



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«Σύνθεση και μελέτη C-γλυκοπυρανοζιτών με πιθανή
φαρμακολογική δράση»**

**Κωνσταντίνος Φιοραβάντες Μαυρέας
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ, 2021

Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

**Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση**

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Σύνθεση και μελέτη C-γλυκοπυρανοζιτών με πιθανή φαρμακολογική δράση

Κωνσταντίνος Φιοραβάντες Μαυρέας

A.M.: 001521

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Αθανάσιος Γκιμήσης, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

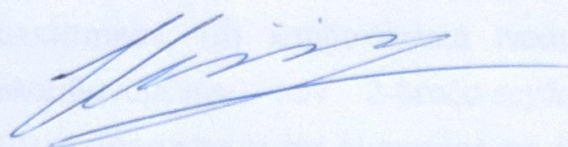
Αθανάσιος Γκιμήσης, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Θωμάς Μαυρομούστακος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

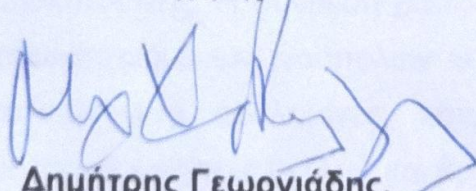
Μιχαήλ Ράλλης, Αν. Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

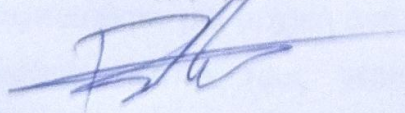
**Αθανάσιος Γκιμήσης,
Καθηγητής ΕΚΠΑ**



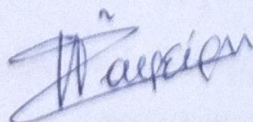
**Μιχαήλ Ράλλης,
Αν. Καθηγητής ΕΚΠΑ**



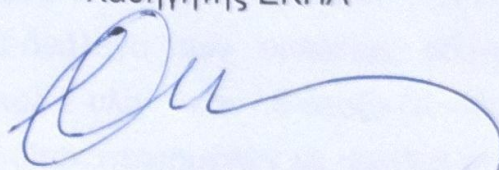
**Δημήτρης Γεωργιάδης,
Καθηγητής ΕΚΠΑ**



**Παναγιώτα Παπαζαφείρη,
Αν. Καθηγήτρια ΕΚΠΑ**



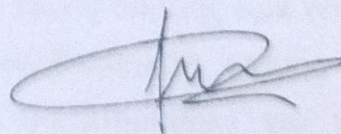
**Θωμάς Μαυρομούστακος,
Καθηγητής ΕΚΠΑ**



**Σταματία Βασιλείου,
Αν. Καθηγήτρια ΕΚΠΑ**



**Αλέξανδρος Κουμπής,
Καθηγητής ΑΠΘ**



ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 10/6/2021

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η σύνθεση νέων, μεταβολικά σταθερών αναστολέων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GP), ενός ενζύμου με κεντρικό ρόλο στην ομοίωση της γλυκόζης, του οποίου η υπερλειτουργία έχει συνδεθεί με παθολογικά σύνδρομα όπως ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 και ο καρκίνος. Για το σκοπό αυτό, αναπτύχθηκαν συνθετικές μεθοδολογίες που έδωσαν πρόσβαση σε δύο νέες οικογένειες πιθανών αναστολέων. Οι νέες ενώσεις είναι ανάλογα ισχυρών αναστολέων, με δομή N^2 -αρυλο-υποκατεστημένων β-D-γλυκοπυρανοζυλοκυτοσινών, που έχουν παρασκευαστεί στο εργαστήριό μας, στα οποία έχει αντικατασταθεί ο ευαίσθητος ακεταλικός γλυκοζιτικός δεσμός. Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν (α) C-β-D-γλυκοπυρανόζυλο-ανάλογα των ενώσεων οδηγών, συμπεριλαμβανομένων των 5-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)- παραγώγων της ουρακίλης, ισοκυτοσίνης και 2-μεθυλοθειοπυριμιδιν-4(3H)-όνης και των N^2 -υποκατεστημένων με ακριδ-9-ον-2-υλο-, ακριδ-9-ον-2-υλο-1-μεθυλο- και 1,3-διυδροβενζο[δ]ιμιδαζολ-2-ον-5-υλο- παραγώγων της 5-β-D-γλυκοπυρανοζυλοϊσοκυτοσίνης. Το συνθετικό πρωτόκολλο συμπεριλάμβανε την οργανομεταλλική σύζευξη κατάλληλα προστατευμένης D-γλυκονο-δ-λακτόνης και παραγωγοποιημένων πυριμιδινών, αναγωγή του ενδιάμεσου μέσω τριαλκυλοσιλανίων παρουσία οξέων Lewis και υποκατάσταση από αρυλαμίνες, κάτω από όξινες συνθήκες, μετά από κατάλληλη τροποποίηση των προστατευτικών ομάδων. Επίσης παρασκευάστηκαν: (β) καρβοκυκλικά ινοσιτολυλο-ανάλογα των ενώσεων οδηγών συμπεριλαμβανομένων των 2-δεοξυ-*scyllo*-ινοσιτολ-2-υλο- και 6-δεοξυ-DL-*chiro*-ινοσιτολυλο- παραγώγων της ουρακίλης και των N^4 -υποκατεστημένων με ακριδ-9-ον-4-υλο-, και 1,3-διυδροβενζο[δ]ιμιδαζολ-2-ον-5-υλο- παραγώγων της 6-δεοξυ-DL-*chiro*-ινοσιτολυλοκυτοσίνης. Η σύνθεση βασίστηκε στη σύζευξη κατάλληλα προστατευμένων και παραγωγοποιημένων ινοσιτολών και πυριμιδίνης, ακολουθούμενη από παρόμοια υποκατάσταση από αρυλαμίνες, κάτω από όξινες συνθήκες. Οι νέες ενώσεις υποβλήθηκαν σε κινητικές μελέτες και βρέθηκαν να αναστέλλουν τη δράση της GP. Βάσει σύγκρισης με τις ενώσεις-οδηγούς και με τη χρήση θεωρητικής διαμορφωτικής μελέτης, πραγματοποιήθηκε μια αρχική ανάλυση της σχέσης δομής-δράσης των νέων ενώσεων. Οι ισχυρότεροι από τους νέους αναστολείς υποβλήθηκαν επίσης σε μελέτες κυτταροτοξικότητας σε καρκινικά κύτταρα, όπου παρατηρήθηκε για πρώτη φορά κυτταροστατική δράση αναστολέων του καταλυτικού κέντρου της GP.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Οργανική και Φαρμακευτική Χημεία

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: C-γλυκοζίτες, καρβασάκχαρα, πυριμιδίνη, αναστολείς φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, κυτταροστατική δράση.

ABSTRACT

The main target of the present doctoral thesis was the synthesis of new, metabolically stable inhibitors of glycogen phosphorylase (GP), a central enzyme in the homeostasis of glucose, dysregulation of which has been implicated in pathological conditions, with type 2 diabetes mellitus and cancer being two prominent examples. For this purpose, synthetic methods were developed that led to two new families of inhibitors.

The new compounds are analogues of potent inhibitors with the structure of *N*²-aryl-substituted β -D-glucopyranosylcytosines, previously synthesized in our group, in which the chemically labile acetal glycosidic linkage has been replaced. More specifically, in the first part, C- β -D-glucopyranosyl analogues of the lead compounds were synthesized, including 5-(β -D-glucopyranosyl)- derivatives of uracil, isocytosine and 2-methylthiopyrimidin 4(3*H*)-one and *N*²-substituted with acrid-9-on-2-yl-, acrid-9-on-2-yl-1-methyl- and 1,3-dihydrobenzo[*d*]imidazole-2-on-5-yl- derivatives of 5- β -D-glucopyranosylisocytosine. The synthetic protocol included an organometallic coupling of appropriately protected D-glucono- δ -lactone and functionalized pyrimidine moieties, followed by reduction of the intermediate by trialkylsilanes in the presence of Lewis acids and consecutive substitution by arylamines, under acidic conditions, after a suitable trans-protection. In the second part, carbacyclic inositolyl-analogues of the lead compounds were synthesized, including 2-deoxy-scyllo-inositol-2-yl- and 6-deoxy-DL-*chiro*-inositol-derivatives of uracil and *N*⁴-substituted with acrid-9-on-2-yl-, and 1,3-dihydrobenzo[*d*]imidazole-2-on-5-yl- derivatives of 6-deoxy- DL-*chiro*-inositolylycytosine.

The synthesis was based on the coupling of suitably protected and functionalized inositols with pyrimidines, followed by a similar with above substitution by arylamines, under acidic conditions. The new compounds were subjected to *in vitro* kinetic assays and were found to act as GP inhibitors. By comparison with the lead compounds and utilization of a theoretical conformation study, an initial structure-activity relationship analysis was performed. The strongest inhibitors of each new class were subjected to a cell viability assay and, for the first time, a cytostatic effect was observed for inhibitors acting at the catalytic site of GP.

SUBJECT AREA: Organic and Medicinal Chemistry

KEYWORDS: C-glycosides, pyrimidine, glycogen phosphorylase inhibitors, cytostatic activity.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ πρώτο από όλους τον επιβλέποντά μου, Καθ. κο Αθανάσιο Γκιμήση, με τον οποίο η συνεργασία μας φέτος κλείνει οχτώ χρόνια. Η καλή του διάθεση, η βαθιά του γνώση κι αγάπη για τη χημεία, τα βράδια που περάσαμε γράφοντας ερευνητικές προτάσεις και τόσα άλλα, με έσπρωξαν να παλεύω να γίνω ο καλύτερος επιστήμονας που μπορώ και μου έδωσαν πολύτιμα μαθήματα και δεξιότητες που θα με συνοδεύουν μια ζωή.

Θα ήθελα να επίσης ευχαριστήσω τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς μου επιτροπής, τον Καθηγητή κο Θωμά Μαυρομούστακο και Αναπλ. Καθηγητή κο Μιχαήλ Ράλλη, για τη βοήθειά τους στην πορεία εκπόνησης της διατριβής. Ευχαριστώ εξαιρετικά επίσης τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής. Τον Καθ. κο Δημήτρη Γεωργιάδη και την Αν. Καθηγήτρια κα Σταματία Βασιλείου, τόσο για τη βοήθεια τους στα τελευταία βήματα της συγγραφής, όσο και για τις πολύτιμες συμβουλές (και φυσικά ηθική υποστήριξη τις ώρες της γκρίνιας) στα χρόνια των πειραμάτων, την Αν. Καθηγήτρια κα Παναγιώτα Παπαζαφείρη από το τμήμα Βιολογίας για τη σημαντικότερη βοήθεια στο τμήμα των βιολογικών πειραμάτων, όπως επίσης και τον Καθηγητή κο Αλέξανδρο Κουμπή από το ΑΠΘ για την προθυμία του να είναι μέλος της επιτροπής. Θεωρώ μεγάλη μου τιμή να έχω τα συγκεκριμένα μέλη ΔΕΠ και μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής.

Ευχαριστώ την Κύρια Ερευνήτρια κα Ευαγγελία Χρυσίνα, τόσο για τα κινητικά και κρυσταλλογραφικά πειράματα, όσο και για τις συμβουλές τις κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής, όσο και τον Διονύση Νεόφυτο, MSc, που πέρα από τη βοήθεια με τα κινητικά πειράματα είχα και τη χαρά να μοιραστούμε τη δημοσίευση της δουλειάς της παρούσας διατριβής.

Ευχαριστώ επίσης την Αθηνά Σαμαρά, MSc του τμήματος βιολογίας που με συνόδεψε στα πρώτα βήματα στον μαγικό κόσμο των πειραμάτων της κυτταρικής βιολογίας, όπως και την υπ. διδάκτορα Μαρία Πάσχου από το τμήμα Βιολογίας που η βοήθειά της ήταν καταλυτική στην επιβεβαίωση των αρχικών υποθέσεων της παρούσας διατριβής.

Από καρδιάς ευχαριστώ τα μέλη του εργαστηρίου, από όλα μου τα χρόνια σε αυτό, ξεκινώντας από τον Δρ. Μιχαήλ Μαμάη που πρώτος με μύησε στην εργαστηριακή καθημερινότητα στα πλαίσια της πτυχιακής μου εργασίας. Από τα χρόνια μου ως

υποψήφιου διδάκτορα, θέλω να ευχαριστήσω για τη βοήθειά τη Βερόνικα Τσουλουγκιάν, επίσης υποψήφια διδάκτορα, τους φοιτητές Ειρήνη Εμμανουήλ και Μιχάλη Μηναντάκη, τους πρώτους προπτυχιακούς φοιτητές που επιτήρησα, ενώ συνέχισαν στο εργαστήριο κι ως μεταπτυχιακοί φοιτητές, όπως και τους προπτυχιακούς φοιτητές Πέτρο Μπαλιμά και Μαντώ Κορόμπα. Ένα μεγάλο ευχαριστώ και στη συνάδελφο υπ. διδάκτορα Κατερίνα Δαλαλάκη, η οποία αισίως παλεύει κι αυτή τον τρίτο κατά σειρά τίτλο σπουδών της στο εργαστήριό μας, πάντα με καλή καρδιά, όπως επίσης και τον Γιώργο Ατσαβέ, τέως μεταπτυχιακό και πλέον νεότερο υπ. διδάκτορα του εργαστηρίου.

Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ και στην κα Εσθήρ Σακκή, τόσο για την τεχνική και υλικοτεχνική υποστήριξη τα δύσκολα χρόνια της υποχρηματοδότησης, αλλά πάνω από όλα για την απεριόριστη υπομονή και ηθική υποστήριξη που μου παρείχε όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος, ένα τεράστιο ευχαριστώ πηγαίνει στους φίλους μου και στα μέλη της οικογένειάς μου, παλιά και νέα, μικρά και μεγάλα για την αμέριστη στήριξη κι αγάπη τους, που με βοηθάνε σε κάθε στιγμή να πάω ένα βήμα παραπέρα.

Σίγουρα κάποιους ξέχασα... αλλά σας ευχαριστώ όλους!

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	9
1. Κεφάλαιο 1: Θεωρητικό μέρος	25
1.1 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου	25
1.2 Παθολογικά σύνδρομα σχετιζόμενα με τη GP	29
1.2.1 GP και Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2.....	29
1.2.2 GP και καρκίνος	34
1.3 Αναστολείς της GP	36
1.4 Σκοπός της εργασίας.....	40
2. Κεφάλαιο 2: C-γλυκοζίτες.....	45
2.1 Εισαγωγή.....	45
2.1.1 Γενικά περί C-γλυκοζιτικών ενώσεων	45
2.1.2 Μέθοδοι C-γλυκοζυλίωσης.....	46
2.1.3 Σχεδιασμός και πρώτες προσπάθειες σύνθεσης C-γλυκοκυρανοζιτικών αναστολέων της GP.....	59
2.2 Αποτελέσματα και σχολιασμός	62
2.2.1 Στόχοι της διατριβής στη σύνθεση C-γλυκοζιτών	62
2.2.2 Το σακχαρικό τμήμα	63
2.2.3 Το πυριμιδινικό τμήμα	67
2.2.4 Διερεύνηση εναλλακτικών συνθετικών πορειών.....	69
2.2.5 Σύζευξη σακχαρικού και πυριμιδινικού τμήματος.....	79
2.2.6 Αναγωγή του ανωμερικού υδροξυλίου	87
2.2.7 Παραγωγοποίηση κι αποπροστασία	94
2.3 Συμπεράσματα Κεφαλαίου 2	107

3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Καρβασακχαρικά ανάλογα.....	109
3.1 Εισαγωγή.....	109
3.2 Χημεία των καρβασακχάρων.....	113
3.2.1 Σχεδιασμός σύνθεσης καρβακυκλικών αναστολέων της GP.....	120
3.3 Αποτελέσματα και σχολιασμός.....	121
3.3.1 Πρώτες προσπάθειες.....	121
3.3.2 Παράγωγα Ινοσιτόλης.....	123
3.3.3 Παράγωγα 2-δεοξυινοσιτόλης.....	136
4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Κινητικές, διαμορφωτικές και βιολογικές μελέτες.....	147
4.1 Κινητικά πειράματα.....	147
4.1.1 C-γλυκοζίτες.....	147
4.1.2 Καρβακυκλικά ανάλογα.....	159
4.2 Βιολογική μελέτη.....	164
4.2.1 Επιλογή κατάλληλων κυτταρικών σειρών	164
4.2.2 Μελέτη κυτταροστατικής δράσης	166
5. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Συμπεράσματα και μελλοντικές κατευθύνσεις.	175
6. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Πειραματικό μέρος.....	181
6.1 Γενικά	181
6.2 Πειραματικές πορείες.....	182
6.2.1 C-Γλυκοζίτες – Συνθέσεις αρχικών αντιδραστηρίων και σύζευξη.....	182
6.2.2 C-Γλυκοζίτες – Ανωμερική αναγωγή και περαιτέρω παραγωγοποίηση ...	191
6.2.3 Καρβασακχαρικά παράγωγα – Παράγωγα Ινοσιτόλης.....	206
6.2.4 Καρβασακχαρικά παράγωγα – Παράγωγα δεοξυ-ινοσιτόλης.....	214
6.3 Κινητικά πειράματα.....	224
6.4 Βιολογικά πειράματα	224
7. Συντμήσεις, αρκτικόλεξα και ακρωνύμια	227

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1: Η φωσφορόλυση του γλυκογόνου.	25
Σχήμα 1.2: Με κόκκινο σημειώνονται οι δομικές διαφοροποιήσεις των προτεινόμενων C- και καρβοκυκλικών παραγώγων των κλασικών αναστολέων.	41
Σχήμα 2.1: Γενική πορεία γλυκοζυλίωσης μέσω καρβοκατιόντος.	48
Σχήμα 2.2: Πρώτο παράδειγμα C-γλυκοζυλίωσης (1945)	48
Σχήμα 2.3: Στάδιο C-γλυκοζυλίωσης στην ολική σύνθεση Νοθοφαγίνης.....	49
Σχήμα 2.4: Παραδείγματα C-γλυκοζυλίωσης μέσω οργανοπυριτικών και οργανοκασσιτερικών παραγώγων.	50
Σχήμα 2.5: Παράδειγμα C-γλυκοζυλίωσης μέσω αναδιάταξης Ferrier.....	50
Σχήμα 2.6: Βιβλιογραφικό παράδειγμα ενδομοριακής C-γλυκοζυλίωσης.	51
Σχήμα 2.7: Παραδείγματα γλυκοζυλίωσης μέσω ριζών.	51
Σχήμα 2.8: Παράδειγμα ριζικής γλυκοζυλίωση με χρήση ιωδιούχου σαμαρίου.	52
Σχήμα 2.9: Παράδειγμα ενδομοριακής αντίδρασης Heck-αποκαρβοξυλίωσης.....	53
Σχήμα 2.10: C-γλυκοζυλίωση με συνδυασμό ανωμερικού φθοριδίου και οργανομεταλλικών πυρηνόφιλων.	53
Σχήμα 2.11: Διάνοιξη εποξειδικού δακτυλίου από οργανομεταλλικά παράγωγα.	54
Σχήμα 2.12: Σύνθεση του φαρμάκου Ipragliflozin μέσω εποξειδίου της γλυκόζης.	54
Σχήμα 2.13. Παραδείγματα προσθήκης αντιδραστηρίων Wittig, αντιδραστήρια τύπου τιτανοκενίου ενολικών ανιόντων και αντιδραστηρίων Grignard σε προστατευμένη D-γλυκονο-δ-λακτόνη.	55
Σχήμα 2.14: Βιομηχανική σύνθεση του αντιικού φαρμάκου Remdesivir.	56
Σχήμα 2.15: Πρώτο παράδειγμα προσθήκης σε D-γλυκονο-δ-λακτόνη, ακολουθούμενο από αναγωγή του ανωμερικού οξυγόνου.	56

Σχήμα 2.16: Στερεοηλεκτρονικός έλεγχος στις αντιδράσεις μεταφοράς υδριδίου σε κυκλικά ιόντα οξωνίου, σύμφωνα με τους Deslongchamps <i>et al.</i>	57
Σχήμα 2.17: Βιομηχανική σύνθεση του Dapagliflozin.	58
Σχήμα 2.18: Γενικό συνθετικό σχήμα C-γλυκοπυρανοζυλο-πυριμιδινών.....	61
Σχήμα 2.20: Συνθέσεις ακυλιωμένων παραγώγων της D-γλυκονο-δ-λακτόνης.....	64
Σχήμα 2.21: Συνθέσεις σιλυλιωμένων παραγώγων της D-γλυκονο-δ-λακτόνης.	65
Σχήμα 2.22: Σύνθεση εποξειδίου από D-γλυκάλη	66
Σχήμα 2.23: Πορείες σύνθεσης της 5-βρωμο-4-tert-βουτοξυ-2-μεθυλοθειοπυριμιδίνης.	68
Σχήμα 2.24: Σύνθεση 5-βρωμο-2,4-διαλκοξυπυριμιδινών.	68
Σχήμα 2.25: Πρώτη προσπάθεια σύνθεσης C- <i>spiro</i> -γλυκοζίτη.....	71
Σχήμα 2.26: Σύνθεση 5-βρωμο-2-μεθυλοθειο-4-καρβοξυπυριμιδίνης	71
Σχήμα 2.27: Παραδείγματα κυκλοποίησης μέσω οξέος.	72
Σχήμα 2.28. Σύνθεση πυριμιδινών προς παρασκευή C- <i>spiro</i> -γλυκοζιτών.....	73
Σχήμα 2.29: Προσπάθειες σύνθεσης οξαζολίνης για την οργανομεταλλική σύζευξη.	74
Σχήμα 2.30: Ρετροσυνθετική πορεία ανοικοδόμησης πυριμιδίνης.....	75
Σχήμα 2.31: Πρώτη προσπάθεια ανοικοδόμησης του δακτυλίου της πυριμιδίνης.	76
Σχήμα 2.32: Σύνθεση του δις-διμεθυλαμινομεθανίου.	77
Σχήμα 2.33: Προσπάθειες α-προσθήκης ενεργοποιημένης μεθυλενομάδας στην ένωση 54.	77
Σχήμα 2.34: Βιβλιογραφικό παράδειγμα σύνθεσης C-γλυκοζίτη της ουρακίλης μέσω κυκλοποίησης.	78
Σχήμα 2.35: Σύνθεση ψευδοουριδίνης χρησιμοποιώντας οργανολιθιακό ενδιάμεσο.....	79
Σχήμα 2.36: Πιθανοί τρόποι διμερισμού πυριμιδινών κατά την τρανσμεταλλίωση.....	80
Σχήμα 2.37: Παράδειγμα εφαρμογής αντίδρασης Grignard σε πυριμιδίνη.	81
Σχήμα 2.38: Απόπειρά σύζευξης με το εποξείδιο της γλυκόζης.	84
Σχήμα 2.39: Σύζευξη με τριμεθυλοσιλυλιωμένη D-γλυκονο-δ-λακτόνη.....	85
Σχήμα 2.40: Προσπάθειες αποπροστασίας του παραγώγου 147.....	86

Σχήμα 2.41: Προσπάθειες άμεσης ακετυλίωσης του παραγώγου 75	86
Σχήμα 2.42: Αντίδραση απόσπασσης κατά την απόπειρα ακετυλίωσης της ένωσης 144b.	92
Σχήμα 2.43: Αναγωγή και παραλαβή του επιθυμητού C-γλυκοζίτη 79.	93
Σχήμα 2.44: Σύνθεση της Ψ-γλυκοπυρανοζυλοουρακίλης 158 (Ψ-GU).	95
Σχήμα 2.45: Σύνθεση της C ⁵ -β-D-γλυκοπυρανοζυλοϊσοκυτοσίνης (Ψ-GisoC)	97
Σχήμα 2.46: Βασικός συνθετικός στόχος είναι η σύνθεση του C-γλυκοπυρανοζυλο- αναλόγου του αναστολέα GLAC.	98
Σχήμα 2.47: Υποκατάσταση της θέσης 2 από αρυλαμίνες	99
Σχήμα 2.48: Προσπάθειες υδρογονόλυσης των βενζυλομάδων στις ενώσεις 163a-d .	100
Σχήμα 2.49: Προτεινόμενος μηχανισμός αντικατάστασης βενζυλαιθέρων από ακετυλομάδες.	101
Σχήμα 2.50: Ανταλλαγή προστατευτικών ομάδων σε ένα βήμα.....	102
Σχήμα 2.51: Υποκατάσταση της θέσης 2 από αρυλαμίνες	103
Σχήμα 2.52: Αποτυχημένη υποκατάσταση από βενζυλαμίνες	104
Σχήμα 2.53: Μεθυλίωση του ενδιαμέσου 168.	105
Σχήμα 2.54: Σύνθεση του N ⁴ -μεθυλιωμένου αναλόγου του Ψ-GLAC.	107
Σχήμα 3.1: Σχηματισμός κατιόντος οξωνίου κατά την όξινη υδρόλυση κλασικού γλυκοζίτη.	109
Σχήμα 3.2: Βιοσύνθεση της <i>myo</i> -ινοσιτόλης από 6-φωσφορική γλυκόζη.	112
Σχήμα 3.3: Πρώτη σύνθεση 2-φωσφορικής ινοσιτόλης.	114
Σχήμα 3.4. Σύνθεση 8 φυσικών καρβασακχάρων ξεκινώντας από <i>myo</i> -ινοσιτόλη.....	114
Σχήμα 3.5: Σύνθεση όλων των πιθανών ισομερών ινοσιτόλης ξεκινώντας από τη <i>myo</i> - ινοσιτόλη.	115
Σχήμα 3.6: Πρώτη αναφορά εφαρμογής καρβοκυκλοποίησης Ferrier σε D-γλυκόζη. .	115
Σχήμα 3.7: Σύνθεση καρβα-α-D-γλυκοπυρανόζης μέσω αναδιάταξης Claisen.	116
Σχήμα 3.8: Πρακτική σύνθεση καρβα-α-D-γλυκοπυρανόζης.	117

Σχήμα 3.9: Βιομηχανική σύνθεση του abacavir.	119
Σχήμα 3.10: Παράδειγμα σύνθεσης καρβοπυρανοζυλο-αδενοσίνης.	120
Σχήμα 3.11: Σύνθεση ινοσιτολυλο-νουκλεοζιδίων.	120
Σχήμα 3.12: Προτεινόμενη ρετροσυνθετική ανάλυση καρβα-γλυκοπυρανοζυλοουρακίλης από βαλιεναμίνη.	122
Σχήμα 3.13: Απόπειρα υδρόλυσης ακαρβόζης.	123
Σχήμα 3.14: Εκλεκτική βενζυλίωση <i>myo</i> -ινοσιτόλης.	125
Σχήμα 3.15: Εκλεκτική βενζυλίωση του ισημερινού υδροξυλίου καταλυόμενη από (n-Bu) ₂ SnO.	125
Σχήμα 3.16: Προσπάθειες υποκατάστασης της μεσυλομάδας από ουρακίλη.	127
Σχήμα 3.17: Σύνθεση (±)1,2-Θειικού (3,4,5,6-τετρα-Ο-βενζυλο)- <i>myo</i> -ινοσιτολυλοεστέρα.	128
Σχήμα 3.18: Αποτυχημένες προσπάθειες υποκατάστασης από ουρακίλη.	130
Σχήμα 3.19: Βιβλιογραφικό παράδειγμα ανοικοδόμησης δακτυλίου ουρακίλης.	130
Σχήμα 3.20: Σύνθεση προστατευμένης 2-αμινο-2-δεοξυ- <i>scyllo</i> -ινοσιτόλης.	131
Σχήμα 3.21: Πορεία σύνθεσης του (3-μεθοξακρυλοϋλο)ισοκυανικού εστέρα (85). ...	132
Σχήμα 3.22: Ανοικοδόμηση δακτυλίου ουρακίλης.	132
Σχήμα 3.23: Σύνθεση της <i>N</i> ¹ -(2-δεοξυ- <i>scyllo</i> -ινοσιτολ-1-υλο)ουρακίλης 258.	132
Σχήμα 3.24: Σύνθεση τριαζολο-παραγώγου της ένωσης 257 με σκοπό την υποκατάσταση.	134
Σχήμα 3.25: Υποκατάσταση από αρυλαμίνες.	134
Σχήμα 3.26: Σύνθεση 1-δεοξυ-3,4,5,6-τετρα-Ο-βενζυλο- <i>myo</i> -ινοσιτόλης.	137
Σχήμα 3.27: Παρασκευή του (-)-(1 <i>S</i> ,4 <i>R</i>) – καμφανοϋλοχλωριδίου 268.	138
Σχήμα 3.28: Παραγωγοποίηση με στόχο τον οπτικό διαχωρισμό.	139
Σχήμα 3.29: Φάσμα ¹ H-NMR (200 MHz σε CDCl ₃) του μίγματος των παραγώγων 266 με λεπτομέρεια της περιοχής των μεθυλομάδων της καμφανοϋλομάδας.	139

Σχήμα 3.30: Σύνθεση προστατευμένης (±)-1-(1,2-διδεοξυ- <i>scyllo</i> -ινοσιτολ-2-υλο)-ουρακίλης	142
Σχήμα 3.31: Τρανς-ακετυλίωση των βενζυλαιθέρων της ένωσης ±269.	143
Σχήμα 3.32: Αποπροστασία του ενδιαμέσου 99.	144
Σχήμα 3.33: Σύνθεση παραγώγου τριαζολίου της ένωσης ±271.	145
Σχήμα 3.34: Υποκατάσταση της ένωσης 101 από αρυλαμίνες ±275 και ±275b.	145
Σχήμα 5.1: Συνοπτικό συνθετικό σχήμα νέων C-γλυκοπυρανοζυλο-αναστολέων της GP.	176
Σχήμα 5.2: Νέοι αναστολείς με δομή C-γλυκοζίτη που παρασκευάστηκαν κατά την εκπόνηση της διατριβής.....	177
Σχήμα 5.3: Συνοπτικό συνθετικό σχήμα νέων καρβοκυκλικών-αναστολέων της GP. ...	178
Σχήμα 6.2: Συνοπτικό συνθετικό σχήμα παραγωγοποίησης C-γλυκοζιτών.....	191
Σχήμα 6.3: Συνοπτικό συνθετικό σχήμα παραγώγων ινοσιτόλης.	206
Σχήμα 6.4: Συνοπτική σύνθεση παραγώγων 2-δεοξυ-ινοσιτόλης.....	214

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1: Ορμονική ρύθμιση της ηπατικής ισομορφής της GP.....	26
Εικόνα 1.2: Κρυσταλλογραφική δομή διμερούς της GP με τα γνωστά κέντρα πρόσδεσης. (1. Καταλυτικό κέντρο, 2. Κ. αναστολής, 3. Αλλοστερικό κ., 4. Νέο αλλοστερικό κ., 5. Κ. αποθήκευσης γλυκογόνου).....	27
Εικόνα 1.3: Οι δύο οδοί του μεταβολισμού γλυκόζης σε ηρεμία (αριστερά) και η παροχέτευση μέσω γλυκογόνου κατά τη σύσπαση του μυός (δεξιά).....	28
Εικόνα 1.4: Αναστολείς α-γλυκοσιδάσης με αντιδιαβητική δράση.....	32
Εικόνα 1.5: Γλιφλοζίνες οι οποίες κυκλοφορούν στην ελληνική αγορά, παράγωγα της φλοριζίνης.....	32
Εικόνα 1.6: Επίδραση αναστολέα GP στην (Α) Ποσότητα συσσωρευμένου γλυκογόνου και (Β) πληθυσμό κυττάρων.	35
Εικόνα 1.7: Μεταβολισμός γλυκόζης και γλυκογόνου στα καρκινικά κύτταρα	36

Εικόνα 1.8: Παραδείγματα αλλοστερικών αναστολέων της GP από τη βιομηχανία.	37
Εικόνα 1.9: Παραδείγματα αναστολέων της GP οι οποίοι δρουν στο καταλυτικό κέντρο.	39
Εικόνα 1.10: Πορεία σύνθεσης και παραδείγματα ισχυρών αναστολέων του καταλυτικού κέντρου της GP του εργαστηρίου μας.....	40
Εικόνα 2.1: Παραδείγματα φυσικών προϊόντων με δομή C-γλυκοζίτη.	45
Εικόνα 2.2: Πρωταρχικός σχεδιασμός για σύνθεση C-γλυκοκυπρανοζυλο-κυτοσινών. ..	59
Εικόνα 2.3: C-γλυκοκυπρανοζυλο-παράγωγα τα οποία έχουν παρασκευαστεί μέχρι στιγμής.	61
Εικόνα 2.4: Απευθείας γλυκοζυλίωση με χρήση εποξειδίου.	66
Εικόνα 2.5: 5-Βρωμο-2-θειο-μεθυλο-4-tert-βουτοξυ-πυριμιδίνη	67
Εικόνα 2.6: Αναστολείς της GP με δομή C- <i>spiro</i> -γλυκοζίτη.	70
Εικόνα 2.7: Πιθανοί <i>spiro</i> -C -γλυκοζίτες ως συνθετικοί στόχοι.....	70
Εικόνα 2.8: Εναλλακτικά παράγωγα της D-γλυκονο-δ-λακτόνης που δοκιμάστηκαν.....	83
Εικόνα 2.9: Λεπτομέρεια τις περιοχής των σακχαρικών και βενζυλικών πρωτονίων από φάσματα ^1H NMR (200 MHz σε Acetone- d_6) του αποτελέσματος της ακετυλίωσης (A) με χρήση DMAP·HCl, Ac ₂ O, Et ₃ N (α/α 7, Πίνακας 3) και (B) με χρήση NaH, Ac ₂ O, THF (α/α 8).	90
Εικόνα 2.10: Φάσμα NOESY (400 MHz σε CDCl ₃) της ένωσης 156 που επιβεβαιώνει τη β-στεreoχημεία του προϊόντος.	94
Εικόνα 2.11: Φάσμα ^1H -NMR (400 MHz, σε DMSO- d_6) της ένωσης 157 με λεπτομέρεια των πρωτονίων H1, H3, και H6.	96
Εικόνα 2.12: Φάσμα ^1H -NMR (400 MHz σε DMSO- d_6) της ένωσης 168 με λεπτομέρεια της περιοχής των σακχαρικών πρωτονίων (5.5 έως 3.5 ppm).....	102
Εικόνα 2.13: Φάσμα ^1H NMR (400 MHz σε μίγμα D ₂ O, DMSO- d_6) του προϊόντος 170a (Ψ-GLAC).	104
Εικόνα 2.14: Πιθανές ταυτομερικές μορφές της ένωσης 170a.....	105
Εικόνα 2.15: Λεπτομέρεια φάσματος HMBC της ένωσης 172.	106

Εικόνα 2.16: Νέα μόρια με δομή C-γλυκοζίτη που παρασκευάστηκαν.	108
Εικόνα 3.1: Παραδείγματα φυσικών καρβα-σακχαρικών παραγώγων.....	110
Εικόνα 3.2: Εμπορικά καρβοκυκλικά παράγωγα με βιολογική δράση.	111
Εικόνα 3.3: Τα 9 ισομερή ινοσιτόλης.	111
Εικόνα 3.4: Παραδείγματα φωσφατιδυλοϊνοσιτολών.	112
Εικόνα 3.5: Η στρεπτομυκίνη.....	113
Εικόνα 3.6: Πειραματικό καρβοκυκλικό ανάλογο του εμπορικού φαρμάκου Dapagliflozin.	118
Εικόνα 3.7: Παραδείγματα συνθετικών νουκλεοζιτών.	119
Εικόνα 3.8: Γενική δομή μορίων-στόχων του παρόντος κεφαλαίου.	121
Εικόνα 3.9: Πιθανά παράγωγα ξεκινώντας από ινοσιτόλη.	123
Εικόνα 3.10: Φάσματα ^1H -NMR (A) και 1D- TOCSY (400 MHz) σε CDCl_3 μίγματος (B, C) endo- κι exo- διαστερεομερών της ένωσης ± 244	129
Εικόνα 3.11: Φάσμα ^1H -NMR (200 MHz σε CDCl_3) του καρβαμιδικού ενδιαμέσου 256.	133
Εικόνα 3.12: Πιθανά καρβοκυκλικά τμήματα για μια νέα οικογένεια δυνάμει αναστολέων της GP.	136
Εικόνα 3.13: Σύγκριση ^{13}C -NMR (50 MHz σε CDCl_3) του προϊόντος ± 264 (A) με τα δύο πιθανά διαστερεομερή (B, C) από βιβλιογραφική αναφορά.....	138
Εικόνα 3.14: Λεπτομέρεια από σειρά φασμάτων ^1H -NMR (400 MHz σε $\text{DMSO}-d_6$) της ένωσης ± 269 με αυξανόμενη θερμοκρασία.	142
Εικόνα 3.15: Λεπτομέρεια του φάσματος HMBC (400 MHz σε $\text{DMSO}-d_6$) του μίγματος των ενώσεων ± 270 και ± 271	144
Εικόνα 3.16: Φάσμα ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) της ένωσης $\pm 275a$	146
Εικόνα 4.1: Σύγκριση σταθερών αναστολής IC_{50} N- και C-β-D-γλυκοκυρανοζυλο αναλόγων ουριδίνης (16 και 158) και κυτοσίνης/ισοκυτοσίνης (276 και 168).	148
Εικόνα 4.2: Σταθερές ιοντισμού της κυτιδίνης και ισοκυτιδίνης.	150

Εικόνα 4.3: Σύγκριση σταθερών αναστολής IC ₅₀ αρυλαμινοϋποκατεστημένων <i>N</i> - (ενώσεις 17a,b) και <i>C</i> - (ενώσεις 170a,b) β-D-γλυκοπυρανοζυλο- παραγώγων.....	151
Εικόνα 4.4: Πιθανά ταυτομερή του αναστολέα Ψ-GLAC.....	152
Εικόνα 4.5: Οι κρίσιμες γωνίες μεταξύ των δακτυλίων των αναστολέων, ψ_1 και ψ_2	152
Εικόνα 4.6: Διαμόρφωση του αναστολέα GLAC στο καταλυτικό κέντρο της GP.....	153
Εικόνα 4.7: Σταθερές διαμορφώσεις αναστολέα GLAC σε υδατικό διάλυμα (DFT)	153
Εικόνα 4.8: Σταθερές διαμορφώσεις του ταυτομερούς B του αναστολέα Ψ-GLAC σε υδατικό διάλυμα (DFT).	154
Εικόνα 4.9: Υπέρθωση των δομών GLAC (κόκκινο) και Ψ-GLAC (κυανό).	156
Εικόνα 4.10: Οι δομικές διαφοροποιήσεις του πυριμιδινικού δακτυλίου.	156
Εικόνα 4.11: «Παραγωγοποίηση» στην επιθυμητή ταυτομερική μορφή A μέσω τοποεκλεκτικής μεθυλίωσης.	157
Εικόνα 4.12: Δύο από τις σταθερές διαμορφώσεις του παραγώγου 174 σε υδατικό διάλυμα (DFT).	158
Εικόνα 4.13: Δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται ανάμεσα στη <i>N</i> ¹ -β-D-γλυκοπυρανοζυλο-ουρακίλη και τα κατάλοιπα αμινοξέων του καταλυτικού κέντρο της RMGP.....	159
Εικόνα 4.14: Σύγκριση ανασταλτικής ισχύος D-γλυκοπυρανοζυλο- (16), <i>scyllo</i> -ινοσιτολυλο-(258) και 2-δεοξυ- <i>chiro</i> -ινοσιτολυλο- (±272) παραγώγων της ουρακίλης επί της GP.	161
Εικόνα 4.15: Διαμορφώσεις των δύο εναντιομερών της 272 οι οποίες αναμένονται στο καταλυτικό κέντρο της RMGPb	162
Εικόνα 4.16: Σύγκριση ανασταλτικής ισχύος <i>N</i> ⁴ -αρυλοϋποκατεστημένων D-γλυκοπυρανόζυλο- ((17a, 17b) και 2-δεοξυ- <i>scyllo</i> -ινοσιτολυλοπαραγώγων (±275a, ±275b) της ουρακίλης επί της GP.	162
Εικόνα 4.17: Δομική σύγκριση παραγώγων που έχουν παρασκευαστεί σε σειρά μειούμενης προσδετικής ικανότητας.	163
Εικόνα 4.18: Παράδειγμα έκφρασης εγκεφαλικής ισομορφής GP σε διάφορες κυτταρικές σειρές (PYGB) όπως παρουσιάζεται στο Human Protein Atlas.	165

Εικόνα 4.19: Έκφραση ηπατικής (PYGL) και εγκεφαλικής (PYGB) GP όπως προκύπτει από κανονικοποίηση δεδομένων του EMBL Expression Atlas, και ποιοτική σύγκριση με τα δεδομένα του Protein Atlas.	166
Εικόνα 4.20: Αποτελέσματα Western Blot για την έκφραση GP στις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν.....	168
Εικόνα 4.21: Εμπορικός αλλοστερικός αναστολέας τη GP.....	169
Εικόνα 4.22: Αποτελέσματα μελέτης βιωσιμότητας δράσης του εμπορικού αναστολέα 276.	171
Εικόνα 4.23: Αποτελέσματα μελέτης βιωσιμότητας δράσης των αναστολέων 170a και 170b.	172

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Σύγκριση σύζευξης πυριμιδινών με βενζυλιωμένη D-γλυκονο-δ-λακτόνη με χρήση <i>n</i> -βουτυλολιθίου (Μέθοδος Α) και TurboGrignard (Μέθοδος Β).....	82
Πίνακας 2: Συνθήκες που δοκιμάστηκαν για την αναγωγή του υποστρώματος 144d....	88
Πίνακας 3: Συνθήκες οι οποίες δοκιμάστηκαν για την ακετυλίωση του ανωμερικού υδροξυλίου.	89
Πίνακας 4: Ανεπιτυχείς συνθήκες αντίδρασης Mitsunobu η οποίες δοκιμάστηκαν	126
Πίνακας 5: Συνθήκες αντίδρασης Mitsunobu οι οποίες δοκιμάστηκαν.	141
Πίνακας 6: Συνοπτικά αποτελέσματα προσδιορισμού IC ₅₀ κυτταροστατικής δράσης των ενώσεων 170a και 170b και του εμπορικού αναστολέα CP-316819.....	169
Πίνακας 7: Μέτρηση γλυκογόνου (mg γλυκόζης/10 ⁶ κύτταρα).....	173

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

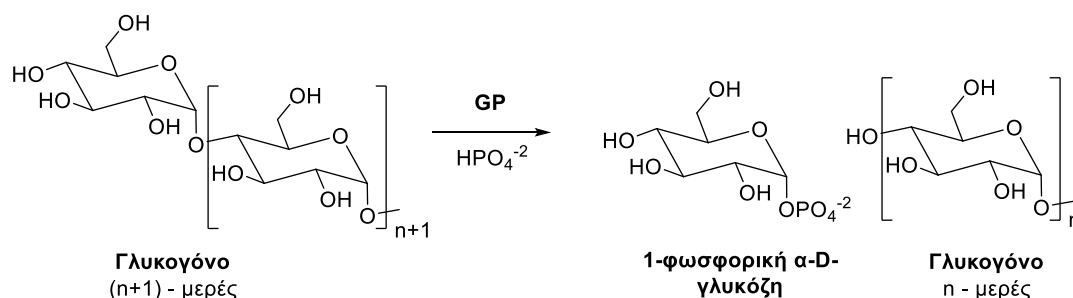
Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά την περίοδο Μαΐου 2016-Απριλίου 2021 υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κου Αθανάσιου Γκιμήση, σε συνεργασία με το εργαστήριο της Αν. Καθηγήτριας κας Παναγιώτας Παπαζαφείρη του Τομέα Φυσιολογίας Ανθρώπου και Ζώων του τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ και το εργαστήριο της κας Ευαγγελίας Χρυσίνα, Κύριας Ερευνήτριας του Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

Κεφάλαιο 1: Θεωρητικό μέρος

1.1 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου

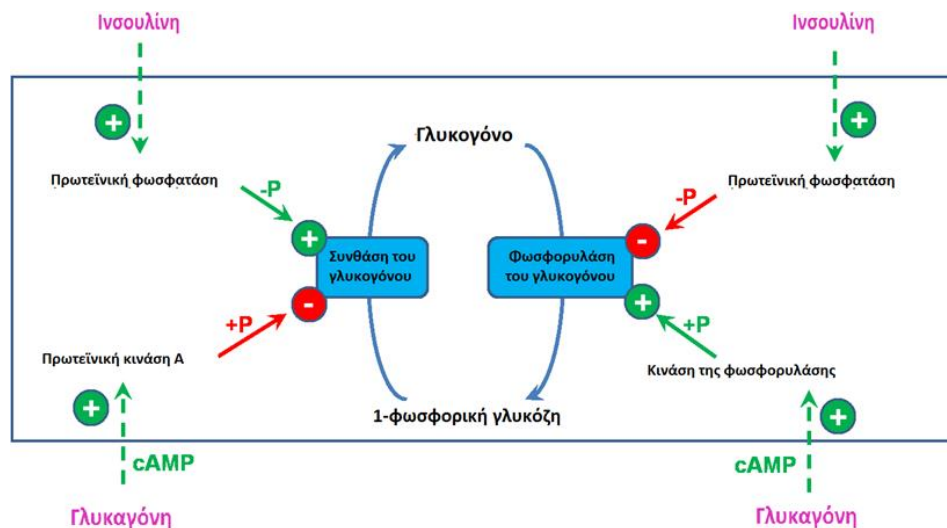
Το ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου (glycogen phosphorylase, GP) αποτελεί τον βασικό μοριακό στόχο της παρούσας εργασίας. Η GP παίζει καθοριστικό ρόλο στην ομοιόσταση της γλυκόζης στους έμβιους οργανισμούς και κατ' επέκταση στην τροφοδότησή τους με ενέργεια.¹

Κύριος ρόλος της GP αποτελεί ο καταβολισμός του γλυκογόνου, αποθηκευτικής μορφής ενέργειας αποτελούμενη από πολυμερή γλυκόζης, μέσω φωσφορόλυσης προς 1-φωσφορική γλυκόζη (**Σχήμα 1.1**). Η 1-φωσφορική-α-D- γλυκόζη στη συνέχεια ισομερειώνεται προς 6-φωσφορική γλυκόζη από το ένζυμο φωσφογλυκομουτάση, κι είναι πλέον διαθέσιμη ως πηγή ενέργειας.



Σχήμα 1.1: Η φωσφορόλυση του γλυκογόνου.

Η δράση της GP ρυθμίζεται στους οργανισμούς τόσο αλλοστερικά, όσο και μέσω φωσφορυλίωσης στο κατάλοιπο του αμινοξέος σερίνης 14. Μπορεί να υπάρξει τόσο στην ενεργή, φωσφορυλιωμένη μορφή (GP_a), όσο και στη λιγότερο δραστική μη φωσφορυλιωμένη (GP_b), ενώ οι δύο μορφές αλληλομετατρέπονται από τα ένζυμα κινάση και φωσφατάση της GP. Η φωσφορυλίωση ρυθμίζεται από ορμόνες όπως είναι η επινεφρίνη, ενώ είναι επίσης ευαίσθητη στην αναλογία γλυκαγόνης / ινσουλίνης που αποτελεί δείκτη ένδειας / επάρκειας γλυκόζης στους ιστούς (**Εικόνα 1.1**).



Εικόνα 1.1: Ορμονική ρύθμιση της ηπατικής ισομορφής της GP.

Η GP συνηθέστερα συναντάται ως διμερές δύο πανομοιότυπων υπομονάδων (**Εικόνα 1.2**). Καθεμία από τις δύο μορφές μπορεί επίσης να υπάρξει στην καταλυτικά ενεργή, χαλαρή (relaxed, R) και την τεταμένη, ανενεργή μορφή (tense, T). Η δεύτερη αλλαγή επιτυγχάνεται μέσω μικρών μορίων τα οποία δρουν ως σηματοδότες, όπως είναι η γλυκόζη, η 6-φωσφορική-γλυκόζη, παράγωγα αδενίνης (ATP, AMP), καφεΐνη και άλλες πουρίνες. Η πρόσδεση πραγματοποιείται τόσο στο καταλυτικό κέντρο, όσο και σε ένα από δύο εξειδικευμένα κέντρα αλλοστερικής ρύθμισης (**Εικόνα 1.2**).²

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου συναντάται σε τρεις ισομορφές: την ηπατική (PYGL), μυϊκή (PYGM) και εγκεφαλική ή εμβρυική (PYGB), οι οποίες χαρακτηρίζονται από υψηλή ομολογία τόσο μεταξύ τους, όσο και ανάμεσα σε διαφορετικούς οργανισμούς και διαφοροποιούνται κυρίως ως προς τη ρύθμιση της λειτουργίας τους.

Η ηπατική ισομορφή της GP, εξασφαλίζει τη διατήρηση μιας σταθερής πηγής ενέργειας στον οργανισμό σε καταστάσεις γενικευμένα χαμηλών επιπέδων γλυκόζης στο αίμα (υπογλυκαιμίας). Η 1-φωσφορική γλυκόζη που απελευθερώνεται από τη δράση της PYGL, ισομερειώνεται προς 6-φωσφορική γλυκόζη, η οποία στη συνέχεια υδρολύεται από την 6-φωσφατάση γλυκόζης προς ελεύθερη γλυκόζη. Η ελεύθερη γλυκόζη μπορεί πλέον να μεταφερθεί έξω από τα ηπατικά κύτταρα στην κυκλοφορία του αίματος, όπου είναι διαθέσιμη στο σύνολο του οργανισμού.



Εικόνα 1.2: Κρυσταλλογραφική δομή διμερούς της GP με τα γνωστά κέντρα πρόσδεσης. (1. Καταλυτικό κέντρο, 2. Κ. αναστολής, 3. Αλλοστερικό κ., 4. Νέο αλλοστερικό κ., 5. Κ. αποθήκευσης γλυκογόνου).³

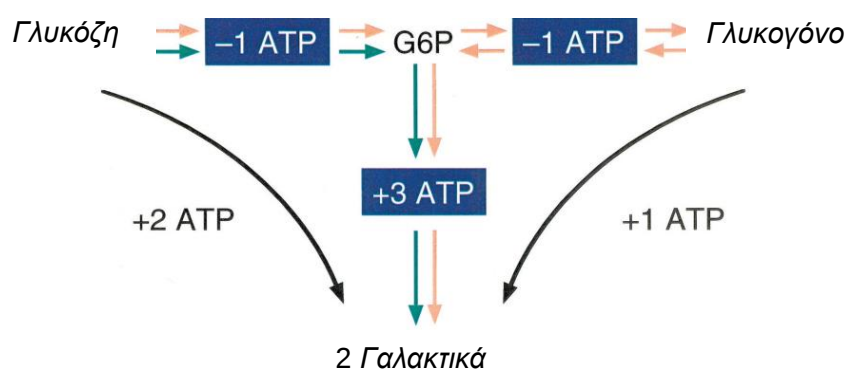
Η PYGL συναντάται συνήθως στην καταλυτικά ενεργότερη μορφή α, ενώ παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης μετατρέπεται στην ανενεργή, τεταμένη μορφή Τ. Μείωση των επιπέδων γλυκόζης οδηγούν στη γρήγορη μετατροπή της στην καταλυτικά ενεργή, χαλαρή μορφή R, ώστε να αποκατασταθεί μέσω του καταβολισμού του γλυκογόνου το έλλειμα γλυκόζης.

Οι άλλες δύο ισομορφές παρέχουν ενέργεια με περισσότερο στοχευμένο τρόπο, καθώς συναντώνται σε ιστούς όπου απουσιάζουν σημαντικές ποσότητες 6-φωσφατάσης της γλυκόζης. Ως αποτέλεσμα, η 6-φωσφορική γλυκόζη είναι διαθέσιμη αποκλειστικά στο εσωτερικό του κυττάρου όπου παράχθηκε, για να καλύψει ίδιες ενεργειακές ανάγκες.

Η μυϊκή φωσφορυλάση συναντάται συνήθως στη λιγότερο ενεργή καταλυτική μορφή β, η οποία με τη σειρά της προτιμά την ανενεργή μορφή Τ. Η παρουσία μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMP), σηματοδοτώντας ενεργειακό έλλειμμα,

οδηγεί στη σταθεροποίηση της PYGM στην περισσότερη ενεργή μορφή b-R (με δραστικότητα περίπου 80% της μορφής a-R), ενώ η παρουσία σηματοδοτικών μορίων όπως είναι η επινεφρίνη οδηγεί στη μετατροπή της στην πλήρως ενεργή μορφή a-R.

Είναι αξιοσημείωτο ότι αντίθετα από ότι συμβαίνει στο ήπαρ, οι ποσότητες γλυκογόνου οι οποίες βρίσκονται αποθηκευμένες στους μυς δεν μειώνονται ακόμη και σε διαστήματα παρατεταμένης υπογλυκαιμίας. Ο καταβολισμός των μυϊκών αποθεμάτων γλυκογόνου συμβαίνει με τη βοήθεια της μυϊκής ισομορφής της GP, η οποία ενεργοποιείται ταχύτατα κατά τη μυϊκή σύσπαση (**Εικόνα 1.3**). Ο ενδοκυττάριος μεταβολισμός γλυκογόνου είναι τάξεις μεγέθους ταχύτερος από την αξιοποίηση της γλυκόζης που βρίσκεται στο αίμα, κι είναι απαραίτητος για να υποστηρίξει την εξίσου ταχύτατη μυϊκή σύσπαση (10-40 msec).⁴ Η μεγάλη σημασία της αφθονίας γλυκογόνου για τη σωστή λειτουργία του μυ έχει ως αποτέλεσμα τη διαρκή αναπλήρωση του ενδοκυτταρικού γλυκογόνου,



Εικόνα 1.3: Οι δύο οδοί του μεταβολισμού γλυκόζης σε ηρεμία (αριστερά) και η παροχέτευση μέσω γλυκογόνου κατά τη σύσπαση του μυός (δεξιά).⁴

ώστε να είναι διαθέσιμο ως πηγή ενέργειας κατά την επόμενη μυϊκή σύσπαση. Ο μηχανισμός αυτός, η φαινομενικά παράδοξη δηλαδή μεσολάβηση του βήματος της ενεργοβόρας σύνθεσης γλυκογόνου αντί για την άμεση χρήση της εξωκυττάριας γλυκόζης προς όφελος της ταχύτερης ανταπόκρισης στις ενεργειακές ανάγκες των ιστών, έχει χαρακτηριστεί ως "παροχέτευση γλυκογόνου" (glycogen shunt).⁴

Η εγκεφαλική GP αποτελεί την κύρια ισομορφή φωσφορυλάσης στα έμβρυα, ενώ στους ενήλικους οργανισμούς συναντάται κυρίως στα αστροκύτταρα του εγκεφάλου. Θεωρούνταν ότι αποτελεί εξελικτικό κατάλοιπο, ωστόσο πρόσφατα ανακαλύφθηκε ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην τροφοδοσία των νεύρων με ενέργεια, υποστηρίζοντας έναν αριθμό κρίσιμων λειτουργιών όπως είναι η μνήμη και η μάθηση.^{5,6} Όπως και στους μυς, ο ρόλος της είναι η στοχευμένη και ταχύτατη ανταπόκριση στην ανάγκη ενέργειας σε περιπτώσεις ξαφνικής αύξησης των ενεργειακών απαιτήσεων σε μικροδομές, όπως είναι για παράδειγμα η απομάκρυνση γλουταμινικού από τη σύναψη μετά την ολοκλήρωση της μετάδοσης του νευρικού ερεθίσματος.⁷

1.2 Παθολογικά σύνδρομα σχετιζόμενα με τη GP

Ο κρίσιμος ρόλος της GP στην ομοιοστάση της γλυκόζης, οδηγεί σε έναν αριθμό προβλημάτων υγείας όταν η λειτουργία της GP διαταράσσεται. Η GP εμπλέκεται, είτε λόγω ανεπαρκούς δραστηριότητας, είτε λόγω ελλαττωματικής ρύθμισής της, σε 3 από τα συνολικά 15 γενετικά σύνδρομα τα οποία σχετίζονται με διαταραχές του μεταβολισμού του γλυκογόνου.⁸ Η συμπτωματολογία συνήθως είναι ήπια. Έτσι, στη νόσο Mc Ardle⁹ εμφανίζεται ήπια μυασθένεια, οφειλόμενη σε απουσία της μυϊκής ισομορφής της GP, ενώ στην περίπτωση της νόσου του Her¹⁰ εμφανίζεται μια γενικευμένη ελαφριά υπογλυκαιμία η οποία σχετίζεται με την ανεπαρκή λειτουργία της ηπατικής ισομορφής της GP.

Δυσλειτουργία του μεταβολισμού του γλυκογόνου στο νευρικό σύστημα έχει συσχετιστεί με προβλήματα μάθησης και απομνημόνευσης, κάποιες μορφές επιληψίας ενώ συναντάται και στη νόσο Alzheimer,⁵ αλλά θεωρείται συνοδό σύμπτωμα παρά αιτία της παθολογίας.

1.2.1 GP και Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (**ΣΔΤ2**, μη ινσουλινοεξαρτώμενος)^{11,12} αποτελεί μία από τις σύγχρονες μαστιγες ιδιαίτερα στις δυτικές κοινωνίες. Οφείλει το όνομά του στην εικονική ομοιότητά του με τον κλασικό διαβήτη τύπου 1 (ινσουλινοεξαρτώμενος), ο οποίος επίσης εμφανίζει υπεργλυκαιμία ως βασικό σύμπτωμα. Πρόκειται για ένα γενικευμένο σύνδρομο διαταραχής της

γλυκόζης, με χρόνια υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, τα οποία μπορούν να επηρεάσουν έναν αριθμό συστημάτων, προξενώντας π.χ. νεφρικές και νευρικές βλάβες και μπορούν να οδηγήσουν σε μια σωρεία παθολογιών όπως τύφλωση, αυξημένη πιθανότητα θανάτου από εγκεφαλικό επεισόδιο, σχετιζόμενες διαταραχές του κυκλοφορικού, δύσκολη επούλωση πληγών και γενικά σημαντικά επιβαρυμένη ποιότητα ζωής. Ο σακχαρώδης διαβήτης, χωρίς κατάλληλη θεραπεία συμβάλλει σημαντικά στον πρώιμο θάνατο του πάσχοντα.

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, αντίθετα από τον τύπου 1 ο οποίος στη συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων έχει γενετική ή αυτοάνοση βάση, φαίνεται να οφείλεται σε έναν συνδυασμό γενετικής προδιάθεσης με κακές διατροφικές συνήθειες και παράλληλη έλλειψη φυσικής άσκησης, που τείνουν να γίνουν ο κανόνας στις δυτικές κοινωνίες. Αποτελεί το 95% των περιπτώσεων διαβήτη παγκοσμίως. Ενώ ο διαβήτης τύπου 2 παραδοσιακά θεωρούνταν μία πάθηση η οποία αφορούσε κυρίως άτομα μεγαλύτερης ηλικίας, ο μέσος όρος ηλικίας των πασχόντων μειώνεται διαρκώς. Πέρα από την ολοένα και μεγαλύτερη εξάπλωσή του, ιδιαίτερα ανησυχητικό είναι το γεγονός ότι τις τελευταίες δεκαετίες ο διαβήτης τύπου 2 συναντάται όλο και συχνότερα σε παιδιά κι εφήβους.

Η βασική αιτία της παθολογίας του διαβήτη τύπου 1 βρίσκεται στην έλλειψη ενδογενούς παραγωγής ινσουλίνης, η οποία είναι υπεύθυνη για τον καταβολισμό της γλυκόζης που προσλαμβάνεται με την τροφή. Οφείλεται στη απουσία των β-κυττάρων από τα νησίδια του Langerhans στο πάγκρεας, τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της. Η αντιμετώπιση πραγματοποιείται με προσεκτικό έλεγχο των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα και την εξωγενή χορήγηση της ορμόνης στις απαιτούμενες ποσότητες.

Στον ΣΔΤ 2, η εικόνα είναι περισσότερο πολύπλοκη. Η παρουσία υπεργλυκαιμίας οφείλεται περισσότερο σε μία συνολική διαταραχή του μεταβολισμού, με κύριο χαρακτηριστικό την αντίσταση του οργανισμού στη δράση της ενδογενούς ινσουλίνης, με τις παραγόμενες ποσότητες να βρίσκονται συχνά σε ίδια επίπεδα (ή και υψηλότερα) με αυτά υγιών ανθρώπων.

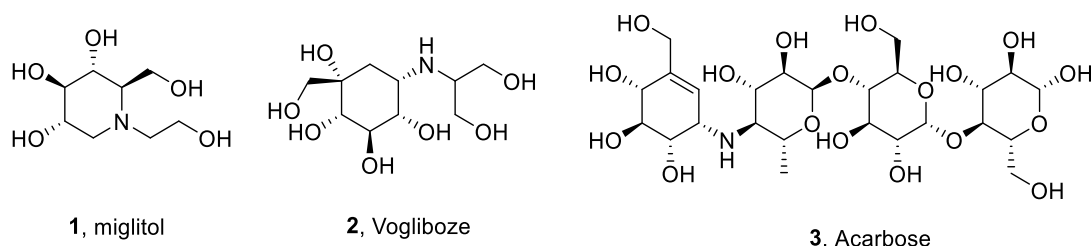
Η διαταραγμένη δράση της ινσουλίνης έχει ως αποτέλεσμα τόσο την ανεπαρκή αξιοποίηση της γλυκόζης που προσλαμβάνεται από τα τρόφιμα, όσο και την αυξημένη παραγωγή γλυκόζης από το ήπαρ, μέσω ανεξέλεγκτου καταβολισμού του γλυκογόνου ή ακατάλληλης ενεργοποίησης του βιολογικού μονοπατιού της γλυκονεογέννεσης.¹³

Η φαρμακευτική αντιμετώπιση του ΣΔΤ 2 πραγματοποιείται κυρίως με φάρμακα που δρουν υποστηρικτικά στο μεταβολισμό της γλυκόζης. Η χορήγηση ινσουλίνης στο διαβήτη τύπου 2, ως μέτρο κατά της υπεργλυκαιμίας, είναι συνήθως το τελευταίο βήμα όταν οι άλλες θεραπευτικές προσεγγίσεις έχουν αποδειχθεί ανεπαρκείς, καθώς τα υψηλά επίπεδα ινσουλίνης τα οποία απαιτούνται οδηγούν σε έναν αριθμό παρενεργειών, όπως είναι η ακόμη μεγαλύτερη αύξηση του σωματικού βάρους και σε επιπλοκές όπως είναι τα επεισόδια σοβαρής υπογλυκαιμίας και το υπερωσμωτικό κώμα.¹⁴ Επίσης, υπάρχουν υπόνοιες ότι καθώς η εξωγενής ινσουλίνη προστίθεται στα ήδη υπάρχοντα επίπεδα, η κατάσταση χρόνιας υπερινσουλιναιμίας η οποία δημιουργείται ενδέχεται να υποβοηθά την ανάπτυξη ορισμένων τύπων καρκίνων, οφειλόμενη κυρίως στο δευτερεύοντα ρόλο της ινσουλίνης ως αυξητικού παράγοντα.¹⁵

Οι πλέον διαδεδομένες θεραπείες βασίζονται σε φάρμακα τα οποία επαν-ευαισθητοποιούν τους ιστούς στη δράση της ινσουλίνης (μετφορμίνη, θειαζολιδινόνες) ή τα οποία ενισχύουν την έκκριση ινσουλίνης από το πάγκρεας (σουλφονουλουρίες, μεγλιτινίδες, ανάλογα GLP-1, γλιπτίνες).¹⁶

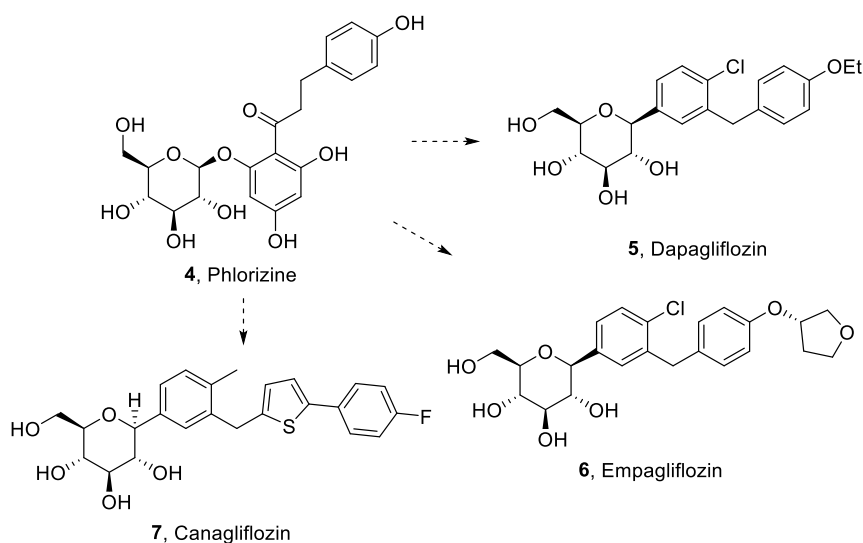
Ιδιαίτερα ενδιαφέροντα για την παρούσα εργασία, καθότι είναι συγγενικά με τους σκοπούς μας, είναι μεταβολικά σταθερά παράγωγα σακχάρων με θεραπευτική δράση. Καθώς στην παθογένεση του ΣΔΤ2 υπεισέρχεται ένας μεγάλος αριθμός μοριακών στόχων οι οποίοι φυσιολογικά προσδένουν παράγωγα της γλυκόζης, γλυκοζίτες και τα ανάλογά τους έχουν βρει εφαρμογή και διερευνώνται διαρκώς για την ανακάλυψη αποτελεσματικότερων θεραπειών.¹⁷ Τέτοια παραδείγματα αποτελούν τροποποιημένοι μονο- και oligo-σακχαρίτες οι οποίοι δρουν αναστέλλοντας τη δράση της α-γλυκοσιδάσης στο λεπτό έντερο, καθυστερώντας τον μεταβολισμό των υδατανθράκων. Θεωρείται ότι δρουν ως ανάλογα της μεταβατικής κατάστασης στο καταλυτικό

κέντρο του ενζύμου.^{18,19} Τέτοια μόρια είναι για παράδειγμα το ιμινοσάκχαρο μιγλιτόλη (miglitol, **1**, **Εικόνα 1.4**) και τα καρβοκυκλικά ανάλογα γλυκοζιτών βογλιμπόζη (voglibose, **2**) και ακαρβόζη (acarbose, **3**).



Εικόνα 1.4: Αναστολείς α-γλυκοσιδάσης με αντιδιαβητική δράση.^{18,19}

Οι γλιφλοζίνες (**Εικόνα 1.5**), μόρια με δομή C-γλυκοζίτη, αποτελούν μια από τις πιο πρόσφατες κατηγορίες χρησιμοποιούμενων φαρμάκων κατά του διαβήτη τύπου 2. Λειτουργούν αναστέλλοντας τη δράση των κυτταρικών συμμεταφορέων γλυκόζης-νατρίου SGLT-2 (sodium-glucose co-transporter Type 2) και οδηγώντας στην απέκκριση της πλεονάζουσας γλυκόζης μέσω των ούρων.^{20,21}



Εικόνα 1.5: Γλιφλοζίνες οι οποίες κυκλοφορούν στην ελληνική αγορά, παράγωγα της φλοριζίνης.²²

Ο σχεδιασμός τους έχει βασιστεί στον φυσικό αναστολέα του SGLT φλοριζίνη (phlorizine, **4**, **Εικόνα 1.5**) η οποία έχει απομονωθεί από τους ιστούς της κοινής μηλιάς.²² Η δομή C-γλυκοζίτη προσφέρει δραματικά αυξημένη σταθερότητα σε σχέση με τους κλασικούς γλυκοζίτες, βελτιώνοντας τις φαρμακοκινητικές

ιδιότητες των μορίων. Η οικογένεια των γλιφλοζινών επεκτείνεται διαρκώς, ενώ στην ελληνική αγορά την τελευταία δεκαετία έχουν ήδη εγκριθεί για ανθρώπινη χρήση τρεις εκπρόσωποι αυτής της κατηγορίας.

Η GP ως μοριακός στόχος στη θεραπεία του ΣΔΤ2

Ο τομέας έρευνας σε νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις κατά του ΣΔΤ2 συνεχίζει να είναι ιδιαίτερα ενεργός μέχρι σήμερα.²³ Αναζητούνται τόσο φάρμακα με λιγότερες παρενέργειες (οι πιο διαδεδομένες θεραπείες τείνουν να εμφανίζουν παρενέργειες στο γαστρεντερικό σύστημα, παράλληλα με απρόβλεπτα επεισόδια υπογλυκαιμίας), όσο και θεραπείες με καλύτερη αποτελεσματικότητα. Σημαντική είναι επίσης η ανακάλυψη φαρμάκων με νέους μηχανισμούς δράσης, καθώς έτσι καθίσταται δυνατός ο συνδυασμός διαφορετικών προσεγγίσεων στην προσπάθεια του καλύτερου ελέγχου των συμπτωμάτων του διαβήτη τύπου 2.

Όπως αναφέρεται παραπάνω, η σημαντική μεταβολική δυσλειτουργία της υπεργλυκαιμίας, η οποία συναντάται στους νοσούντες από ΣΔΤ2, οφείλεται μεταξύ άλλων στην υπερβολική, για τις ανάγκες του οργανισμού, απελευθέρωση γλυκόζης από το ήπαρ μέσω καταβολισμού του γλυκογόνου. Ο μεταβολισμός του γλυκογόνου παρουσιάζει πολυάριθμους στόχους πιθανών θεραπευτικών παρεμβάσεων, οι οποίοι αναφέρονται λεπτομερειακά σε πρόσφατο άρθρο ανασκόπησης.¹³ Από τους πιθανούς μηχανισμούς, η αναστολή της δράσης της GP, ως ένζυμο-κλειδί σε αυτή τη μεταβολική πορεία, έχει αποτελέσει προσφιλή ερευνητικό στόχο τις τελευταίες δεκαετίες.^{17,24,25} Ένα βασικό πλεονέκτημα των αναστολέων της GP στη θεραπεία του διαβήτη αποτελεί το γεγονός ότι η *in vivo* χορήγηση αναστολέων έχει δείξει αντιυπεργλυκαιμική δράση, χωρίς τον κίνδυνο συνοδού υπογλυκαιμίας, διαδεδομένη παρενέργεια πολλών θεραπειών που χρησιμοποιούνται σήμερα.¹¹ Επιπλέον, προκαταρκτικές έρευνες έδειξαν ότι η χορήγηση αναστολέων της GP οδηγεί σε βελτίωση της λειτουργίας των β-κυττάρων του παγκρέατος, το οποίο είναι ιδιαίτερα επιβαρυνμένο στους νοσούντες από διαβήτη.²⁶ Πράγματι, η πιθανή αυτή θεραπευτική προσέγγιση έχει οδηγήσει σε έντονη έρευνα σε σχέση με μόρια τα οποία αναστέλλουν τη GP, που συζητούνται περισσότερο στην Ενότητα 1.3.

1.2.2 GP και καρκίνος

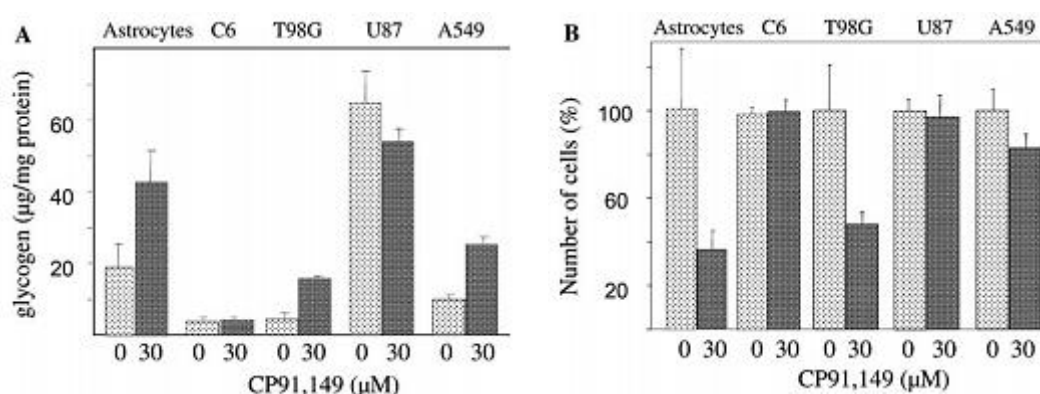
Η διαφοροποίηση ενός ιστού από υγιή σε καρκινικό, έχει βρεθεί ότι συνοδεύεται από σημαντικές αλλαγές στο μεταβολισμό της γλυκόζης. Τα καρκινικά κύτταρα φαίνεται να υπόκεινται σε έναν «μεταβολικό επαναπρογραμματισμό», με την πιο εμφανή διαφοροποίηση να αφορά στο φαινόμενο Warburg,²⁷ κατά το οποίο η διαθέσιμη γλυκόζη μεταβολίζεται ανοξικά μέσω της βιοχημικής οδού της γλυκόλυσης, ακόμη και σε περιβάλλον πλούσιο σε οξυγόνο, αντί να μεταβολιστεί πλήρως και πιο αποδοτικά μέσω του μονοπατιού της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης όπως συμβαίνει στους υγιείς ιστούς.

Ξεκινώντας από το 1979, η ερευνητική ομάδα του Καθ. A. Zweibaum²⁸⁻³⁰ σε μια σειρά εργασιών έδειξε ότι σε έναν μεγάλο αριθμό καρκινικών κυτταρικών σειρών λαμβάνει χώρα έντονος μεταβολισμός γλυκογόνου, ακόμη και αν οι σειρές προέρχονται από ιστούς οι οποίοι στην υγιή κατάσταση δεν μεταβολίζουν γλυκογόνο. Τα αποτελέσματα βασίστηκαν και σε προηγούμενη εργασία η οποία κατέδειξε την παρουσία γλυκογόνου σε υπό επούλωση δερματικές πληγές, καθώς η επούλωση κι ο ταχύς κυτταρικός πολλαπλασιασμός που επιφέρει ενάγει μεταβολικές αλλαγές στα κύτταρα (στο υγιές δέρμα δεν ανιχνεύονται σημαντικές ποσότητες γλυκογόνου).³¹ Κατέληξαν έτσι στη θεωρία ότι η αξιοποίηση του γλυκογόνου είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τον ταχύτατο κυτταρικό πολλαπλασιασμό που παρατηρείται στους καρκινικούς ιστούς.

Μελέτες οι οποίες πραγματοποιήθηκαν τα επόμενα χρόνια οδήγησαν στην ανακάλυψη ότι διάφοροι καρκινικοί ιστοί συχνά ξεκινούν να εκφράζουν την εγκεφαλική ισομορφή της GP. Η γενικότητα αυτού του φαινομένου φάνηκε τόσο σημαντική ώστε το 1999 η έναρξη έκφρασης εγκεφαλικής GP προτάθηκε ως ένας πιθανός, ευαίσθητος βιοδείκτης για την εμφάνιση κακοήθειας στον ανθρώπινο γαστρικό ιστό,³² ενώ πρόσφατα παρατηρήθηκε παρόμοια συσχέτιση και για τον καρκίνο των ωοθηκών.³³

Λίγα χρόνια αργότερα,³⁴ δημοσιεύτηκαν αποτελέσματα που υποστήριξαν ότι η χορήγηση του αλλοστερικού αναστολέα της GP CP-91149 (**8a**, **Εικόνα 1.8**) σε καρκινικές κυτταρικές σειρές με έντονο μεταβολισμό γλυκογόνου, οδηγεί σε

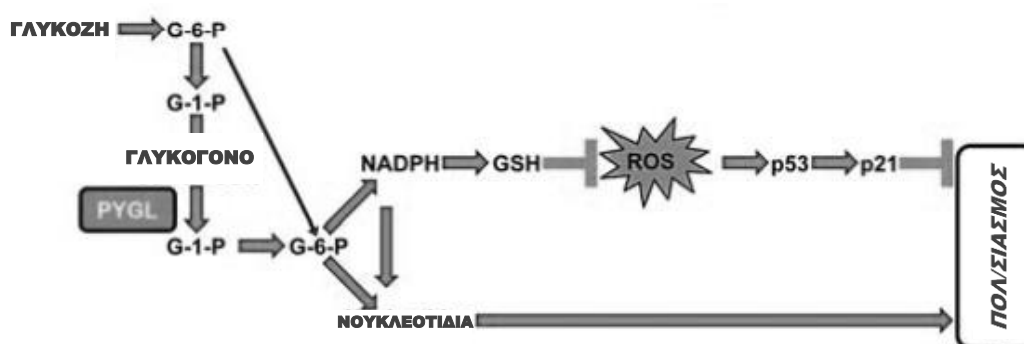
συσσώρευση γλυκογόνου στα καρκινικά κύτταρα (**A, Εικόνα 1.6**) με παράλληλη επιβράδυνση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (**B, Εικόνα 1.6**). Αξιοσημείωτο είναι ότι η αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων ήταν άμεσα ανάλογη με την ποσότητα εκφραζόμενης GP της κάθε κυτταρικής σειράς, επιδεικνύοντας την εκλεκτικότητα της κυτταροστατικής δράσης. Τα νευρικά κύτταρα C6 και U87 τα οποία δεν εκφράζουν παρά ελάχιστη GP έμειναν πρακτικά ανεπηρέαστα, ενώ νευρικά αστροκύτταρα, κύτταρα γλοιοβλαστώματος T98G και καρκίνου του πνεύμονα, A-549, έδειξαν μείωση του πολλαπλασιασμού τους ανάλογη της ποσότητας εκφραζόμενης GP. Σε άλλη ανεξάρτητη εργασία,³⁵ αποδείχθηκε ότι παρατεταμένη επίδραση με τον παρόμοιο δομικά αναστολέα της GP CP-320626 (**8b, Εικόνα 1.8**) σε κύτταρα ηπατικού καρκινώματος, οδήγησε σε αρκετά σημαντικές μεταβολικές αλλαγές ώστε τα κύτταρα τελικά να οδηγηθούν σε απόπτωση.



Εικόνα 1.6: Επίδραση αναστολέα GP στην (**A**) Ποσότητα συσσωρευμένου γλυκογόνου και (**B**) πληθυσμό κυττάρων.³⁴

Ξεκινώντας από το 2012, η ομάδα του Καθ. A.L. Harris από το πανεπιστήμιο της Οξφόρδης,^{36,37} διερεύνησε το φαινόμενο σε μεγαλύτερο ακόμη βάθος. Παρατηρήθηκε ότι, πέρα από την παρουσία μυϊκής και εγκεφαλικής GP, τα καρκινικά κύτταρα σε συνθήκες στρες (συνθήκες υποξίας, θεραπεία με αναστολείς αγγειογένεσης) ανταπεξέρχονται ενάγοντας επιπλέον την έκφραση ηπατικής GP.³² Έδειξαν ότι στα καρκινικά κύτταρα, ακόμη και σε αφθονία εξωκυττάριας γλυκόζης, η διάσπαση του γλυκογόνου αποτελεί βασική πηγή ενέργειας και δομικών συστατικών για τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, μέσω της πορείας των φωσφορικών πεντοζών (**Εικόνα 1.7**).

Παράλληλα, κι άλλες ομάδες,³⁸ διατύπωσαν τη θεωρία ότι τα καρκινικά κύτταρα αξιοποιούν μια εξειδικευμένη εκδοχή της "παροχέτευσης γλυκογόνου" ("glycogen shunt"), όπως έχει περιγραφεί παραπάνω για τα μυϊκά και νευρικά κύτταρα. Η διακοπή της δραστηριότητας της GP με χρήση γενετικών μεθόδων, οδήγησε τα κύτταρα σε αδυναμία πολλαπλασιασμού. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσης των αναγωγικών παραγόντων γλουταθειόνης και NADPH, που οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων ελευθέρων ριζών στο κύτταρο, ενεργοποίηση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 και τελικά κυτταρικό θάνατο.



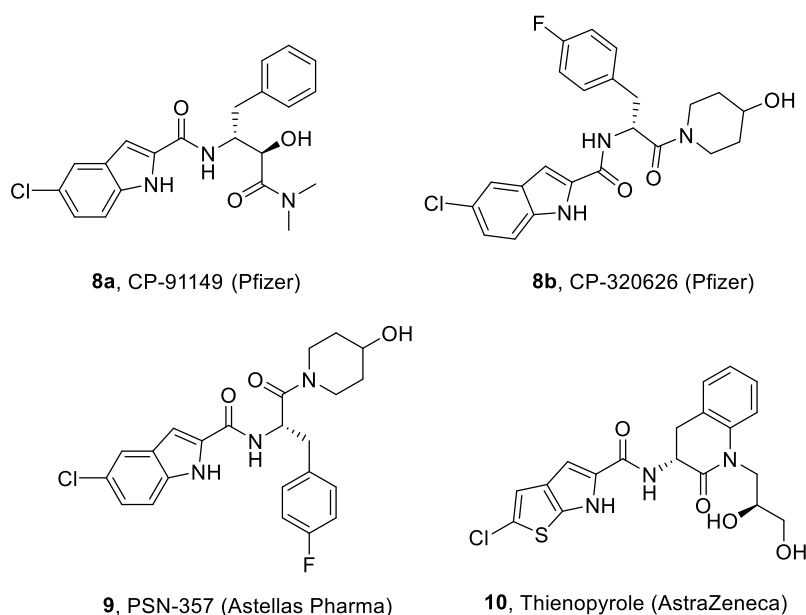
Εικόνα 1.7: Μεταβολισμός γλυκόζης και γλυκογόνου στα καρκινικά κύτταρα.³⁶

1.3 Αναστολείς της GP

Έχει ήδη αναπτυχθεί ένας μεγάλος αριθμός ενώσεων με ανασταλτική δράση επί της GP, με ορισμένες από αυτές να βρίσκονται ήδη σε κλινικές δοκιμές φάσης 2 ως πιθανά αντιδιαβητικά φάρμακα, ενώ αναπτύσσονται διαρκώς νέα μόρια.¹⁷

Επιπλέον, όπως διαφαίνεται από τη συμπτωματολογία των γενετικών συνδρόμων έλλειψης ισομορφών της GP (**Ενότητα 1.2**), η θεραπεία με αναστολείς της GP αναμένεται να εμφανίζει ήπιο προφίλ παρενεργειών, ακόμη και μετά από αθέμιτη μη ειδική αναστολή του ενζύμου στους περιφερικούς ιστούς. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τη μεγάλη σημασία της GP για τον καρκινικό ιστό, οδήγησε στην πρόταση να μελετηθεί ως μοριακός στόχος μιας νέας γενιάς αντικαρκινικών θεραπειών.^{39–41} Η θεραπευτική αυτή προσέγγιση έχει αποτελέσει επίσης αντικείμενο πρόσφατου άρθρου ανασκόπησης.⁴²

Η πρώτη στοχευμένη προσπάθεια σύνθεσης αναστολέων της GP ως πιθανά αντιδιαβητικά αναφέρεται το 1998,⁴³ όταν συντέθηκε μια σειρά ινδολο-καρβοξαμιδικών παραγώγων με δράση αλλοστερικών αναστολέων της GP. Έχουν υπάρξει μελέτες με μια ποικιλία αλλοστερικών αναστολέων της GP,⁴⁴ και η συγκεκριμένη κατηγορία υιοθετήθηκε από τη βιομηχανία, με αντιπροσωπευτικές τις ενώσεις **8-10** (Εικόνα 1.8).⁴⁴



Εικόνα 1.8: Παραδείγματα αλλοστερικών αναστολέων της GP από τη βιομηχανία. ⁴⁴

Ο αναστολέας της GP με κωδικό όνομα GSK1362885 (η δομή του δεν είναι γνωστή αλλά κατά πάσα πιθανότητα πρόκειται κι εδώ για αναστολέα με δομή ινδολίου), ήταν ο πρώτος για τον οποίο ολοκληρώθηκαν με επιτυχία κλινικές δοκιμές φάσης 1 το 2009, όπου μελετήθηκε η ασφάλειά του τόσο σε υγιείς ανθρώπους,⁴⁵ όσο και σε πάσχοντες από ΣΔ2, με θετικά αποτελέσματα.⁴⁶ Παρά τις αρχικές επιτυχίες, δεν έχουν ανακοινωθεί νεότερες κλινικές μελέτες. Παρόμοια, για τον αναστολέα PSN-357 (**9**), ολοκληρώθηκαν επιτυχημένα κλινικές δοκιμές φάσης 1, ωστόσο οι κλινικές δοκιμές φάσης 2 διακόπηκαν πρόωρα, χωρίς ανακοίνωση αποτελεσμάτων.⁴⁷

Μία δυσκολία η οποία συναντάται κατά την επέμβαση στην ηπατική GP, είναι η πιθανή παράλληλη αναστολή και των άλλων δύο ισομορφών, οφειλόμενη στην υψηλή τους ομολογία, με την προϋπόθεση ότι οι αναστολείς θα κατανέμονται παρόμοια στους αντίστοιχους ιστούς. Σύμφωνα με μελέτη σε

μυϊκά κύτταρα αρουραίου,⁴⁸ αναστολή της μυϊκής φωσφορυλάσης θα μπορούσε να οδηγήσει σε μυασθένεια κατά την παρατεταμένη, έντονη άσκηση, χωρίς ωστόσο να είναι ακόμη ξεκάθαρο αν κάτι αντίστοιχο θα συνέβαινε σε πραγματικούς ασθενείς.

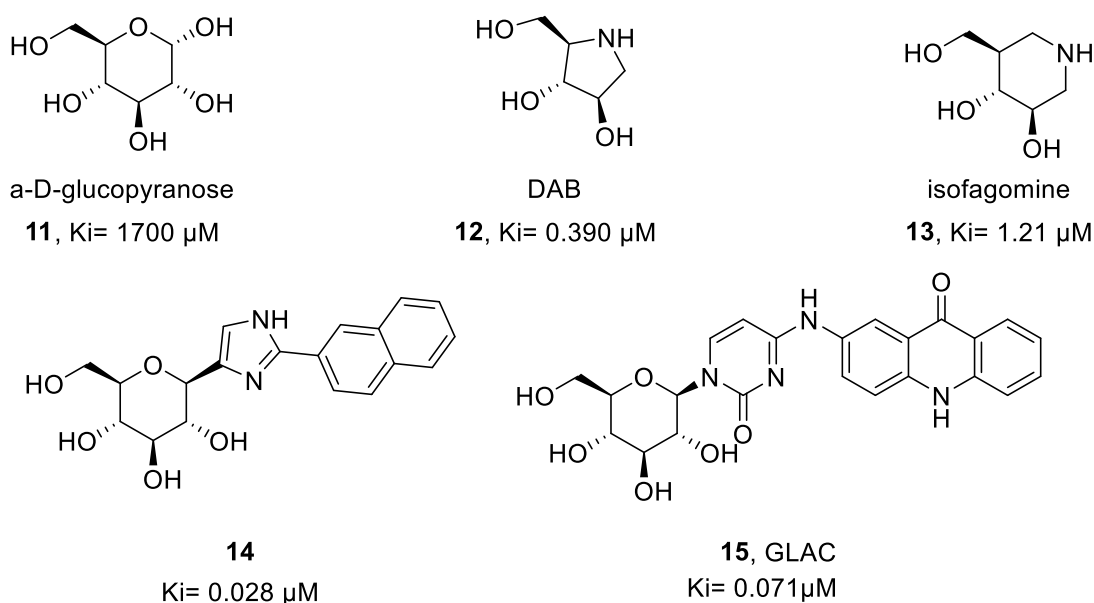
Περισσότερο σοβαρή θα μπορούσε να θεωρηθεί η μη ειδική αναστολή της εγκεφαλικής ισομορφής, η οποία θα μπορούσε να οδηγήσει σε νευρολογικά συμπτώματα που έχουν περιγραφεί παραπάνω. Από τη φύση τους, μικρά λιπόφιλα μόρια όπως τα παραδείγματα στην **Εικόνα 1.8**, διαπερνούν εύκολα τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, αυξάνοντας το ενδεχόμενο παρενεργειών.

Μία άλλη οικογένεια αναστολέων της GP, αποτελείται από μόρια που στοχεύουν στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Φυσιολογικά, η α-D-γλυκοπυρανόζη αποτελεί ασθενή προσδέτη του καταλυτικού κέντρου (1.7 mM), με την παρουσία της στο καταλυτικό κέντρο της GP να αναστέλλει το ένζυμο καταλύοντας τη μετάπτωσή του στην καταλυτικά αδρανή, τεταμένη μορφή T. Η περαιτέρω τροποποίηση της D-γλυκοπυρανόζης, μπορεί να οδηγήσει σε μόρια με ισχυρή προσδετική ικανότητα. Ένα πιθανό πλεονέκτημα τέτοιων δομών είναι η αυξημένη εκλεκτικότητα σε σχέση με τους αναστολείς που έχουν περιγραφεί παραπάνω, καθώς η παρουσία του πολικού σακχάρου μειώνει την ικανότητα διάχυσης μέσα από δομές όπως για παράδειγμα, τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.

Τα πιο απλά παραδείγματα τέτοιων μορίων αποτελούν τα φυσικά ιμινοσάκχαρα 1,4-διδεοξυ-1,4-ιμινο-D-αραβινιτόλη (**12**) και η ισοφαγομίνη (**13**) (**Εικόνα 1.9**), τα οποία αποτελούν ισχυρούς αναστολείς της GP.⁴⁹ Η εκλεκτικότητά τους ωστόσο είναι μάλλον χαμηλή, καθώς αναστέλλουν ισχυρά κι άλλα ένζυμα που σχετίζονται με τον μεταβολισμό της γλυκόζης όπως είναι οι γλυκοσιδάσες.

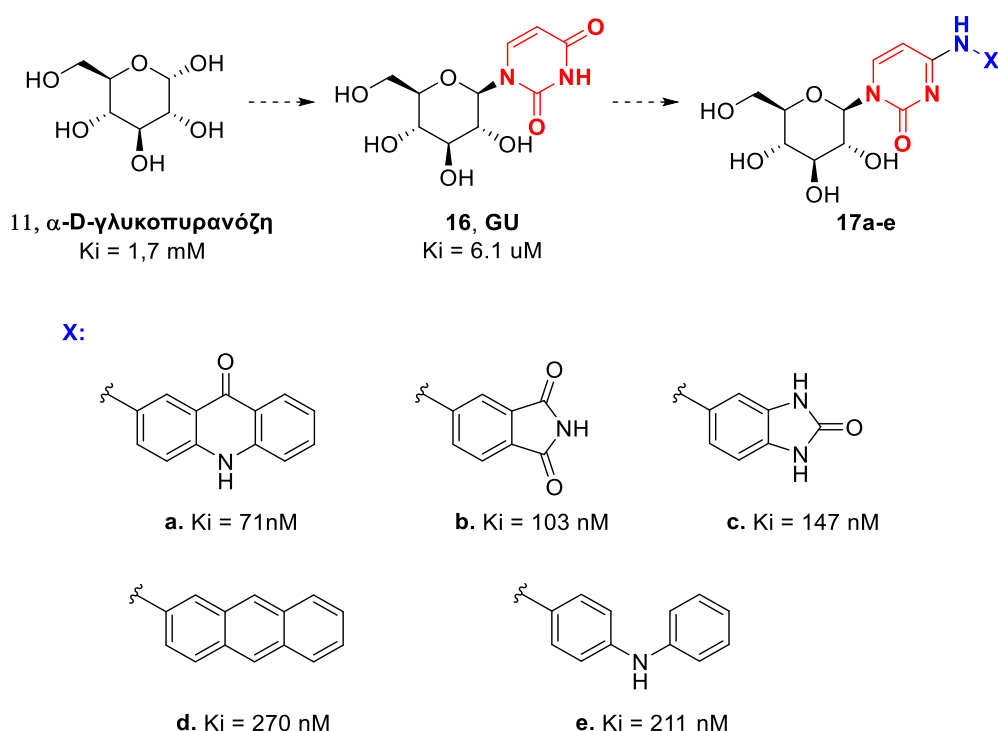
Η πλέον δραστήρια ερευνητική κατεύθυνση τις τελευταίες δεκαετίες εστιάζει στην αύξηση των αλληλεπιδράσεων συνθετικών αναστολέων με το καταλυτικό κέντρο της, εκτείνοντας τα μόρια αυτά προς μια κενή, λιπόφιλη περιοχή του καταλυτικού κέντρου στην GPb ανενεργή μορφή του ενζύμου, η οποία εκτείνεται πέρα από την περιοχή πρόσδεσης της γλυκόζης, το ονομαζόμενο β-κανάλι.⁵⁰ Η ανοικοδόμηση γλυκοζιτών με αρωματικά και ετεροαρωματικά

συστήματα έχει οδηγήσει σε έναν πραγματικά σημαντικό αριθμό ενώσεων, με τους δύο ισχυρότερους της βιβλιογραφίας επί του παρόντος να είναι η (2-(ναφθ-2-υλο)-ιμιδαζολ-4-υλο)-β-D-γλυκοπυρανόζη **14** από την ομάδα του Καθ. L. Somsak,⁵¹ και η 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-N⁴-(ακριδ-9-ον-2-υλο)κυτοσίνη **15** (GLAC), από το εργαστήριό μας.⁵² Ένα σημαντικό πλεονέκτημα αναστολέων με την περιγραφόμενη δομή, φαίνεται να είναι, σύμφωνα με πρόσφατη εργασία,⁵³ η μερική διατήρηση της δραστηριότητας της GP ακόμη και σε υψηλές δοσολογίες, αποφεύγοντας πιθανόν έτσι τις σχετιζόμενες με τη μη εκλεκτική αναστολή της μυϊκής GP παρενέργειες.



Εικόνα 1.9: Παραδείγματα αναστολέων της GP οι οποίοι δρουν στο καταλυτικό κέντρο.^{49,51,52}

Από την ερευνητική δραστηριότητα του εργαστηρίου μας, αναγνωρίστηκε ήδη από το 2010 η ιδιότητα τροποποιημένων γλυκοζιτικών αναλόγων φυσικών νουκλεοζιτών να δρουν ως αναστολείς GP.⁵⁴ Εκτενείς κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες, όπως επίσης και τα πρώτα αποτελέσματα από *in vitro* μελέτες, σε συνδυασμό με την εφαρμογή του ορθολογικού σχεδιασμού φαρμάκων, οδήγησαν στη σύνθεση ισχυρών αναστολέων με γενική δομή N²-αρυλο-υποκατεστημένων β-D-γλυκοπυρανοζυλοκυτοσινών.^{52,54,55} Μέσα από επαναλαμβανόμενους κύκλους ορθολογικού σχεδιασμού, η μελέτη αυτή έχει οδηγήσει σε έναν μεγάλο αριθμό ισχυρών αναστολέων της GP με δράση στο καταλυτικό κέντρο (**Εικόνα 1.10**).



Εικόνα 1.10: Πορεία σύνθεσης και παραδείγματα ισχυρών αναστολέων του καταλυτικού κέντρου της GP του εργαστηρίου μας.

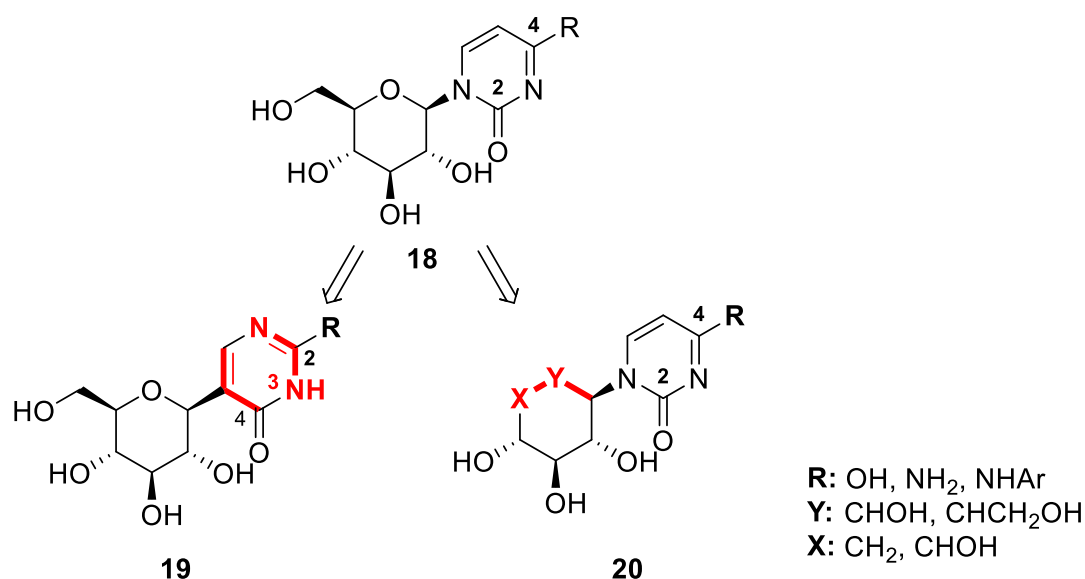
1.4 Σκοπός της εργασίας

Βασιζόμενοι στη μέχρι στιγμής εμπειρία του εργαστηρίου στον σχεδιασμό αναστολέων του καταλυτικού κέντρου της GP, στόχος της παρούσας εργασίας ήταν ο επανασχεδιασμός των ισχυρότερων αναστολέων που είχαν αναπτυχθεί στο εργαστήριο για τη βελτίωση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων τους.

Σε ένα βιολογικό *in vivo* περιβάλλον, ξεκινώντας από το όξινο pH του στομάχου, μια χημική ένωση υποβάλλεται σε έναν αριθμό συνθηκών που αποτελούν πρόκληση για τη σταθερότητά της. *N*-γλυκοζίτες, όπως οι ενώσεις οι οποίες αναφέρθηκαν στην προηγούμενη παράγραφο, πέραν της χημικής ευαισθησίας σε ισχυρά όξινες συνθήκες, αποτελούν επίσης υποστρώματα για έναν μεγάλο αριθμό υδρολυτικών ενζύμων, όπως είναι τα ένζυμα της οικογένειας των γλυκοσιδασών. Πράγματι, προκαταρκτικά *in vivo* πειράματα σε ενώσεις αυτής της κατηγορίας είχαν υποδείξει ισχυρή αλλά βραχύβια υπογλυκαιμική δράση σε διαβητικούς μύες.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, συγκεκριμένος στόχος της παρούσας διατριβής ήταν ο σχεδιασμός και η σύνθεση νέων ενώσεων, αναλόγων των N^2 -αρυλο-υποκατεστημένων β -D-γλυκοπυρανοζυλοκυτοσινών με βελτιωμένες φαρμακοκινητικές ιδιότητες, όπως είναι ο χρόνος ημιζωής, και κατά συνέπεια βελτιωμένη δράση, σε σχέση με τα μέχρι τώρα μόρια, διατηρώντας πάντα τις δομικές λεπτομέρειες οι οποίες είχε ήδη βρεθεί ότι ευθύνονται για την ισχυρή πρόσδεση στο καταλυτικό κέντρο της GP.

Πιο συγκεκριμένα, και βασιζόμενοι σε προηγούμενη εργασία,⁵⁶ σχεδιάστηκαν (α) ανάλογα των γνωστών ενώσεων με δομή C-γλυκοζίτη, όπου ο συμβατικός C-N γλυκοζιτικός δεσμός αντικαθίσταται με έναν σταθερό δεσμό άνθρακα-άνθρακα και (β) ανάλογα όπου το σακχαρικό τμήμα υποκαθίσταται από καρβοκυκλικά παράγωγα βασιζόμενα στη *myo*-ινοσιτόλη. Στόχος των νέων αναλόγων ήταν να «διορθώσουν» το πρόβλημα υδρολυτικής αστάθειας της δομής ημιαμινάλης που συναντάται στα υποστρώματα με δομή κλασικού *N*-γλυκοζίτη (Σχήμα 1.2).



Σχήμα 1.2: Με κόκκινο σημειώνονται οι δομικές διαφοροποιήσεις των προτεινόμενων C- και καρβοκυκλικών παραγώγων των κλασικών αναστολέων.

Δύο σημαντικοί παράγοντες οι οποίοι λήφθηκαν υπόψη κατά τον σχεδιασμό των νέων προτεινόμενων ενώσεων ήταν (α) να είναι όσο το δυνατόν πιο εύκολα συνθετικά προσβάσιμες μέσα στα χρονικά όρια της παρούσας εργασίας και (β) οι νέες ενώσεις να διαφοροποιούνται δομικά όσο το δυνατόν λιγότερο από τις

μέχρι τώρα γνωστές, ώστε να διατηρείται, σε όσο το δυνατό μεγαλύτερο βαθμό, η ικανότητα πρόσδεσής τους στο καταλυτικό κέντρο της GP. Στο **Σχήμα 1.2** φαίνονται ενδεικτικά οι βασικές διαφοροποιήσεις ανάμεσα στις δύο νέες οικογένειες πιθανών αναστολέων σε σχέση με τους μέχρι τώρα αναστολείς .

Για παράδειγμα, ιδιαίτερα σημαντική είναι η παρουσία του καρβονυλίου στη θέση 4 του δακτυλίου. Γνωρίζουμε από τα *N*-β-D-γλυκοπυρανόζυλο παράγωγα ότι το καρβονύλιο στη συγκεκριμένη θέση στον χώρο συμμετέχει, μαζί με μόρια νερού, σε ένα δίκτυο δεσμών υδρογόνου που παίζουν καθοριστικό ρόλο στη δραστηριότητα των μορίων-αναστολέων που έχουν συντεθεί. Επομένως, θεωρήθηκε απαραίτητη η διατήρηση μιας ομάδας καρβονυλίου στην ίδια θέση των νέων ενώσεων.

Ιδιαίτερα για τις ενώσεις **20** θα πρέπει να σημειωθεί ότι είναι η πρώτη φορά στη βιβλιογραφία που σχεδιάζονται καρβοκυκλικά παράγωγα με στόχο την αναστολή της GP. Σε αυτές τις δομές το πυριμιδινικό τμήμα έχει διευθέτηση όμοια με αυτή των κλασικών *N*-γλυκοζιτών ενώ οι διαφοροποιήσεις εντοπίζονται αποκλειστικά στο σακχαρικό τμήμα. Πιο συγκεκριμένα, η βασική επιθυμητή διαφοροποίηση ήταν η αντικατάσταση του ατόμου οξυγόνου του δακτυλίου από ένα άτομο άνθρακα.

Βασιζόμενοι σε προηγούμενα αποτελέσματα *in silico* μελετών,⁵⁷ τέθηκε ως δευτερεύων στόχος η σύνθεση και μελέτη νέων αρωματικών υποκαταστατών, προς σύνθεση νέων αναστολέων, οι οποίοι θα επεδείκνυαν περαιτέρω βελτίωση της ικανότητας πρόσδεσής τους, στο καταλυτικό κέντρο της GP. Το συγκεκριμένο τμήμα της εργασίας ήταν σημαντικό εν όψει της σύνθεσης των προτεινόμενων, νέων αναστολέων. Ισχυρότερη πρόσδεση χάρη στα νέα αρωματικά τμήματα θα μπορούσε να αντισταθμίσει πιθανή μείωση της ανασταλτικής δράσης των νέων ενώσεων οφειλόμενη στις δομικές τους διαφοροποιήσεις από τους κλασικούς αναστολείς. Η συγκεκριμένη πορεία διερευνήθηκε στα πλαίσια δύο πτυχιακών εργασιών,^{58,59} χωρίς ωστόσο να οδηγήσει σε χρήσιμα για τη διδακτορική διατριβή αποτελέσματα.

Τελικός στόχος ήταν να ακολουθήσουν, μετά την επιτυχημένη σύνθεση, κινητικές, κρυσταλλογραφικές και διαμορφωτικές μελέτες των νέων ενώσεων

και δοκιμή τόσο ενώσεων που είχαν συντεθεί προγενέστερα στο εργαστήριο, όσο και των νέων ενώσεων, σε βιολογικές μελέτες της επίδρασής τους σε καρκινικές κυτταρικές σειρές, εξετάζοντας για πρώτη φορά την πιθανή κυτταροστατική δράση αναστολέων του καταλυτικού κέντρου της GP.

Με τις παραπάνω μελέτες, οι νέοι, δομικά τροποποιημένοι αναστολείς αναμενόταν να αποτελέσουν χρήσιμα εργαλεία για την καλύτερη κατανόηση και χαρτογράφηση των δομικών αναγκών του καταλυτικού κέντρου της GP.

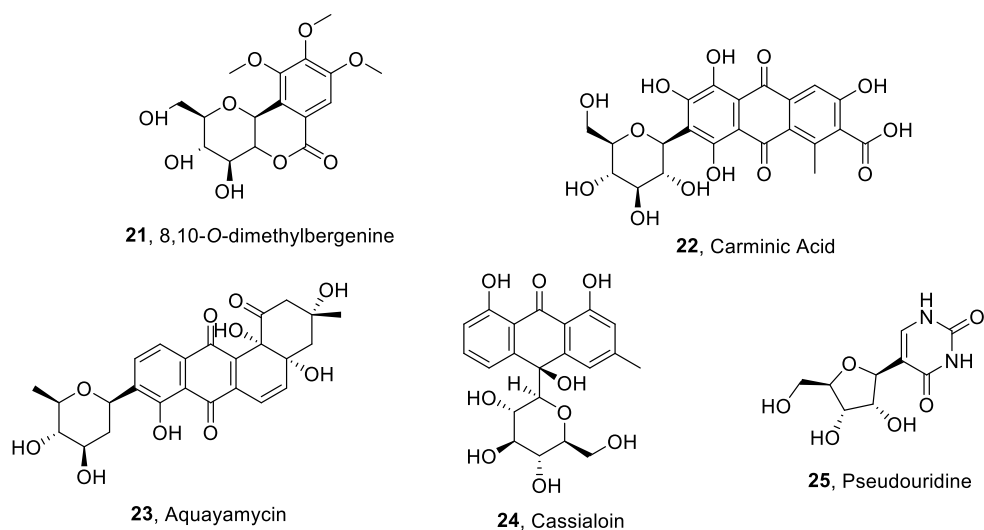
Κεφάλαιο 2: C-γλυκοζίτες

2.1 Εισαγωγή

2.1.1 Γενικά περί C-γλυκοζιτικών ενώσεων

Η ιδιαίτερη υδρολυτική σταθερότητα των μορίων με δομή C-γλυκοζίτη κέντρισε το ερευνητικό μας ενδιαφέρον ήδη κατά την εκπόνηση του μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης του συγγραφέα.⁵⁶

Η σύνθεση C-γλυκοζιτικών ενώσεων αποτελεί κλάδο της οργανικής χημείας ο οποίος έχει γνωρίσει ιδιαίτερη άνθιση τις τελευταίες δεκαετίες. Σημαντικά έχει συνεισφέρει η βελτίωση των διαθέσιμων αναλυτικών μεθόδων, που επέτρεψε την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό ενός μεγάλου αριθμού φυσικών C-γλυκοκυρανόζυλο παραγώγων με συχνά ενδιαφέρουσα φαρμακευτική δράση ή εμπορική σημασία. Στην **Εικόνα 2.1** φαίνονται κάποια χαρακτηριστικά παραδείγματα φυσικών C-γλυκοζιτικών μορίων. Συναντώνται ενώσεις όπως η οικογένεια των βεργενινών (8,10-dimethylbergenine, **21**) που αποτελούν μόρια με ευρεία φαρμακευτική δράση όπως για παράδειγμα εφαρμογές σε μεθόδους ανοσοθεραπείας,⁶⁰ η κασσιαλοΐνη (cassialoin, **24**),⁶¹ ισχυρό αντινεοπλασματικό φάρμακο, νέα αντιβιοτικά με δράση κατά στελεχών βακτηρίων ανθεκτικών στις κλασικές θεραπείες όπως η ακουαΐαμυκίνες (aquayamycin, **23**),^{62,63} ενώ τα άλατα του καρμινικού οξέος (carminic acid, **22**) χρησιμοποιούνται εδώ και δεκαετίες από τη βιομηχανία τροφίμων για το κόκκινο χρώμα τους (ερυθρό της κοχενίλης).⁶⁴



Εικόνα 2.1: Παραδείγματα φυσικών προϊόντων με δομή C-γλυκοζίτη.

Έχουν ανιχνευτεί και χαρακτηριστεί επίσης μια πληθώρα C-γλυκοζιτικών αναλόγων των φυσικών νουκλεοζιτών. Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ψευδοουριδίνη (pseudouridine, **25**, **Εικόνα 2.1**), η οποία αποτελεί μακράν τον πιο διαδεδομένο C-νουκλεοζίτη στα έμβια συστήματα. Προκύπτει από την επίδραση μιας ειδικής κατηγορίας ενζύμων, των Ψ-συνθασών,⁶⁵ στα νουκλεοτίδια ουριδίνης στο tRNA. Ο ρόλος της ψευδοουριδίνης φαίνεται να είναι η ρύθμιση της μετάφρασης του γενετικού υλικού, ενώ εξωγενής χορήγησή της εμφανίζει προστατευτικές ιδιότητες κατά της ιονίζουσας ακτινοβολίας.^{65–68} Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζει η ανακάλυψη ότι η αντικατάσταση της ουριδίνης από ψευδοουριδίνη σε εμβόλια βασιζόμενα σε τεχνητό mRNA αυξάνει σημαντικά τη σταθερότητα και αποτελεσματικότητά τους.⁶⁹ Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται στην αναζήτηση αποτελεσματικών εμβολίων κατά την παρούσα πανδημία της νόσου COVID-19 κι έχει εφαρμοστεί με επιτυχία στα εμβόλια mRNA των εταιριών Pfizer-BioNTech και Moderna.⁷⁰

Η δομική συγγένεια της ψευδοουριδίνης με τους αναστολείς της GP που έχουν συντεθεί από το εργαστήριό μας μέχρι στιγμής (Ενότητα 1.3) αποτέλεσε πηγή έμπνευσης για τις πρώτες μας συνθετικές δοκιμές σε μια νέα οικογένεια μορίων, C-γλυκοπυρανοζυλο- αναλόγων των μέχρι τώρα ενώσεων.

Πέρα από φυσικά προϊόντα, τα τελευταία χρόνια έχουν εμφανιστεί και εμπορικοί, τεχνητοί C-γλυκοζίτες. Η χημική σταθερότητα του C-C γλυκοζιτικού δεσμού μεταφράζεται σε φάρμακα τα οποία παρουσιάζουν υψηλή μεταβολική σταθερότητα. Έχουν συντεθεί έτσι φάρμακα με σημαντικά βελτιωμένους χρόνους ημιζωής σε σύγκριση με φάρμακα με δομή κλασικού γλυκοζίτη, που μέχρι πρόσφατα αποτελούσε και το μεγαλύτερο μειονέκτημα των τελευταίων. Κυριότερος ίσως εκπρόσωπος φαρμακευτικά ενδιαφερόντων C-γλυκοπυρανοζυλο-παραγώγων είναι η οικογένεια των αντιδιαβητικών γλιφλοζινών, που έχουν περιγραφεί στην Ενότητα 1.2.1.

2.1.2 Μέθοδοι C-γλυκοζυλίωσης

Ο συνδυασμός της φαρμακευτικής χρησιμότητας σε συνδυασμό με τη σημαντική μεταβολική σταθερότητα των C-γλυκοζιτικών παραγώγων έναντι των κλασικών γλυκοζιτών, έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ενός πραγματικά τεράστιου αριθμού μεθόδων σύνθεσης, με εφαρμογές τόσο στην ολική σύνθεση

φυσικών προϊόντων,⁷¹ όσο και στη σύνθεση νέων μορίων με βιομηχανικό και φαρμακευτικό ενδιαφέρον.

Στη βιβλιογραφία περιγράφονται μέθοδοι οι οποίες ομοιάζουν στην κλασική γλυκοζιτική σύνθεση, όπως επίσης και μέθοδοι σύνθεσης μέσω ριζών, καταλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούν στοιχεία μετάπτωσης, όπως επίσης κι ένας αριθμός μεθόδων οι οποίες βασίζονται σε οργανομεταλλικά πυρηνόφιλα. Στη βιβλιογραφία εμφανίζονται επίσης κάποια σπάνια παραδείγματα όπου η γλυκοζυλίωση επιτυγχάνεται μέσω ενδομοριακών σιγματροπικών και λοιπών αντιδράσεων αναδιατάξης.

Τα τελευταία χρόνια περιγράφονται και μέθοδοι πράσινης χημείας.⁷² Σημαντικό πλεονέκτημα είναι η δυνατότητα αποφυγής σχημάτων προστασίας κι αποπροστασίας, τα οποία μέχρι στιγμής μοιάζουν αναπόσπαστο κομμάτι της βιοοργανικής χημείας, προσθέτοντας συνήθως σημαντική πολυπλοκότητα στις συνθέσεις. Το τελευταίο μειονέκτημα έγινε άλλωστε ιδιαίτερα αισθητό και στην πορεία των συνθετικών πειραμάτων της παρούσας εργασίας.

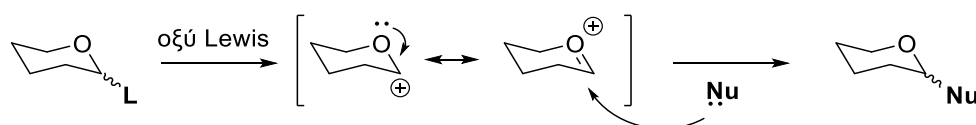
Ο όγκος της έρευνας στη συγκεκριμένη κατηγορία σύνθεσης έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλαπλών (και ιδιαίτερα εκτενών) βιβλίων και άρθρων ανασκόπησης.^{73–76} Η ανάπτυξη νέων μεθόδων C-γλυκοζυλίωσης διευρύνεται σε διαρκώς νέα υποστρώματα, ιδίως ηλεκτρονικά ελλειμματικών αρωματικών συστημάτων τα οποία συχνά δημιουργούν δυσκολίες λόγω της χαμηλής τους δραστηριότητας. Η μεγαλύτερη ωστόσο πρόκληση είναι η ανάπτυξη γενικών μεθόδων που επιτρέπουν τον όσο το δυνατόν καλύτερο έλεγχο της στερεοχημικής έκβασης της γλυκοζυλίωσης.

Στη συνέχεια παρουσιάζεται ένας αριθμός των σημαντικότερων συνθετικών μεθόδων με αντιπροσωπευτικά παραδείγματα, και όχι μια ενδελεχής ανασκόπηση του συνόλου της βιβλιογραφίας. Σημειώνεται ότι ενώ ο όρος “γλυκοζυλίωση” αφήνει να εννοηθεί η σύνθεση με βάση τη D-γλυκόζη, στη πραγματικότητα αναφέρεται σε συνθέσεις όπου μπορεί να χρησιμοποιείται οποιοδήποτε φυσικό ή και τεχνητό σάκχαρο ή και σακχαρικά ανάλογα. Καθότι η δομή του σακχάρου επηρεάζει σημαντικά τόσο τη δραστηριότητα, όσο και την έκβαση του στερεοχημικού αποτελέσματος (στις φουρανόζες για παράδειγμα απουσιάζει πρακτικά το ανωμερικό φαινόμενο, κρίσιμο στη χημεία των

πυρανοζών), στο παρόν κεφάλαιο δίνεται έμφαση ιδίως σε συνθέσεις που αφορούν σε πυρανόζες και ειδικότερα στη D-γλυκοπυρανόζη, που αποτελεί άλλωστε και το αντικείμενο μελέτης της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

2.1.2.1 Όξινα καταλυόμενη σύνθεση C-γλυκοζιτών με μεσολάβηση ιόντων οξωνίου

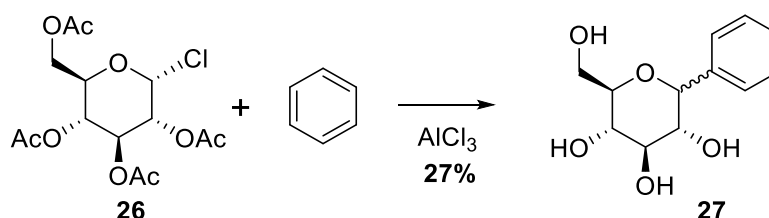
Οι πρώτες μέθοδοι C-γλυκοζυλίωσης οι οποίες αναπτύχθηκαν ακολουθούν τις μεθόδους της κλασικής γλυκοζυλίωσης (**Σχήμα 2.1**). Σε αυτές τις μεθόδους, ένας προστατευμένος μονοσακχαρίτης διαθέτει ανωμερικές ομάδες που μπορούν να ενεργοποιηθούν από οξέα Lewis (αλογόνα, αλκυλο- και αλογονοαλκυλο-εστέρες, ελεύθεροι και υποκατεστημένοι θειικοί και φωσφορικοί εστέρες, σουλφόνες, σουλφοξείδια, θειόλες, τριαλογονοακετιμιδικό εστέρες, ηλεκτρονιακά ελλειμματικοί αιθέρες και 1,2 ανυδρο-σάκχαρα). Η ενεργοποίηση οδηγεί στην απόσπαση της ανωμερικής ομάδας προς σχηματισμό του αντίστοιχου κατιόντος οξωνίου, το οποίο μπορεί στη συνέχεια να αντιδράσει με πυρηνόφιλα σε αντιδράσεις τύπου S_N1.



L: -OH, -OAc, -F, -Cl, -Br, -I, -OMe, -OCOCF₃, -ONHCOCF₃, -OPO(OR)₂, -SR, SOR, -SO₂R etc

Σχήμα 2.1: Γενική πορεία γλυκοζυλίωσης μέσω καρβοκατιόντος.

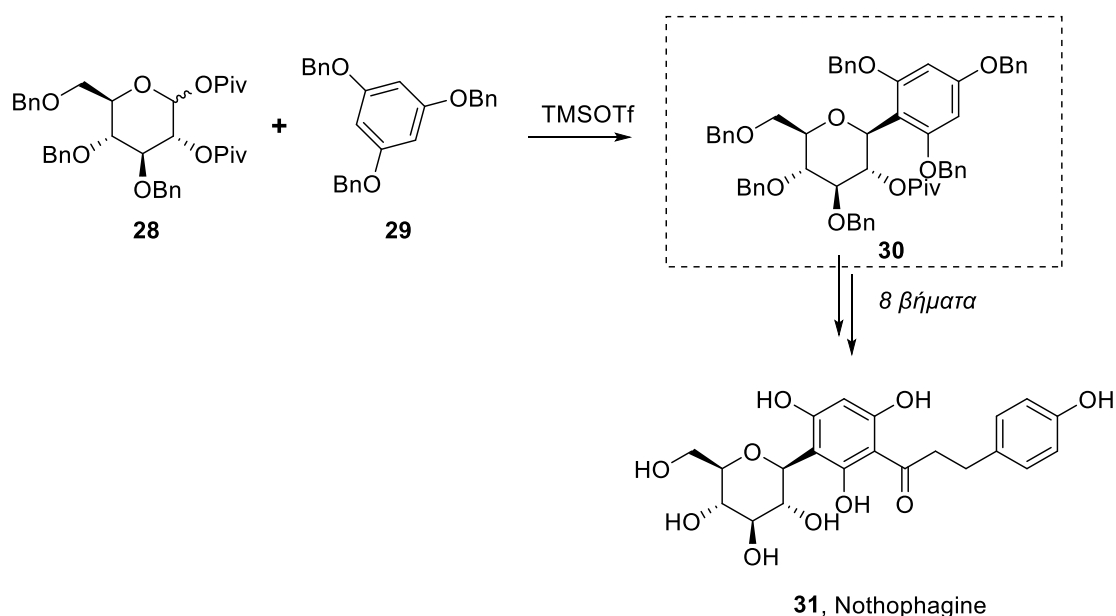
Ενώ η κλασική γλυκοζυλίωση αναπτύχθηκε χρησιμοποιώντας ομάδες με ετεροάτομα, νωρίς ανακαλύφθηκε ότι και ενεργοποιημένα αρωματικά συστήματα μπορούν να οδηγήσουν στον σχηματισμό του αντίστοιχου C-γλυκοζίτη ("γλυκοζυλίωση Friedel-Crafts", **Σχήμα 2.2**).⁷⁷



Σχήμα 2.2: Πρώτο παράδειγμα C-γλυκοζυλίωσης (1945).⁷⁷

Στις μεθόδους αυτού του τύπου, εκτός από την απαίτηση για ενεργοποιημένα αρωματικά συστήματα, το στερεοχημικό αποτέλεσμα είναι συχνά απρόβλεπτο, και επηρεάζεται, πέρα από τη φύση του ίδιου του σακχάρου, από παράγοντες όπως είναι η κατάλληλη επιλογή του οξέος Lewis ή συνδυασμού οξέων, η φύση της ανωμερικής ομάδας, οι χρησιμοποιούμενες προστατευτικές ομάδες και φυσικά ο όγκος του πυρηνόφιλου, καθώς ανταγωνίζονται μεταξύ τους ένας αριθμός από στερεοηλεκτρονιακούς παράγοντες. Ενώ στα D-σάκχαρα προτιμάται ο σχηματισμός ισημερινά υποκατεστημένων προϊόντων με κύριο παράγοντα τη στερεοχημική παρεμπόδιση, συχνά παραλαμβάνονται μίγματα α- και β- ανωμερών. Μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί επίσης η δυσκολία στην τοποεκλεκτικότητα της προσβολής από το πυρηνόφιλο αρωματικό σύστημα όταν αυτό διαθέτει πολλαπλές ενεργοποιημένες θέσεις. Παρά τους περιορισμούς της, η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε έναν αριθμό ολικών συνθέσεων.

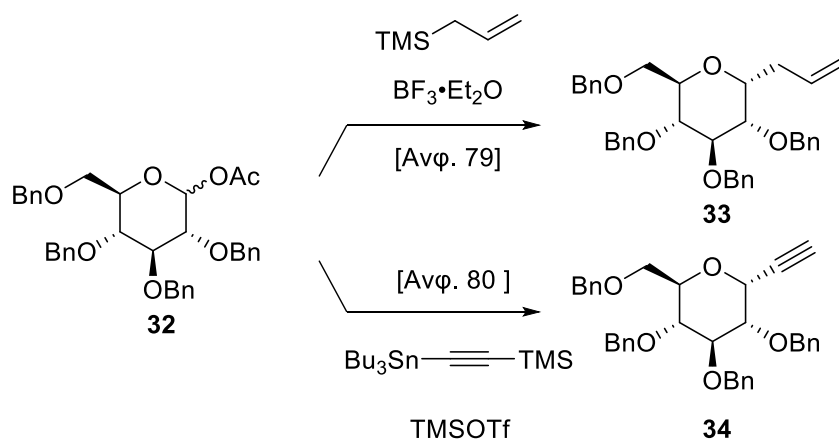
Στο παράδειγμα της ολικής σύνθεσης της νοθοφαγίνης (nothophagine, **31**, **Σχήμα 2.3**),⁷⁸ η προσεκτική επιλογή της κατάλληλης ακυλο-προστατευτικής ομάδας στη θέση 2 του σακχάρου σε συνδυασμό με το κατάλληλο οξύ Lewis επέτρεψε τον σχηματισμό αποκλειστικά του ενδιαμέσου **30**.



Σχήμα 2.3: Στάδιο C-γλυκοζυλίωσης στην ολική σύνθεση Νοθοφαγίνης.⁷⁸

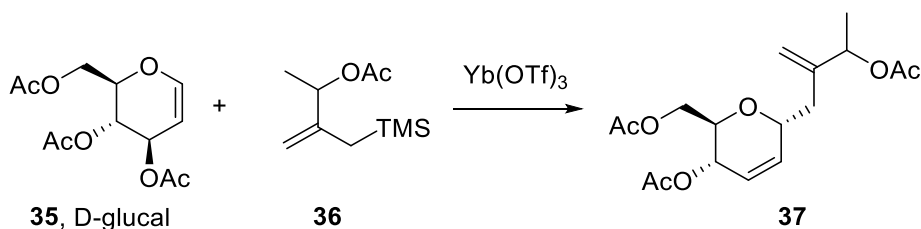
Η συγκεκριμένη μέθοδος τα τελευταία χρόνια έχει επεκταθεί σε ακόρεστα

γραμμικά πυρηνόφιλα (**Σχήμα 2.4**), μέσω οργανοπυριτικών⁷⁹ και οργανοκασσιτερικών ενδιαμέσων.⁸⁰ Αντίθετα από την περίπτωση των αρωματικών πυρηνόφιλων, σε αυτή την κατηγορία επιτυγχάνεται εξαιρετικός έλεγχος της στερεοχημείας, ο οποίος διατηρείται σε μια σειρά πυρανοζών. Η σύνθεση οδηγεί σε α-γλυκοζίτες, όπως υπαγορεύεται από το ανωμερικό φαινόμενο και στη κλασική γλυκοζυλίωση.



Σχήμα 2.4: Παραδείγματα C-γλυκοζυλίωσης μέσω οργανοπυριτικών⁷⁹ και οργανοκασσιτερικών⁸⁰ παραγώγων.

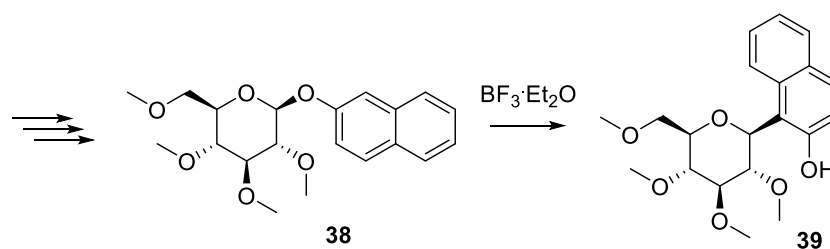
Ιδιαίτερα χρήσιμα ενδιάμεσα, τα οποία επίσης χρησιμοποιούνται και στην κλασική γλυκοζιτική σύνθεση είναι η οικογένεια των γλυκαλών, 1,2 ακόρεστων σακχαρικών αναλόγων. Σημαντικότερη μέθοδος γλυκοζυλίωσης τόσο με κλασικά πυρηνόφιλα, όσο και με ενεργοποιημένα C-πυρηνόφιλα αποτελεί η καταλυόμενη από οξέα Lewis αναδιάταξη Ferrier, που οδηγεί σε ακόρεστα ενδιάμεσα με δυνατότητα περαιτέρω τροποποίησης του σακχαρικού κέντρου. Χρησιμοποιούνται συχνά “ασυνήθιστα” οξέα Lewis, όπως τριφλικό υττέρβιο στο παράδειγμα στο **Σχήμα 2.5**.⁸¹



Σχήμα 2.5: Παράδειγμα C-γλυκοζυλίωσης μέσω αναδιάταξης Ferrier.⁸¹

Μια τελευταία, ενδιαφέρουσα εκδοχή της μεθόδου αποτελεί η ενδομοριακή

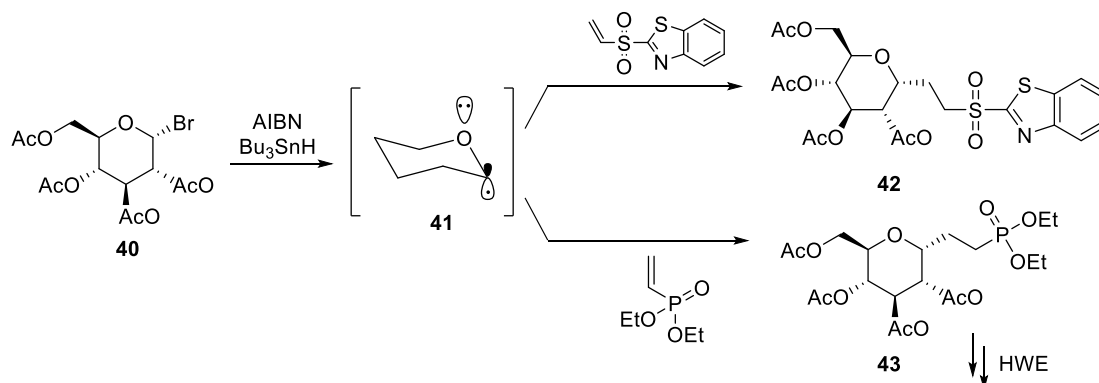
αναδιάταξη ενός κλασικού O-γλυκοζίτη προς C-γλυκοζίτη (**Σχήμα 2.6**).⁸²



Σχήμα 2.6: Βιβλιογραφικό παράδειγμα ενδομοριακής C-γλυκοζυλίωσης.⁸²

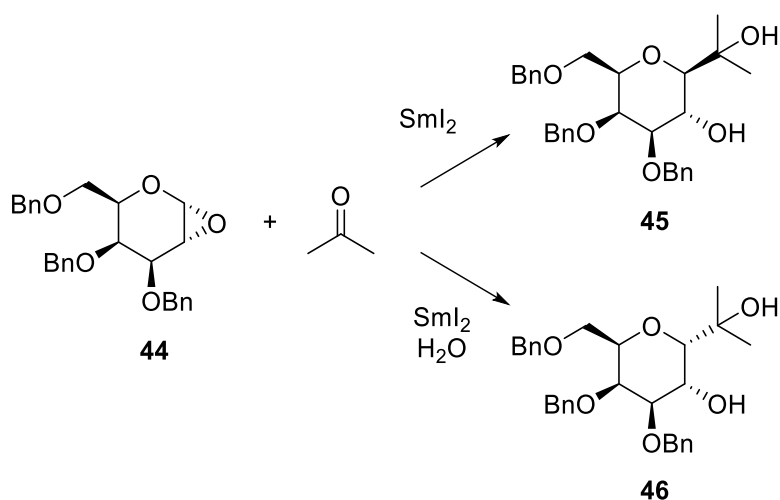
2.1.2.2 Αντιδράσεις ριζικής C-γλυκοζυλίωσης

Η C-γλυκοζυλίωση μέσω ριζών αποτελεί έναν ιδιαίτερα δραστήριο ερευνητικό κλάδο, ενώ έχει αποτελέσει αντικείμενο πρόσφατου άρθρου ανασκόπησης.⁷³ Στη ριζική γλυκοζυλίωση, τη θέση του ενδιάμεσου καρβοκατιόντος το οποίο συναντάται στην κλασική γλυκοζυλίωση με οξέα Lewis, παίρνει μία ανωμερική ρίζα που παρασκευάζεται από ένα κατάλληλα ανωμερικά ενεργοποιημένο σάκχαρο, για παράδειγμα με άτομα αλογόνων ή αιθέρες σεληνίου. Σε ένα από τα πιο απλά παραδείγματα, η χρήση ενός ριζικού εκκινητή όπως AIBN ή Bu₃SnH οδηγεί στον σχηματισμό μιας ρίζας **41** με πυρηνόφιλο χαρακτήρα (**Σχήμα 2.7**), η οποία στη συνέχεια μπορεί να αντιδράσει με ενεργοποιημένες ολεφίνες, όπως είναι σουλφονικοί⁸³ και φωσφορικοί εστέρες,⁸³ με τους τελευταίους να χρησιμοποιούνται για περαιτέρω ανοικοδόμηση του σακχαρίτη μέσω αντιδράσεων Horner-Wadsworth-Emmons. Όπως και στη γλυκοζυλίωση μέσω κατιόντος, προτιμάται ο σχηματισμός α-ανωμερικών προϊόντων λόγω σταθεροποίησης της ενδιάμεσης ρίζας σε αξονική θέση.



Σχήμα 2.7: Παραδείγματα γλυκοζυλίωσης μέσω ριζών.⁸³

Ως γλυκοζιτικοί δότες μπορούν να λειτουργήσουν επίσης τροποποιημένες γλυκάλες και εποξειδία. Τα εποξειδία, χρησιμοποιώντας ως καταλύτη/ εκκινητή ιωδιούχο σαμάριο (**Σχήμα 2.8**), έχουν χρησιμοποιηθεί για τη ριζική C-γλυκοζυλίωση με κετόνες κι αλδεΐδες.⁸⁴

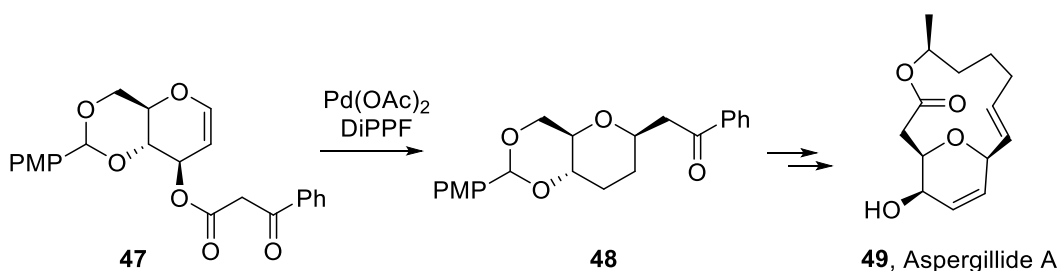


Σχήμα 2.8: Παράδειγμα ριζικής γλυκοζυλίωσης με χρήση ιωδιούχου σαμαρίου.⁸⁴

Στα πλεονεκτήματα της ριζικής γλυκοζυλίωσης είναι οι σχετικά ήπιες συνθήκες, που εξασφαλίζουν συμβατότητα με έναν μεγάλο αριθμό υποστρωμάτων, ενώ αποφεύγονται ορισμένες παράπλευρες αντιδράσεις οι οποίες συχνά δυσκολεύουν την κλασική γλυκοζυλίωση, όπως είναι για παράδειγμα οι ανταγωνιστικές αντιδράσεις απόσπασης.⁷³

2.1.2.3 Αντιδράσεις γλυκοζυλίωσης καταλυόμενες από στοιχεία μετάπτωσης

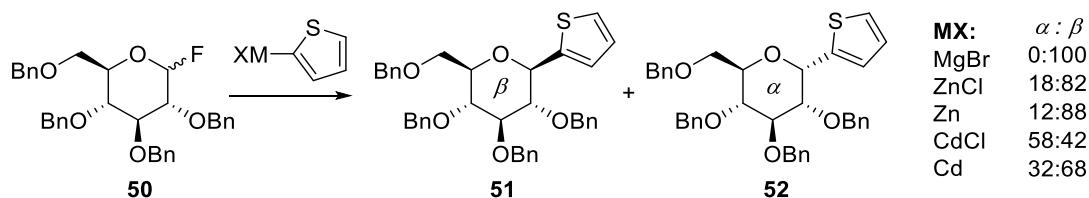
Ο καταλυόμενος από στοιχεία μετάπτωσης σχηματισμός δεσμών C-C αποτελεί σήμερα ένα από τα πιο πολύπλευρα εργαλεία της συνθετικής οργανικής χημείας. Στην κατηγορία της C-γλυκοζυλίωσης, εκπροσωπούνται πρακτικά όλες οι κλασικές μέθοδοι χημείας του παλλαδίου. Συναντώνται παραδείγματα όπου έχουν χρησιμοποιηθεί αντιδράσεις τύπου Mizoroki-Heck,⁸⁵ Migita-Stille,⁸⁶ Negishi, Tsuji-Trost.⁸⁷ Ενώ δεν έχουν αναπτυχθεί μέχρι στιγμής γενικές μέθοδοι, η κατάλυση από παλλάδιο έχει βρει ενδιαφέρουσες εφαρμογές στη σύνθεση φυσικών προϊόντων, όπως στο παράδειγμα της ολικής σύνθεσης του αντνεοπλασματικού aspergillide A (**49**, **Σχήμα 2.9**).



Σχήμα 2.9: Παράδειγμα ενδομοριακής αντίδρασης Heck-αποκαρβοξυλίωσης.⁷²

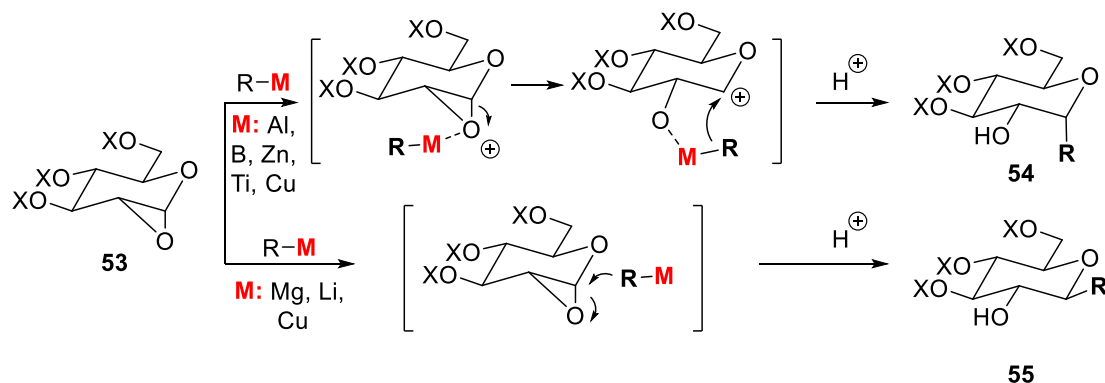
2.1.2.4 Αντιδράσεις γλυκοζυλίωσης μέσω οργανομεταλλικών πυρηνόφιλων

Υπάρχουν πολυάριθμα παραδείγματα όπου ανωμερικά αλογονωμένοι σακχαρίτες χρησιμοποιούνται ως ηλεκτρονιόφιλα στην υποκατάσταση από οργανομεταλλικά ενδιάμεσα. Έχουν χρησιμοποιηθεί τόσο οργανομαγνησιακά και οργανολιθιακά αντιδραστήρια, όσο και παράγωγα του ψευδαργύρου, καδμίου, δημητρίου και άλλα.⁸⁸ Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι και σε αυτές τις μεθόδους το στερεοχημικό αποτέλεσμα είναι μερικές φορές απρόβλεπτο. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί μια εργασία όπου χρησιμοποιείται ανωμερικά φθοριωμένη γλυκόζη ως ηλεκτρονιόφιλο.⁸⁹ Ενώ θα αναμενόταν να λάβει χώρα υποκατάσταση τύπου S_N2 , φαίνεται να υπάρχει μεσολάβηση κατιόντος οξωνίου, που καταδεικνύεται από το γεγονός ότι το στερεοχημικό αποτέλεσμα είναι ανεξάρτητο της διευθέτησης του φθορίου στο αρχικό μόριο. Αλλαγή της σκληρότητας του πυρηνόφιλου φαίνεται επίσης να παίζει σημαντικό ρόλο στην έκβαση του στερεοχημικού αποτελέσματος, υποδεικνύοντας ότι ο πραγματικός μηχανισμός της υποκατάστασης είναι αρκετά πιο σύνθετος (Σχήμα 2.10).



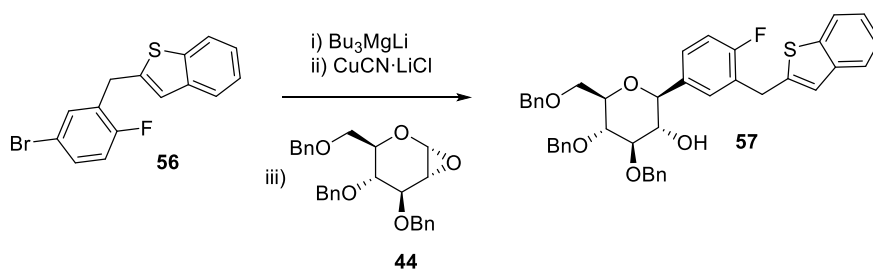
Σχήμα 2.10: C-γλυκοζυλίωση με συνδυασμό ανωμερικού φθοριδίου και οργανομεταλλικών πυρηνόφιλων.⁸⁹

Ως ηλεκτρονιόφιλα έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης 1,2-ανυδρο-σάκχαρα (εποξειδία), συχνά με χρήση όξινων κατά Lewis καταλυτών. Τα εποξειδία των σακχάρων έχουν χρησιμοποιηθεί τόσο για τη σύνθεση α- όσο και β-C-γλυκοζιτών. Η στεreoχημική έκβαση φαίνεται και εδώ να εξαρτάται από τη φύση του πυρηνόφιλου (**Σχήμα 2.11**).⁹⁰



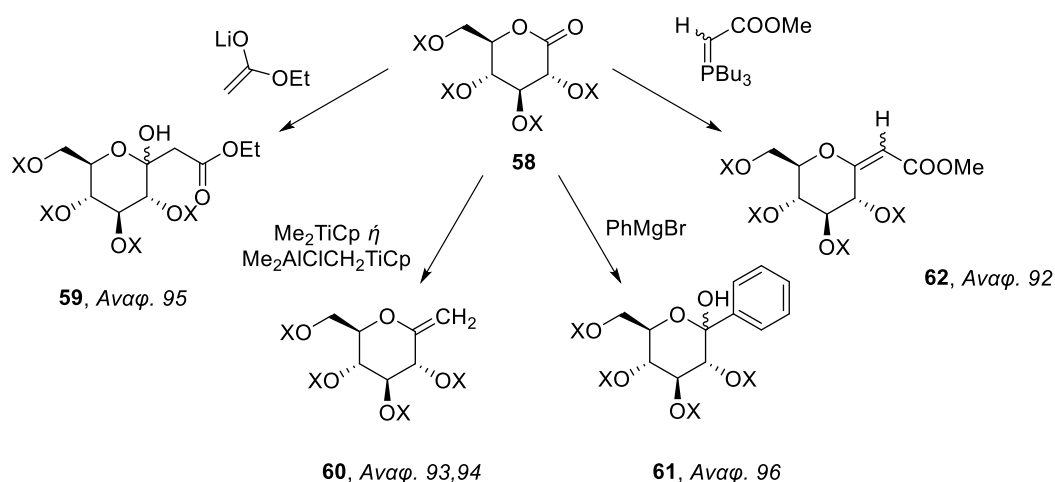
Σχήμα 2.11: Διάνοιξη εποξειδικού δακτυλίου από οργανομεταλλικά παράγωγα.⁹⁰

Έτσι, η χρήση Lewis όξινων, μαλακών οργανομεταλλικών ενώσεων (οργανοψευδαργυρικές, οργανοαργιλιακές, οργανοζirkονιακές, οργανοτιτανιακές και βορονικά παράγωγα), με ή χωρίς προσθήκη οξέος Lewis βιβλιογραφικά οδηγεί στον σχηματισμό κυρίως α-γλυκοζιτών, πιθανότατα ακολουθώντας S_N1 μηχανισμό, ενώ οργανολιθιακές και οργανομαγνησιακές ενώσεις φαίνεται να ευνοούν τον σχηματισμό β-γλυκοζιτών. Μια ενδιαμέση περίπτωση αποτελούν τα αντιδραστήρια τύπου Gilman που η στεreoχημική έκβαση διαφέρει κατά περίπτωση. Οι συγκεκριμένες συνθέσεις δεν έχουν εφαρμοστεί ευρέως για αρωματικά υποστρώματα στη βιβλιογραφία. Ενδιαφέρον παράδειγμα αποτελεί ένα (ιδιαίτερα εκτενές) δίπλωμα ευρεσιτεχνίας το οποίο πραγματεύεται τη σύνθεση εμπορικών γλιφλοζινών μέσω εποξειδίων σακχάρων.⁹¹



Σχήμα 2.12: Σύνθεση του φαρμάκου Ipragliflozin μέσω εποξειδίου της γλυκόζης.⁹¹

Τα ευρύτερα χρησιμοποιούμενα ηλεκτρονιόφιλα αποτελούν οι λακτόνες των αντίστοιχων μονοσακχαριτών. Η δ-λακτόνη της D-γλυκόζης (**58**) έχει αναφερθεί να αντιδρά με μια σειρά από πυρηνόφιλα (**Σχήμα 2.13**). Περιγράφονται έτσι συνθέσεις λακτονών με οργανοφωσφορικά αντιδραστήρια (Wittig)⁹² και αντιδραστήρια τύπου τιτανοκενίου (Tebbe,⁹³ Petassis,⁹⁴ ενολικά ανιόντα - αντιδράσεις συμπύκνωσης Claisen)⁹⁵ κι οργανολιθιακά και οργανομαγνησιακά ενδιάμεσα.⁹⁶

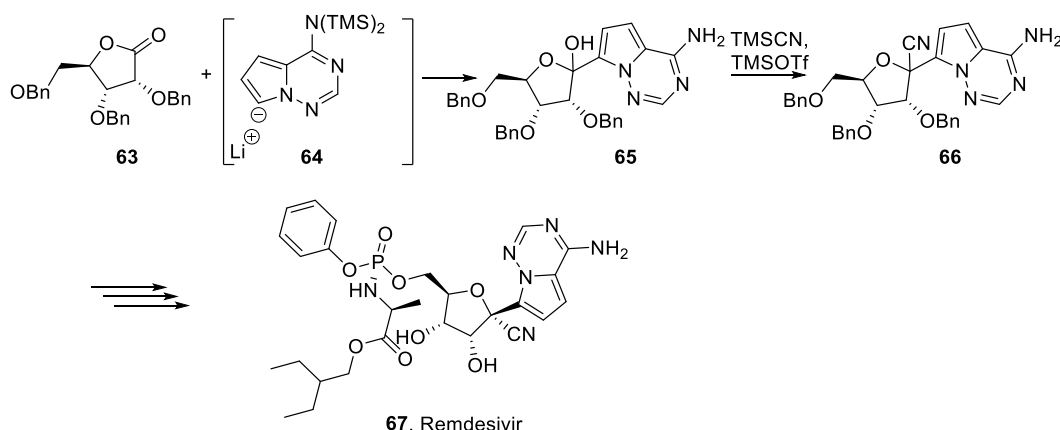


Σχήμα 2.13. Παραδείγματα προσθήκης αντιδραστηρίων Wittig⁹², αντιδραστήρια τύπου τιτανοκενίου^{93,94} ενολικών ανιόντων⁹⁵ και αντιδραστηρίων Grignard σε προστατευμένη D-γλυκονο-δ-λακτόνη.⁹⁶

Ειδικά μέσω οργανολιθιακών αντιδραστηρίων και αντιδραστηρίων Grignard μπορούν να προστεθούν πολύπλοκα αλειφατικά ή αρωματικά συστήματα, με μοναδική προϋπόθεση τη συμβατότητά τους με τη μεταλλίωση. Μπορούν έτσι να εφαρμοστούν σχήματα συγκλίνουσας σύνθεσης, αυξάνοντας σημαντικά τον αριθμό δυνατών παραγώγων.

Ένα παράδειγμα εφαρμογής αυτού του σχήματος στη νουκλεοζιτική χημεία αποτελεί η σύνθεση του remdesivir (**67**, **Σχήμα 2.14**),⁹⁷ αντιικού φαρμάκου το οποίο έχει γνωρίσει πρόσφατα ιδιαίτερη δημοσιότητα λόγω της αποτελεσματικότητάς του ενάντια στην παρούσα πανδημία του νέου κορωνοϊού SARS-COV-2. Εδώ η ενδιάμεση ημιακετάλη **65** υποβάλλεται πρακτικά σε συνθήκες κλασικής γλυκοζυλίωσης, όπου το ανωμερικό υδροξύλιο μετατρέπεται σε νιτρίλιο. Εμφανές μειονέκτημα σε σχέση με τις πυρανόζες

αποτελεί η απουσία πρακτικά στεreoχημικού ελέγχου των αντιδράσεων, που απαιτεί δύσκολους διαχωρισμούς των σχηματιζόμενων διαστερομερών.

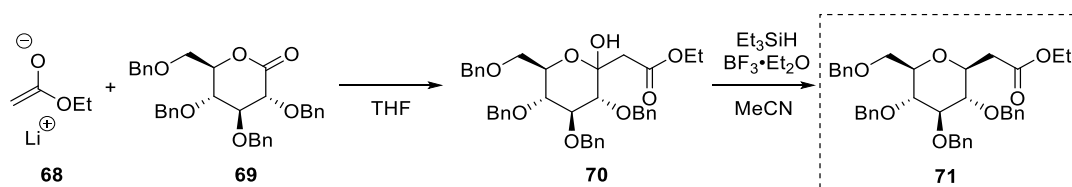


Σχήμα 2.14: Βιομηχανική σύνθεση του αντιικού φαρμάκου Remdesivir.⁹⁷

Περισσότερο συνθετικά ενδιαφέρουσες από την κατηγορία των λακτονών έχουν φανεί οι λακτόνες της κατηγορίας των πυρανοζών. Στις πυρανόζες επιδρά ισχυρά το ανωμερικό φαινόμενο, το οποίο επιτρέπει τον έλεγχο της στεreoχημείας των προϊόντων σε υψηλό βαθμό.

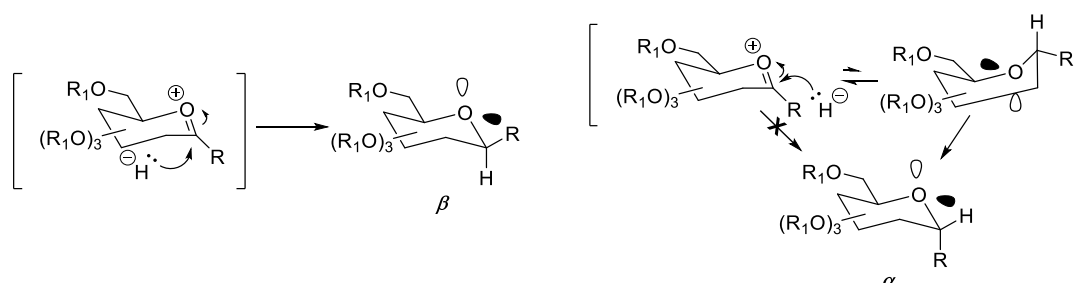
Ένα επιπλέον πλεονέκτημα της προσθήκης οργανομεταλλικών ενδιαμέσων σε λακτόνες είναι το ότι οδηγούν στον σχηματισμό ημιακεταλών, επιτρέποντας την περαιτέρω τροποποίηση του νέου C-γλυκοζίτη στην ανωμερική θέση, όπως εφαρμόζεται στο παράδειγμα του remdesivir (**Σχήμα 2.14**).

Η πιο σημαντική ίσως ανωμερική τροποποίηση, αποτελεί η απομάκρυνση, μέσω αναγωγής, του ανωμερικού υδροξυλίου. Μία εργασία-σταθμός στη C-γλυκοζιτική χημεία αποτελεί η εργασία των Lewis και Kishi.⁹⁵ Οι ερευνητές πραγματοποίησαν σύζευξη της βενζυλιωμένης D-γλυκονο-δ-λακτόνης **69** με ενολικό ανιόν οξικού αιθυλεστέρα (**Σχήμα 2.15**). Στη συνέχεια, επέδρασαν στην ενδιάμεση ακετάλη με Et_3SiH με $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$. Παράχθηκε έτσι το προϊόν **71**, αποκλειστικά με β-στεreoχημεία.



Σχήμα 2.15: Πρώτο παράδειγμα προσθήκης σε D-γλυκονο-δ-λακτόνη, ακολουθούμενο από αναγωγή του ανωμερικού οξυγόνου.⁹⁵

Η β-στερεοεκλεκτικότητα της αναγωγής, όπως και η γλυκοζυλίωση άλλωστε, βασίζεται στο ανωμερικό φαινόμενο, το οποίο παρατηρείται και στην κλασική γλυκοζυλίωση. Το βασικό ενδιάμεσο στάδιο της αναγωγής περιλαμβάνει τον σχηματισμό του αντίστοιχου κατιόντος οξωνίου, στο οποίο τελικά προστίθεται το πυρηνόφιλο ανιόν υδριδίου (**Σχήμα 2.16**). Ο σχηματισμός προϊόντος β-στερεοχημείας απαιτεί την προσβολή του ανιόντος υδριδίου από το κάτω επίπεδο του δακτυλίου έτσι ώστε στη μεταβατική κατάσταση να σταθεροποιείται ηλεκτρονιακά στην αξονική θέση. Για να τηρηθεί αυτό κατά τον σχηματισμό του α-ανωμερούς, η μεταβατική κατάσταση θα έπρεπε να προκύπτει μετά από την ενεργειακά απαιτητική αλλαγή διαμόρφωσης σε λουτήρα.⁹⁸



Σχήμα 2.16: Στερεοηλεκτρονικός έλεγχος στις αντιδράσεις μεταφοράς υδριδίου σε κυκλικά ιόντα οξωνίου, σύμφωνα με τους Deslongchamps *et al.*⁹⁸

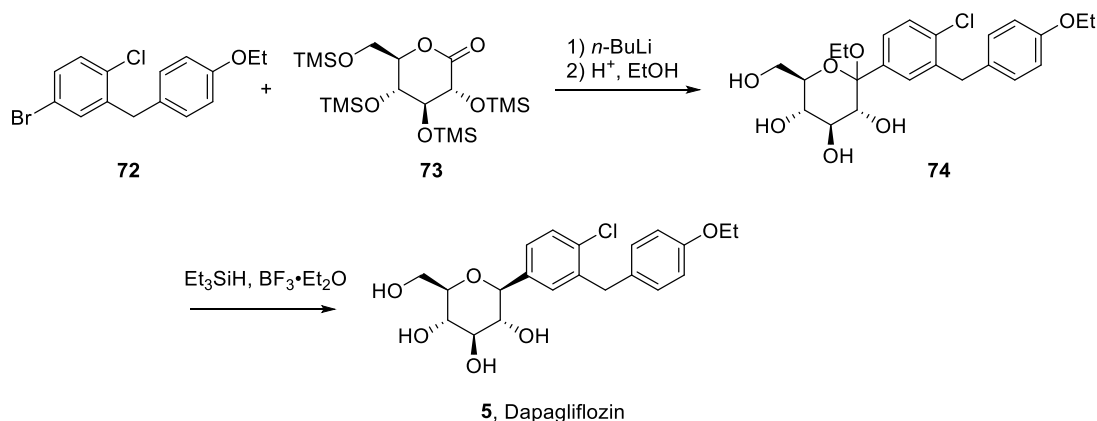
Ο όγκος των προστατευτικών ομάδων έχει βρεθεί ότι ευνοεί τη β-εκλεκτικότητα της αναγωγής, με τον όγκο της προστατευτικής ομάδας να ευνοεί τον σχηματισμό β-προϊόντων, πιθανότατα διότι δυσχεραίνεται ακόμη περισσότερο ο σχηματισμός δομής λουτήρα.⁹⁹ Στην περίπτωση της αναγωγής από σιλάνιο, το ανωμερικό φαινόμενο είναι τόσο ισχυρό ώστε ακόμη και η γειτονική υποβοήθηση από ακυλο-προστατευτικές ομάδες η οποία συνήθως οδηγεί σε ισημερινή προσβολή και χρησιμοποιείται συχνά στην κλασική γλυκοζυλίωση, δεν οδηγεί σε ισημερινή υποκατάσταση.¹⁰⁰

Οι Kraus και Molina λίγα χρόνια αργότερα γενίκευσαν τη μέθοδο, δείχνοντας ότι οι συνθήκες είναι συμβατές με μια σειρά από αρωματικά συστήματα, εγκαθιδρύοντας έτσι ένα νέο, γενικό και στιβαρό συνθετικό σχήμα για την εκλεκτική σύνθεση β-C-γλυκοζιδίων.⁹⁶ Πέρα από την αξιοσημείωτη στερεοεκλεκτικότητα έναντι άλλων μεθόδων, η μεσολάβηση του

οργανομεταλλικού παραγώγου επέτρεψε τη γενίκευση της C-γλυκοζυλίωσης σε ηλεκτρονικά ελλειμματικά υποστρώματα.

Η ίδια μέθοδος τα επόμενα χρόνια εφαρμόστηκε ευρέως σε μια σειρά γενικών συνθέσεων, όπως και στην ολική σύνθεση φυσικών προϊόντων.⁷⁴

Το ενδιαφέρον της βιομηχανίας οδήγησε σε σημαντική διερεύνηση στην αξιοποίηση του σχήματος. Έτσι, για παράδειγμα έχει διερευνηθεί η σημασία των οξέων που χρησιμοποιούνται,¹⁰¹ ο ρόλος των προστατευτικών ομάδων και του σιλανίου επί του στερεοχημικού αποτελέσματος, όπως φυσικά και η μελέτη παραγόντων οι οποίοι επηρεάζουν την καθαρότητα των βημάτων. Μεγαλύτερη καινοτομία αποτελεί η εισαγωγή σχημάτων προσωρινής προστασίας τα οποία βασίζονται στη χρήση σιλυλιωμένης D-γλυκονο-δ-λακτόνης. Η βενζυλιωμένη D-γλυκονο-δ-λακτόνη **69** που στον τομέα της έρευνας χρησιμοποιείται ευρύτατα, είναι χημικά ασταθής, όπως και ιδιαίτερα ακριβή εμπορικά καθότι η σύνθεσή της από D-γλυκοπυρανόζη απαιτεί 6 βήματα. Η τριμεθυλοσίλυλο-λακτόνη **73** αντίθετα συντίθεται σε ένα βήμα από εμπορικά διαθέσιμη και ιδιαίτερα φτηνή D-γλυκονο-δ-λακτόνη. Αποτελεί το βασικό αρχικό αντιδραστήριο για τη σύνθεση φαρμακευτικά σημαντικών μορίων, όπως είναι το Dapagliflozin (**Σχήμα 2.17**).¹⁰²

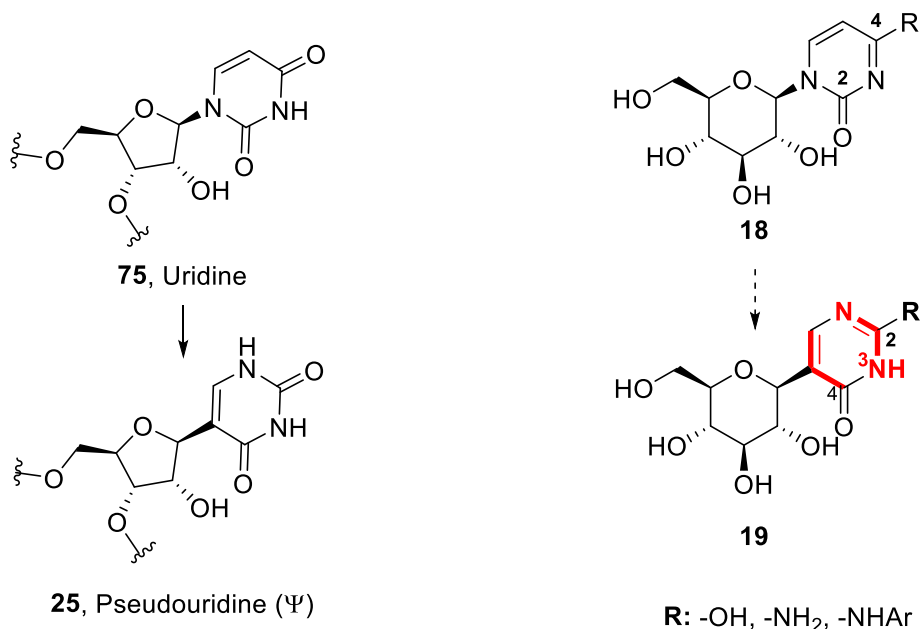


Σχήμα 2.17: Βιομηχανική σύνθεση του Dapagliflozin.¹⁰²

2.1.3 Σχεδιασμός και πρώτες προσπάθειες σύνθεσης C-γλυκοπυρανοζιτικών αναστολέων της GP

Μετά την πολυετή εργασία της ομάδας μας στη σύνθεση N^2 -αρυλοϋποκατεστημένων N^1 -β-D-γλυκοπυρανοζυλο-κυτοσινών με ανασταλτική δράση επί του καταλυτικού κέντρου της GP (Ενότητα 1.3), η αναζήτηση υδρολυτικά σταθερών αναλόγων αποτέλεσε φυσική συνέχεια της έρευνας. Το παρόν κεφάλαιο της διατριβής αποτελεί συνέχεια εργασίας που ξεκίνησε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης του συγγράφοντα. Στόχος είναι η σύνθεση νέων, σταθερών αναστολέων, με βελτιωμένο φαρμακολογικό προφίλ και δράση τόσο *in vitro*, αλλά φυσικά και στο *in vivo* περιβάλλον.

Βασική πηγή έμπνευσης αποτέλεσε ο φυσικός, τροποποιημένος νουκλεοζίτης ψευδοουριδίνη (**25**, **Εικόνα 2.2**), ο οποίος προκύπτει στα έμβια συστήματα από απευθείας ισομερείωση νουκλεοτιδίων ουριδίνης στις αλυσίδες των διαφόρων ειδών RNA, υπό την επίδραση εξειδικευμένων ενζύμων, των Ψ-συνθασών (Ενότητα 2.1.1). Σχεδιάστηκε ένας αριθμός C-γλυκοπυρανόζυλο αναλόγων αναστολέων με δομή N-γλυκοζίτη που είχαν συντεθεί μέχρι τώρα από την ομάδα μας, μιμούμενοι τη δομική διαφοροποίηση ουριδίνης- ψευδοουριδίνης (**Εικόνα 2.2**).



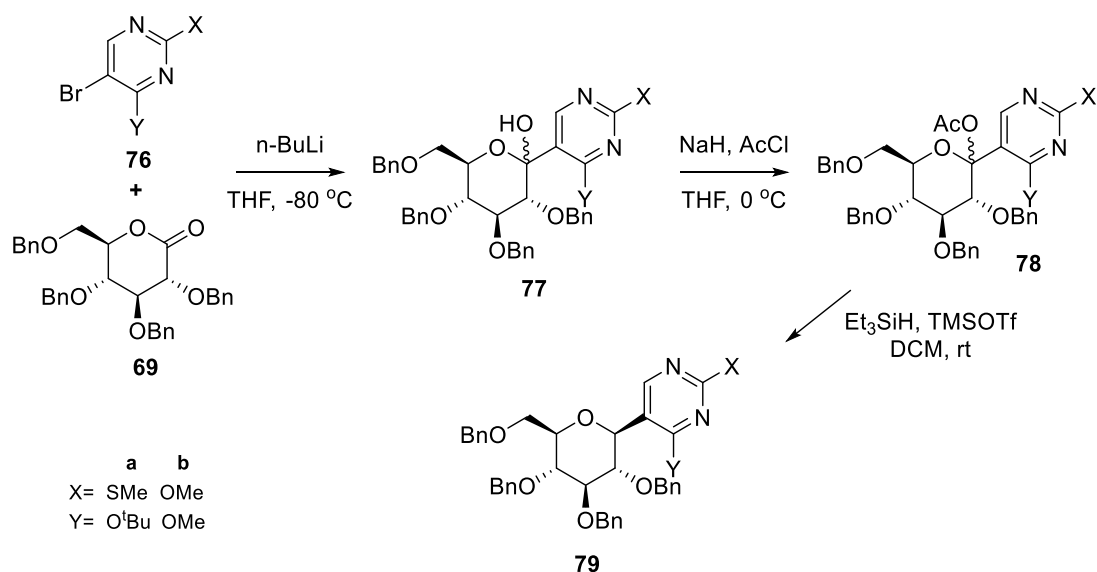
Εικόνα 2.2: Πρωταρχικός σχεδιασμός για σύνθεση C-γλυκοπυρανοζυλο-κυτοσινών.

Η μετατροπή του *N*-γλυκοζιτικού δεσμού στα παράγωγα με γενική δομή **18** σε έναν σταθερό δεσμό C-C, με την “περιστροφή” του πυριμιδινικού δακτυλίου κατά 180°, ώστε να προκύψουν παράγωγα της γενικής μορφής **19**.

Πλεονέκτημα αυτής της αλλαγής είναι ότι η συνολική δομική διαφοροποίηση είναι μικρή, με αποτέλεσμα να διατηρείται η πλειοψηφία των, σημαντικών για την πρόσδεση στο καταλυτικό κέντρο GP, αλληλεπιδράσεων. Πιο συγκεκριμένα, διατηρούνται στο σύνολό τους οι αλληλεπιδράσεις του σακχαρικού τμήματος, όσο και των υποκαταστατών της θέσης 2 του νέου πυριμιδινικού δακτυλίου (θέση 4 στους *N*-γλυκοζίτες). Διατηρείται επίσης η ιδιαίτερα σημαντική αλληλεπίδραση καρβονυλίου της θέσης 2 (θέση 4 στο νέο σύστημα), το οποίο συμμετέχει σε δεσμό υδρογόνου με τη Leu136 του καταλυτικού κέντρου (**Εικόνα 4.13**), κι έχει αποδειχθεί κρίσιμη για την επιτυχή πρόσδεση. Οι μικρές αλλαγές στις αλληλεπιδράσεις van der Waals που προκύπτουν από την αντικατάσταση της ομάδας μεθυνίου από ένα άτομο αζώτου στις ενώσεις **19**, δεν αναμενόταν να επηρεάσουν σημαντικά την ικανότητα πρόσδεσης των νέων ενώσεων (Ενότητα 4.1.1).

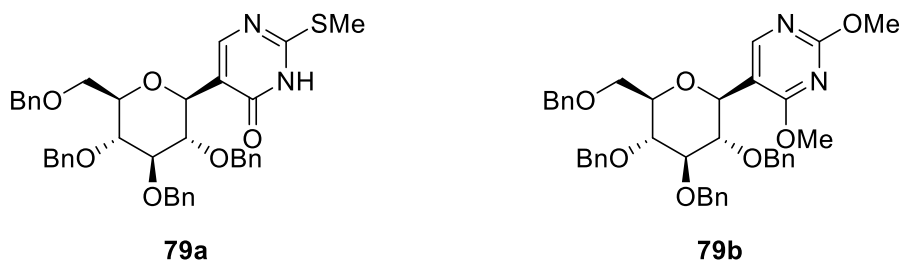
Προχωρήσαμε στη σύνθεση, εφαρμόζοντας το ίσως πιο διαδεδομένο σχήμα β-C-γλυκοζυλίωσης και συγκεκριμένα την προσθήκη σε λακτόνη ακολουθούμενη από αναγωγή (Ενότητα 2.1.2.4). Η μέθοδος επιλέχτηκε τόσο λόγω της συμβατότητάς της με ηλεκτρονικά ελλειματικά πυρηνόφιλα όπως είναι οι πυριμιδίνες, όπως επίσης και λόγω του αναμενόμενου β-στερεοχημικού αποτελέσματος, που είναι απαραίτητο για την πρόσδεση των νέων μορίων στο καταλυτικό κέντρο της GP.

Η πορεία (**Σχήμα 2.18**) ξεκινά με την αντίδραση ενός κατάλληλου, προστατευμένου πυριμιδινικού παραγώγου τύπου **76** με *n*-βουτυλολίθιο προς σχηματισμό της αντίστοιχης οργανολιθιακής ένωσης, η οποία στη συνέχεια αφήνεται να αντιδράσει με την προστατευμένη D-γλυκονο-δ-λακτόνη **69**.



Σχήμα 2.18: Γενικό συνθετικό σχήμα C-γλυκοπυρανοζυλο-πυριμιδινών

Ήδη από τις πρώτες προσπάθειες έγινε εμφανής η χαμηλή δραστηριότητα των ενδιάμεσων **77** στις συνθήκες αναγωγής της βιβλιογραφίας με συνδυασμό οργανοσιλανίου / οξέος Lewis. Ως λύση βρέθηκε ότι η ακετυλίωση του υδροξυλίου αυξάνει τη δραστηριότητά του αρκετά ώστε να αναχθεί, και οδήγησε τελικά στα προστατευμένα προϊόντα **79a** και **79b** (Εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3: C-γλυκοπυρανοζυλο-παράγωγα τα οποία έχουν παρασκευαστεί μέχρι στιγμής.

Το προϊόν **79a** συντέθηκε με σκοπό την περαιτέρω υποκατάσταση στον πυριμιδινικό δακτύλιο, με τη θειομεθυλομάδα στη θέση 2 να παίζει τον ρόλο της αποχωρούσας ομάδας που επιτρέπει την περαιτέρω παραγωγοποίηση όπως είναι η υποκατάσταση από αρυλαμίνες.

Το παράγωγο **79b** είχε παρασκευαστεί με στόχο την υδρόλυση των μεθυλομάδων προς σύνθεση της 5-β-D-γλυκοπυρανοζυλοουρακίλης. Πέρα από σημαντικό προϊόν, θα μπορούσε να λειτουργήσει ως ενδιάμεσο για

περαιτέρω παραγωγοποίηση. Η απόπειρα υδρόλυσης των μεθυλαιθέρων, ακολουθώντας βιβλιογραφικές μεθόδους, δυστυχώς αποδείχτηκε άκαρπη.

2.2 Αποτελέσματα και σχολιασμός

2.2.1 Στόχοι της διατριβής στη σύνθεση C-γλυκοζιδίων

Η εργασία στη σύνθεση C-γλυκοζιδίων η οποία περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα, ήταν πολλά υποσχόμενη κι απέδειξε τη δυνατότητα σύνθεσης C-γλυκοπυρανοζυλο-πυριμιδινών. Δεν είχαν συντεθεί ωστόσο τελικά, αποπροστατευμένα μόρια ώστε να μελετηθούν ως προς τη δράση τους ως δυνάμει αναστολείς της GP, ενώ δεν πραγματοποιήθηκαν προσπάθειες παραγωγοποίησης του πυριμιδινικού δακτυλίου.

Τον βασικότερο από τους στόχους της παρούσας διατριβής, αποτέλεσε η συνολική βελτιστοποίηση και επέκταση του συνθετικού σχήματος, ώστε να παρασκευαστεί ένας αριθμός νέων αναστολέων της GP, σε ικανές ποσότητες ώστε να επιτραπεί ο πλήρης χαρακτηρισμός και η διεξοδική κινητική, κρυσταλλογραφική και *in vivo* μελέτη της νέας οικογένειας ενώσεων.

Κάθε βήμα της μέχρι στιγμής σύνθεσης (**Σχήμα 2.18**) μελετήθηκε διεξοδικά. Παράλληλα με την προσπάθεια απλοποίησης του συνολικού σχήματος, πραγματοποιήθηκαν προσπάθειες βελτίωσης σε κάθε ένα από τα γνωστά βήματα, τόσο σε απόδοση όσο καθαρότητα των ενδιαμέσων. Επιχειρήθηκε επίσης η επίλυση προβλημάτων επαναληψιμότητας στα επιμέρους βήματα, κι ειδικότερα στο κρίσιμο στάδιο της ανωμερικής ακετυλίωσης και αναγωγής.

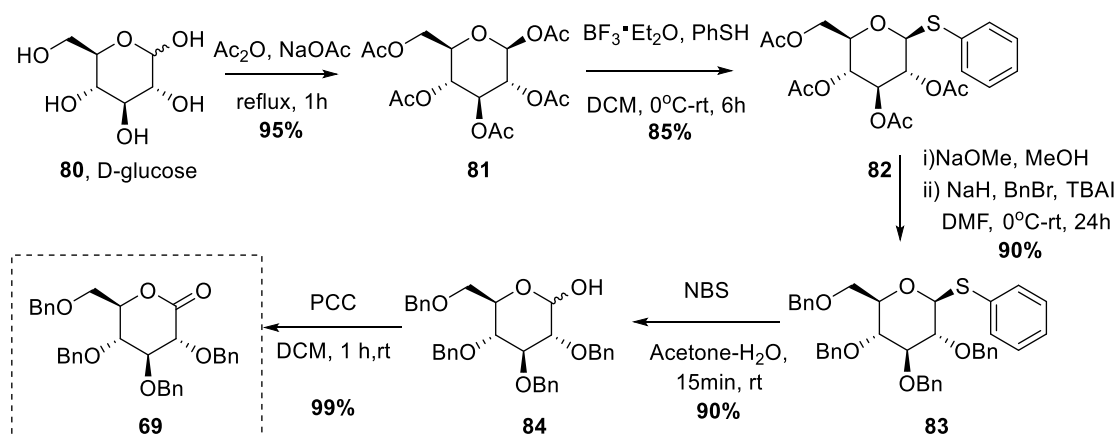
Μετά την ολοκλήρωση της μελέτης, η μεθοδολογία επεκτάθηκε στην υποκατάσταση του δακτυλίου από αρυλαμίνες, αξιοποιώντας κι εξελίσσοντας τη μέχρι τώρα ερευνητική εργασία της ομάδας μας με τελικό στόχο τη σύνθεση ισχυρών, μεταβολικά σταθερών αναστολέων της GP

Περαιτέρω, θεωρήθηκε ενδιαφέρον να εξεταστεί η γενικότητα του σχήματος σε έναν αριθμό πυριμιδινών. Επιχειρήθηκε τέλος η σύνθεση ενδιαμέσων τα οποία θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε ανωμερικά *spiro*-παράγωγα.

2.2.2 Το σακχαρικό τμήμα

Ως αρχικό σακχαρικό τμήμα χρησιμοποιήθηκε η 2,3,4,6-τετρα-Ο-βενζυλο-D-γλυκονο-δ-λακτόνη (**69**). Η ένωση παρασκευάστηκε σε πέντε βήματα από D-γλυκόζη (**80**), ακολουθώντας βιβλιογραφικά γνωστές πορείες (**Σχήμα 2.19**).^{103–}

¹⁰⁵ Η πολυπλοκότητα της παρασκευής του συγκεκριμένου αρχικού αντιδραστήριου εξισορροπείται από τους εύκολους καθαρισμούς των ενδιάμεσων σε παρακάτω βήματα της σύνθεσης (πολλά από τα βενζυλιωμένα ενδιάμεσα είναι κρυσταλλικά), ενώ επιπλέον είναι βιβλιογραφικά γνωστό ότι η παρουσία των βενζυλομάδων υποβοηθά τη στερεοεκλεκτικότητα της αντίδρασης αναγωγής για την παραλαβή του επιθυμητού προϊόντος με β-γεωμετρία. Πράγματι, η συγκεκριμένη ένωση αποτελεί το πιο διαδεδομένο αρχικό αντιδραστήριο σε έναν μεγάλο αριθμό εργασιών στον κλάδο της χημείας των C-γλυκοζιδίων.



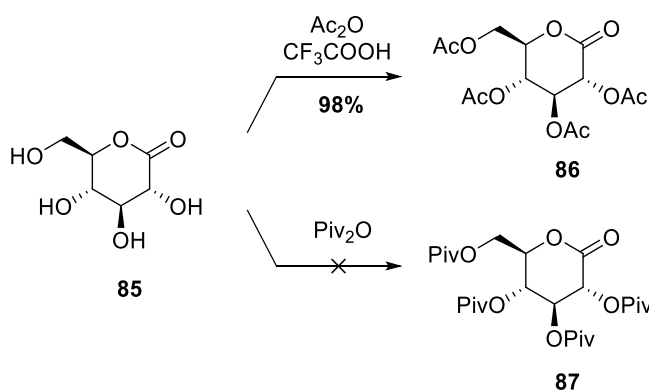
Σχήμα 2.19: Σύνθεση 2,3,4,6-τετρα-Ο-βενζυλο-D-γλυκονο-δ-λακτόνης

Η σημαντική πολυπλοκότητα της παραπάνω σύνθεσης, έναντι της άμεσης βενζυλίωσης της D-γλυκονο-δ-λακτόνης σε ένα βήμα, προκύπτει από την ασυμβατότητα αυτής της ένωσης με βάσεις, την οποία μάλιστα σε μια περίπτωση έχει εκμεταλλευτεί η ομάδα των Williams και συνεργατών για την παρασκευή νέων πολυμερών.¹⁰⁶

Όπως θα συζητηθεί παρακάτω (Ενότητα 2.2.7.2), ένα σοβαρό μειονέκτημα, το οποίο ανέκυψε στην πορεία των δοκιμών, ήταν η αδυναμία απομάκρυνσης των βενζυλο-προστατευτικών ομάδων στο τελευταίο βήμα της σύνθεσης σε πολλές περιπτώσεις. Σε μια προσπάθεια να επιλυθεί το θέμα της αποπροστασίας, όσο

και να απλοποιηθεί η σύνθεση των αρχικών αντιδραστηρίων, επιχειρήθηκε η σύνθεση μίας σειράς από προστατευμένα παράγωγα της D-γλυκονο-δ-λακτόνης, θέτοντας ως προϋπόθεση οι χρησιμοποιούμενες προστατευτικές ομάδες να μπορούν να εγκατασταθούν σε ένα βήμα, και ιδανικά τα προστατευμένα ενδιάμεσα προϊόντα να μην απαιτούν χρωματογραφικό καθαρισμό. Σημαντικό επίσης ήταν οι προστατευτικές ομάδες να είναι συμβατές με τα μετέπειτα βήματα της σύνθεσης ή να μπορούν να ανταλλαχθούν εύκολα με άλλες ομάδες εφόσον απαιτηθεί.

Στην πορεία βελτιστοποίησης του βήματος σύζευξης της σύνθεσης, δοκιμάστηκε η αντικατάσταση των οργανολιθιακών ενδιάμεσων από τα αντίστοιχα, ηπιότερα αντιδραστήρια Grignard (Ενότητα 2.2.5). Εκμεταλλευόμενοι τη βιβλιογραφικά περιγραφόμενη συμβατότητα των αντιδραστηρίων Grignard με έναν αριθμό ηλεκτρονιόφιλων ομάδων,^{107,108} ξεκινήσαμε συνθέτοντας τη βιβλιογραφικά γνωστή 2,3,4,6-τετρα-O-ακετυλο-D-γλυκονο-δ-λακτόνη (**86**, **Σχήμα 2.20**),¹⁰⁹ υπό όξινες συνθήκες, παραλαμβάνοντας το προϊόν ποσοτικά.

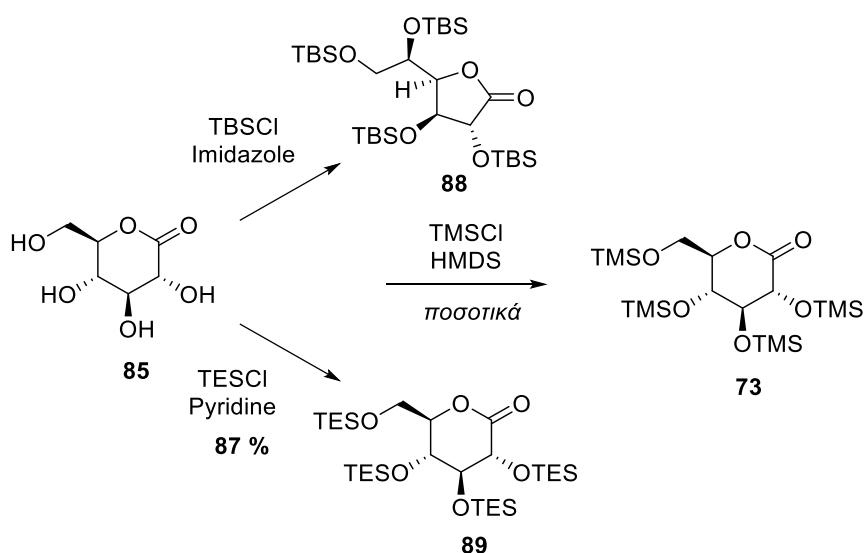


Σχήμα 2.20: Συνθέσεις ακυλιωμένων παραγώγων της D-γλυκονο-δ-λακτόνης

Επιχειρήθηκε επίσης η σύνθεση της 2,3,4,6-τετρα-O-πιβαλοϋλο-D-γλυκονο-δ-λακτόνης (**87**), με το σκεπτικό ότι η μεγάλη στερική παρεμπόδιση της πιβαλοϋλομάδας θα αύξανε τη σταθερότητα της προστατευτικής ομάδας στην επίδραση οργανομαγνησιακών ενώσεων που θα χρησιμοποιούνταν στο επόμενο βήμα της σύζευξης (Ενότητα 2.2.5). Κατά το διάστημα των δοκιμών η ένωση ήταν βιβλιογραφικά άγνωστη. Λόγω της ευαισθησίας της D-γλυκονο-δ-λακτόνης σε βασικές συνθήκες, επιχειρήθηκε η όξινα καταλυόμενη ακυλίωση.

Παρασκευάστηκε πιβαλικός ανυδρίτης,¹¹⁰ ο οποίος αφέθηκε να επιδράσει στη λακτόνη **85** παρουσία τριφθοροξικού οξέος όπως στη σύνθεση του ακετυλιωμένου παραγώγου, δυστυχώς χωρίς επιτυχία. Δοκιμάστηκε επίσης η χρήση $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, όπως επίσης και η χρήση καταλύτη υδροχλωρικού άλατος της 4-*N,N*-διμεθυλαμινοπυριδίνης.¹¹¹ Σε καμία περίπτωση δεν κατέστη δυνατή η απομόνωση κρυσταλλικού προϊόντος.

Σε συνέχεια των δοκιμών, συντέθηκαν δύο γνωστά σιλυλιωμένα παράγωγα της D-γλυκονο-δ-λακτόνης. Στα πλαίσια του μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης είχε ήδη δοκιμαστεί η σύνθεση του τετρα-(*tert*-βουτυλο-διμεθυλοσιλυλο) παραγώγου, που ωστόσο οδήγησε στον σχηματισμό προστατευμένης D-γλυκονο-γ-λακτόνης **88** (Σχήμα 2.21). Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκαν γνωστές πειραματικές πορείες για τη σύνθεση των τριμεθυλοσιλυλο-¹¹² και τριαιθυλοσιλυλο-⁹³ παραγώγων **73** και **89**.



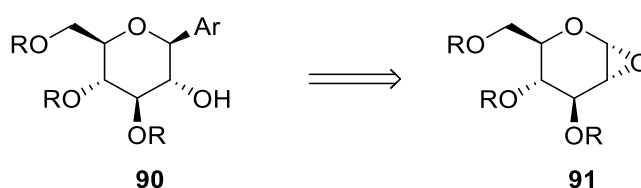
Σχήμα 2.21: Συνθέσεις σιλυλιωμένων παραγώγων της D-γλυκονο-δ-λακτόνης.

Η σύνθεση των παραγώγων **73** και **89** προχώρησε σε ιδιαίτερα ικανοποιητικές αποδόσεις, ενώ ο καθαρισμός και των δύο περιλαμβάνει καταβύθιση των παραπροϊόντων με πεντάνιο, διήθηση και στη συνέχεια απόσταξη των τελικών μορίων υπό κενό.

Το παράγωγο **73** αρχικά σχεδιάστηκε να ενταχθεί σε ένα σχήμα προσωρινής προστασίας, με απομάκρυνση και αντικατάσταση των ομάδων αμέσως μετά το βήμα της οργανομεταλλικής σύζευξης, ενώ το παράγωγο **89** αναμενόταν να

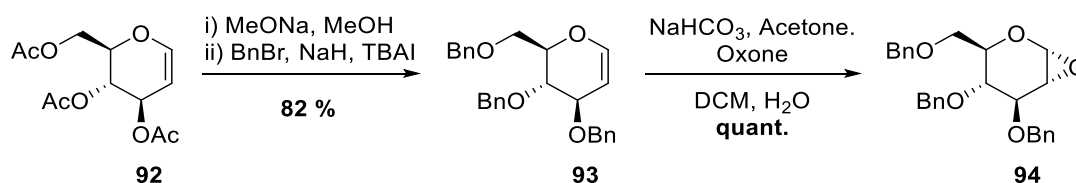
είναι σημαντικά σταθερότερο. Σημειώνεται ότι η 2,3,4,6-τετρα-Ο-τριμεθυλοσιλυλο-D-γλυκονο-δ-λακτόνη (**73**) χρησιμοποιείται ευρύτατα από τη βιομηχανία, συχνά για τη σύζευξη με πολύπλοκα αρωματικά συστήματα (πχ η σύνθεση των γλιφλοζινών, Ενότητα 2.1.2.4). Το τριαιθυλοσιλυλοπαράγωγο **89** αντίθετα δεν έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως.

Τέλος, αποφασίστηκε να δοκιμαστεί η χρήση εποξειδίων της γλυκόζης ως ηλεκτρονιόφιλων για την οργανομεταλλική σύνθεση. Με βάση παραδείγματα της βιβλιογραφίας (Ενότητα 2.1.2.4), οργανομεταλλική σύζευξη της πυριμιδίνης με το κατάλληλο εποξείδιο **91** (**Εικόνα 2.4**), θα μπορούσε να οδηγήσει απευθείας στη σύνθεση του επιθυμητού β-γλυκοζίτη **90**. Παρακάμπτονται έτσι τα βήματα ακετυλίωσης και αναγωγής (**Σχήμα 2.18**) τα οποία είναι απαραίτητα όταν χρησιμοποιείται D-γλυκονο-δ-λακτόνη ως ηλεκτρονιόφιλο. Τα βήματα αυτά, όπως περιγράφεται και παραπάνω, προσθέτουν πειραματική πολυπλοκότητα και εμφάνιζαν προβλήματα επαναληψιμότητας.



Εικόνα 2.4: Απευθείας γλυκοζυλίωση με χρήση εποξειδίου.

Η σύνθεση ξεκίνησε από την εμπορικά διαθέσιμη 2,3,4,6-τετρα-Ο-ακετυλο-D-γλυκάλη (**92**, **Σχήμα 2.22**). Μετά από αλλαγή της προστασίας σε βενζυλομάδες είναι απαραίτητη η οξείδωση του διπλού δεσμού προς το αντίστοιχο εποξείδιο **94**. Είναι βιβλιογραφικά γνωστό ότι η χρήση διμεθυλοξιρανίου (DMDO) υπερτερεί του πιο κλασικού 3-χλωρο-υπερβενζοϊκού οξέος (m-CPBA) στη στερεοεκλεκτικότητα της συγκεκριμένης αντίδρασης, καθότι στην περίπτωση του DMDO παραλαμβάνεται μονάχα το α-εποξείδιο **94**.



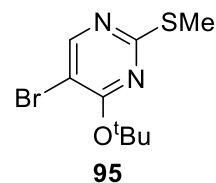
Σχήμα 2.22: Σύνθεση εποξειδίου από D-γλυκάλη

Δοκιμάστηκε τόσο η οξείδωση με διάλυμα DMDO, όσο και η οξειδωση σε διφασικό διάλυμα με *in situ* σχηματισμό DMDO, πρωτοκόλλου σημαντικά απλούστερου και οικονομικότερου σε κατανάλωση οξειδωτικού.¹¹³ Και στις δύο περιπτώσεις σχηματίστηκε αποκλειστικά το επιθυμητό α-εποξειδίο **94** σε ποσοτική απόδοση.

2.2.3 Το πυριμιδινικό τμήμα

Ως πυριμιδινικό τμήμα, όπως και στη μέχρι τώρα εργασία, χρησιμοποιήθηκαν μία σειρά από κατάλληλα υποκατεστημένα παράγωγα ουρακίλης.

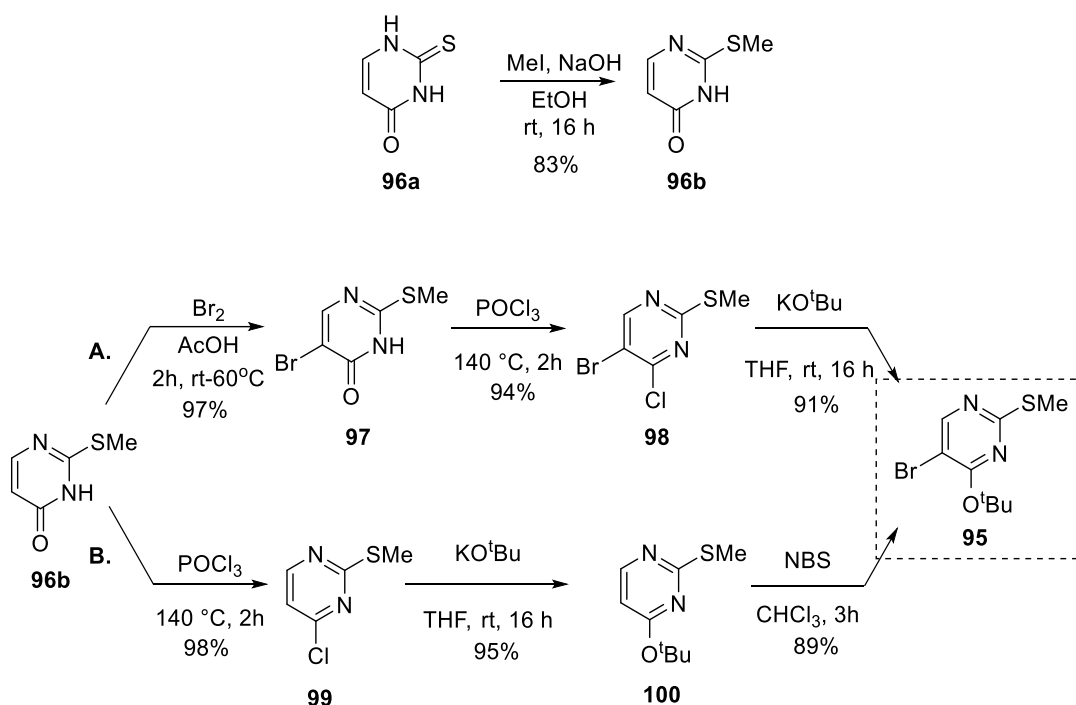
Τα πιο ενδιαφέροντα από συνθετικής άποψης παράγωγα βασίζονται στην πυριμιδίνη **95** (Εικόνα 2.6). Η μεθυλίωση του ατόμου του θείου στη θέση 2 του δακτυλίου, πέρα από την προστασία του από τις συνθήκες της οργανομεταλλικής σύζευξης, έχει ως σκοπό την εγκατάσταση μιας καλώς αποχωρούσας ομάδας, η οποία σε παρακάτω στάδια της σύνθεσης θα επιτρέψει την περαιτέρω παραγωγοποίηση του δακτυλίου.



Εικόνα 2.5: 5-Βρωμο-2-θειο-μεθυλο-4-tert-βουτοξυ-πυριμιδίνη

Η πυριμιδίνη **95** μπορεί να συντεθεί με δύο τρόπους (Σχήμα 2.23), ξεκινώντας από την 2-θειοουρακίλη (**96a**). Μέχρι στιγμής χρησιμοποιήθηκε πορεία η οποία περιλαμβάνει μεθυλίωση του ατόμου στη θέση 2,¹¹⁴ βρωμίωση της θέσης 5 με χρήση στοιχειακού βρωμίου σε οξικό οξύ,¹¹⁵ υποκατάσταση του οξυγόνου της θέσης 4 με χλώριο με χρήση οξυχλωριούχου φωσφόρου και τελικά υποκατάσταση του ατόμου χλωρίου από *tert*-βουτοξειδίο του καλίου.¹¹⁶

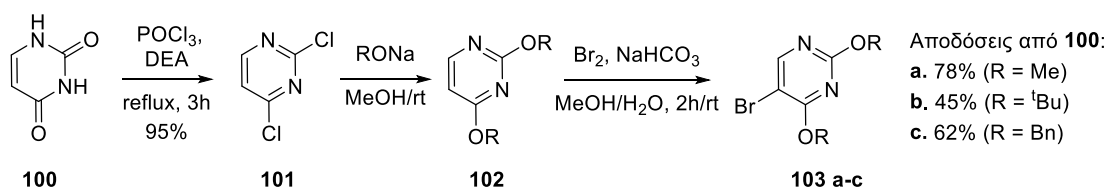
Ενώ η συγκεκριμένη σειρά αντιδράσεων χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερα ικανοποιητική συνολική απόδοση κι απαιτεί μονάχα μία απόσταση στο τελικό στάδιο για την παραλαβή αναλυτικά καθαρής 5-βρωμο-2-θειο-μεθυλο-4-*tert*-βουτοξυπυριμιδίνης (**95**), κατά την επανάληψη της σύνθεσής του έγινε εμφανής η εξαιρετικά έντονη αλλεργιογόνος δράση του ενδιαμέσου **98** (οδήγησε συγκεκριμένα σε τόσο έντονες δερματικές αντιδράσεις του συγγράφοντα που παρά φαρμακευτική θεραπεία οδήγησε σε δίμηνη διακοπή περαιτέρω πειραμάτων). Παρόμοια δράση είναι γνωστή κι από τη συγγενή 5-βρωμο-2,4-διχλωρο πυριμιδίνη.¹¹⁷



Σχήμα 2.23: Πορείες σύνθεσης της 5-βρωμο-4-*tert*-βουτοξυ-2-μεθυλοθειοπυριμιδίνης.

Το πρόβλημα επιλύθηκε αντιστρέφοντας τη σειρά των βημάτων, ώστε να παρακαμφθεί το ενδιάμεσο **98**. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε πρώτα η χλωρίωση κι εγκατάσταση της *tert*-βουτοξυ-ομάδας προς σχηματισμό του ενδιαμέσου **100**, ακολουθούμενη από βρωμίωση με χρήση *N*-βρωμοσουλφονίου, ώστε να αποκλειστεί η ταυτόχρονη παρουσία ατόμων βρωμίου και χλωρίου στα ενδιάμεσα. Ενώ οι αποδόσεις σε **95** είναι ικανοποιητικές, η μέθοδος υστερεί της αρχικής στο γεγονός ότι το προϊόν απαιτεί χρωματογραφικό καθαρισμό.

Παρασκευάστηκαν επίσης, ακολουθώντας βιβλιογραφικά γνωστές πορείες, οι πυριμιδίνες **103a-c** (Σχήμα 2.24).



Σχήμα 2.24: Σύνθεση 5-βρωμο-2,4-διαλκοξυπυριμιδινών.

Η δεύτερη σειρά παραγώγων συντέθηκε με στόχο τόσο τη διερεύνηση της γενικότητας του συνθετικού σχήματος, όπως επίσης και με στόχο να

παρασκευαστεί κάποιο παράγωγο το οποίο να μπορεί να αναχθεί χωρίς ανάγκη τροποποίησης του ανωμερικού υδροξυλίου το οποίο προκύπτει από την οργανομεταλλική σύζευξη.

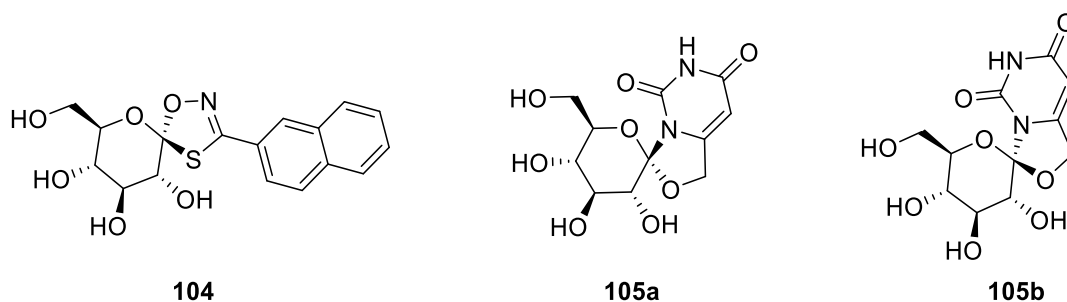
Στο τελευταίο βήμα της βρωμίωσης το στοιχειακό βρώμιο οδήγησε σε κατά πολύ καθαρότερες αντιδράσεις από το *N*-βρωμοσουλκινιμίδιο, παράλληλα ωστόσο οδηγεί σε μερική αποπροστασία των δι-*tert*-βουτυλο- και διβενζυλο- παραγώγων, αλλά οι τελικές ενώσεις καθαρίζονται με απλή απόσταξη. Η περισσότερο διαδεδομένη σύνθεση περιλαμβάνει τη χρήση 5-βρωμο-2,4-διχλωρο πυριμιδίνης, η οποία αποφεύχθηκε για τους λόγους που αναφέρονται παραπάνω.

2.2.4 Διερεύνηση εναλλακτικών συνθετικών πορειών

Κατά τη διάρκεια ανάπτυξης της μεθοδολογίας που περιγράφεται παραπάνω, αναζητήθηκαν εναλλακτικές συνθετικές μεθοδολογίες με στόχο την απλοποίηση του σχήματος μέσω περιορισμού των απαιτούμενων βημάτων ή την παράκαμψη "προβληματικών" βημάτων, όπως το βήμα της ακετυλίωσης, με επαναλήψιμες μεθόδους οι οποίες να εξασφαλίζουν υψηλές αποδόσεις κι ιδανικά να μην περιλαμβάνουν πολύπλοκους χρωματογραφικούς καθαρισμούς.

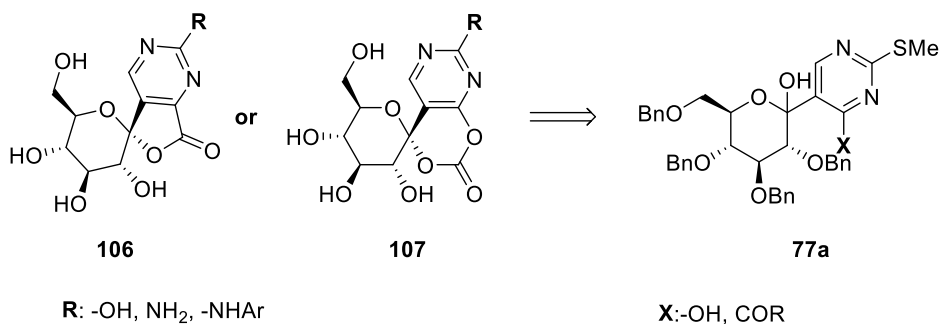
2.2.4.1 *Spiro*-γλυκοζίτες

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποφασίστηκε να διερευνηθεί η σύνθεση νέων *spiro*-*C*-γλυκοζιτών με πιθανή ανασταλτική δράση επί του καταλυτικού κέντρου της GP. Στη βιβλιογραφία είναι πράγματι γνωστά *spiro*-γλυκοζιτικά μόρια με ανασταλτική δράση επί της GP, τόσο από εργασίες άλλων ομάδων (**104**, Εικόνα 2.6),¹¹⁸ όσο και από την ερευνητική δραστηριότητα της ομάδας μας (**105a** και **b**).¹¹⁹



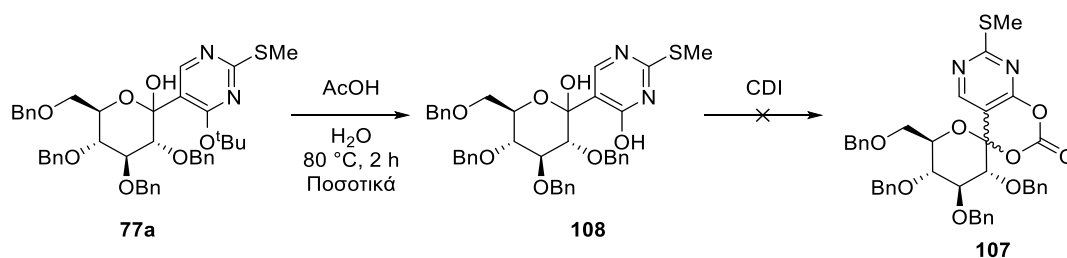
Εικόνα 2.6: Αναστολείς της GP με δομή C-spiro-γλυκοζίτη.^{118,119}

Η παρουσία του ανωμερικού υδροξυλίου το οποίο προκύπτει από το βήμα της οργανομεταλλικής σύζευξης αποτελεί χρήσιμη ομάδα για περαιτέρω χημικές τροποποιήσεις, όπως φαίνεται και σε παραδείγματα της βιβλιογραφίας (Ενότητα 2.1.2.4). Σχεδιάστηκε έτσι μια σειρά πιθανών ενώσεων, διατηρώντας πάντα την επιλογή της περαιτέρω παραγωγοποίησης της θέσης 2 του πυριμιδινικού δακτυλίου (**Εικόνα 2.7**).



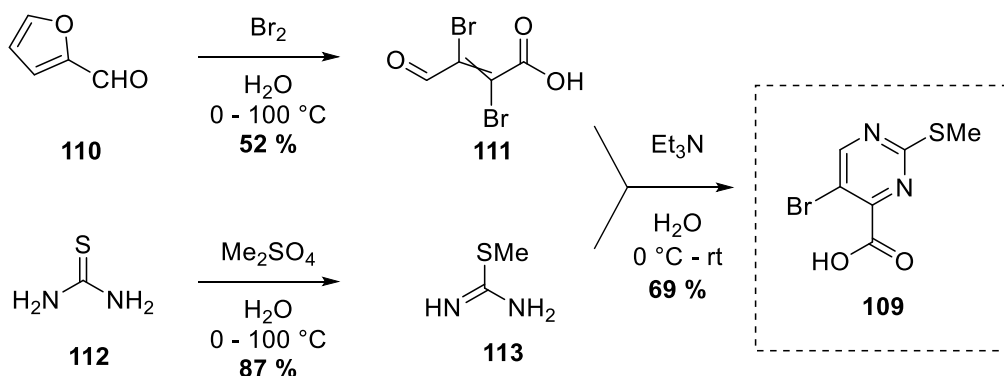
Εικόνα 2.7: Πιθανοί spiro-C -γλυκοζίτες ως συνθετικοί στόχοι.

Η αρχή έγινε με την αποπροστασία του πυριμιδινικού οξυγόνου 4 του γλυκοζίτη **77**, που επιτεύχθηκε ποσοτικά υπό την επίδραση υδατικού οξικού οξέος (**Σχήμα 2.25**). Στη συνέχεια, το προϊόν **108** αφέθηκε να αντιδράσει με καρβονυλοδιιμαδαζόλιο (CDI), στην προσπάθεια το ανωμερικό υδροξύλιο με το πυριμιδινικό οξυγόνο να κυκλοποιηθούν, σχηματίζοντας τον κυκλικό ανθρακικό εστέρα **107**.



Σχήμα 2.25: Πρώτη προσπάθεια σύνθεσης *C-spiro*-γλυκοζίτη.

Στην πράξη δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός του επιθυμητού προϊόντος. Προχωρήσαμε έτσι στη σύνθεση μίας σειράς πυριμιδινών οι οποίες πιθανόν θα επέτρεπαν τη σύνθεση *spiro*-γλυκοζιτών. Η σύνθεση ξεκίνησε με τη βιβλιογραφικά γνωστή 5-βρωμο-2-μεθυλοθειο-4-καρβοξυπυριμιδίνη **109** (Σχήμα 2.26). Η ένωση **109** παρουσιάζει όλα τα επιθυμητά χαρακτηριστικά για τους σκοπούς της διατριβής. Η διευθέτηση του δακτυλίου, του ατόμου βρωμίου και της μεθυλοθειο-ομάδας μιμείται την πυριμιδίνη-κλειδί **95**. Η καρβοξυλομάδα η οποία υποκαθιστά το άτομο οξυγόνου της θέσης 4 του δακτυλίου, αποτελεί χρήσιμη ομάδα για πιθανή κυκλοποίηση με το σακχαρικό τμήμα, ενώ υπάρχει και το καρβονύλιο το οποίο είναι γνωστό από προηγούμενες μελέτες ότι είναι απαραίτητο για την ισχυρή πρόσδεση υποψήφιων αναστολέων στο καταλυτικό κέντρο της GP (Ενότητα 4.1.1).

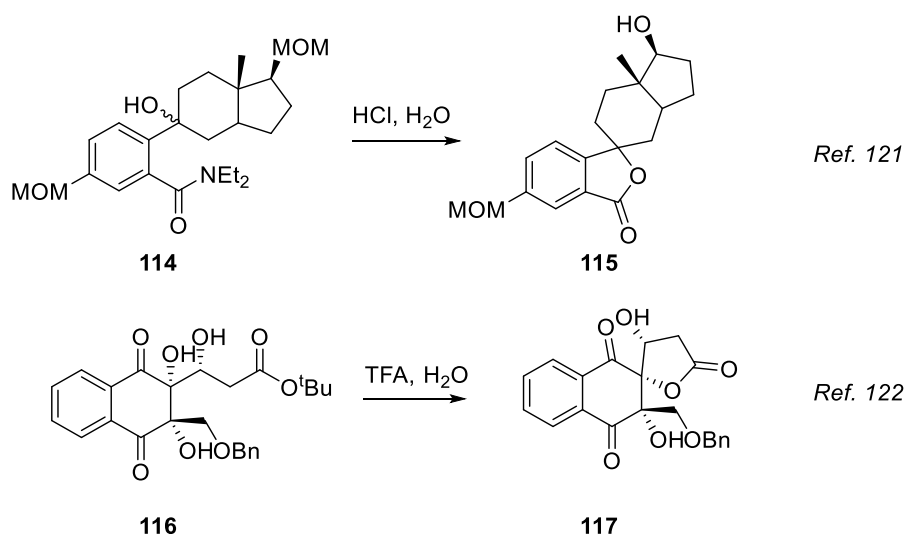


Σχήμα 2.26: Σύνθεση 5-βρωμο-2-μεθυλοθειο-4-καρβοξυπυριμιδίνης

Η σύνθεση ξεκινάει από την αντίδραση φουρφουράλης **110** με μεγάλη περίσσεια στοιχειακού βρωμίου¹²⁰ και τη μεθυλίωση θειουρίας **112** με θειικό διμεθυλεστέρα.¹²¹ Η *S*-μεθυλοθειουρία **113** στη συνέχεια αντιδρά με το μουκοβρωμικό οξύ **111** παρουσία βάσης για να σχηματιστεί τελικά η επιθυμητή πυριμιδίνη **109**.

Στη συνέχεια απαιτείται προστασία της καρβοξυλομάδας καθότι δεν είναι συμβατή με τις συνθήκες της οργανομεταλλικής σύζευξης. Επιχειρήθηκε αρχικά η ταυτόχρονη αποπρωτονίωση της καρβοξυλομάδας και την ανταλλαγή βρωμίου-μαγνησίου, χρησιμοποιώντας δύο ισοδύναμα αντιδραστήριου Turbo-Grignard, ωστόσο παραλήφθηκαν πολύπλοκα μίγματα. Η πυριμιδίνη **109** αποδείχτηκε άλλωστε εξαιρετικά δυσδιάλυτη σε αιθερικούς διαλύτες, οπότε η προστασία αναμενόταν να λύσει και αυτό το πρόβλημα.

Η κατάλληλη προστατευτική ομάδα, πέρα από τη συμβατότητα με τις συνθήκες της οργανομεταλλικής σύζευξης, σχεδιάστηκε ώστε να απομακρύνεται εύκολα ή να επιτρέπει την απευθείας κυκλοποίηση προς την επιθυμητή *spiro*-ένωση σε ένα βήμα, μέσω της επίδρασης οξέος. Στη βιβλιογραφία συναντώνται πολυάριθμες αντιδράσεις αυτού του τύπου, όπου παρόμοια ενδιάμεσα κυκλοποιούνται ενδομοριακά με γειτονικά υδροξύλια, ακόμη και σε ογκώδη συστήματα. Παραδείγματα συναντώνται τόσο για διαλκυλαμίδια,¹²² όσο και για *tert*-βουτυλεστέρες (Σχήμα 2.27).¹²³



Σχήμα 2.27: Παραδείγματα κυκλοποίησης μέσω οξέος.^{122,123}

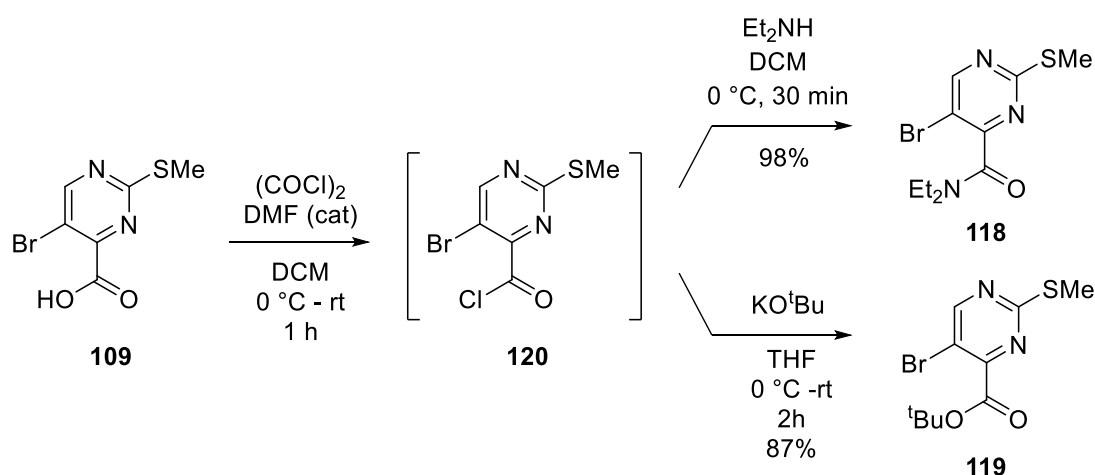
Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής διερευνήθηκε η υποκατάσταση των μέχρι τότε χρησιμοποιούμενων οργανολιθιακών ενδιάμεσων από τα αντίστοιχα αντιδραστήρια Grignard (Ενότητα 2.2.5). Πέρα από έναν αριθμό πλεονεκτημάτων που θα συζητηθούν παρακάτω, λόγω της συγκριτικά χαμηλής

τους δραστηριότητας παρουσιάζουν αυξημένη συμβατότητα με λειτουργικές ομάδες σε σχέση με τα οργανολιθιακά ενδιάμεσα.

Υπάρχουν παραδείγματα στη βιβλιογραφία όπου έχουν παρασκευαστεί οργανομαγνησιακά ενδιάμεσα από αρωματικά αλογονίδια με ομάδες όπως εστέρες¹⁰⁸ και αμίδια,¹⁰⁷ τα οποία στη συνέχεια αντιδρούν με ηλεκτρονιόφιλα σε υψηλές αποδόσεις.

Συνδυάζοντας τα δύο παραπάνω, αποφασίστηκε να πραγματοποιηθεί μετατροπή της ένωσης **109** στο αντίστοιχο διαιθυλαμίδιο **118**, όπως και στον περισσότερο παρεμποδισμένο *tert*-βουτυλεστέρα **119**, ο οποίος είναι βιβλιογραφικά γνωστός (Σχήμα 2.28).¹²⁴

Πρώτο βήμα ήταν η χλωρίωση του καρβοξυλίου της ένωσης **109** με οξαλυλοχλωρίδιο, η οποία με τη χρήση καταλυτικής ποσότητας διμεθυλοφορμαμιδίου ολοκληρώνεται σε 2 ώρες, όπως μαρτυράται από την πλήρη διαλυτοποίηση του δυσδιάλυτου στερεού που υπάρχει αρχικά. Μετά την απομάκρυνση της περίσσειας του χλωριωτικού υπό κενό, στο χλωρίδιο **120** προστέθηκε διαιθυλαμίνη ώστε να παραληφθεί, μετά από υδατική κατεργασία, πρακτικά ποσοτικά το προϊόν **118**.



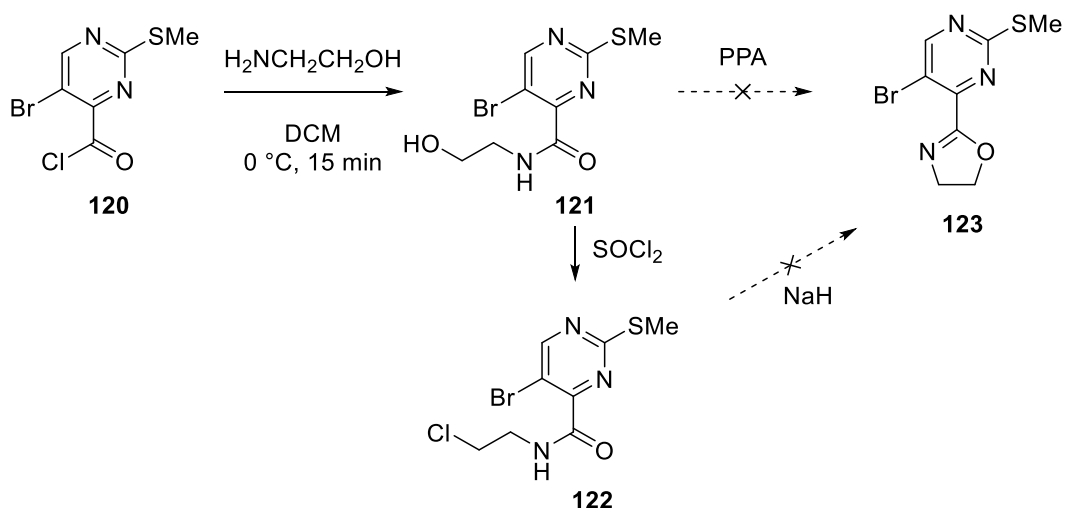
Σχήμα 2.28. Σύνθεση πυριμιδινών προς παρασκευή C-spiro-γλυκοζιδίων.

Ενώ η σύνθεση της πυριμιδίνης **119** έχει περιγραφεί βιβλιογραφικά, χρησιμοποιώντας το οξύ **109** και *tert*-βουτανόλη παρουσία EDC, η βιβλιογραφική απόδοση της τάξης του 23% ήταν μάλλον χαμηλή.¹²⁴ Επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί και εδώ το χλωρίδιο **120**, χρησιμοποιώντας ως

πυρηνόφιλο *tert*-βουτοξυκάλιο, το οποίο οδήγησε με επιτυχία στη σύνθεση του εστέρα **119** σε απόδοση 87%. Ο εστέρας παραλήφθηκε φασματοσκοπικά καθαρός μετά από υδατική κατεργασία. Σημειώνεται ότι ο εστέρας **119** αποδείχθηκε εξαιρετικά ασταθής χρωματογραφικά.

Επιχειρήθηκε, επίσης, η σύνθεση ενός προστατευμένου παραγώγου της καρβοξυλομάδας, ώστε να αυξηθεί η αντοχή του απέναντι σε οργανομεταλλικά αντιδραστήρια. Προστατευτικές ομάδες που έχουν χρησιμοποιηθεί για την προστασία καρβοξυλομάδων εν όψει οργανολιθιακών συζεύξεων αποτελεί η μέθοδος μετατροπής του καρβοξυλίου σε μια 1,3-οξαζολίνη.¹²⁵ Οι οξαζολίνες υδρολύονται ύπο όξινες συνθήκες, ενώ στη βιβλιογραφία περιγράφονται παραδείγματα όπου επίδραση οξέος παρουσία αλκοόλης οδηγεί σε άμεσο σχηματισμό του αντίστοιχου εστέρα,¹²⁶ και αυτό τις καθιστά ιδανικές για τους σκοπούς της διατριβής, καθώς η ίδια αντίδραση με το ημιακεταλικό υδροξύλιο θα μπορούσε να οδηγήσει στον επιθυμητό *spiro*-γλυκοζίτη.

Το χλωρίδιο **120** αντέδρασε ομαλά με 2-αιθανολαμίνη παρουσία τριαιθυλαμίνης, οπότε σχηματίστηκε εκλεκτικά το αμίδιο **121** (Σχήμα 2.29). Στη συνέχεια επιχειρήθηκε η κυκλοποίηση του αμιδίου **121** προς την αντίστοιχη οξαζολίνη **123**.



Σχήμα 2.29: Προσπάθειες σύνθεσης οξαζολίνης για την οργανομεταλλική σύζευξη.

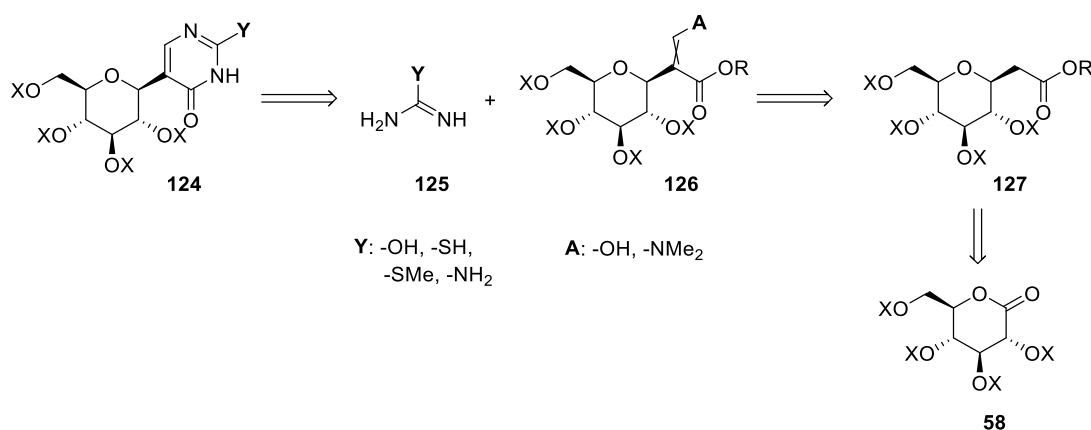
Η πιο διαδεδομένη μέθοδος για τον σχηματισμό οξαζολινών περιλαμβάνει τη χρήση θειονυλοχλωριδίου.¹²⁶ Κατά την αφυδάτωση-κυκλοποίηση, θεωρείται ότι σχηματίζεται πρώτα *in situ* το αντίστοιχο χλωρίδιο, το οποίο στη συνέχεια

κυκλοποιείται με το καρβονύλιο, σχηματίζοντας τον δακτύλιο οξαζολίνης. Στις προσπάθειες που πραγματοποιήθηκαν το μόνο προϊόν που παραλήφθηκε ήταν το χλωρίδιο **122**, το οποίο δεν κυκλοποιήθηκε, ακόμη και με προσθήκη βάσης, με την εφαρμογή θέρμανσης και παρατεταμένους χρόνους αντίδρασης. Η αδυναμία κυκλοποίησης ενισχύει την προηγούμενη θεωρία του ισχυρά ελλειμματικού ηλεκτρονιακά χαρακτήρα του καρβονυλίου, οφειλόμενου στον πυριμιδινικό δακτύλιο.

Σε μια τελευταία προσπάθεια χρησιμοποιήθηκε πολυφωσφορικό οξύ ως όξινος καταλύτης κι αφυδατικό μέσο. Ούτε με αυτή τη μέθοδο παρατηρήθηκε σχηματισμός του προϊόντος, οπότε οι προσπάθειες συνεχίστηκαν με τις πρώτες δύο πυριμιδίνες, **118** και **119**.

2.2.4.2 *De novo* σύνθεση του πυριμιδινικού δακτυλίου

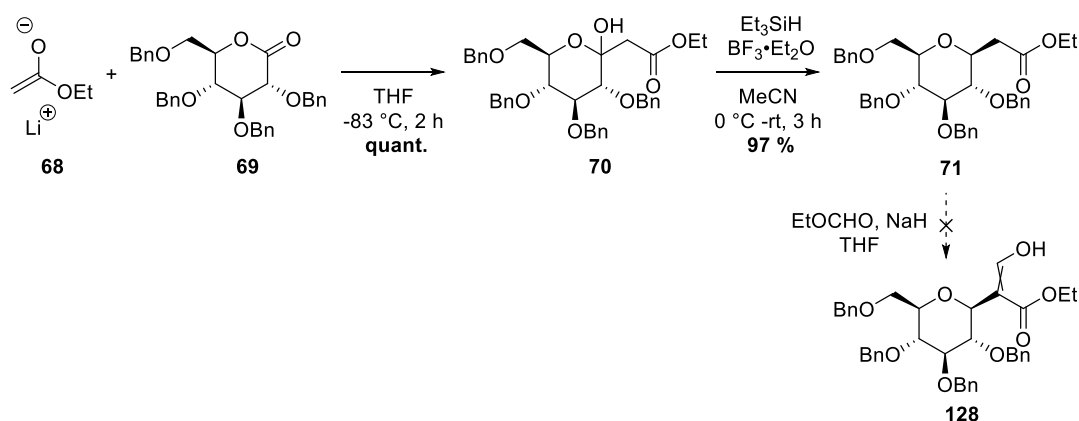
Σε μια άλλη προσέγγιση, διερευνήθηκε η δυνατότητα για τη *de novo* σύνθεση του πυριμιδινικού δακτυλίου, ως εναλλακτική στη σύζευξη του σακχαρικού τμήματος με μία πλήρη πυριμιδίνη. Αυτό θα μπορούσε να επιτευχθεί με την αντίδραση ενός ηλεκτρονιόφιλου παραγώγου τύπου **126** με ένα παράγωγο ουρίας **125**. Το παράγωγο **126** με τη σειρά του θα μπορούσε να προκύψει από ένα C-β-γλυκοζιτικό α-εστέρα **127** μέσω προσθήκης μιας ενεργοποιημένης μεθυλενομάδας (Σχήμα 2.30).



Σχήμα 2.30: Ρετροσυνθετική πορεία *de novo* σύνθεσης πυριμιδίνης.

Κυκλοποιήσεις όπως αυτή που προτείνεται στο **Σχήμα 2.30** αναφέρονται για ένα μεγάλο φάσμα ενεργοποιημένων α-μεθυλενοεστέρων. Τον ρόλο της αποχωρούσας ομάδας παίζουν συνηθέστερα υδροξυ-^{127,128} ή διμεθυλαμινομάδες.^{129,130} Για την κυκλοποίηση χρησιμοποιούνται ως πυρηνόφιλα ενώσεις όπως απλές ή υποκατεστημένες ουρίες, όπως και γουανιδίνες υποκατεστημένες από συχνά πολύπλοκα τμήματα.

Η αρχή έγινε με τη σύνθεση του ενδιάμεσου **71** (**Σχήμα 2.31**), που αποτελεί και το πρώτο υπόστρωμα που συντέθηκε επιτυχώς με τη μέθοδο σύζευξης και ανωμερικής αναγωγής μέσω σιλανίου-οξέος Lewis στη βιβλιογραφία.⁹⁵ Ενδιαφέρον είναι ότι ενώ η συγκεκριμένη ένωση περιγράφεται σε έναν αριθμό δημοσιεύσεων, σε καμία δεν υπάρχει αναλυτική συνθετική πορεία. Βασιζόμενοι στην προηγούμενη εμπειρία μας, η σύνθεση επαναλήφθηκε και οδήγησε στο ενδιάμεσο μόριο **71** ποσοτικά και χωρίς ανάγκη χρωματογραφικού καθαρισμού. Αντίθετα από την εμπειρία μας με τις πυριμιδίνες (Ενότητα 2.2.6), το ενδιάμεσο **70** ανάχθηκε εύκολα χωρίς παραγωγοποίηση του ανωμερικού υδροξυλίου, για να παραληφθεί το **71**, σε απόδοση 97% μετά από χρωματογραφικό καθαρισμό.



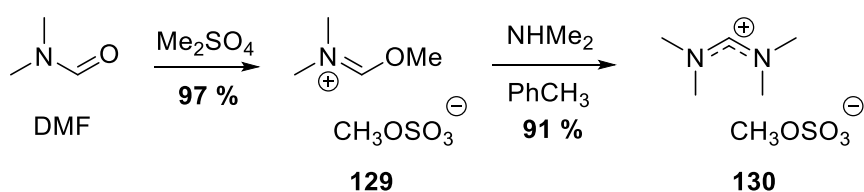
Σχήμα 2.31: Πρώτη προσπάθεια *de novo* σύνθεσης του δακτυλίου της πυριμιδίνης.

Το επόμενο βήμα ήταν η προσθήκη ενός ενεργοποιημένου μεθυλενίου στην α-θέση του εστέρα, και συγκεκριμένα μία υδροξυμεθυλενομάδα. Ο πιο διαδεδομένος τρόπος παρασκευής α-υδροξυμεθυλεστέρων είναι η φορμυλίωση μέσω ενός συνδυασμού υδριδίου του νατρίου και φορμικού αιθυλεστέρα. Το βήμα αυτό επιχειρήθηκε, ωστόσο παραλήφθηκε πολύπλοκο

μίγμα. Παρότι δεν κατέστη δυνατό να ανιχνευθεί το επιθυμητό προϊόν **128**, η αντίδραση επιχειρήθηκε σε δείγματα του μίγματος αντίδρασης με *S*-μεθυλοθειουρία, όσο και απλή ουρία χρησιμοποιώντας ως βάση *tert*-βουτοξειδίο του καλίου, δυστυχώς χωρίς επιτυχία.

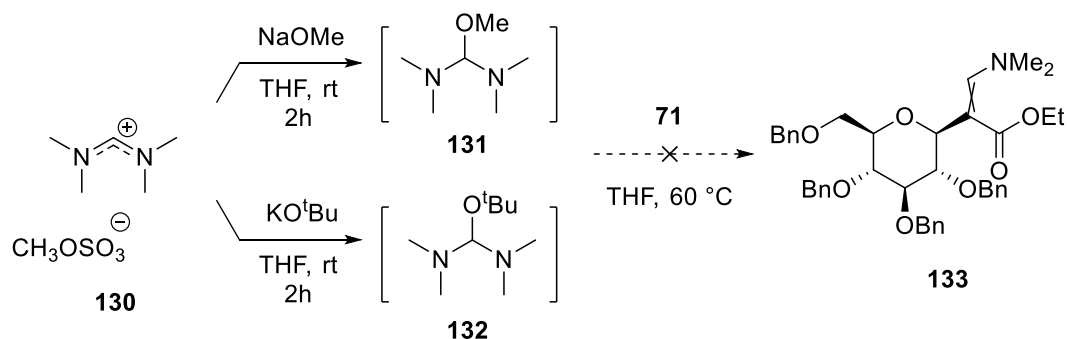
Στην επόμενη δοκιμή, επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί το αντιδραστήριο Bredereck (*tert*-βουτοξυ-δισ-διμεθυλαμινομεθάνιο),¹³¹ που βιβλιογραφικά χρησιμοποιείται συχνά για την προσθήκη διμεθυλαμινομεθυλενομάδων στην αθέση εστέρων.

Ξεκινώντας από διμεθυλοφορμαμίδιο, θειικό διμεθυλεστέρα και άνυδρη διμεθυλαμίνη παρασκευάστηκε το ενδιάμεσο **130** (Σχήμα 2.32).^{132,133}



Σχήμα 2.32: Σύνθεση του δισ-διμεθυλαμινομεθανίου.^{132,133}

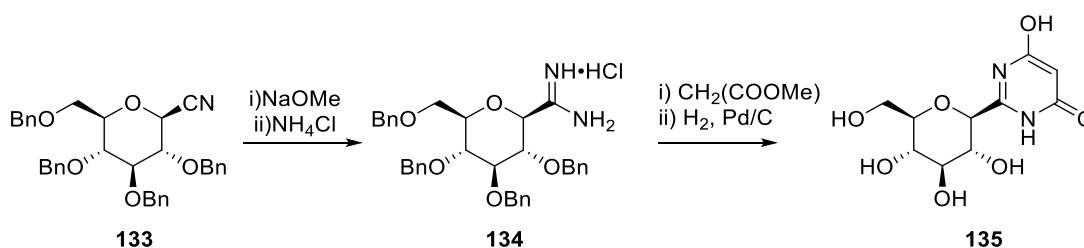
Σε διάλυμα του **130** σε τετραϋδροφουράνιο προστέθηκε διάλυμα *tert*-βουτοξειδίου του καλίου προς τον *in situ* σχηματισμό του αντιδραστήριου Bredereck **132** ακολουθούμενο από τον γλυκοζίτη **71** (Σχήμα 2.33).¹³⁴ Επιχειρήθηκε αντικατάσταση της βάσης με μεθοξυνάτριο, προς τον *in situ* σχηματισμό του λιγότερο παρεμποδισμένου αλκυλιωτικού **131**. Και οι δύο ενώσεις είναι εμπορικά διαθέσιμες, ωστόσο η σύνθεσή τους προτιμήθηκε καθότι πέρα από το απαγορευτικά υψηλό κόστος χαρακτηρίζονται κι από ιδιαίτερη χημική αστάθεια.



Σχήμα 2.33: Προσπάθειες α-προσθήκης ενεργοποιημένης μεθυλενομάδας στην ένωση **54**.

Με κανένα από τα δύο αντιδραστήρια δυστυχώς δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός του επιθυμητού προϊόντος **133**. Θεωρούμε ότι ο στερικός όγκος του γλυκοζίτη **71** σε συνδυασμό με την πιθανά χαμηλή οξύτητα της α -θέσης στο συγκεκριμένο υπόστρωμα εμποδίζει την επιτυχή της αλκυλίωση. Μία εναλλακτική θα μπορούσε να είναι η χρήση του συγγενούς, ισχυρότερου αλκυλιωτικού τρις-διμεθυλαμινομεθανίου, που έχει περιγραφεί να αντιδρά επιτυχώς σε περιπτώσεις που τα προηγούμενα δύο αντιδραστήρια απέτυχαν,¹³⁵ ωστόσο απορρίφθηκε λόγω του απαγορευτικού κόστους του αντιδραστήριου, όσο και της σημαντικά περισσότερο πολύπλοκης σύνθεσής του. Η συγκεκριμένη πορεία σε αυτό το σημείο εγκαταλείφθηκε.

Κατά τη διάρκεια των δικών μας προσπαθειών της *de novo* σύνθεσης δακτυλίου, η ομάδα του καθηγητή L. Somsák, που επί σειρά ετών εργάζεται επίσης στη σύνθεση αναστολέων της GP, δημοσίευσε εργασία το 2018¹³⁶ (μετά την εγκατάλειψη των δικών μας προσπαθειών κυκλοποίησης) στη *de novo* σύνθεση πυριμιδινικού δακτυλίου σε C-γλυκοπυρανοζίτη (**Σχήμα 2.34**). Η προσέγγιση ήταν διαφορετική από αυτήν που περιγράφεται παραπάνω. Πιο συγκεκριμένα, το γλυκοζιτικό τμήμα ενσωματώνεται στο παράγωγο **134** που παίζει τον ρόλο του πυρηνόφιλου, για να κυκλοποιηθεί στη συνέχεια κατά την αντίδραση με μηλονικό διαιθυλεστέρα. Ο πυριμιδινικός δακτύλιος στο μόριο-στόχο **135** παρουσιάζει διαφορετική διευθέτηση από αυτήν των μορίων που περιγράφονται στην παρούσα διατριβή.^{136,137}



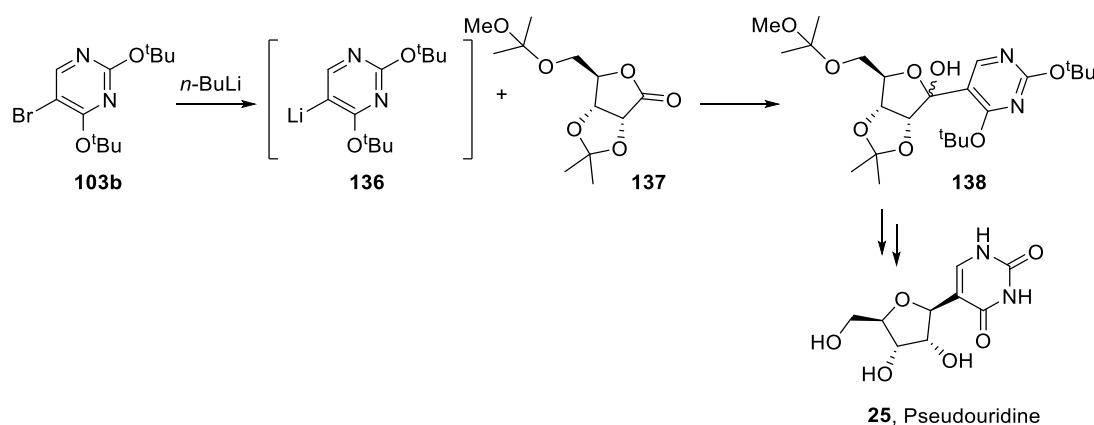
Σχήμα 2.34: Βιβλιογραφικό παράδειγμα σύνθεσης C-γλυκοζίτη της ουρακίλης μέσω κυκλοποίησης.¹³⁶

Το προϊόν **135** δεν παρουσίασε ανασταλτική δράση στο καταλυτικό κέντρο της GP¹³⁶ και στην Ενότητα 4.1.1 δίνεται μια πιθανή εξήγηση μετά από σύγκριση με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής. Παρόλα αυτά το νέο μόριο αποτελεί άλλη μία δομή που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μελέτες δομής-δραστικότητας πιθανών νέων αναστολέων της GP.

2.2.5 Σύζευξη σακχαρικού και πυριμιδινικού τμήματος

Μετά τις προσπάθειες της προηγούμενης ενότητας, επιστρέψαμε στη διερεύνηση της σύζευξης του έτοιμου πυριμιδινικού τμήματος με το σακχαρικό τμήμα. Η χρήση της αντίδρασης σύζευξης αρωματικών οργανομεταλλικών ενώσεων με προστατευμένες γλυκονολακτόνες στη βιβλιογραφία έχει αναπτυχθεί στην Ενότητα 2.1.2.4.

Αν και οι πυριμιδίνες αποτελούν προσφιλή υποστρώματα για αντιδράσεις ορθο-μεταλλίωσης,¹³⁸ η θέση 5 ενεργοποιείται με εφαρμογή αντίδρασης ανταλλαγής αλογόνου-μετάλλου. Αλογονωμένα παράγωγα ουρακίλης, όπως αυτά που έχουν περιγραφεί στην προηγούμενη ενότητα, συνηθέστερα μετατρέπονται σε οργανολιθιακά ενδιάμεσα μέσω επίδρασης *n*-βουτυλολιθίου στο αντίστοιχο βρωμίδιο. Ένα παράδειγμα σύνθεσης, ιδιαίτερα συγγενές με αυτό της παρούσας εργασίας, είναι μία από τις συνθέσεις του φυσικού C-νουκλεοζίτη ψευδοουριδίνη (**25**, Σχήμα 2.35),¹³⁹ συστατικού των εμβολίων mRNA των εταιρειών Pfizer-BioNTech και Moderna.



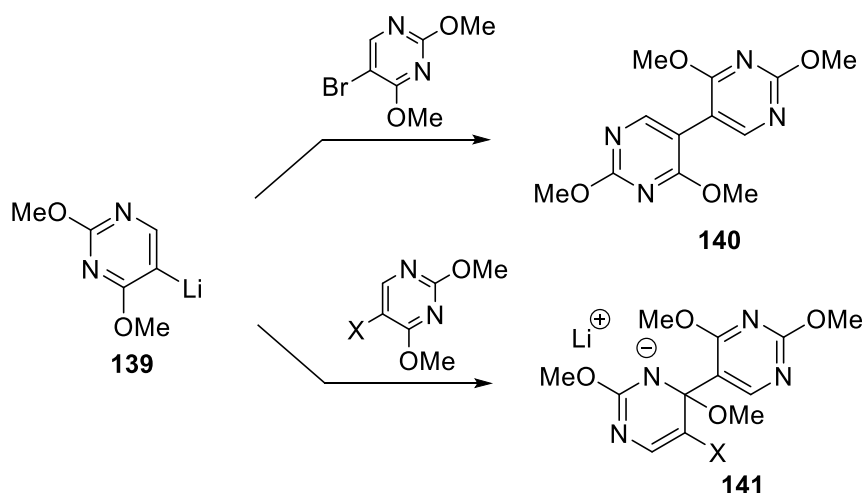
Σχήμα 2.35: Σύνθεση ψευδοουριδίνης χρησιμοποιώντας οργανολιθιακό ενδιάμεσο.¹³⁹

Εδώ η βρωμοπυριμιδίνη **103b** μετατρέπεται στην αντίστοιχη οργανολιθιακή ένωση **136** η οποία στη συνέχεια συζευγνύεται με την προστατευμένη ριβονολακτόνη **137**. Η αντίδραση μεταξύ λιθιοπυριμιδίνης και ριβονολακτόνης έχει χρησιμοποιηθεί και σε έναν αριθμό αντίστοιχων συνθέσεων.^{140,141}

Στην αρχική σύνθεση χρησιμοποιήθηκε ως υπόδειγμα η παραπάνω σύνθεση, λαμβάνοντας ταυτόχρονα υπόψη έναν αριθμό παραδειγμάτων σύζευξης αρυλο-λιθιακών ενώσεων με τη χρησιμοποιούμενη σε αυτή την εργασία D-γλυκονο-δ-λακτόνη (για παράδειγμα η σύνθεση των γλιφλοζινών, Ενότητα 2.1.2.4).

Στην παρούσα συνθετική πορεία η ανταλλαγή αλογόνου-μετάλλου μεταξύ των βρωμιδίων **95** και **103a-c**, όσο κι η σύζευξη που ακολουθεί, επέδειξαν προβλήματα επαναληψιμότητας. Οι αποδόσεις ήταν σχετικά χαμηλές (20 – 40%) και τα μίγματα αντίδρασης ήταν πολύπλοκα, απαιτώντας συχνά επίπονους χρωματογραφικούς καθαρισμούς.

Κατά τη μεταλλίωση των πυριμιδινών, η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας δείχνει εμφανή σχηματισμό παραπροϊόντων, πριν ακόμα την ολοκλήρωση της ανταλλαγής βρωμίου-μετάλλου. Πέρα από την πιθανή αντίδραση οργανολιθίου με την περίσσεια βρωμιδίου (**Σχήμα 2.36**), θα μπορούσε να λαμβάνει χώρα πυρηνόφιλη υποκατάσταση στο αζωμεθυνικό σύστημα του δακτυλίου, όπως περιγράφεται στη βιβλιογραφία για την περίπτωση της 5-βρωμο-2,4-διμεθοξυπυριμιδίνης **103a**.^{142,143}



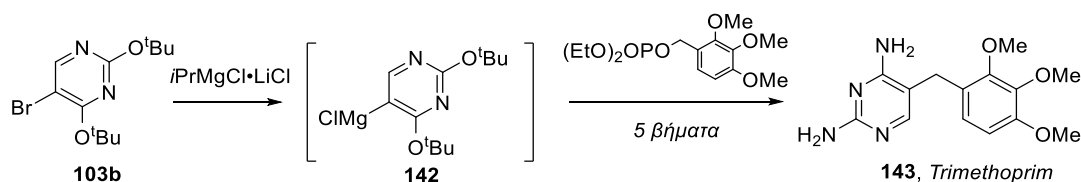
Σχήμα 2.36: Πιθανοί τρόποι διμερισμού πυριμιδινών κατά την τρανσμεταλλίωση.^{142,143}

Η στερεοχημική παρεμπόδιση κι άρα σχετικά χαμηλή ηλεκτρονιοφιλικότητα της ογκώδους βενζυλιωμένης D-γλυκονο-δ-λακτόνης πιθανότατα ευνοεί ανταγωνιστικές αντιδράσεις όπως αυτές στο **Σχήμα 2.36** οδηγώντας σε μείωση της συνολικής απόδοσης. Σε μια προσπάθεια βελτιστοποίησης της σύνθεσης που είχε πραγματοποιηθεί στα πλαίσια του μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης, δοκιμάστηκαν τόσο αλλαγές στη συγκέντρωση του μίγματος της αντίδρασης, όπως επίσης και η εκτέλεση της αντίδρασης σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (μέχρι -100 °C), χωρίς ωστόσο ιδιαίτερη βελτίωση.

Ως εναλλακτική αποφασίστηκε να δοκιμαστεί η αντικατάσταση των

οργανολιθιακών ενδιαμέσων από τα αντίστοιχα αντιδραστήρια Grignard. Οι πυριμιδίνες λόγω του ηλεκτρονικά ελλειμματικού χαρακτήρα τους είναι γενικά αδρανείς στο στοιχειακό μαγνήσιο, με αποτέλεσμα να απαιτείται η χρήση ενός αλκυλμαγνησιοαλογονιδίου για τη μεταλλίωσή τους.

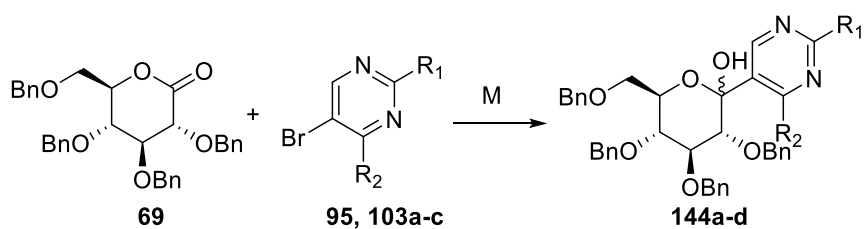
Η ομάδα του Καθηγητή P. Knoche από το πανεπιστήμιο του Μονάχου έχει εργαστεί εκτενώς στη χημεία της αντίδρασης Grignard.^{108,144,145} Ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα για την παρούσα εργασία ήταν η εργασία της ομάδας στα αντιδραστήρια Grignard σε συνδυασμό με πυριμιδίνες και παράγωγα της ουρακίλης,^{107,146–148} όπως για παράδειγμα στον σχεδιασμό μιας νέας σύνθεσης του αντιβιοτικού Trimethoprim (**143**, Σχήμα 2.37).¹⁴⁷



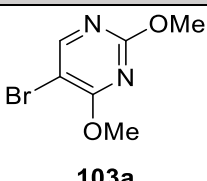
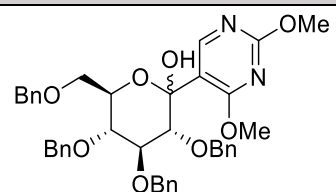
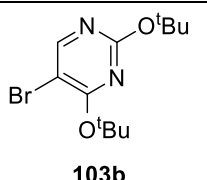
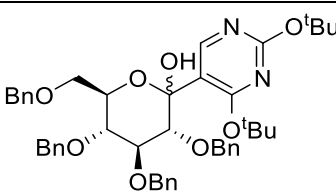
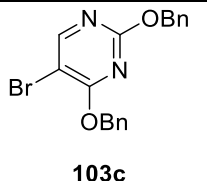
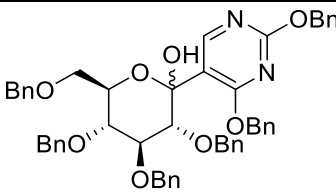
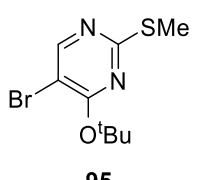
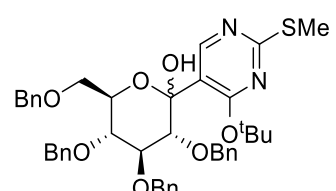
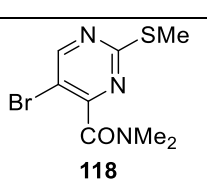
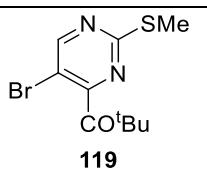
Σχήμα 2.37: Παράδειγμα εφαρμογής αντίδρασης Grignard σε πυριμιδίνη.¹⁴⁷

Δοκιμάσθηκε έτσι η εφαρμογή του αντιδραστήριου Turbo-Grignard (σύμπλοκο ισοπροπυλομαγνησιοχλωριδίου με χλωριούχο λίθιο) στη σύνθεση. Το χλωριούχο λίθιο έχει βρεθεί ότι βοηθά στη διαλυτοποίηση και βελτιστοποίηση της δραστηριότητας των μεταλλοπυριμιδινών.¹⁴⁹ Συγκρίθηκε έτσι η χρησιμότητα του νέου αντιδραστήριου με το *n*-βουτυλολίθιο που είχε χρησιμοποιηθεί στις πρώτες προσπάθειες (Πίνακας 1).

Πράγματι η μεταλλίωση των πυριμιδινών **95** και **103a-c** (α/α 1-4, Πίνακας 1) ολοκληρώθηκε χωρίς να εμφανιστεί σχηματισμός παραπροϊόντων. Μετά την ολοκλήρωση της μεταλλίωσης και την προσθήκη του ηλεκτρονιόφιλου **69**, η σύζευξη προχωρά ομαλά, οδηγώντας σε σημαντικά καθαρότερες αντιδράσεις από ότι στην περίπτωση χρήσης βουτυλολιθίου. Ενδεικτικά, η σύνθεση του σημαντικού ενδιαμέσου **144d** (α/α 1, Πίνακας 1) προχωρά με επαναλήψιμη απόδοση γύρω στο 75%, σε κλίμακες από 1 έως 20 mmol, ενώ η καθαρότητα της αντίδρασης επέτρεψε, μετά από υδατική κατεργασία, τον καθαρισμό του μέσω απλής καταβύθισης. Η δοκιμή και σε άλλα παράγωγα της ουρακίλης επιβεβαιώνει την ανωτερότητα της συγκεκριμένης μεθόδου σε σχέση με τη χρήση *n*-βουτυλολιθίου (Πίνακας 1).



Πίνακας 1: Σύγκριση σύζευξης πυριμιδινών με βενζυλιωμένη D-γλυκονο-δ-λακτόνη με χρήση *n*-βουτυλολιθίου (Μέθοδος **A**) και TurboGrignard (Μέθοδος **B**).

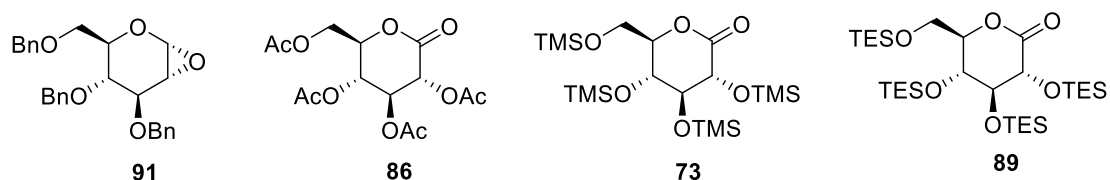
α/α	Πυριμιδίνη	Μέθοδος	Προϊόν	Απόδοση ^(a)
1	 103a	A	 144a	30%
		B		65%
2	 103b	A	 144b	22 %
		B		46%
3	 103c	B	 144c	31%
4	 95	A	 144d	39%
		B		74%
5	 118	B	-	-
6	 119	B	-	-

Για τις καρβοξυ-πυριμιδίνες **118** (α/α **5**, Πίνακας **1**) και **119** (α/α **6**, Πίνακας **1**), αντίθετα από ότι αναμενόταν με βάση τη βιβλιογραφία, η επίδραση αντιδραστήριου Turbo-Grignard οδήγησε στον σχηματισμό ενός αριθμού παραπροϊόντων και στις δύο περιπτώσεις. Η προσθήκη προστατευμένης D-γλυκονο-δ-λακτόνης στη συνέχεια δεν οδήγησε στον ανιχνεύσιμο σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος. Πιθανότατα η ηλεκτρονικά ελλειμματική φύση του πυριμιδινικού δακτυλίου οδηγεί σε σημαντική αύξηση της ηλεκτρονιοφιλικότητας του 4-καρβονυλίου, καθιστώντας το ασύμβατο με τις συνθήκες της μεταλλίωσης.

Ένα επιπλέον πλεονέκτημα το οποίο προέκυψε από τη χρήση οργανομαγνησιακών ενδιάμεσων, οφείλεται στο γεγονός ότι η μειωμένη δραστηριότητα των αντιδραστηρίων Grignard σε σχέση με τα οργανολιθιακά αντιδραστήρια επιτρέπει τη χρήση πολύ πυκνότερων διαλυμάτων (0.5- 1.5 M έναντι 0.05 M), όσο και την εκτέλεση της αντίδρασης σε υψηλότερη θερμοκρασία (-22 °C έως δωματίου έναντι -80 °C), διευκολύνοντας σημαντικά την εκτέλεση της αντίδρασης σε μεγάλες κλίμακες, κρίσιμη βελτίωση λαμβάνοντας υπόψη τον μεγάλο αριθμό των μετέπειτα βημάτων της παρούσας σύνθεσης.

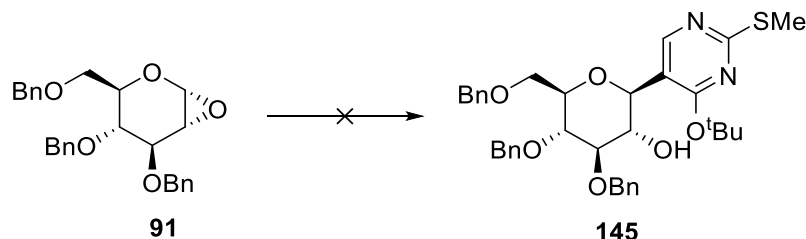
Σύζευξη με άλλα ηλεκτρονιόφιλα

Όπως συζητήθηκε στην Ενότητα 2.2.2, επιχειρήθηκε η απλοποίηση του συνθετικού σχήματος, εφαρμόζοντας τις συνθήκες σύζευξης που αναπτύχθηκαν παραπάνω σε σακχαρικά τμήματα (**Εικόνα 2.8**) με απλουστευμένες συνθέσεις σε σχέση με την 2,3,4,6-τετρα-O-βενζυλο-D-γλυκονο-δ-λακτόνη **69**.



Εικόνα 2.8: Εναλλακτικά παράγωγα της D-γλυκονο-δ-λακτόνης που δοκιμάστηκαν.

Έτσι, ξεκίνησαν οι προσπάθειες σύζευξης της πυριμιδίνης **95** με την 1,2-ανυδρο-3,4,6-τρι-Ο-βενζυλο-D-γλυκοπυρανόζη (**91**, **Σχήμα 2.38**). Η απευθείας σύζευξη της μεταλλιωμένης πυριμιδίνης με το εποξείδιο **91** οδήγησε σε πολύπλοκα μίγματα.

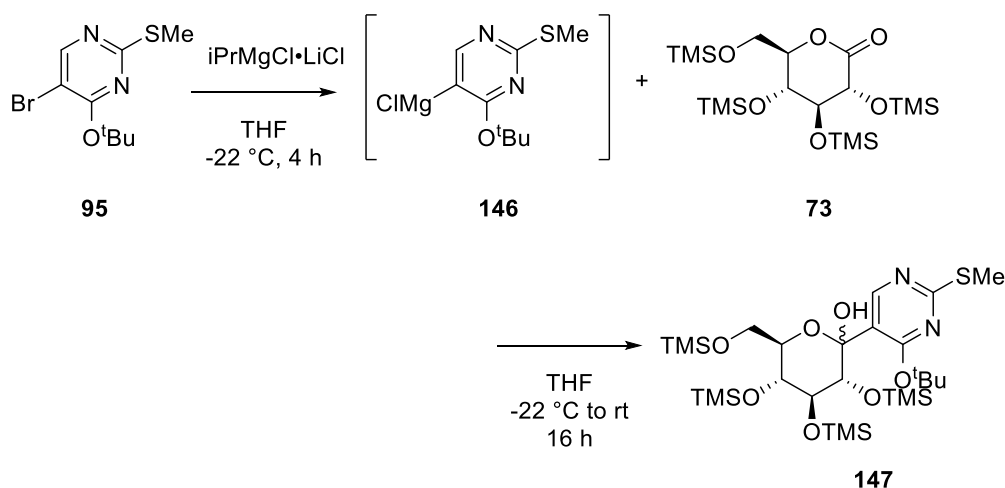


Σχήμα 2.38: Απόπειρά σύζευξης με το εποξείδιο της γλυκόζης.

Στη συνέχεια δοκιμάστηκε η τροποποίηση του οργανομεταλλικού ενδιαμέσου με τη χρήση καταλυτικών ποσοτήτων αλάτων χαλκού, που περιγράφεται στη βιβλιογραφία για τον συνδυασμό αντιδραστηρίων Grignard-εποξειδίων. Δοκιμάστηκε η προσθήκη βρωμιούχου χαλκού (I) και ιωδιούχου χαλκού (I), μετά τη μεταλλίωση και πριν την προσθήκη του ηλεκτρονιόφιλου, που ωστόσο δεν βελτίωσαν την εικόνα της αντίδρασης.

Οι προσπάθειες συνεχίστηκαν με τις προστατευμένες λακτόνες που παρασκευάστηκαν νωρίτερα (Ενότητα 2.2.2) ξεκινώντας από το ακετυλιωμένο παράγωγο **86**. Τα αντιδραστήρια Grignard σε μερικές περιπτώσεις έχουν αποδειχθεί συμβατά με εστέρες. Θεωρήσαμε πιθανό ότι το καρβονύλιο της λακτόνης θα αντιδρούσε κατά προτίμηση σε σχέση με τις ακετυλομάδες, με κινητήρια δύναμη την εκτόνωση της στερεοχημικής τάσης του σακχαρικού δακτυλίου με τον επανυβριδισμό του ανωμερικού άνθρακα σε sp^3 κατά την αντίδραση. Στην πράξη, ωστόσο, κατά τις δοκιμές παραλήφθηκαν πολύπλοκα μίγματα, πρόβλημα το οποίο δεν επιλύθηκε ούτε με μείωση της θερμοκρασίας αντίδρασης στους $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ πριν την προσθήκη του ηλεκτρονιόφιλου.

Στην επόμενη προσπάθεια επιχειρήθηκε η σύζευξη της πυριμιδίνης **95** με το τριμεθυλοσιλυλιωμένο παράγωγο **73** (**Σχήμα 2.39**).



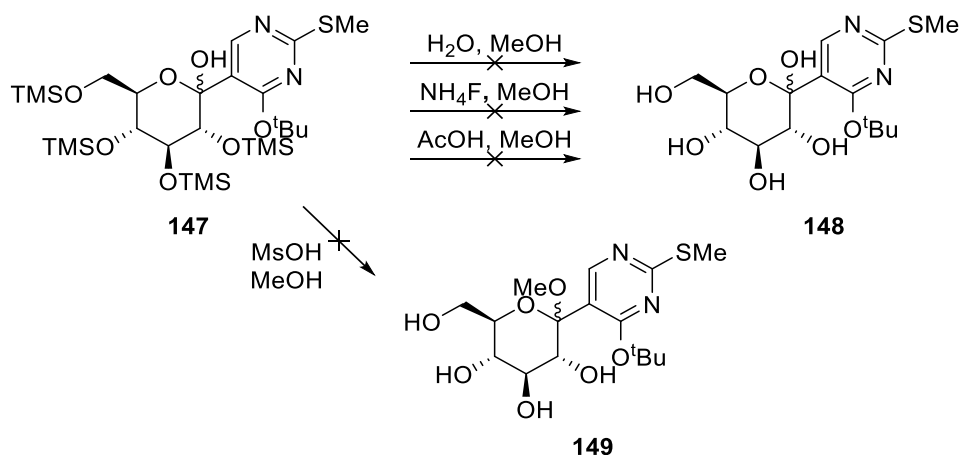
Σχήμα 2.39: Σύζευξη με τριμεθυλοσιλυλιωμένη D-γλυκονο-δ-λακτόνη.

Εφαρμόστηκαν οι ίδιες συνθήκες αντίδρασης όπως και στα παράγωγα που περιγράφηκαν νωρίτερα. Η σύζευξη προχώρησε ομαλά οδηγώντας σε σχεδόν πλήρη κατανάλωση της λακτόνης **73**.

Το προϊόν σύζευξης **147** αποδείχθηκε επαρκώς σταθερό για να υποβληθεί σε υδατική κατεργασία. Ο καθαρισμός του προϊόντος δεν ήταν δυνατός με ανακρυστάλλωση ή καταβυθίσεις, καθώς το προϊόν, όσο και τα παραπροϊόντα της μεταλλίωσης είναι ελαιώδη και διαλύονται σε όλους τους διαθέσιμους οργανικούς διαλύτες. Έτσι, επιχειρήθηκε η εκλεκτική υδρόλυση των τριμεθυλοσιλυλοαιθέρων (**Σχήμα 2.40**). Ο ελεύθερος γλυκοζίτης αναμενόταν σημαντικά πολικότερος από τα παραπροϊόντα της μεταλλίωσης, επιτρέποντας πιθανόν την απομόνωση του προϊόντος μέσω ανακρυστάλλωσης/καταβύθισης.

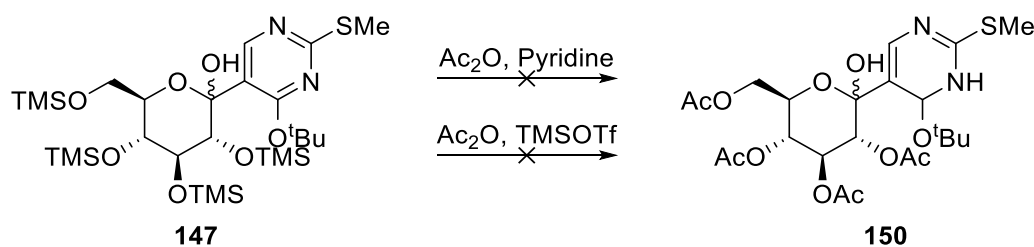
Αρχικά επιχειρήθηκε η αποπροστασία σε διάλυμα υδατικής μεθανόλης, όπως περιγράφεται στη βιβλιογραφία,¹¹² ωστόσο οι προστατευτικές ομάδες αποδείχτηκαν απροσδόκητα σταθερές. Στη συνέχεια δοκιμάστηκε η αποπροστασία με χρήση μεθανόλης με καταλυτική ποσότητα οξικού οξέος, που ωστόσο οδήγησε και σε μερική απόσπαση της *tert*-βουτυλομάδας τόσο από τον σακχαρίτη, όσο κι από ελεύθερες πυριμιδίνες, οδηγώντας σε πολύπλοκα μίγματα. Τελευταία δοκιμάστηκε η αποπροστασία με μεθανολικό διάλυμα φθοριούχου αμμωνίου, η οποία ενώ ξεκίνησε ομαλά, στο διάστημα που απαιτήθηκε για την πλήρη αποπροστασία σχηματίστηκε ένας αριθμός παραπροϊόντων. Επιχειρήθηκε επίσης η ταυτόχρονη αποπροστασία με

παράλληλη μετατροπή στον μεθυλο-γλυκοζίτη **149**, όπως εφαρμόζεται σε πολλά παραδείγματα από τη σύνθεση των γλιφλοζινών (Ενότητα 2.1.2.4), και πάλι με απογοητευτικά αποτελέσματα.



Σχήμα 2.40: Προσπάθειες αποπροστασίας του παραγώγου **147**.

Τέλος, δοκιμάστηκε η απευθείας αντικατάσταση των σιλυλαιθέρων από ακετυλομάδες με οξικό ανυδρίτη παρουσία πυριδίνης, όσο και όξινα καταλυόμενη αλλαγή προστασίας (**Σχήμα 2.41**). Αναμενόταν να σχηματιστεί το τετρα-Ο-ακετυλιωμένο παράγωγο **150** λόγω της χαμηλής δραστηριότητας της ακετυλίωσης της ανωμερικής υδροξυλομάδας (Ενότητα 2.2.6). Ξανά οι αντιδράσεις οδήγησαν στον σχηματισμό πολύπλοκων μιγμάτων οπότε το σχήμα εγκαταλείφθηκε.



Σχήμα 2.41: Προσπάθειες άμεσης ακετυλίωσης του παραγώγου **75**

Η επόμενη προσπάθεια ήταν η σύζευξη της πυριμιδίνης **95** με το τριαιθυλοσιλυλιωμένο παράγωγο **89** (**Σχήμα 2.41**). Εμφανίστηκαν ίχνη προϊόντος μετά από διάστημα 4 ωρών από την προσθήκη του πυρηνόφιλου, ωστόσο η πρόοδος της αντίδρασης δεν βελτιώθηκε ακόμη και μετά από παρατεταμένο χρόνο αντίδρασης. Πιθανόν ο αυξημένος στερικός όγκος της

τριαιθυλοσιλυλομάδας δυσκολεύει την αντίδραση με τη σχετικά ογκώδη πυριμιδίνη.

2.2.6 Αναγωγή του ανωμερικού υδροξυλίου

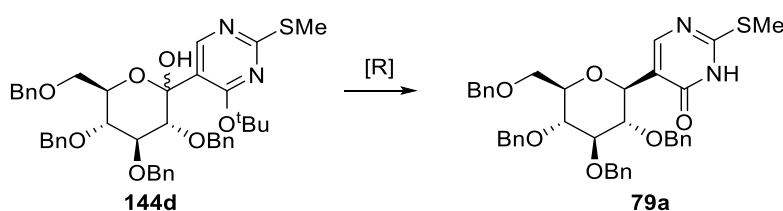
Επόμενο βήμα μετά την επιτυχή σύζευξη αποτελεί η στερεοεκλεκτική αναγωγή του ανωμερικού υδροξυλίου των προϊόντων της οργανομεταλλικής σύζευξης και **144a-d** (Πίνακας 1) προς σχηματισμό του αντίστοιχου C-γλυκοζίτη. Οι κλασικές συνθήκες αποτελούνται από την πολική αναγωγή του υδροξυλίου με τον συνδυασμό τριαιθυλοσιλανίου κι ενός οξέος Lewis,^{95,96} η οποία αναφέρεται για ένα μεγάλο αριθμό υποστρωμάτων.

Βάσει προηγούμενης εμπειρίας, η αναγωγή υποστρωμάτων υποκατεστημένων από πυριμιδινικούς δακτυλίους ήταν αδύνατη για κάθε ένα από τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω παραγωγοποίηση των υδροξυ-γλυκοζιτών **144a-d**.

Είχαν πραγματοποιηθεί προσπάθειες αναγωγής με μια σειρά από παράγωγα. Μετατροπή του υδροξυλίου στον αντίστοιχο φαινυλοθειανθρακικό εστέρα με στόχο την αναγωγή μέσω ριζών με χρήση αποξυγόνωσης Barton-McCombie αποδείχτηκε άκαρπη, όπως επίσης και η προσπάθεια πολικής αναγωγής μέσω μεθυλίωσης του ανωμερικού υδροξυλίου.

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής επαναλήφθηκαν κάποιες από τις προηγούμενες δοκιμές μας, ενώ δοκιμάστηκαν και κάποιες νέες συνθήκες (Πίνακας 2). Χρησιμοποιώντας την ένωση **144d** ως μοντέλο, δοκιμάστηκε ένας αριθμός συνθηκών και οξέων Lewis. Στην περίπτωση χρήσης ήπιων οξέων Lewis ($\text{BF} \cdot \text{Et}_2\text{O}$, **α/α 1-3**, TMSOTf , **α/α 4**, Πίνακας 2) η μοναδική αντίδραση η οποία παρατηρήθηκε ήταν η αποπροστασία των *tert*-βουτυλαιθέρων, ενώ παρατεταμένοι χρόνοι αντίδρασης (48 h, **α/α 2**, Πίνακας 2) οδήγησαν σε αποικοδόμηση του αρχικού αντιδραστήριου και εμφάνιση δυσδιάλυτων παραπροϊόντων. Παρόμοια, η χρήση ισχυρότερων οξέων Lewis (TiCl_4 , **α/α 5**, SnCl_4 , **α/α 6**, $\text{Sc}(\text{OTf})_3$, **α/α 7**, Πίνακας 2) οδήγησε σε αποικοδόμηση του αντιδρώντος, πιθανώς μέσα από την παράπλευρη απόσπαση των βενζυλαιθέρων, χωρίς και πάλι σχηματισμό ανηγμένου γλυκοζίτη.

Στη βιβλιογραφία μέχρι στιγμής αναφέρονται μόνο δύο περιπτώσεις παρόμοιων δυσκολιών κατά την αναγωγή του υδροξυλίου σε ηλεκτρονιακά ελλειμματικά υποστρώματα.^{105,150} Και στις δύο περιπτώσεις λύση ήταν η ακετυλίωση του ανωμερικού υδροξυλίου, με το ανωμερικά ακετυλιωμένο παράγωγο να ανάγεται ομαλά στη συνέχεια. Η ακετυλίωση πράγματι έδωσε τη λύση και στη δική μας περίπτωση κατά την εκπόνηση του μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης, επιτρέποντας τη σύνθεση των ανηγμένων προϊόντων **79a** και **79b** (Εικόνα 2.3, Ενότητα 2.1.3).

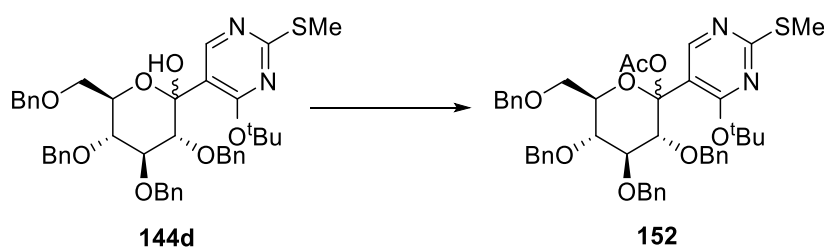


Πίνακας 2: Συνθήκες που δοκιμάστηκαν για την αναγωγή του υποστρώματος **144d**.

A/A	X	Οξύ Lewis	Σιλάνιο	t (h)	T	Απόδοση
1	-OH	BF·Et ₂ O	(iPr) ₃ SiH	24 h	-78 °C	-
2	-OH	BF·Et ₂ O	Et ₃ SiH	24 h	0 °C – r.t	-
3	-OH	BF·Et ₂ O	Et ₃ SiH	48h	r. t	-
4	-OH	TMSOTf	Et ₃ SiH	24 h	r.t	-
5	-OH	TiCl ₄	Et ₃ SiH	24 h	0 °C – r.t	-
6	-OH	SnCl ₄	Et ₃ SiH	24 h	0 °C – r.t	-
7	-OH	Sc(OTf) ₃	Et ₃ SiH	24 h	0 °C – r.t	-

Η ανάγκη ακετυλίωσης του ανωμερικού υδροξυλίου για την επιτυχή αναγωγή, μετέτρεψε το βήμα της ακετυλίωσης σε ένα από τα πιο κρίσιμα βήματα της σύνθεσης. Οι συνθήκες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν την πρώτη φορά (υδρίδιο του νατρίου, ακετυλοχλωρίδιο, **α/α 1**, **Πίνακας 3**) στις προσπάθειες επανάληψης επέδειξαν σοβαρά προβλήματα επαναληψιμότητας, ειδικά με αύξηση της κλίμακας, με αποτέλεσμα τη μεγάλη απώλεια του αρχικού αντιδρώντος. Ως αποτέλεσμα, η επανάληψη του βήματος της ακετυλίωσης του

ανωμερικού υδροξυλίου μας απασχόλησε αρκετά. Ενώ στη βιβλιογραφία χρησιμοποιούνται κλασικές μέθοδοι με καλά αποτελέσματα,^{105,150} στην παρούσα εργασία ανέκυψαν σοβαρά προβλήματα επαναληψιμότητας και χαμηλές αποδόσεις, με μια ποικιλία μεθόδων. Δοκιμάστηκαν μια σειρά από συνθήκες που φαίνονται στον **Πίνακα 3**. Ως μοντέλο χρησιμοποιήθηκε το ενδιάμεσο-κλειδί **144d**.



Πίνακας 3: Συνθήκες οι οποίες δοκιμάστηκαν για την ακετυλίωση του ανωμερικού υδροξυλίου.

A/A	Συνθήκες	T	Χρόνος	Αποτέλεσμα
1	NaH, AcCl, THF	0 - 25 °C	24 h	Πολύπλοκο μίγμα
2	Ac ₂ O, Pyridine	25 °C	48 h	Καμία αντίδραση
3¹⁰⁵	AcCl, DMAP, Et ₃ N, DCM	25 °C	72 h	Πολύπλοκο μίγμα
4	NaH, AcCl, DMAP, THF	0 - 25 °C	24 h	Πολύπλοκο μίγμα
5¹⁵¹	TMSOTf, Ac ₂ O, THF	-40 °C - rt	24 h	Καμία αντίδραση
6¹⁵²	Sc(OTf) ₃ , Ac ₂ O, DCM	25 °C	24 h	Πολύπλοκο μίγμα
7¹¹¹	DMAP·HCl, Ac ₂ O, Et ₃ N Toluene ¹¹¹	90 °C	24 h	Ποσοτική αντίδραση
8	NaH, Ac₂O, THF	0 - 25 °C	96 h	Ποσοτική αντίδραση

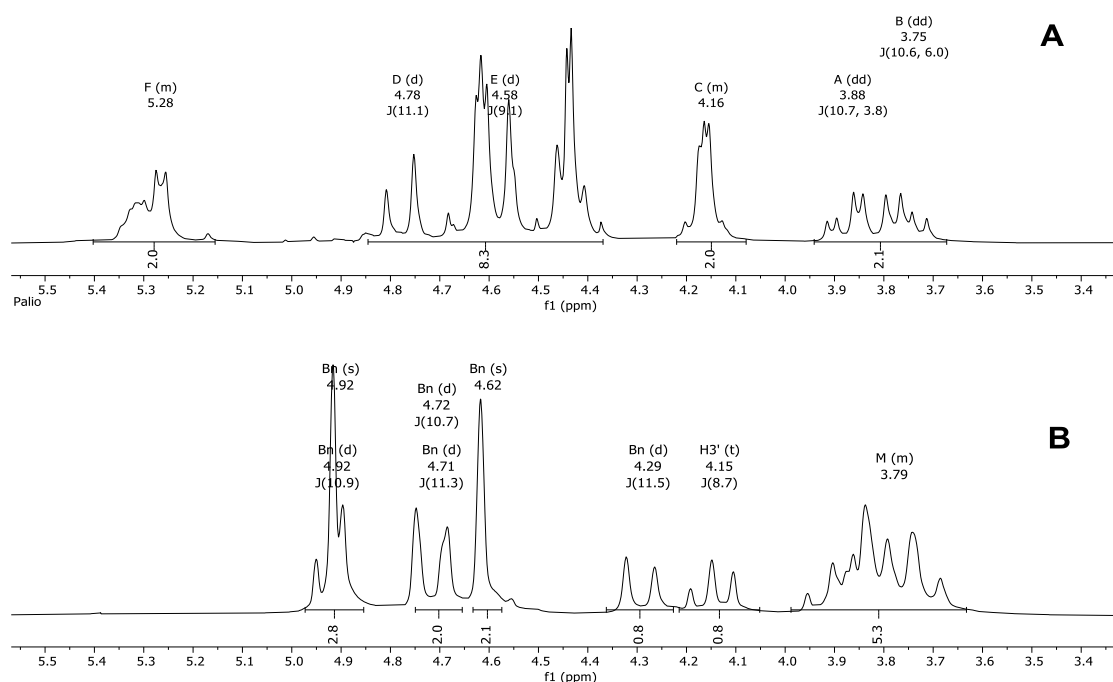
^a Το προϊόν του α/α 7 είχε την αναμενόμενη μοριακή μάζα για το επιθυμητό προϊόν, αλλά διέφερε σημαντικά στο ¹H-NMR από το προϊόν της α/α 8.

Από τις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 3**, το υπόστρωμα **144d**, είτε παρέμεινε αδρανές (**α/α 2,5**), είτε διασπάστηκε σε πολύπλοκα μίγματα παραπροϊόντων, με αποτέλεσμα τις χαμηλές έως μηδενικές αποδόσεις σε προϊόν **152 (α/α 1,3,4,6)**.

Ενδιαφέρουσα ήταν η περίπτωση του συνδυασμού συνθηκών DMAP·HCl, Ac₂O, Et₃N, θέρμανση (**α/α 7, Πίνακας 3**) στην ένωση **144d**.¹¹¹ Η ακετυλίωση υπό αυτές τις συνθήκες ολοκληρώθηκε ποσοτικά, όπως επιβεβαιώθηκε τόσο με φασματομετρία μάζας, όσο και με φασματοσκοπία NMR.

Στο φάσμα ¹H- NMR (**Εικόνα 2.9**) ωστόσο παρατηρήθηκε ότι το προϊόν που σχηματίστηκε, ήταν διαφορετικό από αυτό που παρασκευάστηκε με τις επιτυχημένες συνθήκες **α/α 8**. Τα φάσματα μάζας, όσο και τα φάσματα NMR πρωτονίου και άνθρακα δείχνουν επιτυχή ακετυλίωση, ενώ οι ολοκληρώσεις των κορυφών της περιοχής των σακχαρικών και βενζυλικών πρωτονίων εμφανίζουν της αναμενόμενες τιμές. Οι χημικές μετατοπίσεις ωστόσο των κορυφών δεν συμφωνούν με αυτές του προϊόντος που ελήφθη με τα συνθήκες του **α/α 8**.

Kainourio



Εικόνα 2.9: Λεπτομέρεια τις περιοχής των σακχαρικών και βενζυλικών πρωτονίων από φάσματα ¹H NMR (200 MHz σε Acetone-*d*₆) του αποτελέσματος της ακετυλίωσης (A) με χρήση DMAP·HCl, Ac₂O, Et₃N (**α/α 7, Πίνακας 3**) και (B) με χρήση NaH, Ac₂O, THF (**α/α 8**).

Η ένωση **144d** παραλαμβάνεται ως ένα αποκλειστικά ανωμερές από την αντίδραση σύζευξης. Είναι πιθανόν ότι το προϊόν των συνθηκών **α/α 7**, έχει λάβει χώρα επιμερείωση λόγω επίδρασης του ελαφρά όξινου καταλύτη. Είναι

αξιοσημείωτο ότι, ενώ στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι και τα δύο ανωμερή σχετικών ακετυλιωμένων παραγώγων αντιδρούν ομαλά στο επόμενο βήμα της αναγωγής,¹⁰⁵ το ανωμερές που σχηματίστηκε υπό όξινες συνθήκες αποδείχθηκε πλήρως αδρανές στις συνθήκες της αναγωγής. Λόγω του έντονου συνωστισμού των κορυφών στα φάσματα πρωτονίων και των δύο ενώσεων, δεν ήταν δυνατός ο προσδιορισμός της σχετικής στεreoχημείας των δύο προϊόντων με φασματοσκοπία NOESY.

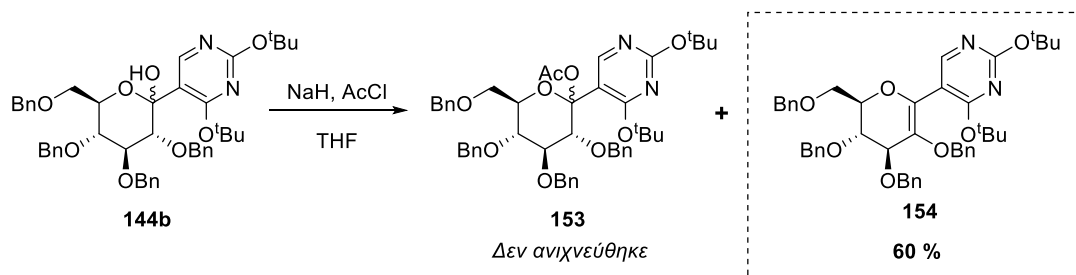
Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, απευθείας εξουδετέρωση του μίγματος της οργανομεταλλικής σύζευξης με ακυλιωτικά, που θεωρητικά θα οδηγούσε σε ακετυλίωση,¹¹³ είχε ως μοναδικό αποτέλεσμα των σχηματισμό πολύπλοκων μιγμάτων.

Τέλος, σε δύο προσπάθειες που δεν αναφέρονται στον **Πίνακα 3**, δοκιμάστηκε να χρησιμοποιηθεί ο περισσότερο δραστικός χλωροξικός ανυδρίτης, όπως επίσης επιχειρήθηκε η προσθήκη της λιγότερο στερικά παρεμποδισμένης φορμυλομάδας, υποκαθιστώντας τον οξικό ανυδρίτη με μίγμα οξικού ανυδρίτη-φορμικού οξέος,¹⁵³ χωρίς χρήσιμα αποτελέσματα.

Η πιο αποτελεσματική μέθοδος για το υπόστρωμα **144d** τελικά αποδείχθηκε ο συνδυασμός οξικού ανυδρίτη και υδριδίου του νατρίου (**α/α 8, Πίνακας 3**). Ενώ η αντίδραση απαιτεί ασυνήθιστα παρατεταμένο χρόνο (96 ώρες), το προϊόν παραλαμβάνεται πρακτικά ποσοτικά και σε καθαρότητα που επιτρέπει τη χρήση του στο ακόλουθο βήμα της αναγωγής χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Κρίσιμη φάνηκε να είναι η συγκέντρωση του μίγματος αντίδρασης, με συγκεντρώσεις πυκνότερες των 0.05 M να οδηγούν στην εμφάνιση παραπροϊόντων, χωρίς να βελτιώνεται σημαντικά ο χρόνος ολοκλήρωσης της αντίδρασης.

Το ενδιαμέσο **144c** παρέμεινε αδρανές στην ακετυλίωση υπό μία σειρά από διαφορετικές συνθήκες (**Πίνακας 3**). Πέρα από τη χαμηλή δραστηριότητα των ενδιάμεσων **144a-d**, πιθανότατα λόγω ενός συνδυασμού στερικών και ηλεκτρονιακών παραγόντων, έγινε εμφανής η τάση των υποστρωμάτων να συμμετέχουν σε αντιδράσεις απόσπασσης, με σχηματισμό του αντίστοιχου αλκενίου. Ακραίο παράδειγμα αποτελεί η ακετυλίωση του παραγώγου **144b** με

ακετυλοχλωρίδιο παρουσία υδριδίου του νατρίου που οδήγησε (**α/α 1, Πίνακας 3**) στο συνθετικά μη επιθυμητό προϊόν απόσπασης E₁ **153** σε απόδοση 60% (**Σχήμα 2.42**), όπως διαπιστώθηκε από τα αντίστοιχα φάσματα NMR.

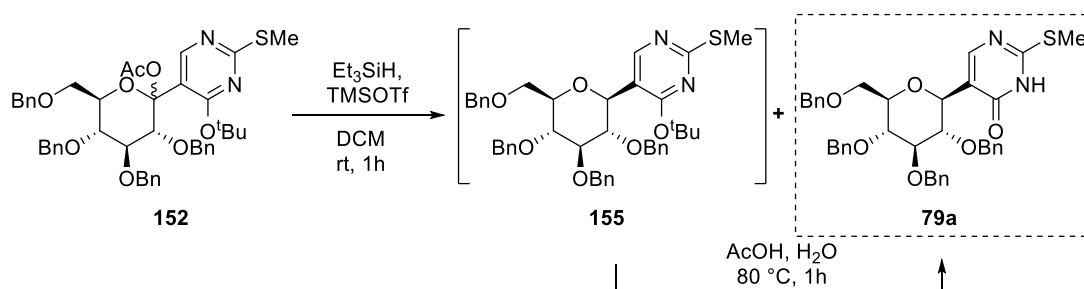


Σχήμα 2.42: Αντίδραση απόσπασης κατά την απόπειρα ακετυλίωσης της ένωσης **144b**.

Η ευαισθησία σχετίζεται πιθανότατα με την εμφάνιση ιχνών οξέων. Στην περίπτωση του παραγώγου **144b**, για παράδειγμα, πιθανόν συμβαίνει απελευθέρωση μικρών ποσοτήτων υδροχλωρίου κατά την αντίδραση με ακετυλοχλωρίδιο (**α/α 1, Πίνακας 3**) που δεν δεσμεύονται αρκετά γρήγορα από την ετερογενή βάση (ένδειξη αποτελεί η οξείδωση της μεταλλικής βελόνας που χρησιμοποιήθηκε για τη διατήρηση ατμόσφαιρας αργού κατά την αντίδραση). Προσθήκη οργανικής βάσης (για παράδειγμα DMAP, **α/α 4, Πίνακας 3**) μειώνει το ποσοστό απόσπασης, χωρίς να το εξαλείφει ωστόσο. Αντίστοιχα η παραμονή του ενδιαμέσου **152** σε μη σταθεροποιημένο δευτεριωμένο χλωροφόρμιο, που τείνει να εμφανίζει ελαφριά οξύτητα με την πάροδο του χρόνου, για μία νύχτα στους -18 °C ήταν αρκετή για τη διάσπασή του σε έναν αριθμό παραπροϊόντων. Αναμενόμενα η συγκεκριμένη κατηγορία ενώσεων αποδείχτηκε και σχετικά ασταθής στη χρωματογραφία στήλης.

Τα ενδιάμεσα **144b** και **144c** δεν ακετυλιώθηκαν επιτυχώς μετά από έναν αριθμό προσπαθειών. Για το λόγο αυτό και επειδή τα δύο παράγωγα δεν ήταν πλέον χρήσιμα για τους συνθετικούς μας στόχους, εγκαταλείφθηκαν σε αυτό το σημείο της σύνθεσης και οι προσπάθειες συνεχίστηκαν με το ενδιάμεσο **152**.

Μετά την επιτυχημένη ακετυλίωση, το παράγωγο **152** ανάχθηκε ομαλά στον επιθυμητό γλυκοζίτη **79a** (**Σχήμα 2.43**).



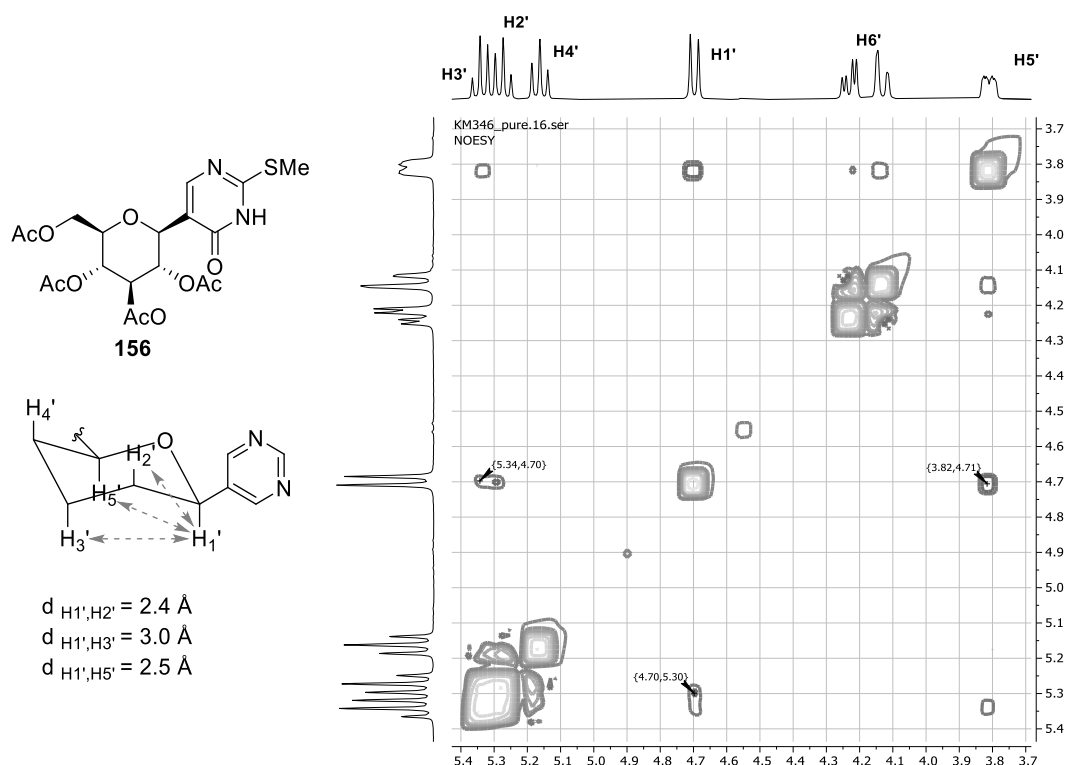
Σχήμα 2.43: Αναγωγή και παραλαβή του επιθυμητού C-γλυκοζίτη **79**.

Σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρήθηκε ατελής αποπροστασία της πυριμιδίνης και παρουσία του άπολου ενδιαμέσου **155** (Σχήμα 2.43) στα αρχικά κλάσματα της χρωματογραφίας. Ωστόσο επίδραση υδατικού οξέος και θέρμανση σε αυτά τα κλάσματα οδηγούσε στην περαιτέρω μετατροπή του στο επιθυμητό προϊόν **79a**. Σε κάθε περίπτωση η απόδοση σε **79a** ήταν σταθερά της τάξης του 85%.

Η επιθυμητή β-στεreoχημεία του προϊόντος **79a** επιβεβαιώθηκε φασματοσκοπικά. Ήδη στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του **79a**, το ανωμερικό πρωτόνιο, που διακρίνεται ανάμεσα στις κορυφές που αντιστοιχούν στις βενζυλομάδες, δείχνει σταθερά σύζευξης $J_{H1,H2} = 9.5 \text{ Hz}$, το οποίο υποδεικνύει δίεδρη γωνία ανάμεσα στο νέο $H1$ και $H2$ στη περιοχή των 180° ,¹⁵⁴ λαμβάνοντας υπόψη ότι ο σακχαρικός δακτύλιος στο προϊόν **79a** αναμένεται να λαμβάνει διαμόρφωση με τους ογκώδεις υποκαταστάτες σε ισημερινή θέση.

Η διευθέτηση γίνεται πιο εμφανής στην περίπτωση του ακετυλιωμένου παραγώγου **156** (Εικόνα 2.10), η σύνθεση του οποίου θα συζητηθεί παρακάτω. Σε αυτό το παράγωγο, διακρίνονται καθαρά οι κορυφές που αντιστοιχούν στα σακχαρικά πρωτόνια, με το σύνολο των σταθερών σύζευξης των πρωτονίων του σακχαρικού δακτυλίου να ξεπερνούν τα 9 Hz.

Πέρα από τις σταθερές σύζευξης, η χρήση φασματοσκοπίας NOESY (Εικόνα 2.10) δείχνει εμφανώς τη χωρική αλληλεπίδραση του ανωμερικού πρωτονίου $H1$ με τα πρωτόνια $H3$ και $H5$ τα οποία όπως αναμένεται βρίσκονται από την ίδια πλευρά του σακχαρικού δακτυλίου, όπως επίσης και με το γειτονικό πρωτόνιο $H2$. Οι αποστάσεις που φαίνονται στο σχήμα έχουν υπολογιστεί από θεωρητική μελέτη της ένωσης **156** μετά από ελαχιστοποίηση με το λογισμικό Chem3D.



Εικόνα 2.10: Φάσμα NOESY (400 MHz σε $CDCl_3$) της ένωσης **156** που επιβεβαιώνει τη β-στεreoχημεία του προϊόντος.

2.2.7 Παραγωγοποίηση κι αποπροστασία

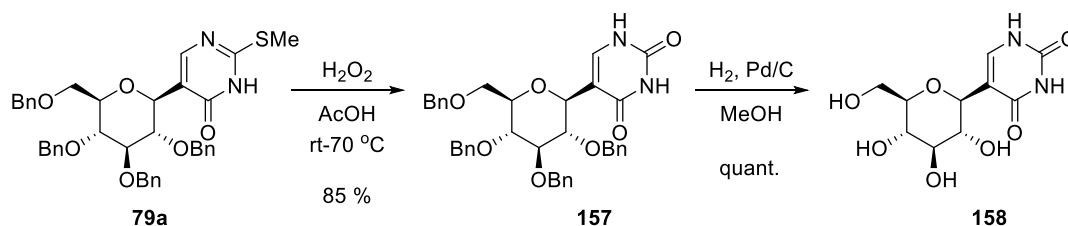
Μετά την επιτυχή σύνθεση μεγάλων ποσοτήτων του ενδιαμέσου-κλειδιού **79a**, ξεκίνησαν οι δοκιμές για τη σύνθεση παραγώγων του. Μετά από την προστασία των νέων ενδιαμέσων, θα είχε πλέον εγκαινιαστεί μια νέα οικογένεια δυνάμει αναστολέων της GP.

2.2.7.1 C^5 -β-D-γλυκοπυρανοζυλοανάλογα νουκλεοζιτών

Πρώτος στόχος ήταν η σύνθεση της C^5 -D-γλυκοπυρανοζυλοουρακίλης (Ψ-GU, **158**), γλυκοπυρανοζιτικού αναλόγου της ψευδοουριδίνης η οποία αποτέλεσε πηγή έμπνευσης της παρούσας σύνθεσης (Ενότητα 2.1.1).¹⁵⁵

Επιχειρήθηκε έτσι η υδρόλυση της μεθυλοθειο-ομάδας της ένωσης **79a** προς υδροξύλιο. Η χρήση υδατικών βάσεων και οξέων αποδείχθηκε αναποτελεσματική. Αντίθετα, η επίδραση οξικού οξέος παρουσία υδατικού υπεροξειδίου του υδρογόνου με θέρμανση (**Σχήμα 2.44**),¹⁵⁶ οδήγησε στον

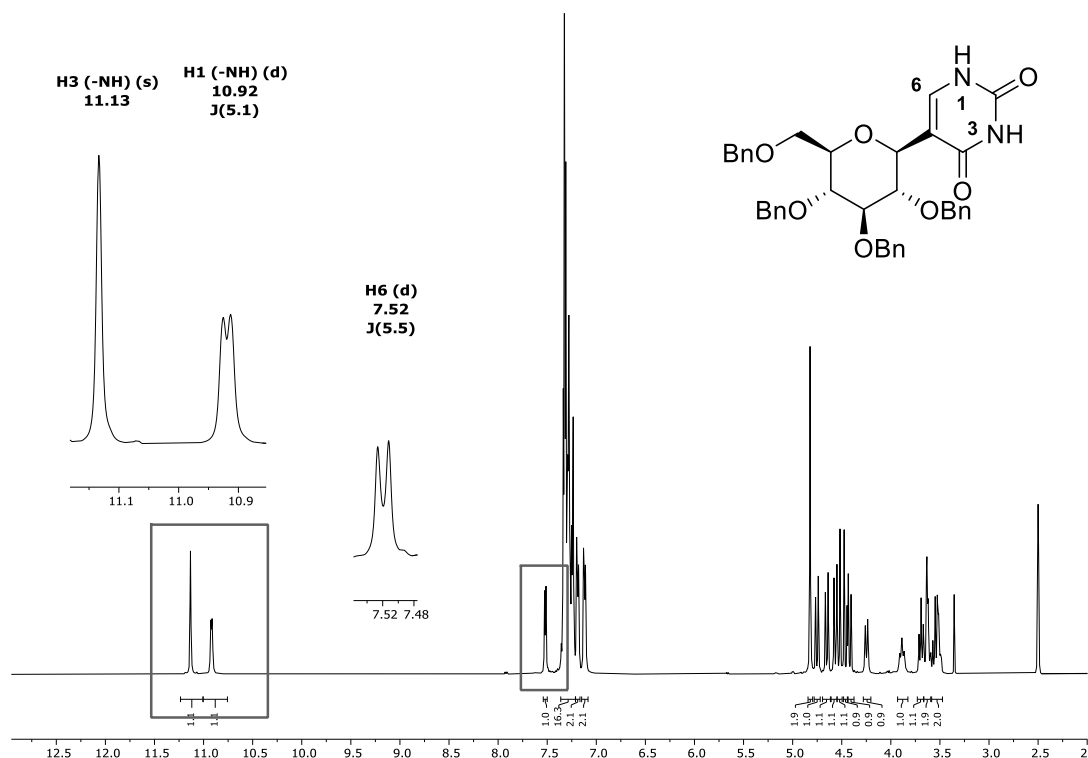
ομαλό σχηματισμό του προϊόντος **157**, πιθανότατα μέσω οξείδωσης στην ενδιάμεση σουλφόνη, και στη συνέχεια υδρόλυσή της από το νερό.



Σχήμα 2.44: Σύνθεση της Ψ-γλυκοκυρανοζυλοουρακίλης **158** (Ψ-GU).

Μια ενδιαφέρουσα λεπτομέρεια πάνω στη δομή των C-γλυκοκυρανοζιτών της παρούσας εργασίας προκύπτει από το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης **157** (Εικόνα 2.11). Στο φάσμα της ένωσης είναι ιδιαίτερα διακριτά τα αμιδικά πρωτόνια $H1$ και $H3$, όπως επίσης και η κορυφή η οποία αντιστοιχεί το πρωτόνιο $H6$ του πυριμιδινικού δακτυλίου η οποία εμφανίζεται ως διπλή, λόγω σχάσης με το αμιδικό $H1$. Θα καταστεί εμφανές αργότερα, αλλά είναι σημαντικό να σημειωθεί σε αυτό το σημείο ότι παρόμοια σχάση του $H6$ δεν διακρίνεται σε κανένα άλλο από τα N^2 -αρυλοϋποκατεστημένα παράγωγα **163a-d** και **170a,b** που παρασκευάστηκαν στη συνέχεια, τα οποία περιέχουν ένα μόνο αμιδικό πρωτόνιο στον πυριμιδινικό δακτύλιο (Ενότητα 2.2.7.2). Το γεγονός αυτό παρέχει την πληροφορία ότι σε όλες αυτές τις ενώσεις θα επικρατεί το ταυτομέρες της πυριμιδίνης το οποίο διατηρεί πρωτονιωμένο το άζωτο $N3$ έναντι του $N1$, γεγονός που στην πορεία των πειραμάτων αποδείχθηκε να έχει άμεση σχέση με την ικανότητα πρόσδεσης των παραγώγων στο καταλυτικό κέντρο της GP (Ενότητα 4.1.1).

Στη συνέχεια η ένωση **157** υποβλήθηκε σε καταλυτική υδρογόνωση προς απομάκρυνση των βενζυλομάδων (Σχήμα 2.44). Η τελική ένωση **158** παραλήφθηκε ποσοτικά και φασματοσκοπικά καθαρή.

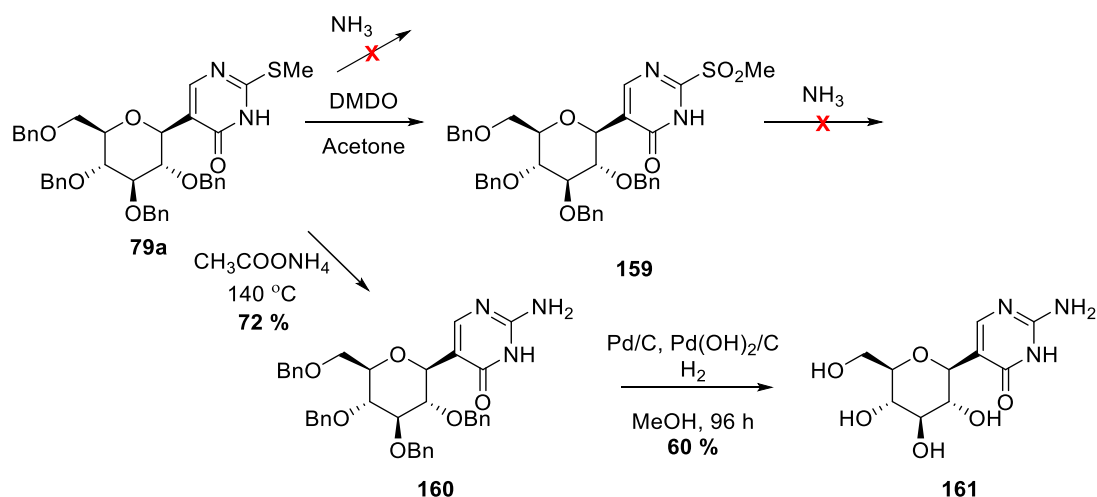


Εικόνα 2.11: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, σε $\text{DMSO-}d_6$) της ένωσης **157** με λεπτομέρεια των πρωτονίων H1, H3, και H6.

Ως δεύτερος στόχος τέθηκε η σύνθεση της $\text{C}^5\text{-D-γλυκοκυπρανοζυλο-ισοκυτοσίνης}$ ($\Psi\text{-GisoC}$). Ο αντίστοιχος ψευδοριβονουκλεοζίτης ψευδοϊσοκυτιδίνη χρησιμοποιείται ευρέως στη σύνθεση τεχνητών αναλόγων του γενετικού υλικού με εφαρμογές στην γενετική και μοριακή βιολογία.¹⁵⁷

Η απευθείας υποκατάσταση της μεθυλοθειομάδας του ενδιαμέσου **79a** από αμμωνία (**Σχήμα 2.45**), ενώ περιγράφεται στη βιβλιογραφία,¹⁵⁸ δεν οδήγησε σε σχηματισμό προϊόντος. Δοκιμάστηκε η οξείδωση του θείου με τη χρήση διμεθυλοδιοξιρανίου,^{159,160} οπότε σχηματίστηκε η αντίστοιχη σουλφόνη **159**, με σκοπό την αύξηση της ηλεκτρονιοφιλικότητας του άνθρακα C^2 . Και πάλι, ακόμη και μετά από πολύωρη διαβίβαση αέριας αμμωνίας σε διάλυμα της σουλφόνης¹⁵⁹ δεν παρατηρήθηκε υποκατάσταση.

Το επιθυμητό προϊόν **160** συντέθηκε τελικά προσροφώντας το ενδιάμεσο **79a** σε κονιορτοποιημένο, στερεό οξικό αμμώνιο και προχωρώντας σε σύντηξη του μίγματος σε θερμοκρασία $140\text{ }^\circ\text{C}$.¹⁶¹ Από το στερεοποιημένο τήγμα απομονώθηκε, μετά από υδατική κατεργασία και χρωματογραφικό καθαρισμό, σε απόδοση 72% το προϊόν **160**.



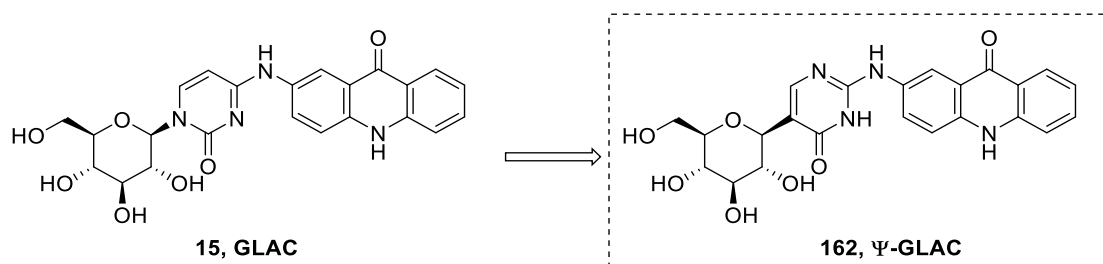
Σχήμα 2.45: Σύνθεση της C⁵-β-D-γλυκοπυρανοζυλοϊσοκυτοσίνης (Ψ-GisoC)

Η αποβενζυλίωση του προϊόντος **160** αποδείχτηκε δύσκολη σε σχέση με τη περίπτωση του παραγώγου **157**. Οι κλασικές συνθήκες υδρογόνωσης χρησιμοποιώντας παλλάδιο σε άνθρακα σε ατμόσφαιρα υδρογόνου οδήγησαν σε ποσοτική ανάκτηση του αρχικού αντιδραστήριου. Η αποπροστασία τελικά επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας πρακτικά ισομοριακή ποσότητα υποστρώματος και συνδυασμού καταλυτών παλλαδίου και υδροξειδίου του παλλαδίου.¹⁶² Ακόμη κι υπό αυτές τις συνθήκες η αποβενζυλίωση απαιτήσε παρατεταμένο χρόνο αντίδρασης (96 h) σε σχέση με το **157**, ενώ απαιτήθηκε επίπλοκος χρωματογραφικός καθαρισμός για να παραληφθεί το προϊόν **161** σε απόδοση 60%. Θεωρούμε ότι η δομή τύπου γουανιδίνης η οποία σχηματίζεται ανάμεσα στα δύο άτομα αζώτου του δακτυλίου σε συνδυασμό με το εξωκυκλικό άτομο αζώτου, πιθανόν συμμετέχει σε σχηματισμό σύμπλοκης ένωσης με το μεταλλοάτομο του καταλύτη, απενεργοποιώντας τον.

2.2.7.2 Υποκατάσταση από αρυλαμίνες

Στη συνέχεια ξεκίνησαν οι δοκιμές παραγωγοποίησης της ένωσης **79a** με τη χρήση αρυλαμινών, προς σχηματισμό ενός αριθμού N²-αρυλο-υποκατεστημένων C⁴-γλυκοπυρανοζυλο-ισοκυτιδινών. Η επιλογή των αρυλαμινών έγινε με βάση ενώσεις που έχουν παρασκευαστεί από την ομάδα μας νωρίτερα και έχουν αποδειχθεί ιδιαίτερα ισχυροί αναστολείς της GP (Ενότητα 1.3) Βασικός στόχος ήταν η σύνθεση ειδικότερα του C-γλυκοπυρανοζυλο αναλόγου του αναστολέα GLAC (**15**, Σχήμα 2.46), που

αποτελεί τον ισχυρότερο αναστολέα του καταλυτικού κέντρου της GP που έχει παρασκευαστεί από την ομάδα μας μέχρι στιγμής,⁵² όπως επίσης κι έναν από τους ισχυρότερους της βιβλιογραφίας.

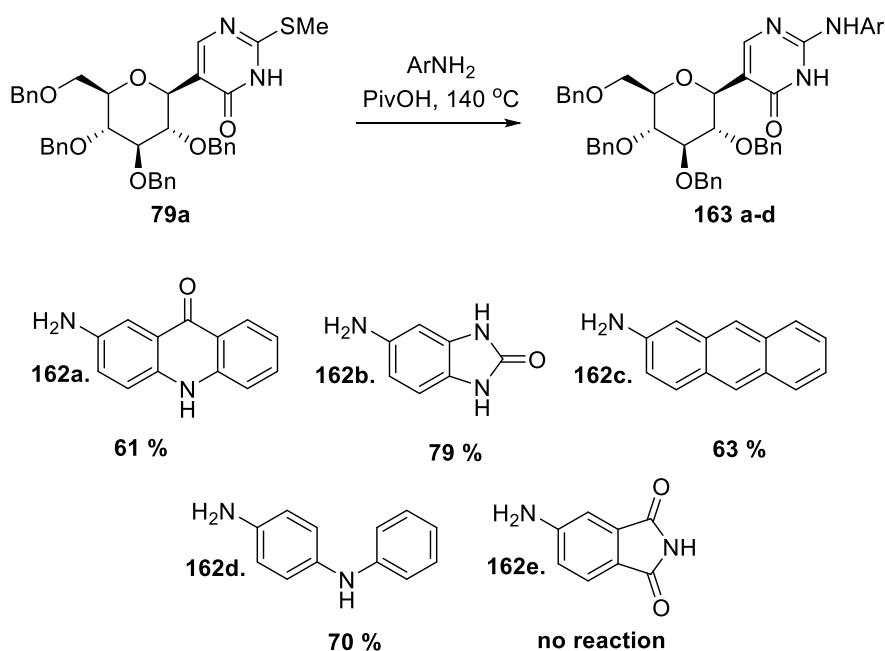


Σχήμα 2.46: Βασικός συνθετικός στόχος είναι η σύνθεση του C-γλυκοπυρανοζυλο-αναλόγου του αναστολέα GLAC.

Σε σχέση με τη θέση 4 του πυριμιδινικού δακτυλίου, η θέση 2 είναι περισσότερο ηλεκτρονικά πλούσια, καθιστώντας τη λιγότερο πυρηνόφιλη. Η μάλλον σταθερή φύση της μεθυλοθειομάδας στην υποκατάσταση σε συνδυασμό με τον ηλεκτρονικά ελλειμματικό χαρακτήρα των αρυλαμινών αναμενόταν να δυσκολέψει την υποκατάσταση.

Ο αρχικός σχεδιασμός περιλάμβανε την οξείδωση της μεθυλοθειομάδας σε σουλφόνη με στόχο τη μετατροπή της σε ευκολότερα αποχωρούσα ομάδα, όπως περιγράφεται στην προηγούμενη ενότητα. Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτής της προσέγγισης στην περίπτωση της ισοκυτοσίνης ήταν μάλλον απογοητευτικά.

Ως εναλλακτική δοκιμάστηκε η απευθείας υποκατάσταση της 2-μεθυλοθειομάδας παρουσία πιβαλικού οξέος (**Σχήμα 2.47**).¹⁶³ Στο συγκεκριμένο παράδειγμα το πιβαλικό οξύ πέρα από διαλύτης, αποτελεί και όξινο καταλύτη για την αντίδραση. Η οξύτητα και η δυνατότητα πραγματοποίησης της αντίδρασης σε υψηλή θερμοκρασία επιτρέπει την απομάκρυνση της μεθυλοθειομάδας ως αέρια μεθυλομερκαπτάνη, βοηθώντας σημαντικά την επίτευξη της υποκατάστασης ακόμη και από όχι ισχυρά πυρηνόφιλες αρυλαμίνες. Η επιλογή του πιβαλικού οξέος έγκειται στην υψηλή στερεοχημική παρεμπόδιση της *tert*-βουτυλομάδας, που περιορίζει τον ανταγωνιστικό σχηματισμό αμιδίου μεταξύ οξέος κι αρυλαμίνης, όπως συναντάται για παράδειγμα κατά τη χρήση οξικού οξέος.¹⁶³



Σχήμα 2.47: Υποκατάσταση της θέσης 2 από αρυλαμίνες

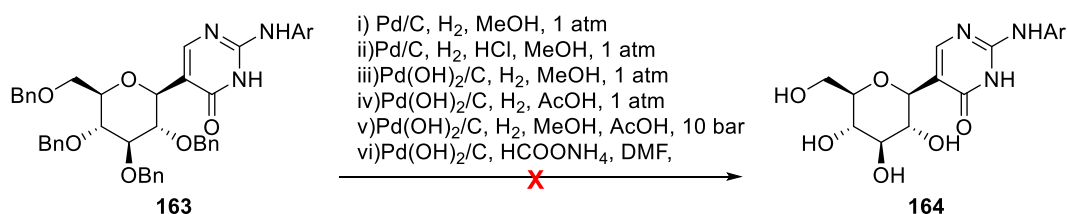
Οι αμίνες **162a**, **162b** και **162c** αντέδρασαν ομαλά. Η ιδιαίτερα ηλεκτρονιακά ελλειμματική αμίνη **162e** δεν αντέδρασε προς σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος ακόμη και μετά από παρατεταμένους χρόνους αντίδρασης. Στη περίπτωση της αμίνης **162d** χρειάστηκε να προστεθούν σταδιακά 4 ισοδύναμα αμίνης, πιθανότατα επειδή ο οξειδωτικός πολυμερισμός της αμίνης ανταγωνίζεται την υποκατάσταση.¹⁶⁴

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης ήταν αναγκαία η απομάκρυνση του πιβαλικού οξέος, που στα πλαίσια της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε με απόσταξη υπό υψηλό κενό παρουσία παγίδας υγρού αζώτου, και στη συνέχεια, στην περίπτωση που το προϊόν ήταν ικανοποιητικά διαλυτό σε οργανικούς διαλύτες, υδατική κατεργασία με βάση.

Οι ενώσεις επέδειξαν ιδιαίτερα χαμηλή διαλυτότητα σε κοινούς διαλύτες σε σχέση με τους αντίστοιχους αναστολείς με δομή κλασικού γλυκοζίτη, καθιστώντας τον χρωματογραφικό καθαρισμό των ενώσεων ιδιαίτερα επίπονο. Σε κάθε περίπτωση απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν με επιτυχία τα προϊόντα **163a-d**.

Τελευταίο βήμα της σύνθεσης ήταν κι εδώ η απομάκρυνση των βενζυλαιθέρων, η οποία προς μεγάλη μας απογοήτευση ήταν αδύνατη σε κάθε περίπτωση. Αρχικά, και λαμβάνοντας υπόψη τόσο τη μάλλον χαμηλή διαλυτότητα των

αρχικών αντιδραστηρίων, όσο και την αναμενόμενη διαλυτότητα των προϊόντων, δοκιμάστηκε μία σειρά διαλυτών και συνδυασμών διαλυτών. Αν και στην περίπτωση του παραγώγου **163b** παρατηρήθηκε σχηματισμός προϊόντος, αυτό προέκυψε ως ένα μη διαχειρίσιμο σκουρόχρωμο μίγμα, πιθανότατα λόγω της παρουσίας κολλοειδών παραπροϊόντων παλλαδίου. Εξετάστηκε ένας αριθμός καταλυτών, χωρίς αποτέλεσμα (**Σχήμα 2.48**). Η προσθήκη οξέων, η προσπάθεια υδρογόνωσης υπό υψηλή πίεση, η χρήση στερεών φορέων υδρογόνου (π.χ. φορμικό αμμώνιο), προσθήκη οξέος, όπως και οι πολύ παρατεταμένοι χρόνοι αντίδρασης με ισομοριακές ποσότητες καταλυτών, οδήγησαν, χωρίς εξαίρεση σε αποσύνθεση των υποστρωμάτων χωρίς ανιχνεύσιμες ποσότητες προϊόντων μέσα στα πολύπλοκα μίγματα που προέκυψαν.



Σχήμα 2.48: Προσπάθειες υδρογονόλυσης των βενζυλομάδων στις ενώσεις **163a-d**

Θεωρούμε ότι τα απογοητευτικά αποτελέσματα κατά την τελική αποπροστασία οφείλονται στην πολύ χαμηλή διαλυτότητα των προϊόντων σε συνδυασμό με την παρουσία της δομής γουανιδίνης στον πυριμιδινικό δακτύλιο, που πιθανά οδηγούν σε απενεργοποίηση του καταλύτη, όπως παρατηρήθηκε και στην περίπτωση της 2,3,4,6-τετρα-Ο-βενζυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλοϊσοκυτοσίνης (**160**).

Το επόμενο βήμα ήταν οι προσπάθειες απομάκρυνσης και αντικατάστασης των βενζυλομάδων στα βήματα πριν τη N^2 -υποκατάσταση. Δοκιμάστηκε η υδρογονόλυση του ενδιαμέσου **79a** η οποία (αναμενόμενα) απέτυχε, πιθανότατα λόγω δηλητηρίασης του καταλύτη από τη μεθυλοθειομάδα.

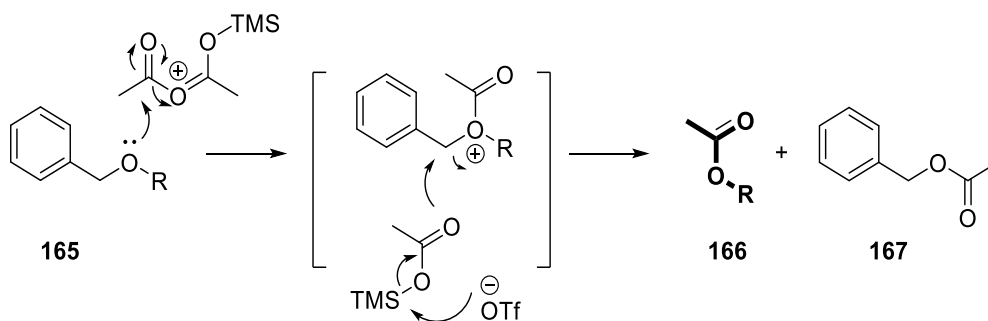
Η επόμενη, περισσότερο διαδεδομένη, μέθοδος αποπροστασίας μέσω επίδρασης πρωτικών οξέων ή οξέων Lewis δεν εφαρμόστηκε, λόγω της μεγάλης πιθανότητας επιμερείωσης των προϊόντων. Η επιμερείωση υπό την παρουσία τόσο πρωτικών οξέων, όσο και οξέων Lewis περιγράφεται τόσο για τους C-γλυκοζίτες γενικότερα,¹⁶⁵ όσο και για τους αντίστοιχους C⁵-νουκλεοζίτες

της ουρακίλης,¹³⁹ οπότε αποφασίστηκε να αναζητηθούν εναλλακτικές συνθετικές οδοί.

Δοκιμάστηκε έτσι η σύνθεση να πραγματοποιηθεί ξεκινώντας από το στάδιο της σύζευξης χρησιμοποιώντας εξ αρχής διαφορετικές προστατευτικές ομάδες στο σακχαρικό τμήμα των μορίων (Ενότητα 2.2.2). Δυστυχώς κι εδώ δεν επιτεύχθηκε κάποιο συνθετικά χρήσιμο αποτέλεσμα, όπως περιγράφεται στην Ενότητα 2.2.5.

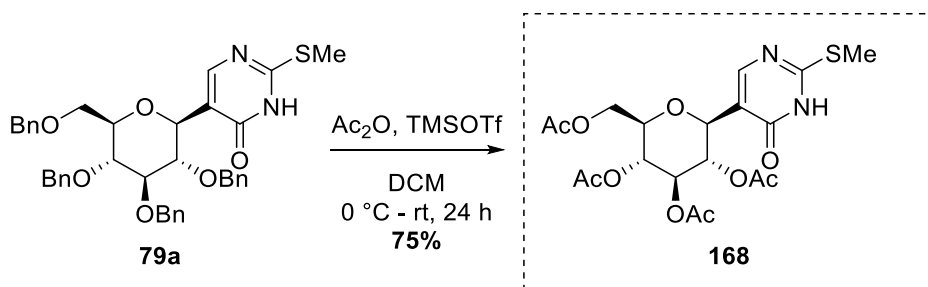
Ως τελική λύση επιχειρήθηκε να χρησιμοποιηθεί η εργασία των Vasella και συνεργατών.¹⁶⁶ Η συγκεκριμένη ομάδα αντιμετώπισε προβλήματα αστάθειας των υπό μελέτη υποστρωμάτων τους σε συνθήκες υδρογονολυτικής αποβενζυλίωσης, που επιλύθηκε χρησιμοποιώντας τον συνδυασμό TMSOTf και μεγάλης περίσσειας οξικού ανυδρίτη (>1000 ισοδύναμα), ο οποίος οδήγησε στην ανταλλαγή των βενζυλομάδων από ακετυλομάδες, με τις βενζυλομάδες να απομακρύνονται ως οξικός βενζυλεστέρας (**167**, Σχήμα 2.49).

Οι ακετυλομάδες θεωρήθηκαν ιδιαίτερα κατάλληλες και για τα υποστρώματα της παρούσας εργασίας, καθότι στην εμπειρία μας μπορούν να απομακρυνθούν υπό ετερογενείς συνθήκες (αιώρημα υποστρώματος σε μεθανολικό διάλυμα αμμωνίας), παρακάμπτοντας έτσι τυχόν προβλήματα διαλυτότητας.



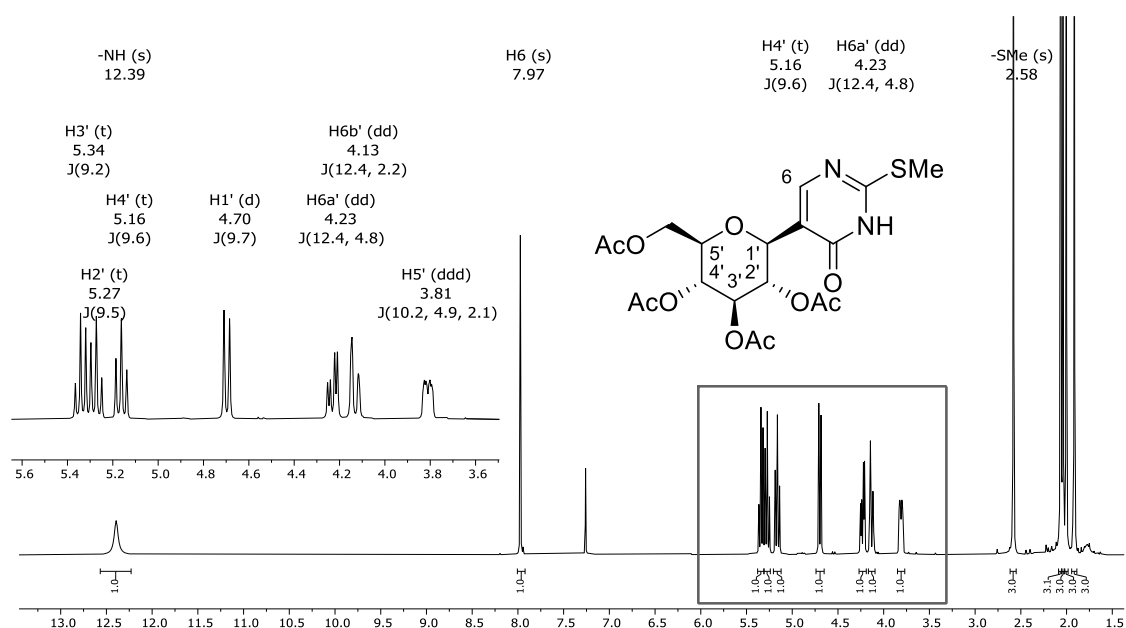
Σχήμα 2.49: Προτεινόμενος μηχανισμός αντικατάστασης βενζυλαιθέρων από ακετυλομάδες.

Μετά από βελτιστοποίηση των συνθηκών, επιτεύχθηκε πράγματι η σύνθεση του πλήρως ακετυλιωμένου ενδιαμέσου **168** σε απόδοση 75% (Σχήμα 2.50).



Σχήμα 2.50: Ανταλλαγή προστατευτικών ομάδων σε ένα βήμα.

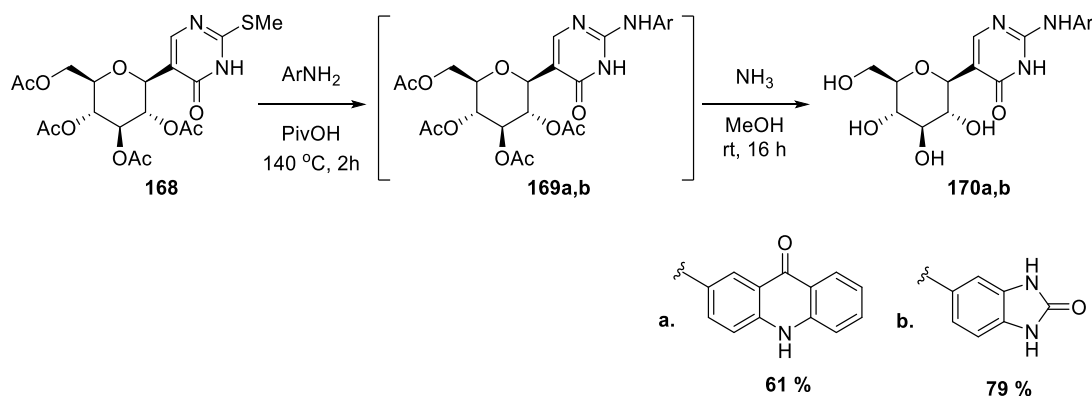
Ένα ακόμη ευχάριστο αποτέλεσμα που προέκυψε από την ανταλλαγή των προστατευτικών ομάδων, ήταν η σημαντική βελτίωση της ευκρίνειας του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης (**Εικόνα 2.12**). Η απουσία των κορυφών που αντιστοιχούν στα βενζυλικά πρωτόνια από την περιοχή των σακχαρικών κορυφών, όσο και η διεύρυνση της περιοχής μετατοπίσεων των σακχαρικών λόγω του φαινομένου μαγνητικής ανισοτροπίας των ακετυλομάδων, επέτρεψε τον λεπτομερή φασματοσκοπικό χαρακτηρισμό. Οδήγησε, τέλος, στην οριστική επιβεβαίωση της β-στεreoχημείας του προϊόντος της αναγωγής μέσω φασματοσκοπίας NOESY (Ενότητα 2.2.6).



Εικόνα 2.12: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz σε $\text{DMSO-}d_6$) της ένωσης **168** με λεπτομέρεια της περιοχής των σακχαρικών πρωτονίων (5.5 έως 3.5 ppm).

Υποκατάσταση του ακετυλιωμένου ενδιαμέσου **168** από αρυλαμίνες

Οι παραπάνω επιτυχημένες συνθήκες ακετυλίωσης δεν ήταν το ίδιο επιτυχείς για τα *N*²-αρυλοϋποκατεστημένα υποστρώματα **163a-d** της προηγούμενης ενότητας, τα οποία οδήγησαν σε πολύπλοκα μίγματα. Έτσι, το ενδιαμέσο **168** υποβλήθηκε στις ίδιες συνθήκες υποκατάστασης που είχαν εφαρμοστεί νωρίτερα με επιτυχία στα βενζυλιωμένα υποστρώματα (**Σχήμα 2.51**).



Σχήμα 2.51: Υποκατάσταση της θέσης 2 από αρυλαμίνες

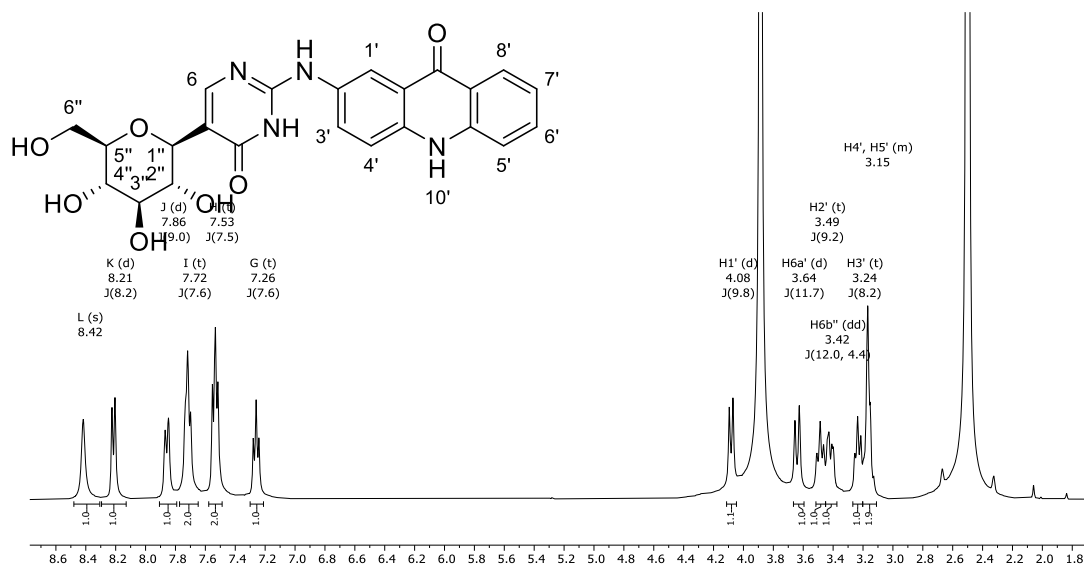
Από το αρχικό αντιδραστήριο **168** συντέθηκαν τα υποκατεστημένα προϊόντα **169a** και **169b**, χρησιμοποιώντας τις αντίστοιχες αρυλαμίνες σε συνδυασμό με πιβαλικό οξύ. Ενδιαφέρουσα ήταν η σημαντικά βελτιωμένη δραστηριότητα του ακετυλιωμένου ενδιαμέσου **168** έναντι του αντίστοιχου βενζυλιωμένου **79a**.

Και τα δύο προϊόντα υποκατάστασης εμφάνισαν εξαιρετικά χαμηλή διαλυτότητα στους κοινούς εργαστηριακούς διαλύτες. Ενδεικτικά, επιχειρήθηκε η απομόνωση του προϊόντος **169a** με υδατική κατεργασία, χρωματογραφία στήλης κανονικής κι αντίστροφης φάσης, όσο και με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών χρησιμοποιώντας Sephadex-LH20 ως πληρωτικό υλικό και διμεθυλοφορμαμίδιο ως κινητή φάση. Σε καμία περίπτωση δεν απομονώθηκε καθαρό το ενδιαμέσο μόριο **169a**.

Πραγματοποιήθηκε, λοιπόν, απευθείας αποπροστασία σε μεθανολικό διάλυμα αμμωνίας, αφού πρώτα το πιβαλικό οξύ απομακρύνθηκε υπό κενό. Μετά την αποπροστασία, απαιτείται απομάκρυνση του σχηματιζόμενου ακεταμιδίου, όσο και της περίσσειας αρυλαμίνης από το προηγούμενο βήμα. Στην περίπτωση του προϊόντος **170a** (**Ψ-GLAC**), η πολύ χαμηλή του διαλυτότητα στους κοινούς διαλύτες αποδείχθηκε χρήσιμη. Ο καθαρισμός του πραγματοποιήθηκε με επαναλαμβανόμενες καταβυθίσεις με βοήθεια φυγοκέντρωσης από οξικό

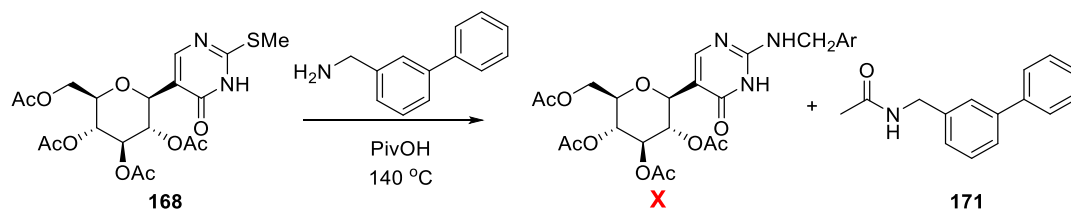
αιθυλεστέρα και μεθανόλη, ώστε να παραληφθεί το τελικό προϊόν **170a** σε απόδοση 61% από το βήμα της υποκατάστασης (**Εικόνα 2.13**).

Το ενδιάμεσο **169b** επίσης αποπροστατεύτηκε ομαλά και το τελικό προϊόν **170b** παραλήφθηκε, μετά από χρωματογραφικό καθαρισμό, σε απόδοση 79%.



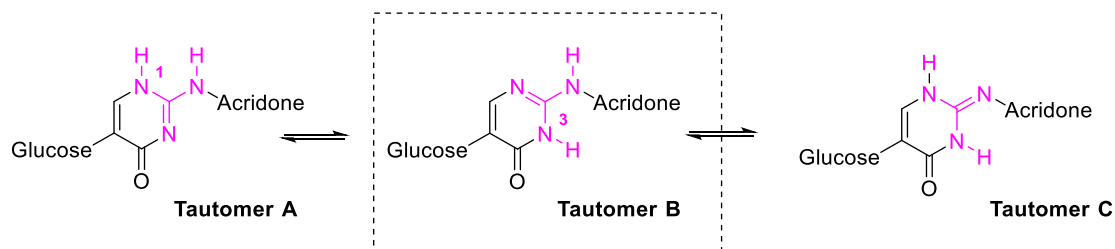
Εικόνα 2.13: Φάσμα ^1H NMR (400 MHz σε μίγμα D_2O , $\text{DMSO}-d_6$) του προϊόντος **170a** (Ψ -GLAC).

Σε αυτό το βήμα δοκιμάστηκε κι η επέκταση της αντίδρασης υποκατάστασης σε βενζυλαμίνες βασιζόμενοι σε προηγούμενη εργασία (**Σχήμα 2.52**). Η αυξημένη βασικότητα της βενζυλαμίνης σε συνδυασμό με τις όξινες συνθήκες της αντίδρασης οδήγησε αποκλειστικά στη μετανάστευση μίας ακετυλομάδας στη [1,1'-διφαινυλο]-3-υλομεθαναμίνη που χρησιμοποιήθηκε (**Σχήμα 2.52**), προς σχηματισμό του παραπροϊόντος ακεταμιδίου **171**. Το επιθυμητό προϊόν δεν κατάφερε να απομονωθεί. Γίνεται έτσι εμφανής ο σημαντικά μειωμένος ηλεκτρονιόφιλος χαρακτήρας της θέσης C^2 σε σχέση με τη θέση C^4 του πυριμιδινικού δακτυλίου.



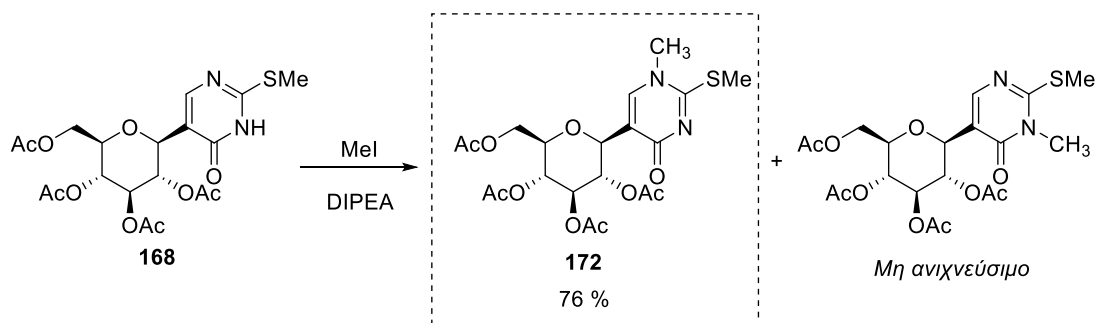
Σχήμα 2.52: Αποτυχημένη υποκατάσταση από βενζυλαμίνες

Μια τελευταία τροποποίηση σχετίζεται με τα αποτελέσματα της κινητικής και διαμορφωτικής μελέτης των νέων αναστολέων (Ενότητα 4.1.1). Όπως είχε ήδη δειχθεί από τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ κι επιβεβαιώθηκε από τη θεωρητική διαμορφωτική μελέτη του αναστολέα **170a** (Ψ -GLAC), από τα τρία πιθανά ταυτομερή της ένωσης (**Εικόνα 2.14**) επικρατεί το ταυτομερές B, οδηγώντας σε εξασθένιση της ικανότητας πρόσδεσης του αναστολέα Ψ -GLAC στο καταλυτικό κέντρο της GP.



Εικόνα 2.14: Πιθανές ταυτομερικές μορφές της ένωσης **170a**

Επιχειρήθηκε λοιπόν η ένωση να “κλειδωθεί”, με παραγωγοποίηση, στην ταυτομερική μορφή **A**. Ο πιο απλός τρόπος, με τις αναμενόμενα λιγότερο δυσμενείς επιπτώσεις στην ικανότητα πρόσδεσης του μορίου, αποτελεί την εκλεκτική μεθυλίωση της θέσης 1 του πυριμιδινικού δακτυλίου (**Σχήμα 2.53**).



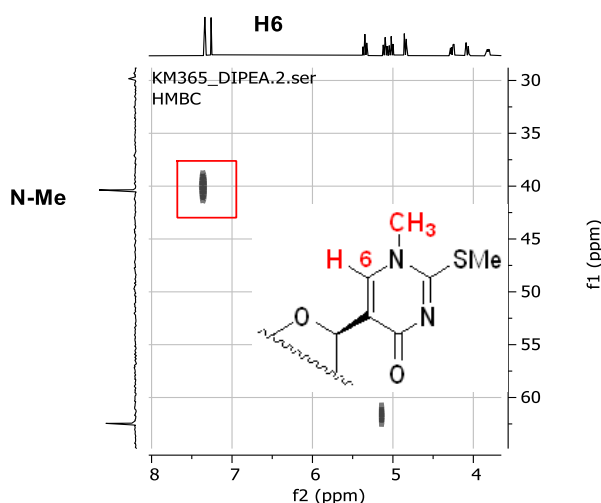
Σχήμα 2.53: Μεθυλίωση του ενδιάμεσου **168**.

Η τοποεκλεκτικότητα στη μεθυλίωση πυριμιδινών εξαρτάται από τη φύση του αλκυλιωτικού, όπως επίσης κι από στερεοηλεκτρονιακούς παράγοντες. Έτσι, μαλακά μεθυλιωτικά (ιωδομεθάνιο, θειικός διμεθυλεστέρας) δείχνουν μεγάλη εκλεκτικότητα στην αλκυλίωση ατόμων θείου και αζώτου. Σκληρότερα αλκυλιωτικά όπως το διαζομεθάνιο, έχει αναφερθεί ότι οδηγούν σε μείγματα *N*- και *O*- μεθυλιωμένων προϊόντων. Στην περίπτωση της *N*-μεθυλίωσης, συνήθως παραλαμβάνονται μίγματα *N*¹ και *N*³-μεθυλιωμένων προϊόντων.

Φαίνεται επίσης ότι ηλεκτρονιακοί παράγοντες υπερισχύουν της στεreoχημικής παρεμπόδισης, ευνοώντας τον σχηματισμό N^3 -μεθυλιωμένων (θερμοδυναμικών) προϊόντων, πιθανόν λόγω του μικρού όγκου της μεθυλομάδας.

Στην περίπτωση της μεθυλίωσης της ένωσης **168**, ενώ η χρήση υδριδίου του νατρίου οδήγησε σε πολύπλοκα μίγματα με χαμηλή απόδοση του επιθυμητού N^1 -μεθυλιωμένου προϊόντος, η χρήση των περισσότερο ογκωδών οργανικών βάσεων διισοπροπυλαιθυλαμίνης και DBU οδήγησαν πρακτικά στον αποκλειστικό σχηματισμό του κινητικού N^1 μεθυλιωμένου προϊόντος **172**, με τις πρώτες συνθήκες να οδηγούν σε απόδοση 76%. Η

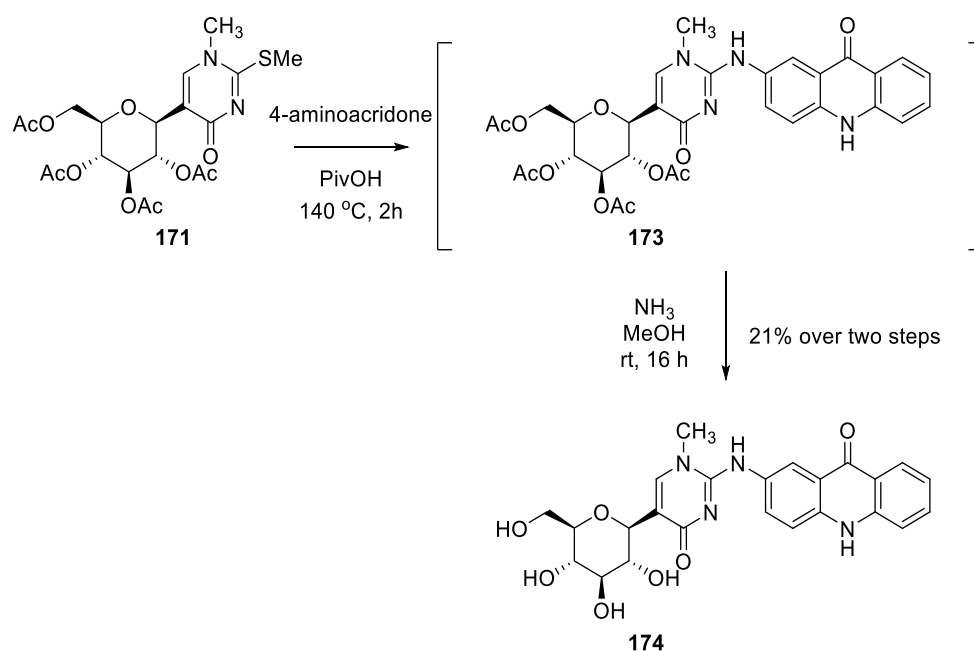
τοποεκλεκτικότητα της μεθυλίωσης, που φαίνεται να οφείλεται σε στεreoχημικούς παράγοντες, επιβεβαιώθηκε μέσω φάσματος HMBC της ένωσης (**Εικόνα 2.16**), με την κορυφή που αντιστοιχεί στον



Εικόνα 2.15: Λεπτομέρεια φάσματος HMBC της ένωσης **172**.

άνθρακα της νέας μεθυλομάδας στα 40 ppm να εμφανίζει μία αποκλειστικά κορυφή συσχέτισης με το πρωτόνιο 6 του πυριμιδινικού δακτυλίου. Αντίστοιχα τα πρωτόνια της νέας μεθυλομάδας αλληλεπιδρούν αποκλειστικά με τον άνθρακα της θέσης 6 και τον τεταρτοταγή άνθρακα της θέσης 2.

Η ένωση **172** υποβλήθηκε σε συνθήκες υποκατάστασης με 4-αμινοακριδόνη σε πιβαλικό οξύ (**Σχήμα 2.54**) για να σχηματιστεί το προϊόν **173**.

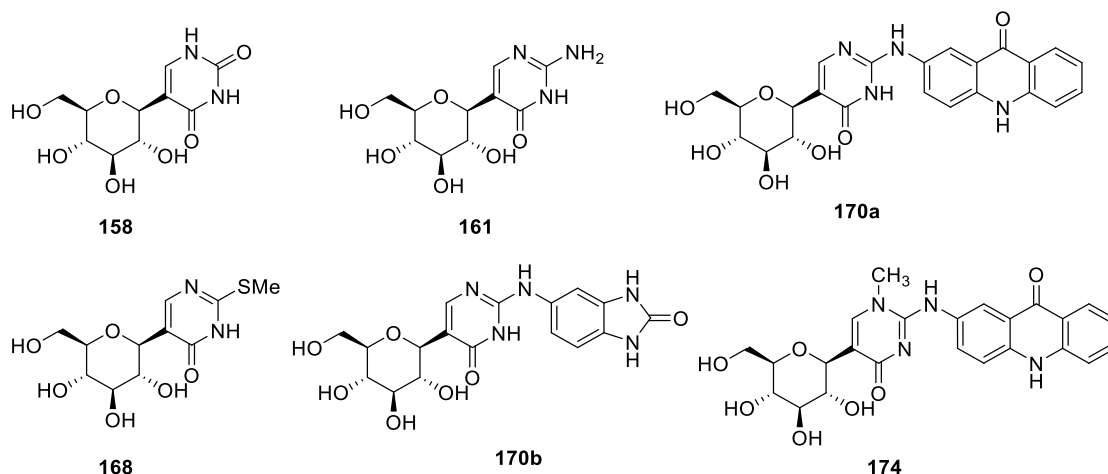


Σχήμα 2.54: Σύνθεση του N^2 -μεθυλιωμένου αναλόγου του Ψ-GLAC.

Η αντίδραση προχώρησε βραδύτερα από ότι στην περίπτωση του μη μεθυλιωμένου ενδιαμέσου **168**, πιθανότατα λόγω της αυξημένης στερεοχημικής παρεμπόδισης που προκαλείται από τη νέα μεθυλομάδα. Παράλληλα, παρατηρήθηκε ο σχηματισμός ενός μεγάλου αριθμού παραπροϊόντων. Θεωρούμε πιθανό ότι ο συνδυασμός της οξύτητας του συστήματος με την υψηλή θερμοκρασία, οδηγούν, μεταξύ άλλων, σε πιθανή απόσπαση και μετανάστευση της μεθυλομάδας προς τον σχηματισμό του θερμοδυναμικά σταθερότερου N^3 -μεθυλιωμένου προϊόντος. Θεωρούμε ότι το N^3 - είναι σταθερότερο θερμοδυναμικά του N^1 - ισομερούς λόγω της εκτεταμένης συζυγίας που επιτρέπει η μεθυλίωση στη N -3 θέση. Μετά από αποπροστασία του ενδιαμέσου **173**, το τελικό προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης, πολλαπλές καταβυθίσεις και παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, ώστε να παραληφθεί τελικά το προϊόν **174** σε απόδοση 21%.

2.3 Συμπεράσματα Κεφαλαίου 2

Συμπερασματικά, επιτεύχθηκε η σύνθεση ενός αριθμού νέων C-γλυκοζιτικών παραγώγων (**Εικόνα 2.16**) με σκοπό τη μελέτη πιθανής αναστολής που επέχουν στη λειτουργία της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.



Εικόνα 2.16: Νέα μόρια με δομή C-γλυκοζίτη που παρασκευάστηκαν.

Ξεκινώντας από την προκαταρκτική σύνθεση που περιγράφεται στην Ενότητα 2.1.3, μελετήθηκε ένας αριθμός εναλλακτικών συνθετικών οδών (Ενότητες 2.2.4, 2.2.5), ενώ πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση των επιμέρους συνθετικών βημάτων.

Πιο συγκεκριμένα, η αρχή έγινε από την αύξηση των αποδόσεων κατά το βήμα της σύζευξης πυριμιδινικού και σακχαρικού τμήματος, μέσω της υποκατάστασης οργανολιθιακών ενδιαμέσων με τα αντίστοιχα αντιδραστήρια Grignard (Ενότητα 2.2.5). Επιλύθηκαν επίσης συνθετικά προβλήματα κατά την, απαραίτητη για την επιτυχή αναγωγή, ακετυλίωση του ανωμερικού υδροξυλίου (Ενότητα 2.2.6), η οποία παρουσίαζε σοβαρά προβλήματα επαναληψιμότητας, τα οποία τελικά επιλύθηκαν. Επιτεύχθηκε επίσης η υποκατάσταση του πυριμιδινικού δακτυλίου από αρυλαμίνες που δεν είχε επιχειρηθεί στην αρχική σύνθεση στα πλαίσια του μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης. Ενώ συναντήθηκαν προβλήματα στο βήμα της τελικής αποπροστασίας, και αυτό επιλύθηκε με την εφαρμογή αντίδρασης αλλαγής της προστασίας των βενζυλαιθέρων προς ακετυλομάδες σε ένα στάδιο (Ενότητα 2.2.7). Ολοκληρώθηκε έτσι με επιτυχία ο σχεδιασμός ενός στιβαρού, επαναλήψιμου συνθετικού σχήματος που επέτρεψε την πρόσβαση σε μία νέα οικογένεια δυνάμει αναστολέων της GP με γενική δομή C-γλυκοζίτη.

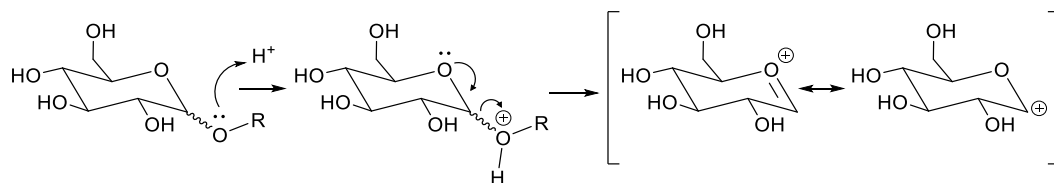
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Καρβασακχαρικά ανάλογα

3.1 Εισαγωγή

Η δεύτερη προσέγγιση η οποία μελετήθηκε για τη σύνθεση μεταβολικά σταθερών αναστολέων της GP, αποτέλεσε η σύνθεση καρβασακχαρικών αναλόγων των *N*²-αρυλο-υποκατεστημένων β-D-γλυκοπυρανοζυλοκυτοσινών που έχουν συζητηθεί νωρίτερα (Ενότητα 1.3).

Ως καρβασάκχαρα περιγράφονται ανάλογα των παραδοσιακών σακχάρων, όπου ο οξανικός δακτύλιος υποκαθίσταται από έναν καρβοκυκλικό δακτύλιο, με μία μεθυλενομάδα να παίρνει τη θέση του ημιακεταλικού ατόμου οξυγόνου του δακτυλίου. Τα καρβασάκχαρα συναντώνται στη φύση συνήθως ως τμήματα περισσότερο πολύπλοκων μορίων.¹⁶⁷

Τα καρβοκυκλικά ανάλογα σακχάρων συνήθως παρουσιάζουν αξιοσημείωτη συγγένεια με ένζυμα τα οποία εμπλέκονται στον μεταβολισμό των φυσικών αναλόγων τους και μπορούν να λειτουργήσουν ως εναλλακτικοί προσδέτες σε αυτά. Η αντικατάσταση του ημιακεταλικού ατόμου οξυγόνου στον δακτύλιο από μεθυλενομάδα στα καρβασάκχαρα, αποτρέπει τον σχηματισμό, σταθεροποιημένων μέσω συντονισμού, ενδιάμεσων κατιόντων οξωνίου που αποτελούν σημαντικά ενδιάμεσα τόσο κατά την όξινη, όσο και κατά την ενζυματική υδρόλυση των κλασικών γλυκοζιτών.¹⁶⁸



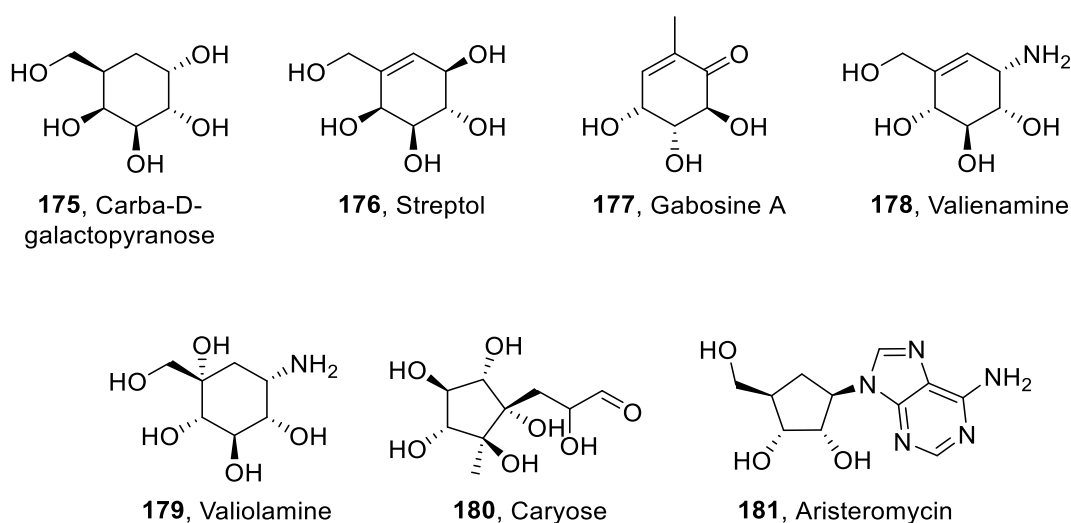
Σχήμα 3.1: Σχηματισμός κατιόντος οξωνίου κατά την όξινη υδρόλυση κλασικού γλυκοζίτη.

Ως αποτέλεσμα, τα παράγωγα των καρβασακχάρων παρουσιάζουν ιδιαίτερα αυξημένη σταθερότητα στις βιολογικές συνθήκες σε σχέση με παρόμοια γλυκοζιτικά ανάλογα, ενώ επίσης δεν παρουσιάζουν το φαινόμενο της επιμερείωσης το οποίο παρατηρείται στα αναγωγικά κυρίως σάκχαρα.

Η αυξημένη σταθερότητα, παράλληλα με τη σημαντική δομική συγγένεια των καρβασακχάρων με τα συμβατικά σάκχαρα, καθιστούν τους καρβασακχαρίτες

προσφιλή στόχο στη φαρμακευτική χημεία, ως μιμητές φυσικών και τεχνητών γλυκο- και νουκλεοζιτών.

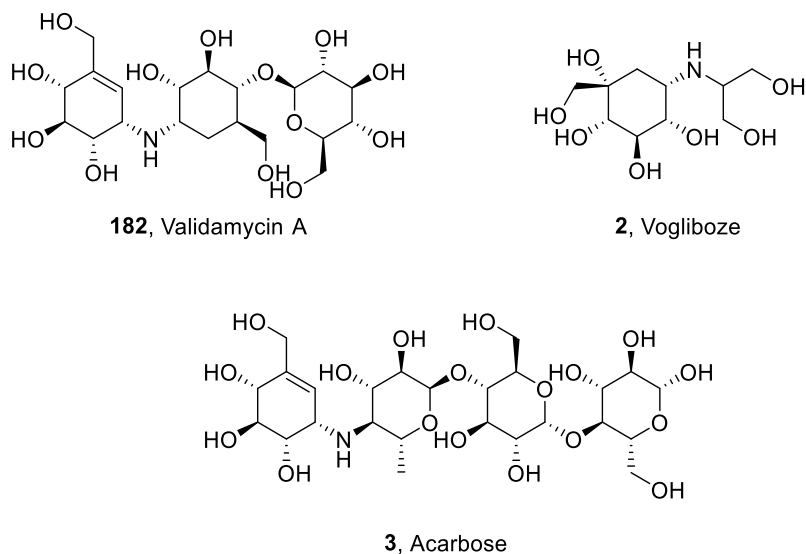
Τα παράγωγα αυτής της κατηγορίας σπάνια συναντώνται ως αυτοτελή φυσικά προϊόντα, με μοναδική εξαίρεση την καρβα-α-D-γαλακτοπυρανόζη (*carba*-D-galactopyranose, **175**, **Εικόνα 3.1**).¹⁶⁹ Αποτελούν τμήμα μορίων αποκλειστικά μικροβιακής προέλευσης και συναντώνται πιο συχνά ως τμήματα παραγώγων με φαρμακευτικό ενδιαφέρον. Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα είναι η στρεπτόλη (streptol, **176**) και η οικογένεια καρβονυλο-καρβαεξοζών της γκαμποσίνης (gabosine A, **177**). Ιδιαίτερα κοινά είναι τα παράγωγα της βαλιεναμίνης (valienamine, **178**), η οποία αποτελεί 1-αμινο-ανάλογο της στρεπτόλης, αλλά και η αντίστοιχη βαλιολαμίνη (valiolamine, **179**). Απαντώνται επίσης καρβαριβόζες, όπως η καρυόζη (caryose, **180**), ενώ συναντάται και καρβα-D-ριβόζη ως παράγωγο φυσικών καρβα-νουκλεοζιτών όπως είναι το αντιβιοτικό αριστερομυκίνη (aristeromycin, **181**).¹⁷⁰



Εικόνα 3.1: Παραδείγματα φυσικών καρβα-σακχαρικών παραγώγων.

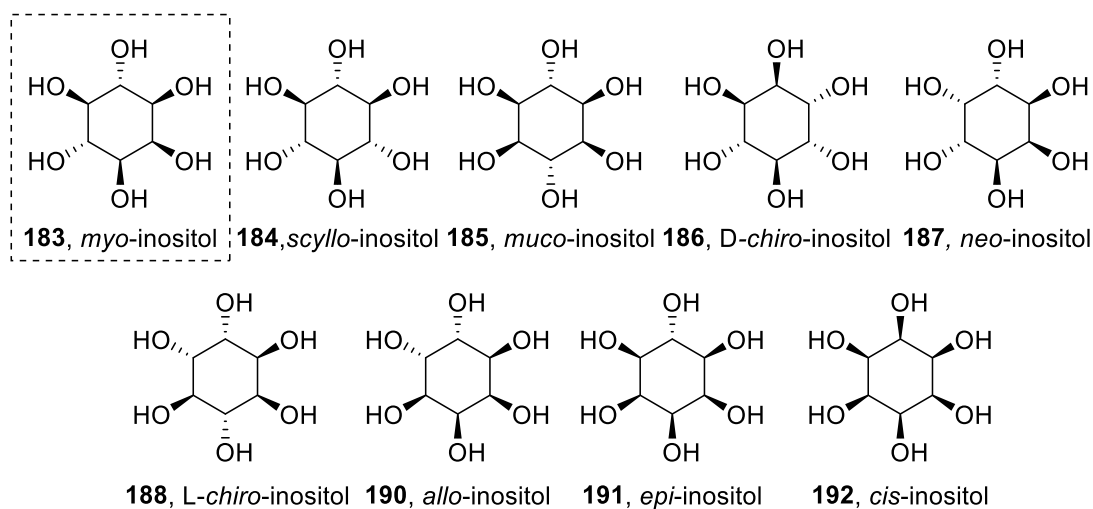
Πολλά καρβασακχαρικά παράγωγα τα οποία έχουν απομονωθεί από μικροβιακές καλλιέργειες εμφανίζουν ενδιαφέρουσα βιολογική δράση και έχουν βρει έναν αριθμό εφαρμογών. Τέτοια παραδείγματα παραγώγων της βαλιεναμίνης με εμπορικές εφαρμογές είναι η βαλιδαμυκίνη A (Validamycin A, **182**, **Εικόνα 3.2**),¹⁷¹ αντιμυκητιασικό αγροτικής σημασίας και οι αναστολείς α-γλυκοσιδάσης βογλιμπόζη (voglibose, **2**) και ακαρβόζη (acarbose, **3**). Και οι

δύο ενώσεις αποτελούν προϊόντα φυσικής προέλευσης, είναι διαθέσιμα εμπορικά και χρησιμοποιούνται κατά του διαβήτη τύπου 2 (Ενότητα 1.2.1).¹⁷



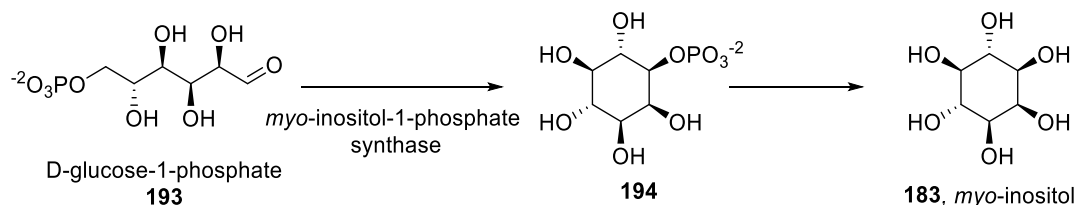
Εικόνα 3.2: Εμπορικά καρβοκυκλικά παράγωγα με βιολογική δράση.

Ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα για την παρούσα εργασία είναι η οικογένεια των καρβα-εξοζών, καθότι αποτελούν ευρέως διαδεδομένα φυσικά προϊόντα με δομή πλησιέστερη της D-γλυκοπυρανόζης. Η δομή εξαμελούς καρβασακχάρου συναντάται συχνά στη φύση. Τα μακράν πιο διαδεδομένα παράγωγα ανήκουν στην οικογένεια της ινοσιτόλης. Από τα 9 πιθανά ισομερή (**Εικόνα 3.3**), στα έμβια συστήματα συναντώνται τα πρώτα 5 (*myo*-, *scyllo*-, *muco*-, *D-chiro*- και *neo*-ινοσιτόλη), με τη *myo*-ινοσιτόλη (**183**) να αποτελεί το ενδιάμεσο για τη βιοσύνθεση των υπόλοιπων τεσσάρων.¹⁷²



Εικόνα 3.3: Τα 9 ισομερή ινοσιτόλης.

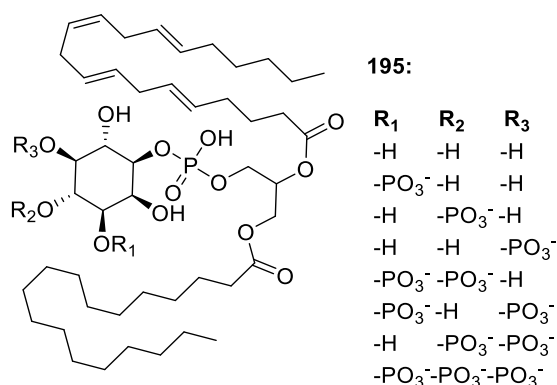
Η *myo*-ινοσιτόλη έχει βρεθεί ότι αποτελεί αποφωσφορυλιωμένο προϊόν του ενδιαμέσου **194** (Σχήμα 3.2), το οποίο με τη σειρά του προκύπτει από ισομερείωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης **193** από το εξειδικευμένο ένζυμο συνθάση της 1-φωσφορικής ινοσιτόλης.¹⁷³ Η *myo*-ινοσιτόλη αποτελεί με διαφορά τον πιο διαδεδομένο εκπρόσωπο της οικογένειας.



Σχήμα 3.2: Βιοσύνθεση της *myo*-ινοσιτόλης από 6-φωσφορική γλυκόζη.¹⁷³

Τα διάφορα ισομερή της ινοσιτόλης και τα παράγωγά τους παίζουν σημαντικό ρόλο σε βιοχημικές οδούς δευτερογενούς σηματοδότησης, ρυθμίζοντας τη λειτουργία νευρομεταβιβαστών, ορμονών και άλλων σηματοδοτικών μορίων στον εγκέφαλο και σε άλλους ιστούς, ενώ αποτελούν δομικά λιπίδια της οικογένειας των φωσφατιδυλοϊνοσιτολών και των φωσφορικών εστέρων της (**195**, Εικόνα 3.4).¹⁷⁴ Διαδραματίζουν έτσι κρίσιμο ρόλο στην ομαλή λειτουργία των έμβιων συστημάτων. Δυσλειτουργίες στον μεταβολισμό ινοσιτόλης έχουν συσχετιστεί με τη διπολική διαταραχή¹⁷⁵ και σύνδρομα υπογονιμότητας,¹⁷⁶ ενώ συναντώνται σε έναν αριθμό μεταβολικών συνδρόμων όπως είναι ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2.¹⁷⁷

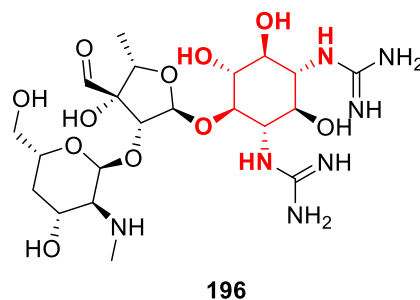
Τα τελευταία χρόνια δοκιμάζεται η χρήση διάφορων ισομερών της ινοσιτόλης στη θεραπεία νόσων όπως είναι η κλινική κατάθλιψη, το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών¹⁷⁸ και η νόσος Alzheimer.¹⁷⁹ Έχουν επίσης απομονωθεί από φυτά παράγωγα φαρμακευτικού ενδιαφέροντος με αντιφλεγμονώδη δράση,¹⁸⁰ όπως



Εικόνα 3.4: Παράδειγματα φωσφατιδυλοϊνοσιτολών.¹⁷⁴

επίσης και πλούσια σε ινοσιτολοζίτες μίγματα με σημαντική αντιοξειδωτική δράση.¹⁸¹

Τα καρβασάκχαρα συναντώνται συνήθως ως τμήματα περισσότερο πολύπλοκων δομών. Έτσι, δεοξυ-διαμινο-παράγωγα, συγγενικά της ινσοτιτόλης (δεοξυστρεπταμίνη, με **κόκκινο** στην **Εικόνα 3.5**), αποτελούν πυρηνική δομή σε ενώσεις της οικογένειας της στρεπτομυκίνης **196**, ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά που παράγονται από μικροοργανισμούς της οικογένειας *Streptomyces*.¹⁸²



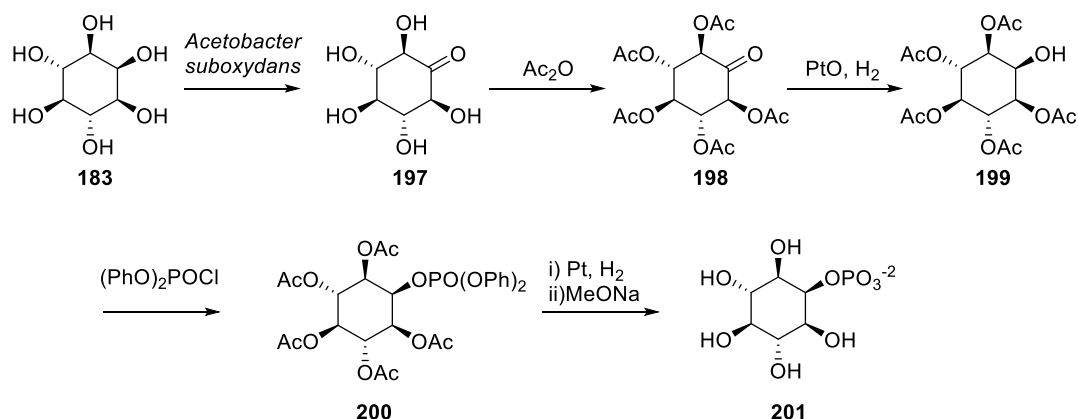
Εικόνα 3.5: Η στρεπτομυκίνη

3.2 Χημεία των καρβασακχάρων

Όπως αναφέρθηκε, τα φυσικά καρβασακχαρικά παράγωγα αποτελούν αποκλειστικά προϊόντα βακτηριακής προέλευσης. Ο συνηθέστερος τρόπος παρασκευής τους σε βιομηχανική κλίμακα, όπως για παράδειγμα του φαρμάκου ακαρβόζη, πραγματοποιείται με βιολογικές / βιοτεχνολογικές μεθόδους μέσω βακτηριακής ζύμωσης κατάλληλων σακχαριτών, με τα βακτήρια του γένους *Streptomyces* να επιδεικνύουν αξιοσημείωτη εξειδίκευση στη σύνθεση καρβασακχάρων. Ενώ περιγράφονται χημικές συνθετικές μέθοδοι για την περίπτωση πχ της ακαρβόζης (**3**, **Εικόνα 3.2**),¹⁸³ λόγω του πολύ μεγάλου αριθμού βημάτων και την ανάγκη πολλαπλών καθαρισμών των ενδιάμεσων είναι μάλλον ασύμφορες βιομηχανικά.

Από τη βιβλιογραφία απουσιάζουν *de novo* συνθετικές μέθοδοι *myo*-ινοσιτόλης, που οφείλεται στην ευρεία διαθεσιμότητα κι εύκολη απομόνωσή της. Η ευρεία βιολογική παρουσία των παραγώγων της σε εκχυλίσματα των έμβιων οργανισμών ωστόσο, οδήγησε ήδη από τη δεκαετία του 1940 στην προσπάθεια σύνθεσης διάφορων βιομορίων με δομή ινσοιτόλης όπως είναι οι διάφοροι μονο-, δι- και τριφωσφορικοί εστέρες της, οι διάφορες φωσφατιδυλοϊνοσιτόλες¹⁸⁴ και λειτουργικά ανάλογά τους.^{185,186} Πρώτο παράδειγμα στη βιβλιογραφία ήταν η σύνθεση της 2-φωσφορικής ινσοιτόλης

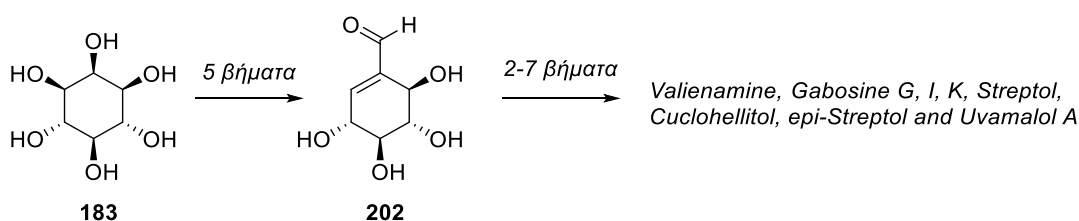
(201, Σχήμα 3.3) ήδη το 1949,¹⁸⁷ με πλήθος εργασιών μέσα στις επόμενες δεκαετίες.



Σχήμα 3.3: Πρώτη σύνθεση 2-φωσφορικής ινοσιτόλης.¹⁸⁷

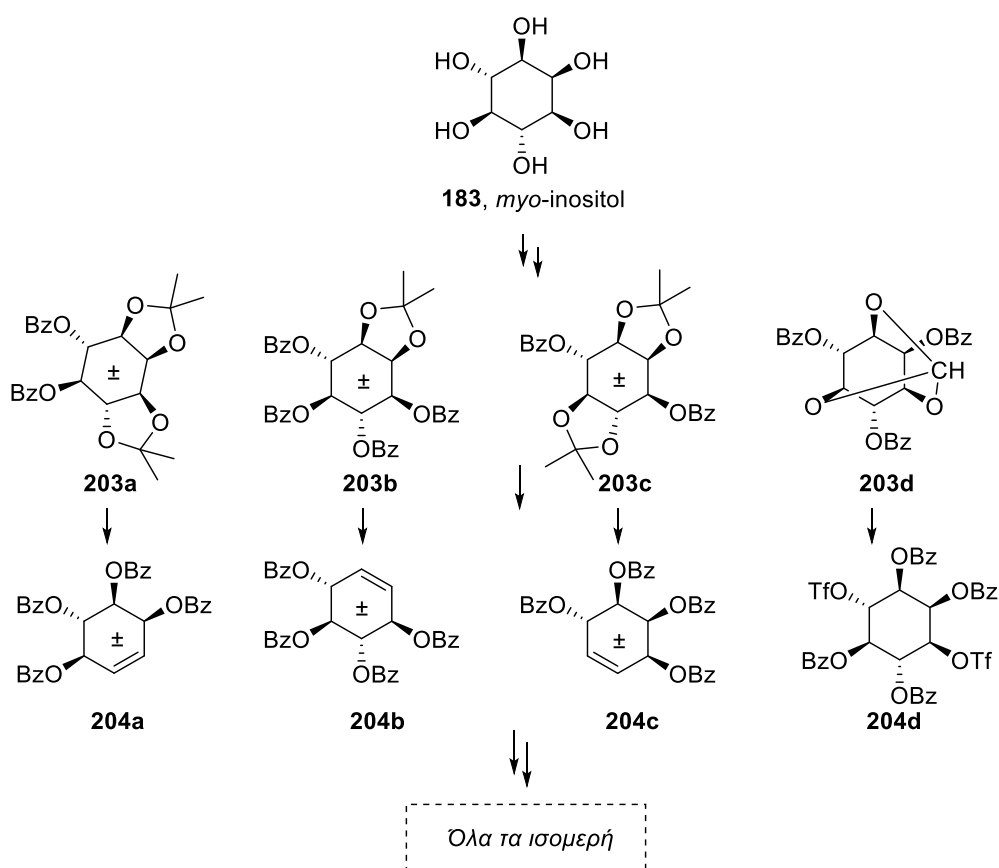
Η παρουσία του αξονικού υδροξυλίου στη *myo*-ινοσιτόλη επιτρέπει τη χημική διαφοροποίηση των υδροξυλομάδων, που μαζί με την παρουσία 6 χειρόμορφων κέντρων, καθιστά τη *myo*-ινοσιτόλη χρήσιμο αρχικό αντιδραστήριο.

Εξαιρετικό παράδειγμα για τη συνθετική χρησιμότητα της *myo*-ινοσιτόλης, αποτελεί επίσης εργασία όπου η *myo*-ινοσιτόλη χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή ενός μεγάλου αριθμού φυσικών καρβασακχαρικών προϊόντων (Σχήμα 3.4).¹⁸⁸



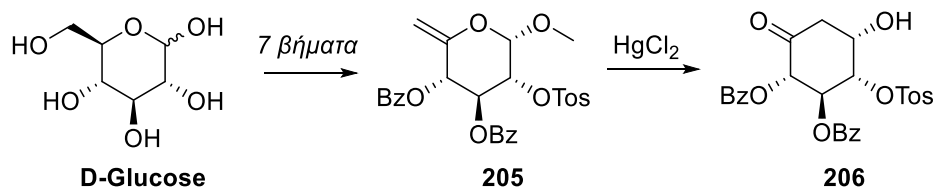
Σχήμα 3.4. Σύνθεση 8 φυσικών καρβασακχάρων ξεκινώντας από *myo*-ινοσιτόλη.¹⁸⁸

Εξίσου αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αποτελεί η σύνθεση όλων των γνωστών ισομερών της ινοσιτόλης από *myo*-ινοσιτόλη, και πάλι με απώτερο στόχο τη σύνθεση φωσφορικών εστέρων και τη μελέτη της δράσης τους (Σχήμα 3.5).¹⁸⁹



Σχήμα 3.5: Σύνθεση όλων των πιθανών ισομερών ινοσιτόλης ξεκινώντας από τη *myo*-ινοσιτόλη.¹⁸⁹

Ιδιαίτερα διαδεδομένες είναι και συνθέσεις καρβασακχάρων που ξεκινούν από ένα κλασικό σάκχαρο, το οποίο υποβάλλεται στις επονομαζόμενες αντιδράσεις καρβοκυκλοποίησης, οι οποίες οδηγούν σε καρβοκυκλικά ανάλογα. Οι μακράν πιο διαδεδομένες συνθέσεις βασίζονται στην αντίδραση καρβοκυκλοποίησης Ferrier (**Σχήμα 3.6**) ως ένα από τα στάδια. Η σύνθεση ξεκινά από D-γλυκόζη που τροποποιείται κατάλληλα ώστε υπό την επίδραση χλωριούχου υφιδράργυργου τελικά να κυκλοποιηθεί στο ανάλογο **206**.¹⁹⁰



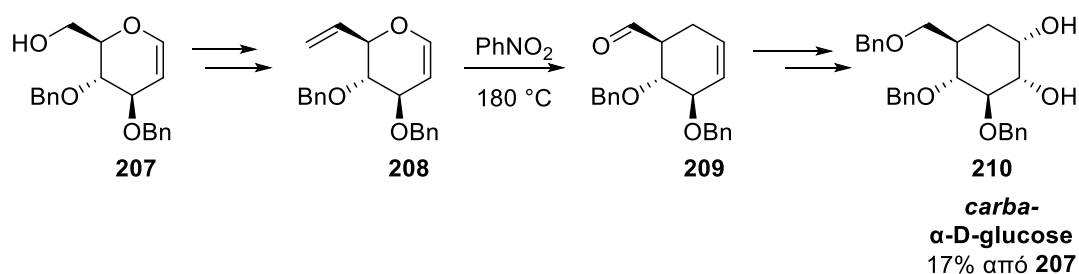
Σχήμα 3.6: Πρώτη αναφορά εφαρμογής καρβοκυκλοποίησης Ferrier σε D-γλυκόζη.¹⁹⁰

Πέρα από τροποποιημένες εκδοχές της καρβοκυκλοποίησης Ferrier,¹⁹¹ έχει περιγραφεί ένας πολύ μεγάλος αριθμός συναφών συνθέσεων, οι οποίες έχουν

οδηγήσει σε έναν μεγάλο αριθμό καρβα-σακχάρων και λειτουργικών αναλόγων τους. Η σύνθεση «πιστών» καρβοκυκλικών αναλόγων των κλασικών πυρανοζών αποτελεί έναν εξαιρετικά ενδιαφέροντα στόχο για τη φαρμακευτική χημεία, καθώς ανοίγει τον δρόμο στη σύνθεση μεταβολικά σταθερών αναλόγων κλασικών νουκλεοζιτικών και γλυκοζιτικών μορίων με σημαντικά βελτιωμένα προφίλ φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων και δραστηριότητας.

Στη σύνθεση των καρβασακχάρων είναι πολυάριθμα τα παραδείγματα προσπάθειας σύνθεσης καρβοκυκλικών αναλόγων των κλασικών πυρανοζών και ριβοζών. Οι συνθέσεις που χρησιμοποιούνται συχνά οδηγούν σε διαστερεομερικά μίγματα σε περισσότερα από ένα ενδιάμεσα στάδια, απαιτώντας δύσκολους καθαρισμούς των προϊόντων ανάμεσα στα βήματα και καθιστώντας δύσκολη τη σύνθεση του επιθυμητού σακχάρου σε ικανοποιητικές αποδόσεις. Μια επιπλέον πρόκληση αποτελεί η ανεύρεση μεθόδων οι οποίες να ξεκινούν από απλά, φτηνά αρχικά αντιδραστήρια, όπως στο παράδειγμα της καρβοκυκλοποίησης Ferrier. Συναντώνται κι άλλες αντιδράσεις κυκλοποίησης, με παραδείγματα τόσο από τη χημεία ριζών,^{192,193} όσο κι από κατάλυση από στοιχεία μετάπτωσης.¹⁹⁴

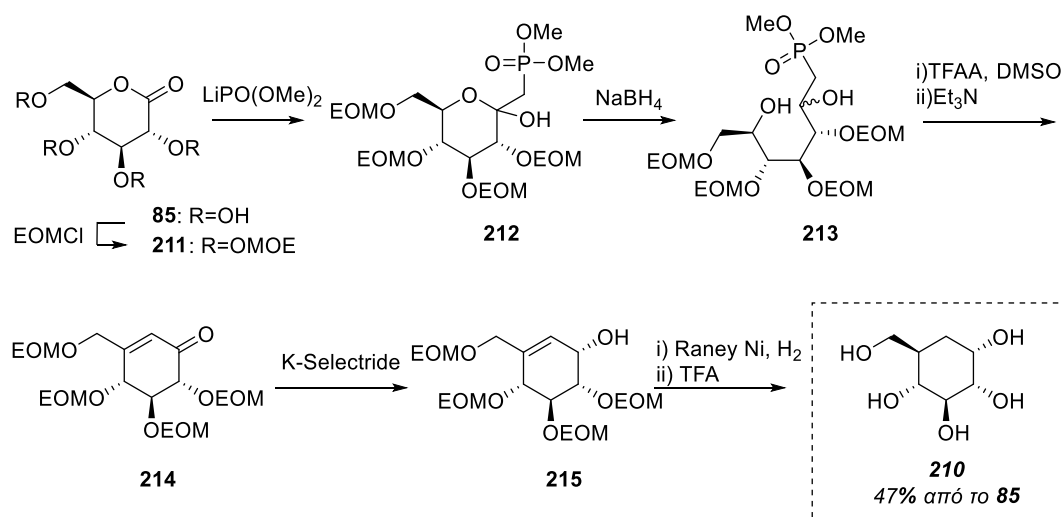
Ειδικά η σύνθεση ενός «πιστού» καρβοκυκλικού αναλόγου της D-γλυκόζης (**210**), του μακράν πιο διαδεδομένου σακχάρου στη φύση, αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης ήδη από τη δεκαετία του 1970, επιτεύχθηκε ωστόσο μόλις το 1998 (**Σχήμα 3.7**), εφαρμόζοντας σε D-γλουκάλη (**207**), μετά από κατάλληλη τροποποίηση, την αντίδραση αναδιάταξης Claisen ως μέθοδο καρβοκυκλοποίησης.¹⁹⁵



Σχήμα 3.7: Σύνθεση καρβα-α-D-γλυκοπυρανόζης μέσω αναδιάταξης Claisen.¹⁹⁵

Ενώ στα ενδιάμεσα χρόνια η έρευνα στις καρβα-πυρανόζες ήταν ιδιαίτερα πλούσια, με μία εργασία μάλιστα να παρουσιάζει ένα σχήμα αποκλίνουσας

σύνθεσης με προϊόντα τα καρβα-ανάλογα και των 16 φυσικών πυρανοζών,¹⁹⁶ όλες οι συνθέσεις ήταν ιδιαίτερα πολύπλοκες, με κατά κανόνα μη ικανοποιητικό στερεοέλεγχο και τελικά χαμηλές αποδόσεις. Ο μεγάλος αριθμός βημάτων και η ανάγκη για συχνά ιδιαίτερα ακριβά αντιδραστήρια αποτελούσε ένα επιπλέον πρόβλημα. Η πρώτη πρακτική σύνθεση της καρβα-α-D-γλυκοπυρανόζης (**210**, **Σχήμα 3.8**), ξεκινώντας από την ιδιαίτερα φτηνή D-γλυκονο-δ-λακτόνη (**85**), δημοσιεύτηκε το 2011.¹⁹⁷ Η καρβοκυκλοποίηση επιτυγχάνεται μέσω ενδομοριακής αντίδρασης Horner-Wadsworth-Emmons, ενώ αξιοσημείωτα αποτελεί την πρώτη σύνθεση με λιγότερα από 10 συνθετικά βήματα. Μειονέκτημα της μεθόδου που περιγράφονται στη σχετική εργασία είναι η ανάγκη για χρωματογραφικούς καθαρισμούς ανάμεσα στα βήματα,.



Σχήμα 3.8: Πρακτική σύνθεση καρβα-α-D-γλυκοπυρανόζης.¹⁹⁷

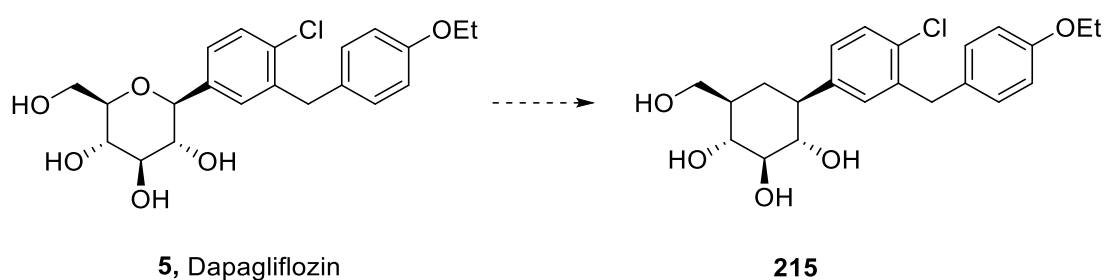
Η συγκεκριμένη σύνθεση του αναλόγου **210** είναι αξιοσημείωτη, καθώς αποτελεί ένα πρόσφατο βιβλιογραφικό παράδειγμα το οποίο περιλαμβάνει λιγότερα από 10 συνθετικά βήματα και οδηγεί τελικά στην καρβα-α-D-γλυκοπυρανόζη (**210**) σε υψηλή απόδοση (47% σε 7 βήματα).

Στην πλειοψηφία τους, οι ολικές συνθέσεις καρβαεξοζών τείνουν να είναι πολύπλοκες, περιλαμβάνοντας ιδιαίτερα πολλά βήματα, συχνά επίπονους καθαρισμούς και οι αποδόσεις δεν είναι πάντα ικανοποιητικές. Φαίνεται επίσης να υπάρχουν διαφωνίες ανάμεσα στις εργασίες των διάφορων ομάδων ως προς την επαναληψιμότητα κάποιων επιμέρους βημάτων τους, ιδιαίτερα σε θέματα του στερεοχημικού αποτελέσματος.

Όπως αναφέρθηκε, τα καρβασάκχαρα είναι ιδιαίτερα σταθερά. Συχνά ωστόσο οι ίδιοι οι καρβα-μονοσακχαρίτες, ενώ παρουσιάζουν υψηλή με έναν μεγάλο αριθμό βιολογικών στόχων, δεν εμφανίζουν αξιόλογη φαρμακευτική δράση. Αποτελούν ωστόσο ιδιαιτέρως ενδιαφέροντα μόρια για τη σύνθεση νέων φαρμάκων με δομή καρβασακχαρίτη.

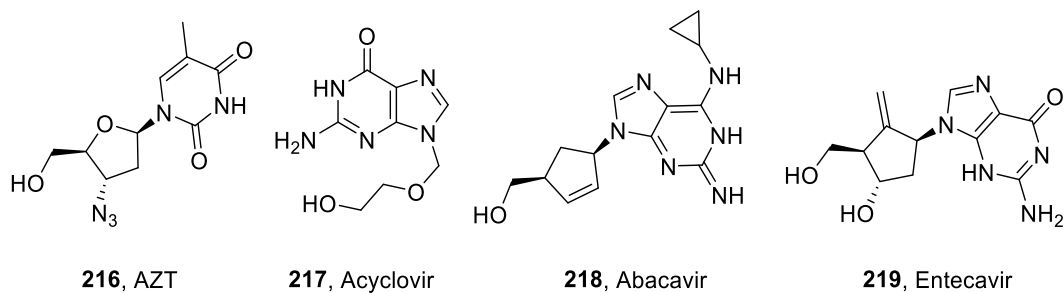
Η προσέγγιση της αντικατάστασης ενός σακχαρικού τμήματος από ένα λειτουργικό ανάλογο, αποτελεί τακτική η οποία έχει εφαρμοστεί ευρέως από τη φαρμακευτική βιομηχανία, με στόχο τη σύνθεση μορίων με βελτιωμένες φαρμακοκινητικές ιδιότητες.

Η τακτική αυτή εφαρμόστηκε πρόσφατα στη σύνθεση μιας σειράς καρβαγλυκοζιτικών αναλόγων του dapagliflozin (**5**, Ενότητα 1.2.1), C-γλυκοζιτικού αντιδιαβητικού φαρμάκου της κατηγορίας των γλιφλοζινών μεγάλης εμπορικής σημασίας (**Εικόνα 3.6**).¹⁹⁸



Εικόνα 3.6: Πειραματικό καρβοκυκλικό ανάλογο του εμπορικού φαρμάκου Dapagliflozin.¹⁹⁸

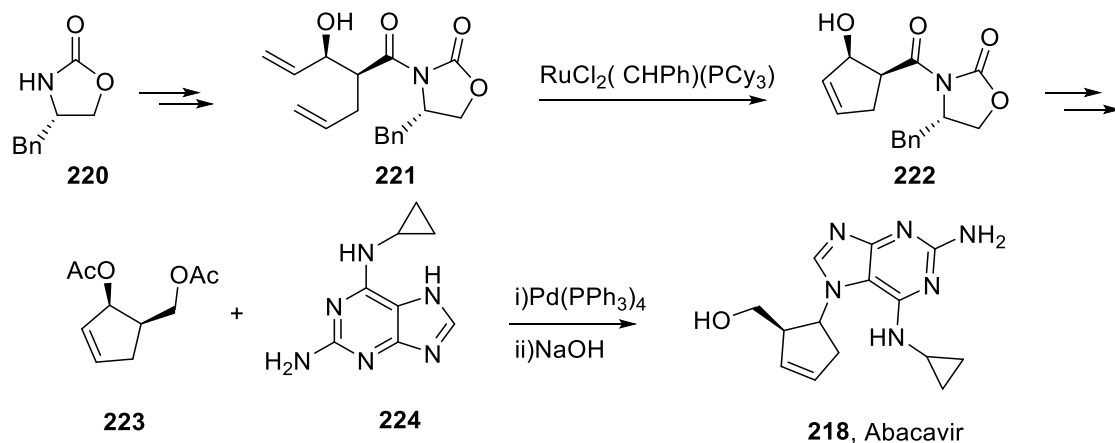
Η υποκατάσταση του σακχαρικού τμήματος ωστόσο, έχει βρει ευρεία εφαρμογή ειδικά σε μόρια από την κατηγορία των τεχνητών νουκλεοζιτών και έχει οδηγήσει σε έναν μεγάλο αριθμό χρήσιμων αντικαρκινικών και αντιϊκών φαρμάκων.¹⁹⁹ Οι διαφοροποιήσεις σε σχέση με τους φυσικούς νουκλεοζίτες μπορεί να εντοπίζονται τόσο στο πυριμιδινικό, όσο και στο σακχαρικό τμήμα. Χαρακτηριστικά παραδείγματα (**Εικόνα 3.7**) αποτελούν τα εμπορικά αντιϊκά φάρμακα AZT (**216**) και acyclovir (**217**), τα οποία χρησιμοποιούνται κατά του ιού HIV και των ερπητοϊών αντίστοιχα.



Εικόνα 3.7: Παραδείγματα συνθετικών νουκλεοζιτών.¹⁹⁹

Κατά την τελευταία δεκαετία, η οικογένεια των αναλόγων νουκλεοζιτών εμπλουτίστηκε από νέα, καρβοκυκλικά νουκλεοζιτικά ανάλογα, με σημαντικότερα εξ' αυτών τα entecavir (**218** και abacavir (**291**) σημαντικά εμπορικά αντιϊικά φάρμακα.

Συνήθως η σύνθεση καρβα-νουκλεοζιτών ξεκινά με τη σύνθεση του σακχαρικού τμήματος, ακολουθούμενη από τη σύζευξη με το ετεροκυκλικό τμήμα, η οποία συνηθέστερα επιτυγχάνεται μέσω της αντίδραση Mitsunobu,^{200–206} ενώ χρησιμοποιείται και χημεία του παλλαδίου, όπως στο παράδειγμα της βιομηχανικής σύνθεσης του abacavir (**Σχήμα 3.9**).

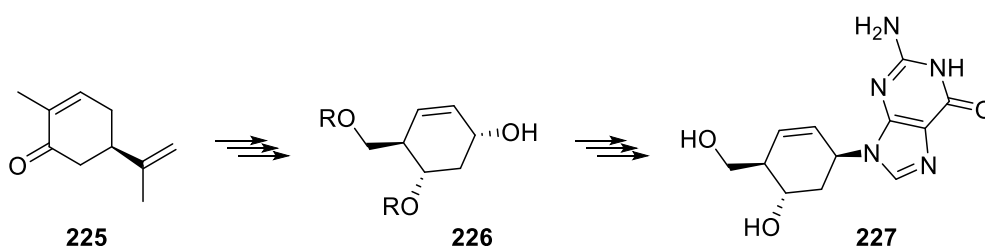


Σχήμα 3.9: Βιομηχανική σύνθεση του abacavir.²⁰⁷

Στο συγκεκριμένο παράδειγμα, το σακχαρικό τμήμα **223** συντίθεται με στάδιο κλειδί το κλείσιμο του καρβοκυκλικού δακτυλίου με μία μετάθεση κλεισίματος δακτυλίου, καταλυόμενη από ρουθίνιο. Η σύζευξη με την τροποποιημένη

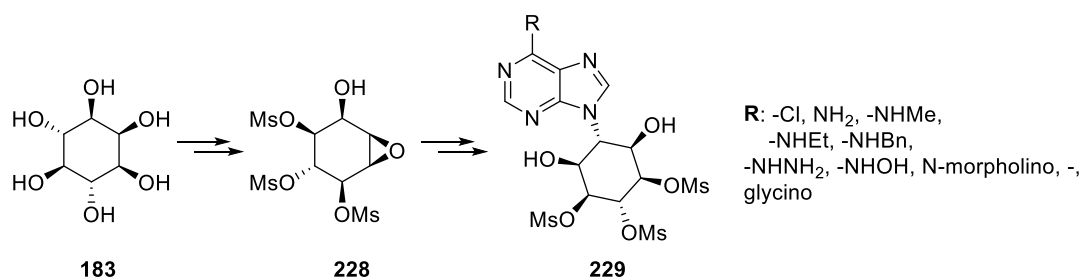
ετεροκυκλική βάση **224** πραγματοποιείται με εφαρμογή μιας αντίδρασης Tsuji-Trost.

Ενώ στη βιβλιογραφία υπάρχει ένας τεράστιος αριθμός καρβα-φουρανοζιτών, υπάρχουν και κάποια παραδείγματα σύνθεσης παραγώγων με εξαμελείς δακτυλίους. Ένα πρώιμο παράδειγμα αποτελεί η σύνθεση που φαίνεται στο **Σχήμα 3.10**. Στα πλαίσια αναζήτησης νέων αντιικών φαρμάκων, η σύνθεση ξεκινά χρησιμοποιώντας ως χειρόμορφο αρχικό αντιδραστήριο R-(-)-καρβόνη (**225**) προς παρασκευή της καρβαπυρανόζης **226**, ενώ η νουκλεοβάση προστίθεται με εφαρμογή της μεθόδου Mitsunobu.^{208,209}



Σχήμα 3.10: Παράδειγμα σύνθεσης καρβοπυρανοζυλο-αδενοσίνης.^{208,209}

Σε αυτή την κατηγορία συναντάται επίσης ένα από τα ελάχιστα παραδείγματα σύνθεσης αρωματικών παραγώγων ξεκινώντας από ινοσιτόλη, όπως επίσης και το μοναδικό παράδειγμα σύνθεσης ινοσιτολυλο-νουκλεοζιτών (**Σχήμα 3.11**).²¹⁰

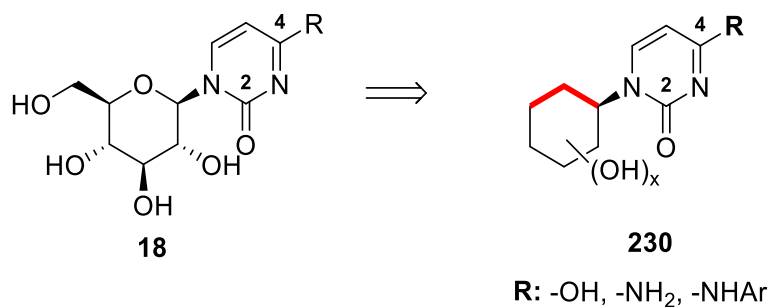


Σχήμα 3.11: Σύνθεση ινοσιτολυλο-νουκλεοζιτών.²¹⁰

3.2.1 Σχεδιασμός σύνθεσης καρβοκυκλικών αναστολέων της GP

Η προσπάθεια σύνθεσης καρβα-γλυκοπυρανόζυλο αναλόγων των συμβατικών N²-αρυλοϋποκατεστημένων N¹-β-D-γλυκοπυρανοζυλο-κυτοσινών με ανασταλτική δράση επί του καταλυτικού κέντρου της GP (Ενότητα 1.3), αποτέλεσε μια δεύτερη επέκταση της μεθοδολογίας προς τη σύνθεση

υδρολυτικά σταθερών αναλόγων, επιπρόσθετη στη σύνθεση παραγώγων με δομή C-γλυκοζίτη (Κεφάλαιο 1). Η δομική διαφοροποίηση, αντίθετα από τους C-γλυκοζίτες, περιορίζεται στο σακχαρικό τμήμα, με το πυριμιδινικό τμήμα να παραμένει στην ίδια διαμόρφωση όπως και στους συμβατικούς γλυκοζίτες (Εικόνα 3.8).



Εικόνα 3.8: Γενική δομή μορίων-στόχων του παρόντος κεφαλαίου.

Προηγούμενες εργασίες, τόσο του εργαστηρίου μας όσο και άλλων ομάδων, έχουν υποδείξει ότι το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου-στόχου μας, της GP, δείχνει σημαντική εξειδίκευση στην παρουσία της D-γλυκοπυρανόζης, με την υποκατάσταση σε αποτελεσματικούς αναστολείς από διαφορετικά σάκχαρα να οδηγεί σε σημαντική εξασθένιση στην ανασταλτική δράση των μορίων.²¹¹ Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, επιχειρήθηκε για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία, η σύνθεση νέων αναστολέων του καταλυτικού κέντρου της GP, αντικαθιστώντας τη D-γλυκόζη με καρβοκυκλικά δομικά ανάλογα ακολουθώντας τη γενική δομή **230**.

3.3 Αποτελέσματα και σχολιασμός

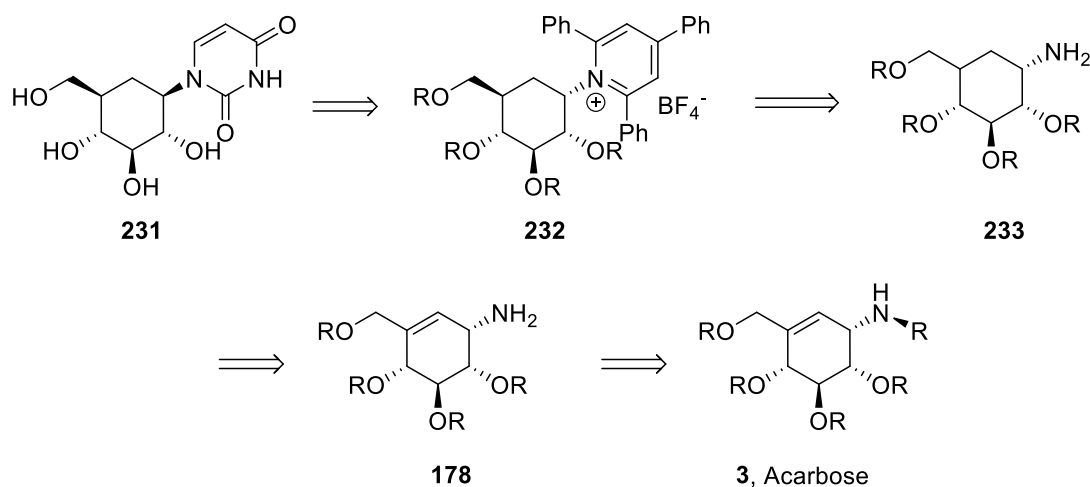
3.3.1 Πρώτες προσπάθειες

Στον σχεδιασμό της σύνθεσης καρβασακχαριτών που πραγματοποιήθηκε, αναζητήθηκαν ανάλογα τα οποία να μιμούνται όσο το δυνατόν πληρέστερα τη D-γλυκοπυρανόζη.

Κατά τον σχεδιασμό προτιμήθηκε να αποφευχθούν κατά το δυνατόν ιδιαίτερα πολύπλοκες συνθέσεις, αναζητώντας ως αφετηρία καρβοκυκλικά ανάλογα γλυκόζης τα οποία να μπορούν να συζευχθούν με ουρακίλη μετά από σχετικά

απλές συνθετικές τροποποιήσεις. Πραγματοποιήθηκε προσπάθεια να επιλεχθούν συνθετικές οδοί οι οποίες να μπορούν να πραγματοποιηθούν σε μεγάλες κλίμακες (> 20 g), να οδηγούν σε υψηλές αποδόσεις να περνούν από ενδιάμεσα που ιδανικά να μην απαιτούν καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης, διατηρώντας ταυτόχρονα έναν λογικό αριθμό βημάτων.

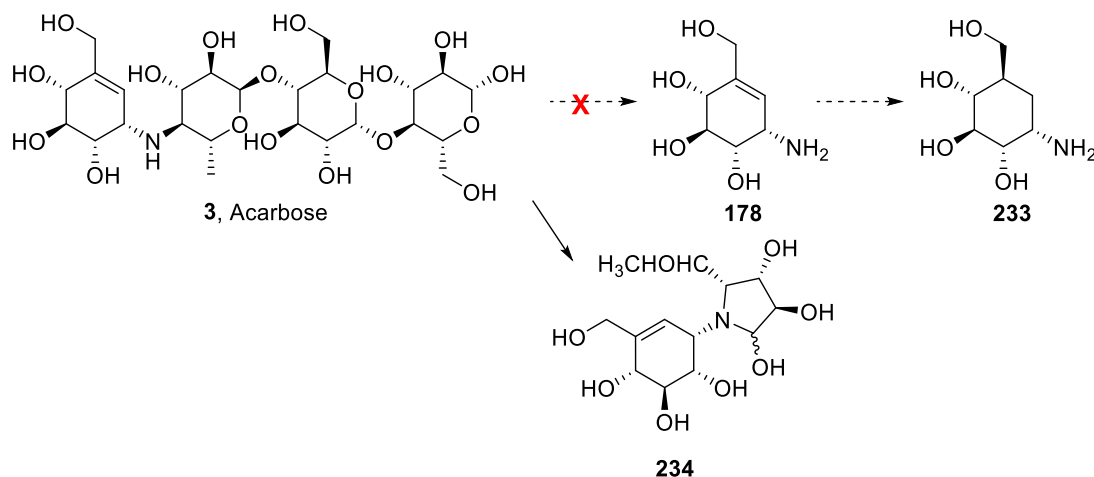
Οι δοκιμές ξεκίνησαν με την προσπάθεια σύνθεσης της βαλιεναμίνης (**178**) από εμπορικά διαθέσιμη ακαρβόζη (**3**),²¹² ακολουθώντας βιβλιογραφικές αναφορές,^{196,213} όπως θα αναλυθεί παρακάτω. Η ακαρβόζη, όπως και η βαλιδομυκίνη, μπορούν υδρολυθούν προς βαλιεναμίνη (**178**), η οποία με τη σειρά της μπορεί να αναχθεί με χρήση Raney Nickel προς βαλιδαμίνη (**233**) (Σχήμα 3.12). Η αμινομάδα της βαλιδαμίνης διαθέτει την κατάλληλη στερεοχημεία ώστε να μπορεί να μετατραπεί σε καλώς αποχωρούσα ομάδα, π.χ., στο αντίστοιχο κατιόν τριφαινυλοπυριλίου **232**,^{214–216} για να υποκατασταθεί στη συνέχεια από ουρακίλη και να προκύψει μετά από αποπροστασία το επιθυμητό προϊόν **231**.



Σχήμα 3.12: Προτεινόμενη ρετροσυνθετική ανάλυση καρβα-γλυκοπυρανοζυλοουρακίλης από βαλιεναμίνη.

Στο πρώτο βήμα η ακαρβόζη απομονώθηκε από δισκία του φαρμακευτικού σκευάσματος Glycobay. Στη συνέχεια επιχειρήθηκε υδρόλυση της ακαρβόζης ακολουθώντας μέθοδο από βιομηχανικό δίπλωμα ευρεσιτεχνίας,²¹³ υπό την επίδραση ισχυρά όξινης κατιοντοανταλλακτικής ρητίνης Amberlite IR-120 (H⁺) (Σχήμα 3.13) που πράγματι οδήγησε σε ένα κύριο προϊόν, το οποίο και

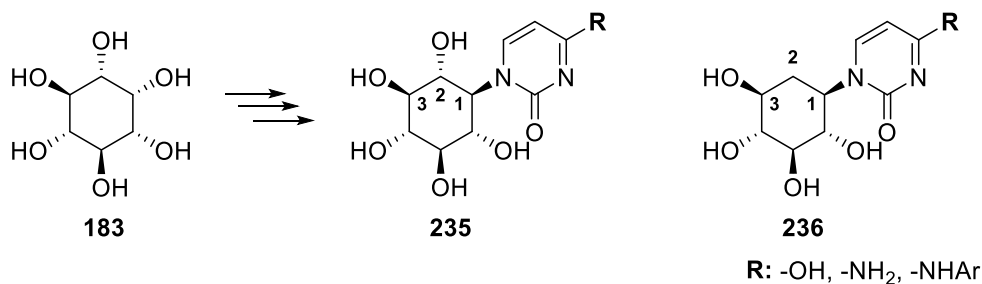
απομονώθηκε με διαδοχική χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής και κλασική χρωματογραφία στήλης. Αποδείχτηκε ωστόσο ότι πρόκειται για το βιβλιογραφικά γνωστό παραπροϊόν **234**.²¹⁷ Μετά από έναν αριθμό εναλλακτικών δοκιμών, δεν κατέστη δυνατή η απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος, οπότε το σχήμα εγκαταλείφθηκε.



Σχήμα 3.13: Απόπειρα υδρόλυσης ακαρβόζης.

3.3.2 Παράγωγα Ινοσιτόλης

Οι προσπάθειες συνεχίστηκαν ξεκινώντας από την εμπορικά διαθέσιμη *myo*-ινοσιτόλη. Οι ομάδες του υδροξυλίου μιμούνται ικανοποιητικά την *all-trans* διευθέτηση αυτών της D-γλυκοπυρανόζης (**Εικόνα 3.9**). Ιδιαίτερα χρήσιμο είναι το δεύτερο από τα τρία διαδοχικά *cis*-υδροξύλια (υδροξύλιο 2), καθότι, όντας αξονικό, διαφοροποιείται χημικά από τα υπόλοιπα 5 υδροξύλια του δακτυλίου (Ενότητα 3.2). Διαθέτει επίσης την κατάλληλη στερεοχημεία ώστε κατά μια S_N2-τύπου υποκατάσταση από ουρακίλη να μπορεί να προκύψει μια οικογένεια αναλόγων τύπου **235**.



Εικόνα 3.9: Πιθανά παράγωγα ξεκινώντας από ινοσιτόλη.

Θεωρήσαμε, επίσης, ενδιαφέρον να εξετάσουμε τις επιπτώσεις που έχουν (α) η υποκατάσταση της 6-υδροξυμεθυλενομάδας η οποία απαντάται στη D-γλυκοπυρανόζη από το υδροξύλιο 3 της ινοσιτόλης, και (β) η αντικατάσταση του οξυγόνου του δακτυλίου της γλυκόζης από την υδροξυμεθυλενομάδα στη θέση-2 της ινοσιτόλης, στην ικανότητα πρόσδεσης των νέων μορίων με το καταλυτικό κέντρο της GP. Ενδιαφέρον τέλος ήταν το ενδεχόμενο να παρασκευαστεί ένα παράγωγο τύπου **236**, όπου το ημιακεταλικό οξυγόνο αντικαθίσταται από μια μεθυλενομάδα, προσεγγίζοντας ακόμη περισσότερο τη δομή της D-γλυκοπυρανόζης.

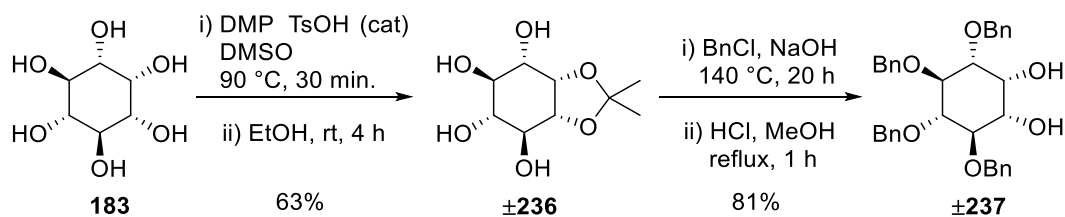
3.3.2.1 Το καρβασακχαρικό τμήμα

Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι ενώ η βιβλιογραφία στη χημεία των ινοσιτολών, είναι πλούσια, όπως αναφέρεται και παραπάνω, οι εργασίες επικεντρώνονται κυρίως γύρω από παρασκευές και αλληλομετατροπές μεταξύ των διαφόρων στερεοϊσομερών ινοσιτολών. Πέρα από αυτό, οι περισσότερες εργασίες οι οποίες πραγματεύονται περαιτέρω παραγωγοποίηση ινοσιτολών είναι μάλλον αποσπασματικές και κυρίως εξειδικευμένες στη σύνθεση φυσικών, παραγώγων της ινοσιτόλης όπως έχουν περιγραφεί παραπάνω.

Η σύνθεση ξεκίνησε με την κατάλληλη προστασία της *myo*-ινοσιτόλης. Πάντα βάσει παραδειγμάτων της βιβλιογραφίας, επιχειρήθηκε η, σε ένα βήμα, εκλεκτική προστασία των ισημερινών υδροξυλίων με ακετυλο-,²¹⁸ βενζοϋλο-²¹⁹ και βενζυλομάδες,²²⁰ που θεωρητικά επιτρέπει να παραμείνει ελεύθερο το αξονικό υδροξύλιο, ως λιγότερο δραστικό, ώστε να υποκατασταθεί στη συνέχεια από ουρακίλη. Κανένα σχήμα δεν έδωσε το επιθυμητό προϊόν σε ικανοποιητική απόδοση και καθαρή μορφή. Η συνθετική τακτική η οποία ακολουθήθηκε στη συνέχεια ξεκινά με την αντίδραση δύο εκ των τριών *cis*-υδροξυλίων προς την αντίστοιχη ακετάλη, προστασία των υπόλοιπων υδροξυλίων, υδρόλυση της ακετάλης κι εκλεκτική προστασία της ισημερινής υδροξυλομάδας (**Σχήμα 3.14** και **Σχήμα 3.15**).

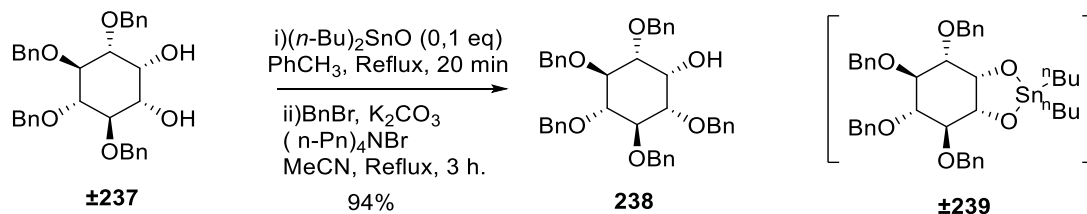
Δοκιμάζοντας βιβλιογραφικές συνθήκες, επιλέχθηκε τελικά η ισοπροπυλιδενο ακετάλη $\pm$ **236**²²¹ έναντι της κυκλοεξυλιδενο-ακετάλης²²² και βενζυλομάδες²²³ για τα υπόλοιπα υδροξύλια, έναντι ακετυλο- ή βενζοϋλομάδων, καθώς

αποδείχτηκε ο καλύτερος συνδυασμός βάσει διαλυτότητας, δραστηριότητας, καθαρότητας προϊόντων και τελικά απόδοσης στο ενδιάμεσο ± 237 .



Σχήμα 3.14: Εκλεκτική βενζυλίωση *myo*-ινοσιτόλης.^{221,223}

Ενώ υπάρχει μέθοδος για την εκλεκτική βενζυλίωση του ισημερινού υδροξυλίου του ενδιαμέσου ± 237 ,²²³ είναι απαραίτητες μεγάλες ποσότητες βενζολίου ως διαλύτη, ενώ κατά τις δοκιμές η καθαρότητα του επιθυμητού προϊόντος **238** (Σχήμα 3.15) δεν ήταν ικανοποιητική. Μία περισσότερο «πράσινη» εναλλακτική έδωσαν οι καταλυτικές συνθήκες των Z. Pei και συνεργατών,²²⁴ βασιζόμενες σε οργανοκασσιτερική χημεία για την εκλεκτική βενζυλίωση πυρανοζών. Το οξείδιο του δι(*n*-βουτυλο)κασσίτερου λειτουργεί ως καταλύτης, σχηματίζοντας την κασσιτεροακετάλη ± 239 η οποία στη συνέχεια διανοίγεται εκλεκτικά, ενεργοποιώντας το ισημερινό υδροξύλιο το οποίο και βενζυλιώνεται.



Σχήμα 3.15: Εκλεκτική βενζυλίωση του ισημερινού υδροξυλίου καταλυόμενη από $(n\text{-Bu})_2\text{SnO}$.²²⁴

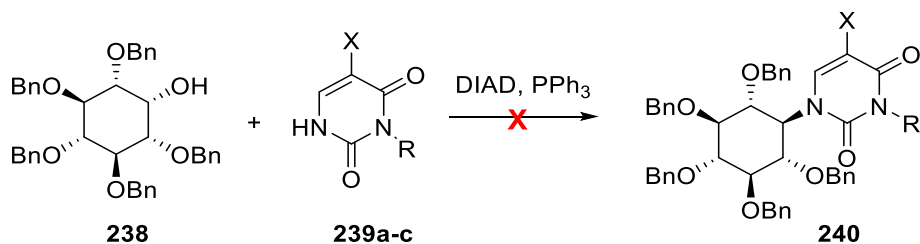
Η μέθοδος εφαρμόστηκε στο ενδιάμεσο ± 237 . Η μέθοδος λειτούργησε εξαιρετικά, ενώ το προϊόν **238** παραλήφθηκε καθαρό μετά από διήθηση και καθαρισμό με καταβύθιση σε πρακτικά ποσοτική απόδοση (94% έναντι 73 % με τη μέθοδο η οποία χρησιμοποιεί βενζόλιο).

3.3.2.2 Σύζευξη με ουρακίλη

Απόπειρες χρήσης της ουρακίλης ως πυρηνόφιλο

Επόμενο βήμα ήταν η υποκατάσταση του αξονικού υδροξυλίου του ενδιαμέσου **238** από ουρακίλη, με ταυτόχρονη αντιστροφή της στερεοχημείας.

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος για την πραγματοποίηση αυτής της υποκατάστασης, με πολυάριθμα παραδείγματα στην παραπλήσια χημεία των καρβοκυκλικών νουκλεοζιτών,^{200–206} είναι η αντίδραση Mitsunobu η οποία εκμεταλλεύεται τη σχετικά όξινη φύση των αμιδικών πρωτονίων της ουρακίλης. Δοκιμάστηκε μια σειρά μεθόδων. Στην πιο απλή εκδοχή, μίγμα της ινοσιτόλης **238**, ουρακίλης **239a** και τριφαινυλοφωσφίνης ψύχεται και στη συνέχεια προστίθεται αζωδικαρβοξυλικός διισοπροπυλεστέρας (DIAD), μέθοδος η οποία δεν οδήγησε στον σχηματισμό προϊόντος (μέθοδος προσθήκης **A**, α/α **1**, **3**, Πίνακας 4).^{201,202,206} Δοκιμάστηκε ένας αριθμός διαλυτών θερμοκρασιών, κι επίσης ο σχηματισμός της βεταΐνης της ουρακίλης με το DIAD και τριφαινυλοφωσφίνη και τελευταία την προσθήκη της προστατευμένης ινοσιτόλης (μέθοδος προσθήκης **B**, α/α **2**, Πίνακας 4).²⁰⁵ Επίσης δοκιμάστηκε η βελτίωση της χαμηλής διαλυτότητας της ουρακίλης με τη μετατροπή της σε *N*³-βενζοϋλο-ουρακίλη **239c** (α/α **4,5**, Πίνακας 4),²⁰⁴ καθώς και αύξηση τόσο της διαλυτότητας, όσο και δραστικότητάς της χλωριώνοντάς τη σε 5-χλωρουρακίλη **239b** (α/α **6,7**, Πίνακας 4).²²⁵



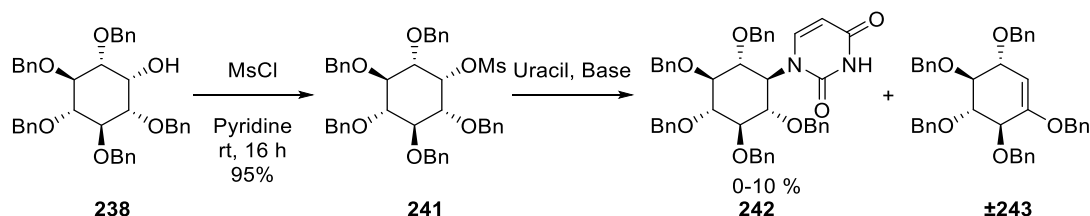
Πίνακας 4: Ανεπιτυχείς συνθήκες αντίδρασης Mitsunobu η οποίες δοκιμάστηκαν

Αρ.		Διαλύτης	T	Μέθοδος Προσθήκης
1	a. X = H, R = H	THF	0 °C -r.t.	A
2		THF	0 °C -r.t.	B
3		Διοξάνιο	100 °C	A
4	b. X = H, R = Bz	THF	0 °C - r.t.	B
5		Διοξάνιο	100 °C	A
6	a. X = Cl, R = H	THF	0 °C - r.t.	A
7		THF	0 °C -r.t.	B

Ενώ σε κάποιες περιπτώσεις το επιθυμητό προϊόν ήταν ανιχνεύσιμο με χρήση φασματομετρίας μάζας, τίποτα από τα παραπάνω δεν οδήγησε στον σχηματισμό απομονώσιμων ποσοτήτων του επιθυμητού προϊόντος.

Παρά το γεγονός ότι η ουρακίλη είναι ιδιαίτερα διαδεδομένο υπόστρωμα για σύζευξη με συνθήκες Mitsunobu,^{201,202,205,206} αποδείχθηκε ότι ο στερικώς απαιτητικός χαρακτήρας της πεντα-Ο-βενζυλο-*m*-γυο-ινοσιτόλης **238** τις καθιστά αναποτελεσματικές.

Στη συνέχεια δοκιμάστηκε η υποκατάσταση μέσω μετατροπής της αξονικής υδροξυλομάδας του ενδιαμέσου **238** στον μεθανοσουλφονικό εστέρα **241**. Ως πυρηνόφιλο δοκιμάστηκε ουρακίλη σε συνδυασμό με βάσεις (DBU,²²⁶ υδρίδιο του νατρίου,^{200,227} ανθρακικό κάλιο), ενώ παρασκευάστηκαν και τα μετά καλίου και μετά νατρίου άλατα της ουρακίλης.²²⁸ Η *anti*-ομοεπίπεδη διευθέτηση του μεθανοσουλφονικού εστέρα με τα πρωτόνια των γειτονικών ανθράκων, υποβοηθούμενη από την ακαμψία του συστήματος την οποία προσδίδει η δομή κλειστού δακτυλίου, σε συνδυασμό με τη χαμηλή πυρηνοφιλικότητα της ουρακίλης οδήγησε σε μεγάλο ποσοστό σχηματισμό του προϊόντος απόσπασης $\pm$ **243** μέσω αντίδρασης E₂, το οποίο προσδιορίστηκε με φασματομετρία μάζας (Σχήμα 3.16).

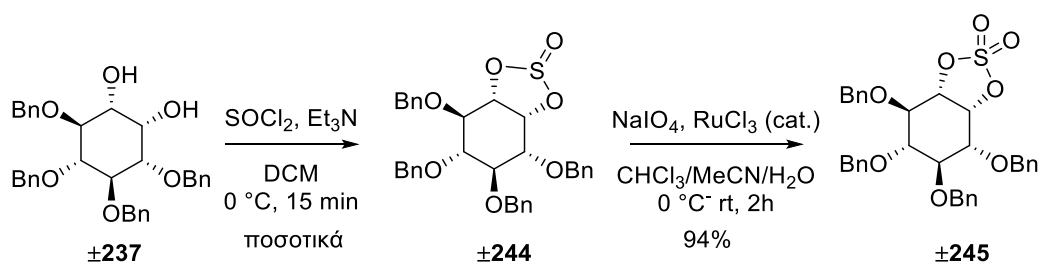


Σχήμα 3.16: Προσπάθειες υποκατάστασης της μεσυλομάδας από ουρακίλη.

Το επιθυμητό προϊόν **242** παρατηρήθηκε μόνο όταν χρησιμοποιήθηκε DBU, πιθανότατα λόγω της σημαντικής αύξησης της διαλυτότητας της ουρακίλης λόγω *in situ* σχηματιζόμενου άλατος.²²⁶ Οι αποδόσεις ωστόσο ήταν της τάξης του 0-10%, με πρακτικά ανύπαρκτη επαναληψιμότητα, οπότε αναζητήθηκαν αποδοτικότερες εναλλακτικές.

Κυκλικοί θειώδεις και θειικοί εστέρες

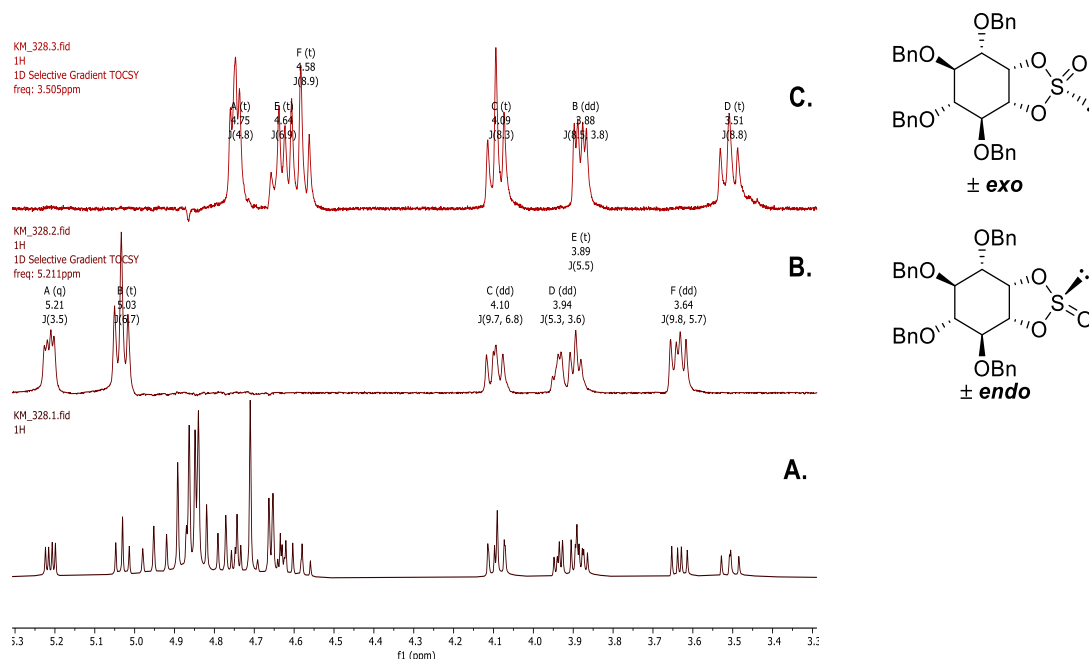
Μία ακόμη εναλλακτική που δοκιμάστηκε αξιοποιεί ως ενδιάμεσα θειώδεις ή θειικούς κυκλικούς εστέρες. Οι θειικοί εστέρες αποτελούν μια ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα κατηγορία ενώσεων, οι οποίες χρησιμοποιούνται ως ενώσεις με δραστηριότητα συγκρίσιμη με τα αντίστοιχα εποξειδία.²²⁹ Αντιδρούν με πυρηνόφιλα σε αντιδράσεις S_N2 με διάνοιξη του δακτυλίου, και μετά από όξινη υδρόλυση του εναπομείναντα θειικού εστέρα οδηγούν σε υποκατεστημένες αλκοόλες. Η χρησιμότητά τους προκύπτει από το γεγονός ότι παρουσιάζουν συχνά αντίστροφη τοποεκλεκτικότητα κατά την προσβολή τους από πυρηνόφιλα, δρουν άρα περισσότερο συμπληρωματικά προς τα εποξειδία παρά ως εναλλακτική μέθοδος με αυτά.²²⁹ Στη περίπτωση της παρούσας εργασίας, η παρασκευή εποξειδίου από το υπόστρωμα **±237** καθίσταται δύσκολη λόγω της *cis*-στεreoχημείας των υδροξυλίων, οπότε δοκιμάστηκε η εφαρμοσιμότητα θειωδών και θειικών εστέρων. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα που προκύπτει από την παρουσία του δακτυλίου, είναι η διατάραξη της *anti* ομοεπίπεδης διευθέτησης της αποχωρούσας ομάδας και των γειτονικών πρωτονίων, όπως συμβαίνει για παράδειγμα στο υπόστρωμα **241**, γεγονός το οποίο θεωρητικά περιορίζει ανταγωνιστικές αντιδράσεις απόσπασης.²²⁹ Η σύνθεση ξεκίνησε με αντίδραση του ενδιαμέσου **±237** με θειονυλοχλωρίδιο και τριαιθυλαμίνη προς σύνθεση του αντίστοιχου θειώδη εστέρα **±244** (Σχήμα 3.17).²³⁰ Το προϊόν προέκυψε ως δύσκολα διαχωρίσιμο μίγμα των *endo*- και *exo*-διαστερεομερών σε αναλογία 1:1, όπως αναμένεται βάση της σχετικής βιβλιογραφίας.²³¹



Σχήμα 3.17: Σύνθεση (±)1,2-Θειικού (3,4,5,6-τετρα-Ο-βενζυλο)-*myo*-ινοσιτολυοεστέρα.^{230,232}

Με τη χρήση φασμάτων 1D-TOCSY (Εικόνα 3.10), έγινε δυνατός ο φασματοσκοπικός διαχωρισμός των κορυφών του δακτυλίου τόσο ανάμεσα στα δύο διαστερεομερή, όσο κι από τα βενζυλικά πρωτόνια των

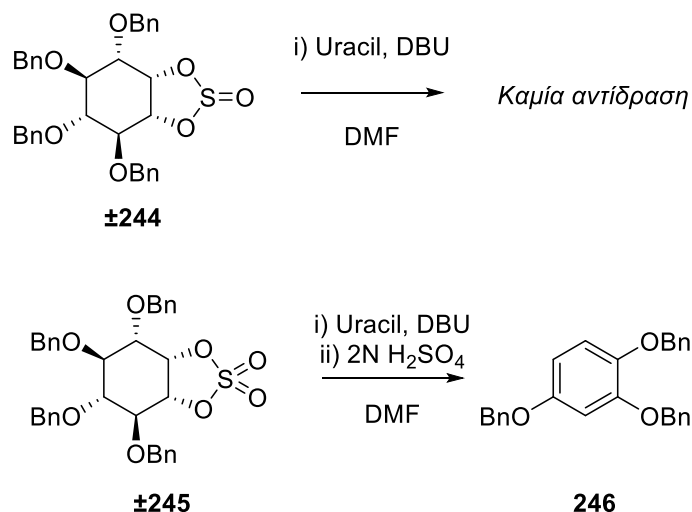
προστατευτικών ομάδων, που επέτρεψε τον χαρακτηρισμό των διαστερομερών.



Εικόνα 3.10: Φάσματα ^1H -NMR (A) και 1D- TOCSY (400 MHz) σε CDCl_3 μίγματος (B, C) endo- κι exo- διαστερομερών της ένωσης ± 244 .

Στη συνέχεια η ένωση ± 244 οξειδώθηκε στον θειικό εστέρα ± 245 με χρήση υπερϊωδικού νατρίου και καταλυτική ποσότητα τριχλωριούχου ρουθενίου.²³² Και τα δύο βήματα προχωρούν σε πρακτικά ποσοτική απόδοση και τα προϊόντα προκύπτουν φασματοσκοπικά καθαρά μετά από υδατική κατεργασία.

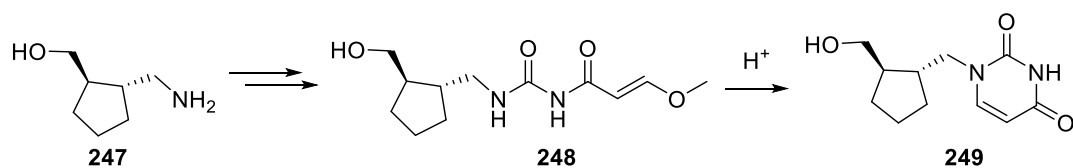
Στο επόμενο βήμα επιχειρήθηκε η προσθήκη ουρακίλης στο σύστημα τόσο στον θειώδη εστέρα ± 244 όσο και στον περισσότερο δραστικό θειικό εστέρα ± 245 (Σχήμα 3.18). Χρησιμοποιήθηκε ουρακίλη σε συνδυασμό με DBU που ήταν ο μοναδικός συνδυασμός ο οποίος παρατηρήθηκε να οδηγεί σε υποκατάσταση στο συγγενές μεθανοσουλφονυλο-παράγωγο **71** της προηγούμενης ενότητας. Τα αποτελέσματα ήταν μάλλον απογοητευτικά. Η αντίδραση του θειώδη εστέρα οδήγησε σε ποσοτική ανάκτηση του αρχικού αντιδρώντος ± 244 . Ο θειικός εστέρας ± 245 αντέδρασε, ωστόσο μετά από το βήμα της όξινης υδρόλυσης απομονώθηκε αποκλειστικά το προϊόν τριπλής απόσπασσης **246**, το οποίο αναφέρεται σε συναφή σύνθεση.²³³



Σχήμα 3.18: Αποτυχημένες προσπάθειες υποκατάστασης από ουρακίλη.

***De novo* σύνθεση του πυριμιδινικού δακτυλίου**

Μια μέθοδος η οποία συχνά χρησιμοποιείται στη βιβλιογραφία, για τη σύνθεση παραγώγων πυριμιδινών όταν η αντίδραση Mitsunobu δεν είναι επιτυχής, περιλαμβάνει τη *de novo* σύνθεση του πυριμιδινικού δακτυλίου. Σε ένα παράδειγμα από τη βιβλιογραφία,²³⁴ το σακχαρικό τμήμα **247** ανοικοδομείται μέσω της εξωκυκλικής αμινομάδας του προς ένα καρβαμιδικό ενδιάμεσο τύπου **248**, το οποίο στη συνέχεια κυκλοποιείται προς ουρακίλη υπό όξινες συνθήκες για να προκύψει τελικά ο επιθυμητός νουκλεοζίτης **249** (Σχήμα 3.19).

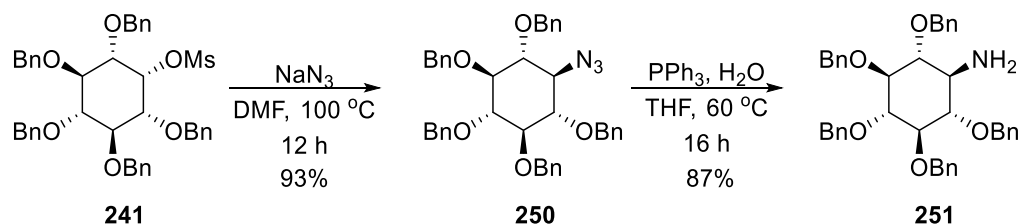


Σχήμα 3.19: Βιβλιογραφικό παράδειγμα *de novo* σύνθεσης δακτυλίου ουρακίλης.²³⁴

Η συγκεκριμένη μέθοδος εμφανίζεται επίσης συχνά και στη χημεία των καρβοκυκλικών αναλόγων νουκλεοζιτών.^{234–237}

Επιχειρήθηκε η εφαρμογή αυτής της μεθόδου στην περίπτωση της ινοσιτόλης, μετατρέποντάς τη στην αντίστοιχη αμίνη (Σχήμα 3.20). Πρώτο βήμα για την εγκατάσταση της αμινομάδας ήταν η υποκατάσταση της μεσυλομάδας του

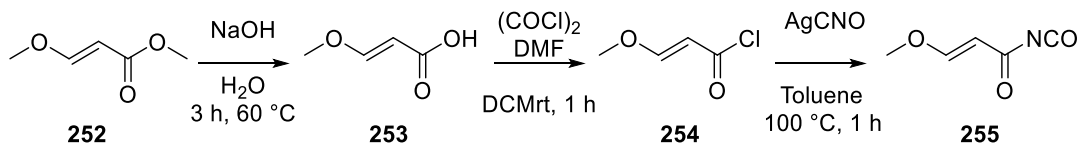
ενδιάμεσου **241** από αζίδιο, το οποίο επιτεύχθηκε σε απόδοση 93 % υπό την επίδραση νατραζιδίου για να προκύψει τελικά το ενδιάμεσο **250**.



Σχήμα 3.20: Σύνθεση προστατευμένης 2-αμινο-2-δεοξυ-*scyllo*-ινοσιτόλης

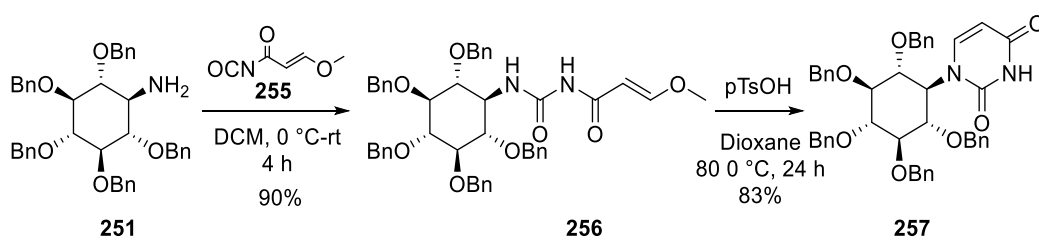
Στη συνέχεια απαιτείται η εκλεκτική αναγωγή του αζιδίου προς αμινομάδα. Ενώ αυτό επιτυγχάνεται ομαλά και σε υψηλές αποδόσεις χρησιμοποιώντας τριφαινυλοφωσφίνη σε υδατικό τετραϋδροφουράνιο (αντίδραση Staudinger), το προϊόν απαιτεί χρωματογραφικό καθαρισμό για την απομάκρυνση του σχηματιζόμενου τριφαινυλοφωσφινоксиδίου, που προσθέτει πειραματική πολυπλοκότητα σε μεγάλες κλίμακες. Καταβύθιση του προϊόντος **251** ως υδροχλωρικό άλας και εξουδετέρωση δεν οδήγησε σε καθαρό προϊόν, καθώς το σχηματιζόμενο άλας, παρά τις πολλαπλές προσπάθειες, φάνηκε να εγκλωβίζει προσμίξεις. Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές προς αποφυγή χρήσης της, κλασικής σε παρόμοιες συνθέσεις, αντίδρασης Staudinger, για να αποφευχθεί η ανάγκη για χρωματογραφικό καθαρισμό. Καταλυτική υδρογόνωση με Pd/C οδήγησε σε μερική αποπροστασία του υποστρώματος. Δοκιμάστηκε στη συνέχεια αύξηση της εκλεκτικότητας δηλητηριάζοντας μερικώς τον καταλύτη παλλαδίου με αμμωνία,²³⁸ ή με υδρογόνωση με τον λιγότερο ενεργό καταλύτη Lindlar, χωρίς αποτέλεσμα. Τέλος, δοκιμάστηκε ανεπιτυχώς η αναγωγή με βοριοϋδρίδιο του νατρίου καταλυόμενη από άλατα κοβαλτίου και νικελίου,²³⁹ όπως επίσης και η αναγωγή με λιθιοαργιλιοϋδρίδιο, η οποία ήταν επιτυχής αλλά και πάλι χρειάστηκε χρωματογραφικός καθαρισμός. Σε όλες τις μετέπειτα δοκιμές χρησιμοποιήθηκε τελικά η αντίδραση Staudinger.

Για τη μετατροπή της **251** στο καρβαμιδικό ενδιάμεσο **256** (Σχήμα 3.21), παρασκευάστηκε ως ακυλιωτικό μέσο ο ισοκυανικός εστέρας **255**, από τον εμπορικά διαθέσιμο 3-μεθοξυακρυλικό μεθυλεστέρα **252** κι ακολουθώντας βιβλιογραφικά γνωστές πορείες:^{234,237,240}



Σχήμα 3.21: Πορεία σύνθεσης του (3-μεθοξακρυλοϋλο)ισοκυανικού εστέρα (**85**).^{234,237,240}

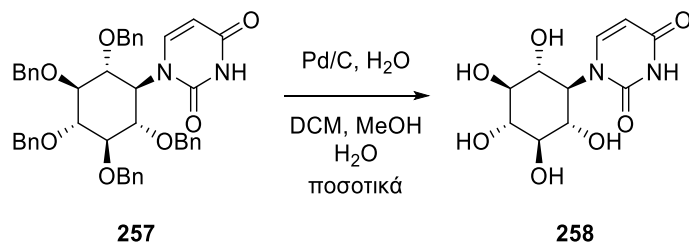
Στη συνέχεια η αμίνη **251** αφέθηκε να αντιδράσει με τον ισοκυανικό εστέρα **255**. Χρησιμοποιώντας 2 ισοδύναμα του ισοκυανικού εστέρα **255**, η ένωση **256** σχηματίστηκε σε απόδοση 90% , ενώ απομονώθηκε φασματοσκοπικά καθαρή μετά από απλή διήθηση και καταβύθιση του προϊόντος από το μίγμα της αντίδρασης με χρήση μεθανόλης (**Σχήμα 3.22**).



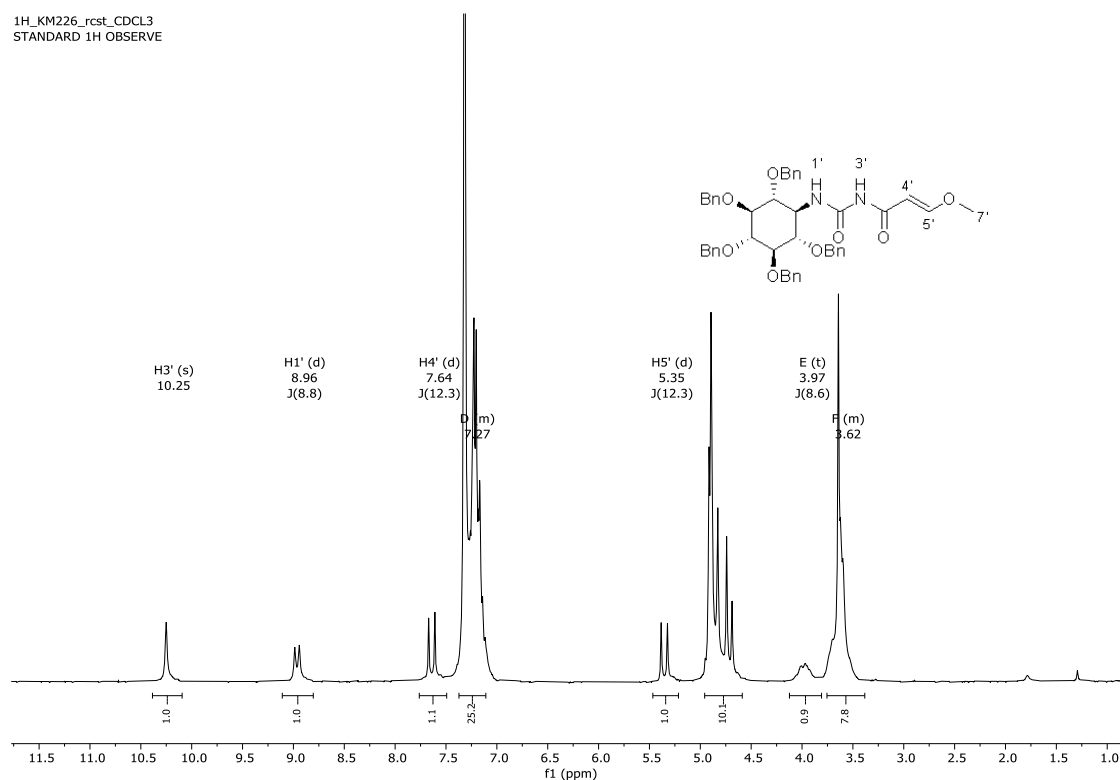
Σχήμα 3.22: *De novo* σύνθεση δακτυλίου ουρακίλης.

Η κυκλοποίηση της ακυλοουρίας **256** (**Εικόνα 3.11**) δοκιμάστηκε τόσο υπό από βασικές (υδατική αμμωνία / αιθανόλη),²⁴¹ όσο κι όξινες συνθήκες (με θειικό οξύ 2M/ τετραϋδροφουράνιο),²³⁴ ωστόσο αντιμετωπίστηκαν προβλήματα διαλυτότητας της ένωσης **256**. Η κυκλοποίηση επιτεύχθηκε τελικά με καταλυτική ποσότητα τολουολοσουλφονικού οξέος σε διοξάνιο²⁴² που οδήγησε στην επιθυμητή *N*¹-(πενταβενζυλο-*scyllo*-ινοσιτολ-1-υλο)ουρακίλη (**257**).

Το παράγωγο **257** αποπροστατεύτηκε ομαλά μέσω καταλυτικής υδρογόνωσης, για να παραληφθεί τελικά η ένωση **258** (**Σχήμα 3.23**).



Σχήμα 3.23: Σύνθεση της *N*¹-(2-δεοξυ-*scyllo*-ινοσιτολ-1-υλο)ουρακίλης **258**.

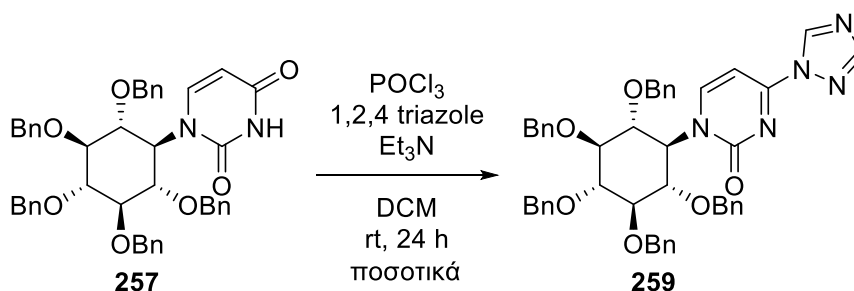


Εικόνα 3.11: Φάσμα ^1H -NMR (200 MHz σε CDCl_3) του καρβαμιδικού ενδιαμέσου **256**.

Σε μια προσπάθεια να αποφευχθούν τα προβλήματα αποβενζυλίωσης που αναφέρονται στην ενότητα των *C*-γλυκοζιτών (Ενότητα 2.2.7) επιχειρήθηκε επίσης η ακετυλίωση του προϊόντος **258**, η οποία ωστόσο δεν επιτεύχθηκε, λόγω της εξαιρετικής δυσδιαλυτότητάς του.

3.3.2.3 Υποκατάσταση από αρυλαμίνες

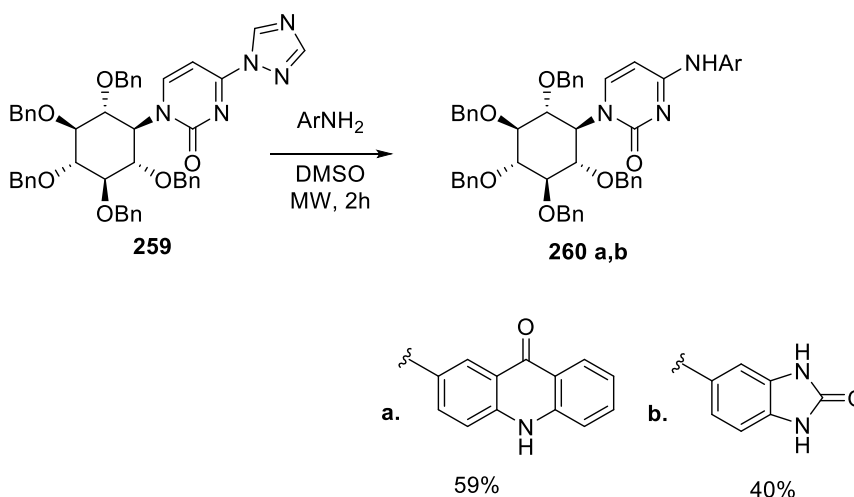
Επόμενο βήμα στη σύνθεση ήταν η υποκατάσταση του δακτυλίου της ουρακίλης στη θέση 4 από αρυλαμίνες. Για τον σκοπό αυτό, αξιοποιήθηκε η εμπειρία του εργαστηρίου μας στη σύνθεση αναστολέων με δομή κλασικού γλυκοζίτη της ουρακίλης, που βασίζεται στη μετατροπή του ατόμου οξυγόνου στη θέση 4 του πυριμιδινικού δακτυλίου σε μια καλώς αποχωρούσα ομάδα στη θέση του ατόμου του οξυγόνου.⁵⁵ Έχει βρεθεί ότι από μια ποικιλία πιθανών ομάδων, το 1,2,4-τριαζόλιο διαθέτει την κατάλληλη ισορροπία ανάμεσα σε δραστηριότητα, που επιτρέπει την υποκατάσταση, και σταθερότητα, που διευκολύνει τον χειρισμό των ενδιαμέσων.



Σχήμα 3.24: Σύνθεση τριαζολο-παραγώγου της ένωσης **257** με σκοπό την υποκατάσταση

Με εξαίρεση την αλλαγή του διαλύτη της αντίδρασης από ακετονιτρίλιο σε διχλωρομεθάνιο (για λόγους διαλυτότητας), ακολουθήθηκε η προηγούμενη εργασία, όπου το ενδιάμεσο **257** αφέθηκε να αντιδράσει με οξυχλωριούχο φωσφόρο και 1,2,4-τριαζόλιο παρουσία τριαιθυλαμίνης, για να παραληφθεί πρακτικά ποσοτικά το παράγωγο **259** (Σχήμα 3.24).

Το παράγωγο **259** αφέθηκε στη συνέχεια να αντιδράσει με τις επιθυμητές αρυλαμίνες **162a** και **162b** υπό την επίδραση μικροκυματικής ακτινοβολίας χρησιμοποιώντας ως διαλύτη DMSO (Σχήμα 3.25). Ενώ η υποκατάσταση και στις δύο περιπτώσεις προχώρησε ικανοποιητικά, οι ενώσεις **260a** και **260b** αποδείχτηκαν ιδιαίτερα δυσδιάλυτες, οπότε απομονώθηκαν από το μίγμα της αντίδρασης με επαναλαμβανόμενη καταβύθιση και έκπλυση, με τη βοήθεια φυγοκέντρου.



Σχήμα 3.25: Υποκατάσταση από αρυλαμίνες.

Ενώ ήταν δυνατή η ταυτοποίηση με φασματομετρία μάζας των ενώσεων **260a** και **260b**, δεν ήταν δυνατός ο χαρακτηρισμός καμίας από τις δύο με

φασματοσκοπία NMR. Τόσο σε διαλύτη DMSO, όσο και σε μίγματα δευτεριωμένου χλωροφορμίου με μεθανόλη (για λόγους διαλυτότητας), οι κορυφές στο φάσμα ήταν τόσο διευρυμένες (ευρύτερες από 5 ppm) ώστε τα φάσματα να μην είναι αξιοποιήσιμα. Η φασματοσκοπική εικόνα δεν βελτιώθηκε με τη λήψη των φασμάτων σε υψηλότερες θερμοκρασίες.

Πραγματοποιήθηκε προσπάθεια να αποπροστατευτούν οι ενώσεις με στόχο τον χαρακτηρισμό των τελικών μορίων. Αποπροστασία με υδρογόνωση οδήγησε σε παρόμοια αρνητικά αποτελέσματα με αυτά των C-γλυκοπυρανοζιτών (Ενότητα 2.2.7.2). Στις διάφορες συνθήκες που δοκιμάστηκαν, το μοναδικό αποτέλεσμα ήταν η διάσπαση των υποστρωμάτων σε πολύπλοκα μίγματα, χωρίς να μπορεί να ανιχνευτεί το επιθυμητό προϊόν με φασματομετρία μάζας.

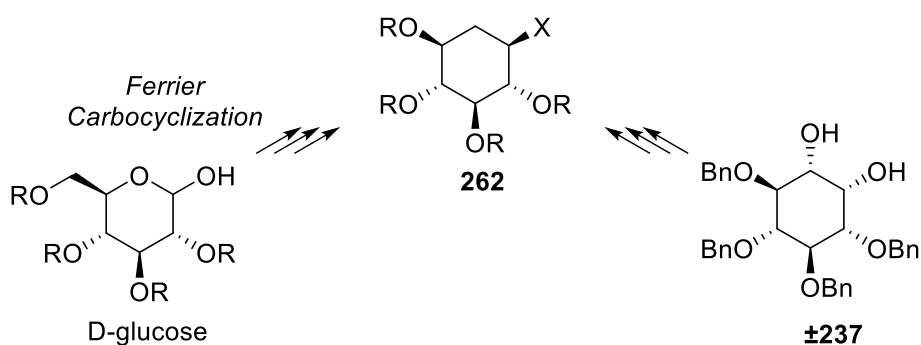
Στο διάστημα που μεσολάβησε ολοκληρώθηκε η κινητική και κρυσταλλογραφική μελέτη του προϊόντος **258** (Ενότητα 4.1.2). Τα αποτελέσματα ήταν απογοητευτικά, καθώς το **258** αποδείχθηκε ότι πρακτικά δεν προσδένεται στο καταλυτικό κέντρο της GP, οπότε σταμάτησαν οι προσπάθειες αποπροστασίας των ενώσεων **260a** και **260b** και προχωρήσαμε στις δοκιμές για την επόμενη οικογένεια πιθανών αναστολέων.

3.3.3 Παράγωγα 2-δεοξυινοσιτόλης

Όπως περιγράφεται στην προηγούμενη ενότητα, τα καρβοκυκλικά ανάλογα της ινοσιτόλης διαφοροποιούνται αρκετά από τους κλασικούς γλυκοζίτες ώστε να παρεμποδίζεται η πρόσδεσή τους στο καταλυτικό κέντρο της GP. Οι δομικές διαφοροποιήσεις που οδηγούν στην ανικανότητα πρόσδεσης συζητούνται αναλυτικότερα στο Κεφάλαιο 4. Η διερεύνηση συνεχίστηκε στην οικογένεια των καρβοκυκλικών αναλόγων αναζητώντας παράγωγα που να ομοιάζουν περισσότερο δομικά προς τη D-γλυκοπυρανόζη .

3.3.3.1 Σύνθεση του καρβασακχαρικού τμήματος

Όπως συζητήθηκε παραπάνω, αποφασίσαμε να αποφύγουμε τη σύνθεση καρβα-D-γλυκοπυρανόζης, για να αποφευχθεί επιπλέον πολυπλοκότητα στη συνολική σύνθεση. Εναλλακτικά, κατάλληλα παράγωγα θα μπορούσαν να είναι μόρια βασισμένα σε ένα καρβοκυκλικό ανάλογο γλυκόζης με τη γενική δομή **262** που φαίνεται στην **Εικόνα 3.12**. Τέτοια παράγωγα θα μπορούσαν να προκύψουν από καρβοκυκλοποίηση Ferrier (Ενότητα 3.2). Εναλλακτικά, αποφασίστηκε η αξιοποίηση των μεγάλων ποσοτήτων ενδιαμέσου $\pm$ **237** που ήταν διαθέσιμο από την (αδιέξοδη) σύνθεση της προηγούμενης ενότητας. Αποξυγόνωση της θέσης 2 θα μπορούσε να οδηγήσει σε μόρια με την επιθυμητή δομή **262**.



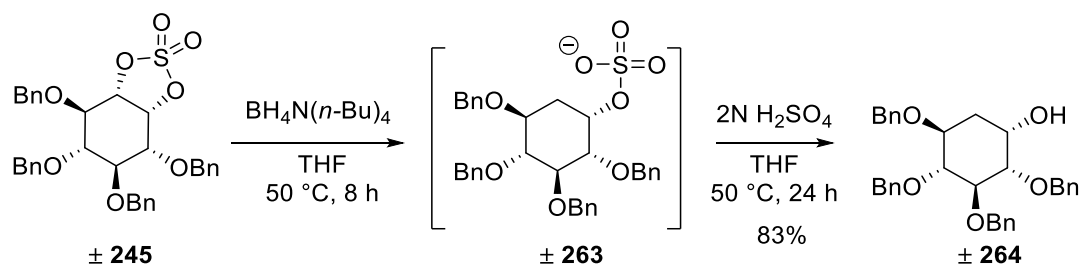
Εικόνα 3.12: Πιθανά καρβοκυκλικά τμήματα για μια νέα οικογένεια δυνάμει αναστολέων της GP.

Στη βιβλιογραφία υπάρχει πράγματι ένα παράδειγμα όπου πραγματοποιείται αποξυγόνωση του μορίου $\pm$ **237**.²³³ Στο πρώτο βήμα το ισημερινό υδροξύλιο μετατρέπεται εκλεκτικά σε τοσυλεστέρα και στη συνέχεια αποσπάται

αναγωγικά. Στα χέρια μας η τοσυλίωση έδωσε σχετικά χαμηλές αποδόσεις, που σε συνδυασμό με το υψηλό κόστος του απαιτούμενου αναγωγικού μας οδήγησε στην αναζήτηση καλύτερων εναλλακτικών.

Αποφασίστηκε να δοκιμαστεί η αναγωγή του ενδιαμέσου ± 237 μέσω του προστατευμένου θειικού εστέρα της *myo*-ινοσιτόλης ± 245 , που είχε ήδη παρασκευάσει νωρίτερα (Ενότητα 3.3.2.1)

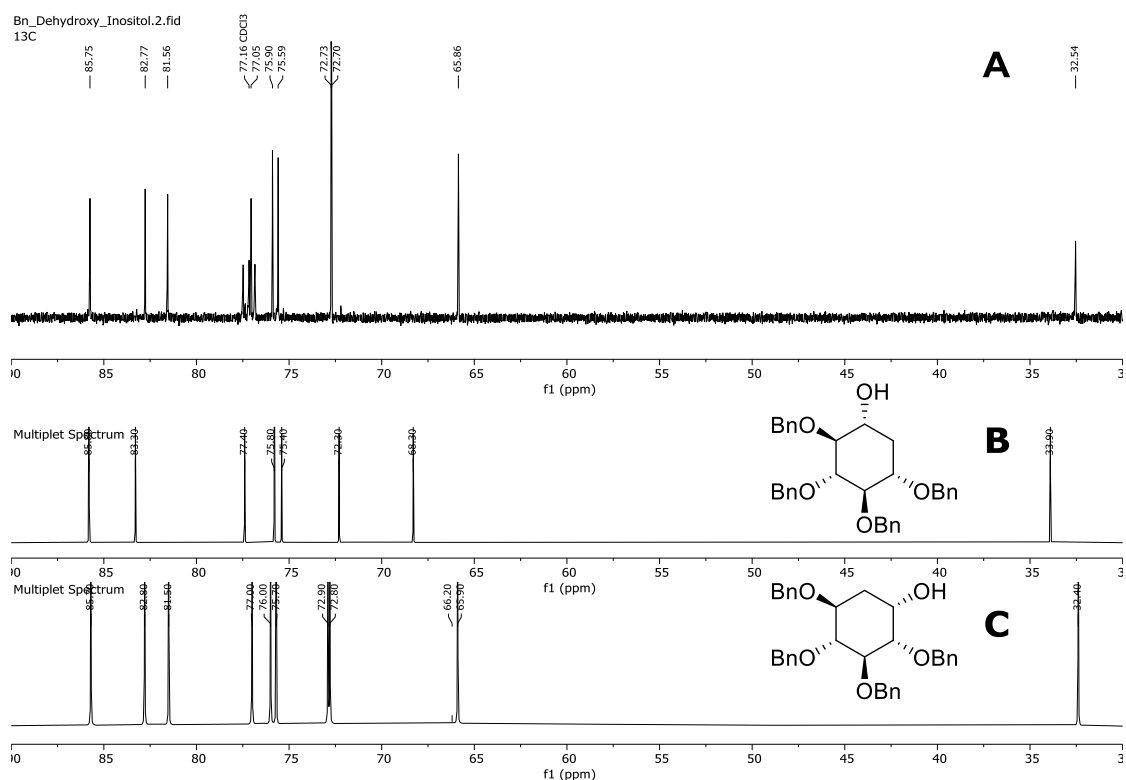
Με βάση βιβλιογραφία από τη χημεία γλυκοζιτών,²⁴³ πραγματοποιήθηκε σε αναγωγή του ± 245 με βοριοϋδρίδιο του τετρα-βουτυλαμμωνίου, το οποίο παρασκευάστηκε ακολουθώντας βιβλιογραφική αναφορά,²⁴⁴ ακολουθούμενη από όξινη υδρόλυση του ενδιαμέσου ± 263 (Σχήμα 3.26).



Σχήμα 3.26: Σύνθεση 1-δεοξυ-3,4,5,6-τετρα-Ο-βενζυλο-*myo*-ινοσιτόλης.

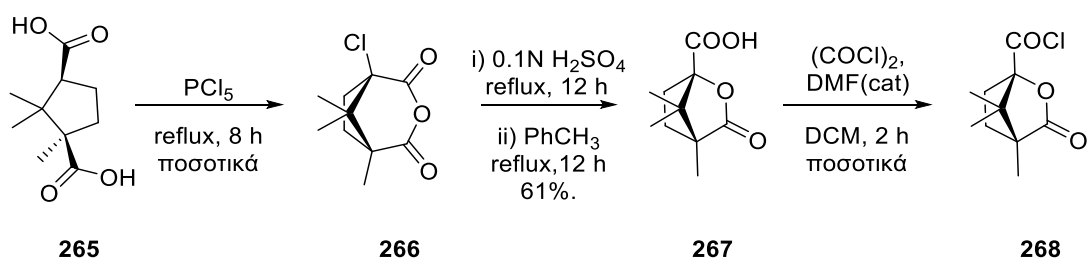
Πέρα από υδατική κατεργασία ο μοναδικός καθαρισμός ο οποίος απαιτήθηκε ήταν το φιλτράρισμα του τελικού προϊόντος ± 264 από silica, ώστε να παραληφθεί σε απόδοση 83%. Το προϊόν ταυτοποιήθηκε συγκρίνοντας φάσματα ^{13}C -NMR του προϊόντος με φάσματα από βιβλιογραφική αναφορά,²⁴⁵ όπου και τα δύο πιθανά διαστερεομερή παρασκευάστηκαν με διαφορετικές μεθόδους (Εικόνα 3.13).

Η αξιοσημείωτη τοποεκλεκτικότητα της διάνοιξης του δακτυλίου, με το υδρίδιο να προσβάλλει αποκλειστικά από αξονική κατεύθυνση επιβεβαιώνει την ιδιαίτερη στερεοεκλεκτικότητα των θειικών εστέρων κατά την προσβολή τους από πυρηνόφιλα όπως συζητήθηκε στην Ενότητα 3.3.2.1.



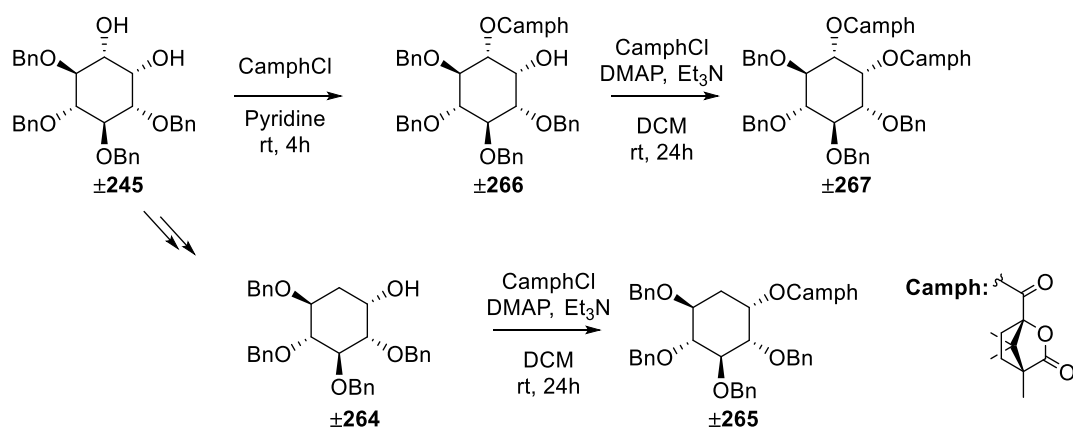
Εικόνα 3.13: Σύγκριση ^{13}C -NMR (50 MHz σε CDCl_3) του προϊόντος ± 264 (**A**) με τα δύο πιθανά διαστερεομερή (**B**, **C**) από βιβλιογραφική αναφορά.²⁴⁵

Το προϊόν ± 264 παραλήφθηκε ως ρακεμικό μίγμα, οπότε επιχειρήθηκε ο διαχωρισμός των εναντιομερών. Στη βιβλιογραφία ο διαχωρισμός εναντιομερών παραγώγων ινοσιτόλης πραγματοποιείται συχνά με μετατροπή των ενδιαμέσων τους αντίστοιχους εστέρες οπτικά καθαρού καμφανικού οξέος.^{246–250}



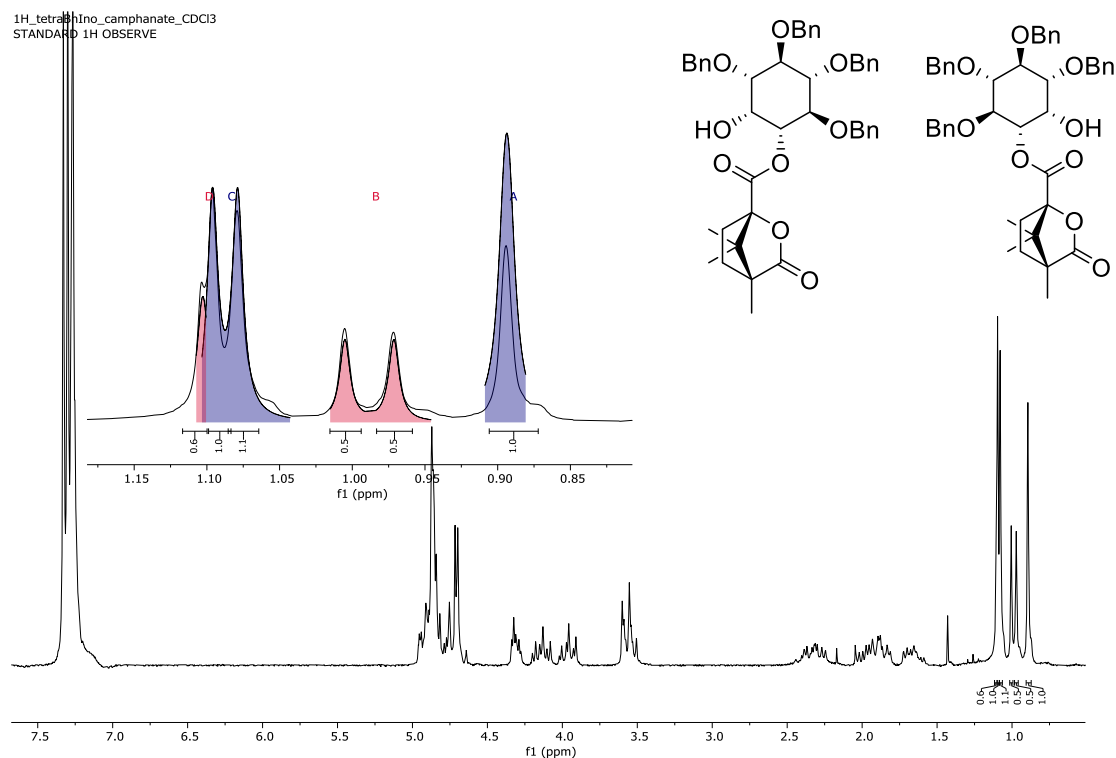
Σχήμα 3.27: Παρασκευή του (-)-(1*S*,4*R*) – καμφανοϋλοχλωριδίου **268**.²⁵¹

Παρασκευάστηκε (-)-(1*S*,4*R*) – καμφανοϋλοχλωρίδιο (**268**), ακολουθώντας βιβλιογραφικά γνωστή μέθοδο (**Σχήμα 3.27**).²⁵¹ Το χλωρίδιο **268** αφέθηκε να αντιδράσει με την ένωση ± 264 προς σχηματισμό του αντίστοιχου διαστερεομερικού μίγματος των εστέρων **269** (**Σχήμα 3.28**).



Σχήμα 3.28: Παραγωγοποίηση με στόχο τον οπτικό διαχωρισμό.

Παρασκευάστηκαν επίσης ο μονο- **266** και δι-καμφανούλεστέρας **267** της ένωσης **245**. Σε καμία από τις παραπάνω περιπτώσεις δεν κατέστη δυνατός ο χρωματογραφικός διαχωρισμός του διαστεreoμερικού μίγματος.



Σχήμα 3.29: Φάσμα ¹H-NMR (200 MHz σε CDCl₃) του μίγματος των παραγώγων **266** με λεπτομέρεια της περιοχής των μεθυλομάδων της καμφανούλομάδας.

Διαστερομερικό μίγμα της ένωσης **266** μπόρεσε να εμπλουτιστεί στο ένα διαστερομερές με επαναλαμβανόμενες ανακρυσταλλώσεις, ωστόσο οι ανακτήσεις ήταν τελικά τόσο χαμηλές ώστε οι προσπάθειες εγκαταλείφθηκαν. Ενδεικτικά, στο **Σχήμα 3.29** φαίνεται το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ μίγματος των παραγώγων **266** μετά από 3 ανακρυσταλλώσεις από μεθανόλη, όπου φαίνεται αναλογία 1:2 μεταξύ των διαστερομερών.

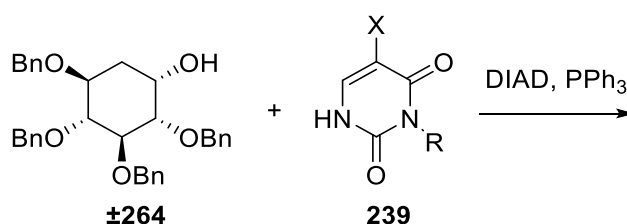
Μία επιπλέον εναλλακτική η οποία εξετάστηκε ήταν η ασύμμετρη μονο-ακετυλίωση της διόλης $\pm\mathbf{245}$ με τη χρήση ενζύμων, συγκεκριμένα λιπασών,^{252–255} ωστόσο η ένωση αποδείχτηκε αδρανής τόσο στον συνδυασμό οξικού ανυδρίτη με προσροφημένη σε διατομική γη λιπάση AY-30 που παρασκευάστηκε με γνωστή μέθοδο,²⁵⁴ όσο και σε οξικό βινυλεστέρα και λιπάσης Amano.

Αποφασίστηκε έτσι να συνεχιστεί η σύνθεση με τη ρακεμική μορφή του ενδιαμέσου $\pm\mathbf{264}$. Στο επίπεδο της *in vitro* κινητικής και κρυσταλλογραφικής μελέτης δεν απαιτούνται οπτικά καθαρά προϊόντα. Από την πολυετή εμπειρία της ομάδας μας, με σχετική ασφάλεια μπορεί να αξιοποιηθεί το γεγονός ότι το καταλυτικό κέντρο της GP είναι ιδιαίτερα εξειδικευμένο στην πρόσδεση γλυκοπυρανοζών. Επίσης, δεν έχει παρατηρηθεί σε κανένα από τα πειράματα η πρόσδεση του πυριμιδινικού και αρωματικού τμήματος, η οποία θα μπορούσε ενδεχομένως να λάβει χώρα σε κάποιο από τα κέντρα αλλοστερικής ρύθμισης του ενζύμου. Κατ' επέκταση, αναμενόταν κατά την κινητική μελέτη των παραγώγων αυτής της ενότητας να προσδεθεί εκλεκτικά το επιθυμητό εναντιομερές, με το δεύτερο να παραμένει αδρανές, τουλάχιστον στο επίπεδο του *in vitro* κινητικού πειράματος.

3.3.3.2 Σύζευξη με ουρακίλη

Στη συνέχεια ξεκίνησαν οι δοκιμές υποκατάστασης του ελεύθερου υδροξυλίου από ουρακίλη. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν δοκιμές σύζευξης του υποστρώματος $\pm\mathbf{264}$ κάτω από συνθήκες Mitsunobu.^{200–206} Στην περίπτωση της παραγώγων της ινοσιτόλης η συγκεκριμένη αντίδραση δεν είχε οδηγήσει σε χρήσιμα αποτελέσματα (Ενότητα 3.3.2.2). Παρά τη μικρότερη στερική

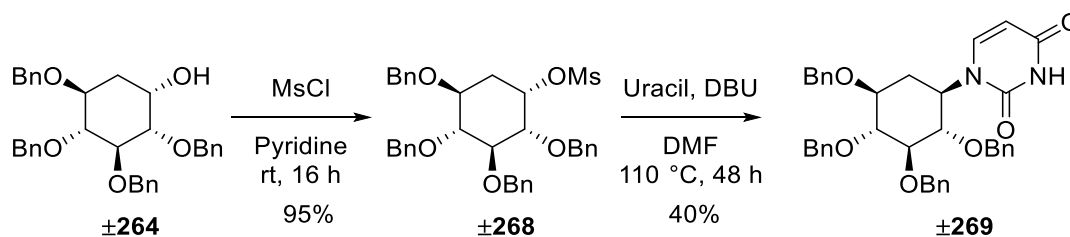
παρεμπόδιση του υποστρώματος **±264** τα αποτελέσματα ήταν κι εδώ απογοητευτικά. Δοκιμάστηκε τόσο η προσθήκη DIAD σε μίγμα των υπόλοιπων αντιδρώντων (μέθοδος **A**, α/α **1,3**, Πίνακας **5**), όσο και ο σχηματισμός της βεταΐνης φωσφίνης και DIAD και στη συνέχεια διαδοχική προσθήκη ουρακίλης και ινοσιτόλης (μέθοδος **B**, α/α **2**, Πίνακας **5**), χωρίς θετικό αποτέλεσμα. Και πάλι δοκιμάστηκε η τροποποίηση της πορείας με χρήση 5-χλωρουρακίλης (α/α **4,5**, Πίνακας **5**), για βελτίωση χαρακτηριστικών διαλυτότητας και δραστηριότητας, ωστόσο αυτό οδήγησε σε πολύπλοκα μίγματα.



Πίνακας 5: Συνθήκες αντίδρασης Mitsunobu οι οποίες δοκιμάστηκαν.

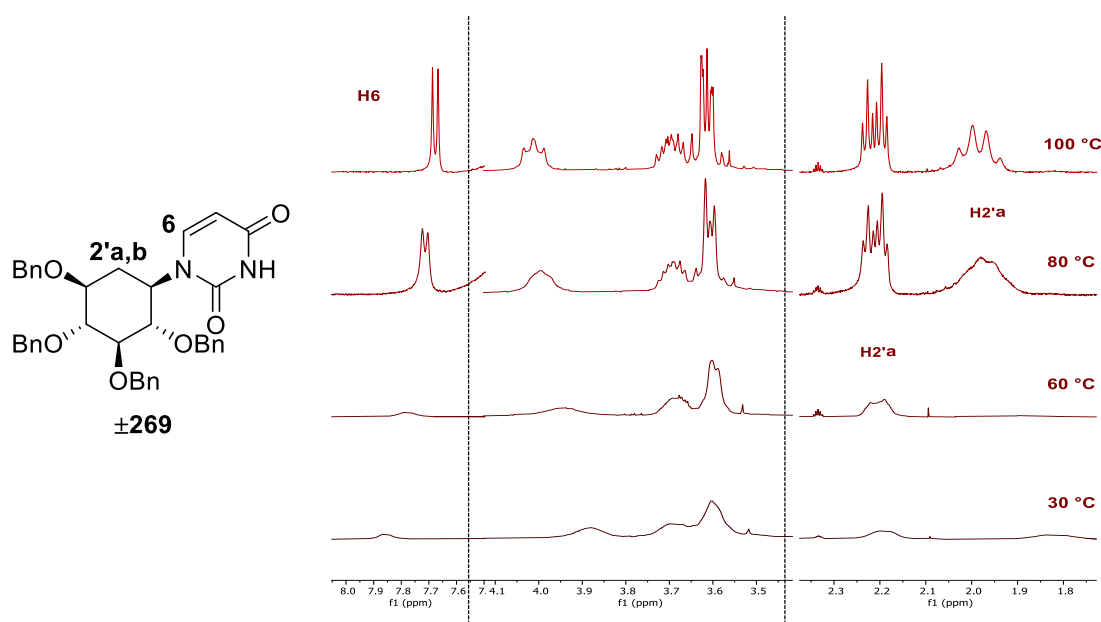
Αρ.		Διαλύτης	T	Μέθοδος Προσθήκης
1		THF	0 °C -r.t.	A
2	X = H, R = H	THF	0 °C -r.t.	B
3		Διοξάνιο	100 °C	A
4		THF	0 °C - r.t.	A
5	X = Cl, R = H	THF	0 °C -r.t.	B

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε παρασκευή του μεθανοσουλφονυλοπαραγώγου **±268** (Σχήμα **3.30**). Δοκιμάζοντας μια σειρά από βάσεις, ο συνδυασμός ουρακίλης-DBU, οδήγησε στον σχηματισμό του προϊόντος **±269**. Οι αποδόσεις ήταν μάλλον χαμηλές (30-40%). Κι εδώ παρατηρήθηκε ο σχηματισμός του αντίστοιχου προϊόντος απόσπασης, όπως συνέβαινε και στην περίπτωση της *μγ*-ινοσιτόλης. Η επαναληψιμότητα της αντίδρασης και η ευκολία σύνθεσης του αρχικού μορίου **±264** ωστόσο δικαιολογούν τη χρήση αυτού του σχήματος έναντι της σταδιακής ανοικοδόμησης της ουρακίλης η οποία χρησιμοποιήθηκε για τα παράγωγα ινοσιτόλης (Ενότητα 3.3.2.2), που θα προσέθετε 7 βήματα στη σύνθεση.



Σχήμα 3.30: Σύνθεση προστατευμένης (±)-1-(1,2-διδεοξυ-*scyllo*-ινοσιτολ-2-υλο)-ουρακίλης

Ο χαρακτηρισμός της ένωσης ± 269 με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ αποδείχτηκε δύσκολος. Η προσθήκη της ουρακίλης οδηγεί σε σημαντική διεύρυνση των κορυφών του καρβασακχαρικού τμήματος. Ειδικότερα τα μεθυλениκά πρωτόνια της θέσης 2 καθίστανται πρακτικά μη ανιχνεύσιμα. Η λήψη φασμάτων ικανοποιητικής ευκρίνειας ωστόσο έγινε εφικτή με σταδιακή θέρμανση δείγματος μέχρι τους 100 °C (**Εικόνα 3.14**) σε διαλύτη $\text{DMSO-}d_6$. Παρόμοιο φαινόμενο παρατηρείται και στην περίπτωση του πρωτονίου H^6 της ουρακίλης, γεγονός το οποίο μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πιθανότατα η διεύρυνση οφείλεται σε μια ιδιαίτερα αργή περιστροφή του δεσμού ανάμεσα στο καρβασακχαρικό και πυριμιδινικό τμήμα.



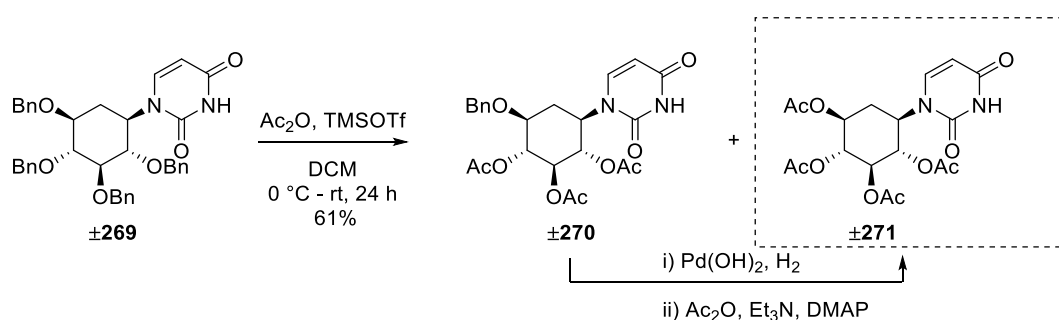
Εικόνα 3.14: Λεπτομέρεια από σειρά φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz σε $\text{DMSO-}d_6$) της ένωσης ± 269 με αυξανόμενη θερμοκρασία.

Η ίδια συμπεριφορά παρατηρήθηκε σε κάθε παράγωγο στη συνέχεια της συγκεκριμένης συνθετικής πορείας.

Το παράγωγο ± 269 , όπως και τα παράγωγα ινοσιτόλης, παρουσιάζει

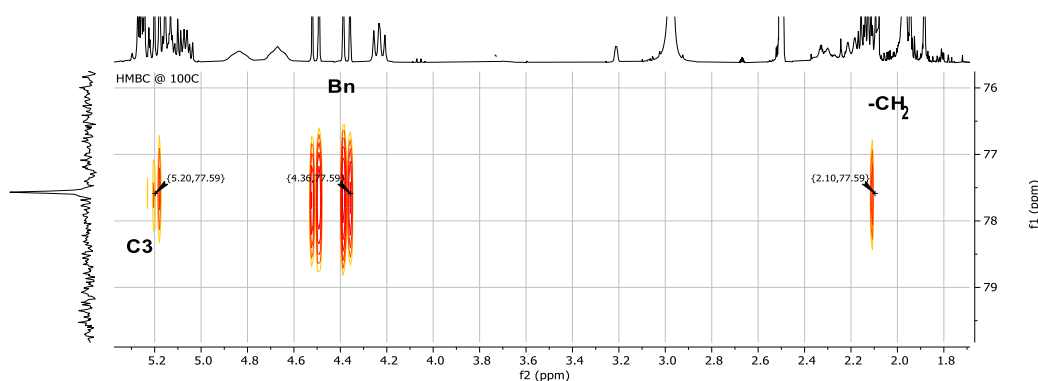
προβλήματα διαλυτότητας. Επιπρόσθετα, η προσπάθεια αποπροστασίας του μέσω υδρογόνωσης οδήγησε σε μίγματα προϊόντων από τα οποία δεν έγινε δυνατή η απομόνωση του αντίστοιχου ελεύθερου προϊόντος παρά έναν αριθμό προσπαθειών.

Σε αυτό το σημείο αξιοποιήσαμε την (πρόσφατη) εμπειρία μας από τη σύνθεση των C-γλυκοκυρανοζιτών (Ενότητα 2.2.7.2). Χρησιμοποιώντας τις ίδιες συνθήκες οι οποίες έλυσαν τα προβλήματα που δημιουργούσε η προστασία των βενζυλομάδων (οξικός αιθυλεστέρας, TMSOTf), επιχειρήθηκε η ανταλλαγή των βενζυλομάδων με ακετυλομάδες. Παραλήφθηκε ένα δύσκολο διαχωρίσιμο μίγμα δύο ενώσεων: της επιθυμητής, πλήρως ακετυλιωμένης ένωσης **±271**, με την ένωση **±270** στην οποία διατηρείται μία βενζυλομάδα (**Σχήμα 3.31**).



Σχήμα 3.31: Τρανς-ακετυλίωση των βενζυλαιθέρων της ένωσης **±269**.

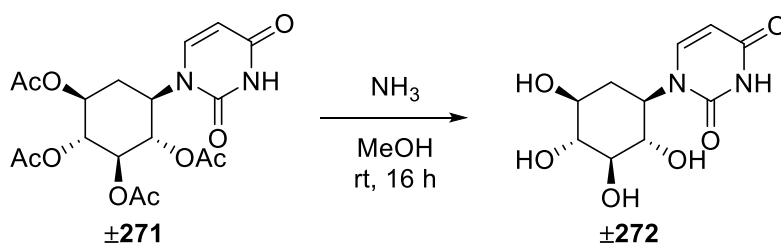
Εφαρμόζοντας φασματοσκοπικό διαχωρισμό του μίγματος με χρήση φασμάτων 1D-TOCSY σε συνδυασμό με φάσματα HMBC, αποδείχθηκε ότι η κορυφή η οποία αντιστοιχεί στο ζεύγος των διαστερεοτοπικών βενζυλικών πρωτονίων (4.51 και 4.25 ppm) αλληλεπιδρά με ένα άτομο άνθρακα που ταυτοποιήθηκε ως ο άνθρακας της θέσης 3 του δακτυλίου (77.59 ppm) (**Εικόνα 3.15**). Η ταυτοποίηση του άνθρακα 3 προκύπτει από την αλληλεπίδρασή του με το ένα από τα δύο μεθυλενικά πρωτόνια της θέσης 2 (2.10 ppm), όπως και με άλλο ένα πρωτόνιο, αυτό της θέσης 4 (5.20 ppm), πάντα από το φάσμα HMBC. Η απουσία της κορυφής στα 77.59 στα φάσματα ^{13}C καθαρής ένωσης **±271** η οποία παρασκευάστηκε στη συνέχεια, αποτελούν επιπλέον απόδειξη ότι πρόκειται για κορυφή ατόμου άνθρακα χαρακτηριστικής του μονοβενζυλιωμένου προϊόντος **±270**.



Εικόνα 3.15: Λεπτομέρεια του φάσματος HMBC (400 MHz σε DMSO- d_6) του μίγματος των ενώσεων ± 270 και ± 271 .

Σε πολλαπλές επαναλήψεις, ακόμη και με τροποποίηση των συνθηκών (αύξηση θερμοκρασίας, αύξηση ισοδυνάμων των αντιδραστηρίων) το αποτέλεσμα ήταν παρόμοιο. Πραγματοποιήθηκε λοιπόν σε υδρογονολυτική απόσπαση της τελευταίας βενζυλομάδας (απαιτήθηκε η χρήση του ισχυρού καταλύτη $Pd(OH)_2$ και 48 h χρόνος αντίδρασης) και επανακετυλίωση του μίγματος. Έγινε σε αυτό το σημείο ξανά εμφανής η χαμηλή δραστηριότητα της υδροξυλομάδας καθώς απαιτήθηκαν 50 ισοδύναμα Ac_2O και προσθήκη DMAP για την ολοκλήρωση της αντίδρασης. Τελικά το προϊόν ± 271 παραλήφθηκε σε συνολική απόδοση 61%.

Το προϊόν ± 271 αποπροστατεύτηκε ποσοτικά με επίδραση μεθανολικής αμμωνίας. Το ελεύθερο προϊόν ± 272 απομονώθηκε καθαρό μετά από επαναλαμβανόμενες καταβυθίσεις από οξικό αιθυλεστέρα.

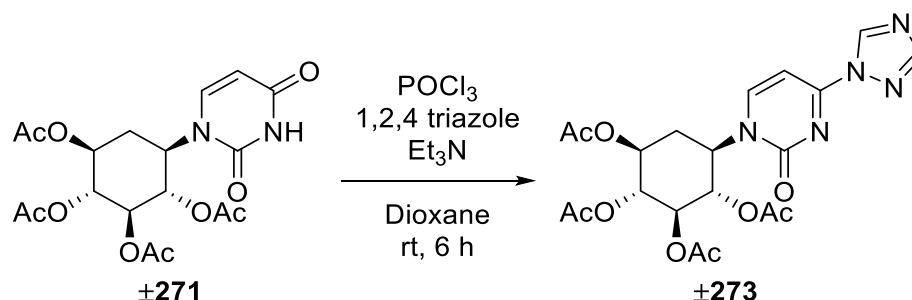


Σχήμα 3.32: Αποπροστασία του ενδιάμεσου **99**.

3.3.3.3 Υποκατάσταση από αρυλαμίνες

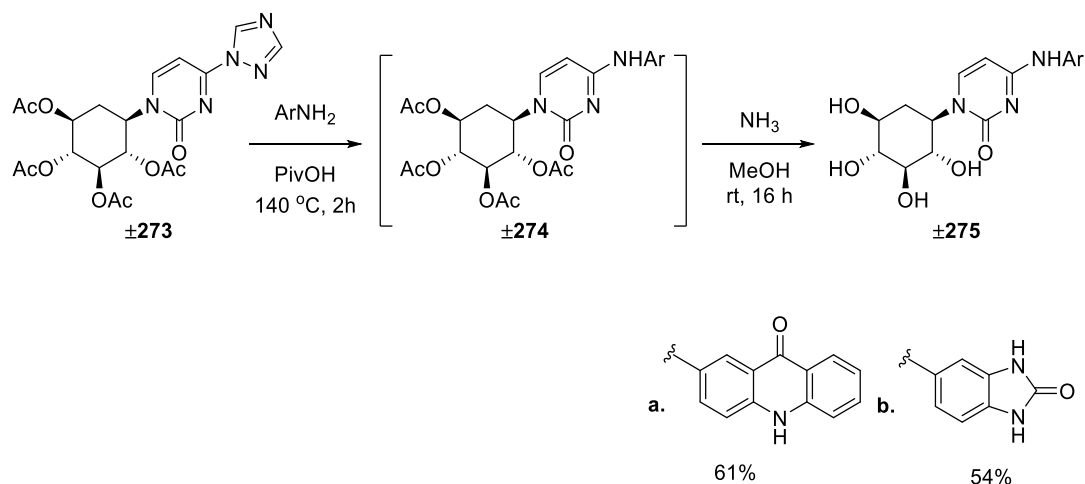
Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές για την υποκατάσταση της θέσης 4 του δακτυλίου της ουρακίλης. Ακολουθώντας την ίδια πορεία όπως για το παράγωγο της ινοσιπόλης **257** (Σχήμα 3.24, Ενότητα 3.3.2.3) (απαιτήθηκε η

αλλαγή του διαλύτη σε διοξάνιο), παρασκευάστηκε το τριαζολοπαράγωγο **±101** σε πρακτικά ποσοτική απόδοση.



Σχήμα 3.33: Σύνθεση παραγώγου τριαζολίου της ένωσης **±271**.

Ελλείπει λειτουργικού εξοπλισμού μικροκυμάτων κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, όπως εφαρμόζονται συνήθως, για την υποκατάσταση χρησιμοποιήθηκε κλασική θέρμανση του παραγώγου και αρυλαμίνης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη πιβαλικό οξύ (**Σχήμα 3.34**),¹⁶³ μέθοδος η οποία έχει αποδειχτεί ιδιαίτερα κατάλληλη για την υποκατάσταση τριαζολίου στους αντίστοιχους κλασικούς γλυκοζίτες που έχουν παρασκευαστεί στο εργαστήριό μας.

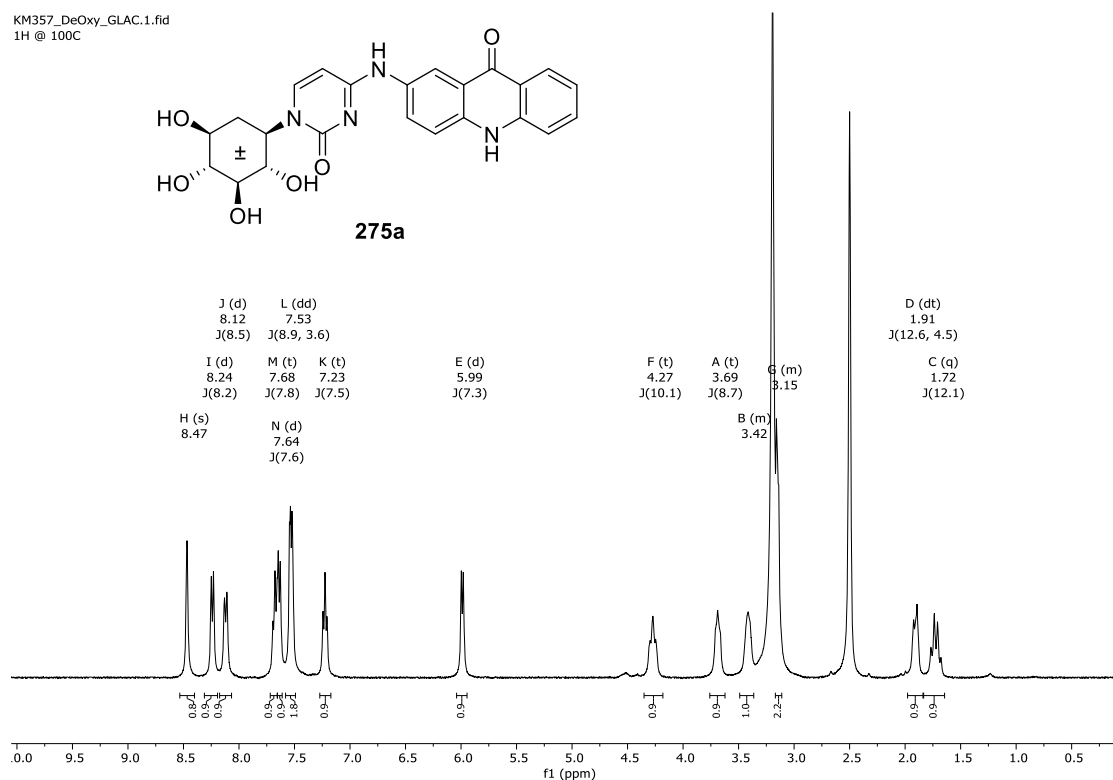


Σχήμα 3.34: Υποκατάσταση της ένωσης **101** από αρυλαμίνες **±275** και **±275b**.

Η υποκατάσταση με τις αμίνες **162a** και **162b** προχώρησε ιδιαίτερα γρήγορα και οι αντιδράσεις οδήγησαν σε αξιοσημείωτα απλά μίγματα. Τα προϊόντα **±275a** και **±275b** αποδείχτηκαν εξαιρετικά δυσδιάλυτα, περισσότερο ακόμη κι από τους αντίστοιχους C-γλυκοπυρανοζίτες **170a** και **170b**, οπότε επιλέχθηκε

η απευθείας αποπροστασία των ενώσεων, μετά από απόσταξη του πιβαλικού οξέος, με χρήση μεθανολικής αμμωνίας.

Μετά την αποπροστασία η ένωση **±275a** (**Εικόνα 3.16**) καθαρίστηκε με επαναλαμβανόμενες καταβυθίσεις προς απομάκρυνση της περίσσειας αμίνης από το βήμα της υποκατάστασης, τριαζολίου και ακεταμιδίου, ενώ η ένωση **±275b** καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης.



Εικόνα 3.16: Φάσμα ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) της ένωσης **±275a**.

Συντέθηκαν έτσι με επιτυχία τρεις νέοι καρβοκυκλικοί, δυνάμει αναστολείς της GP, σε ικανή ποσότητα ώστε να προχωρήσουμε σε περαιτέρω βιολογικές *in vitro* μελέτες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Κινητικές, διαμορφωτικές και βιολογικές μελέτες

4.1 Κινητικά πειράματα

Η δράση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GP) βασίζεται στην ισορροπία:



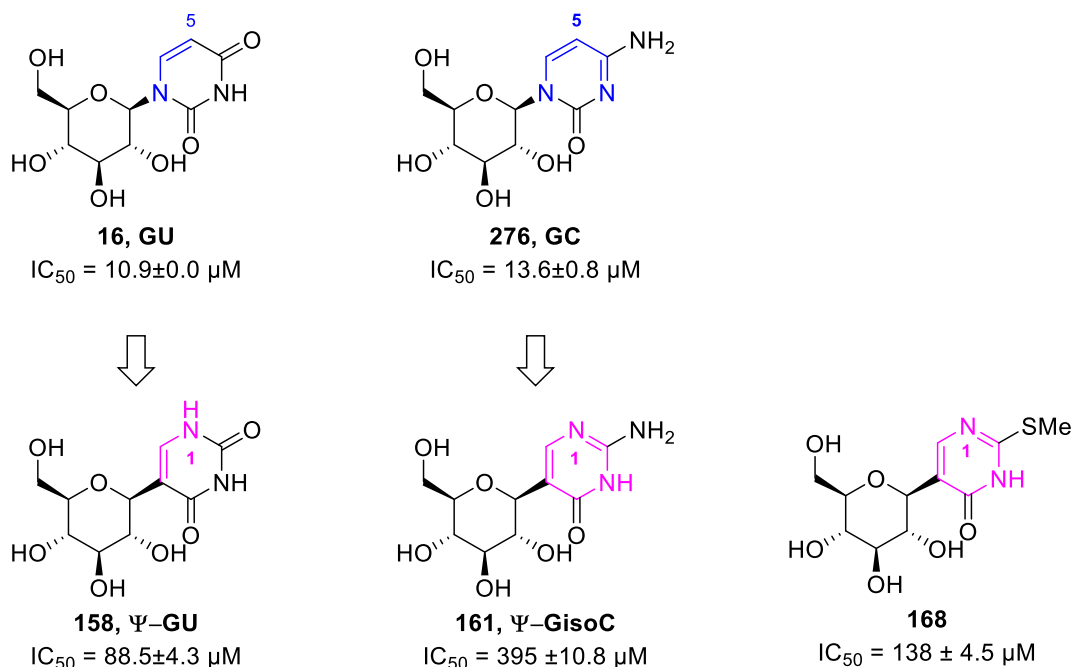
Ενώ στους ζωντανούς οργανισμούς η αντίδραση είναι μετατοπισμένη προς την κατεύθυνση υδρόλυσης του γλυκογόνου προς 1-φωσφορική γλυκόζη, λόγω των υψηλών σχετικά συγκεντρώσεων φωσφορικών, στα κινητικά πειράματα η αντίδραση μελετάται προς την αντίθετη κατεύθυνση. Επώαση του ενζύμου παρουσία αναστολέα επιτρέπει την πρακτική ποσοτικοποίηση των απελευθερωμένων φωσφορικών με φωτομετρική μέθοδο,^{256,257} ώστε να χαραχθούν τελικά οι κινητικές καμπύλες και να εξαχθεί η τιμή IC₅₀ για τον εκάστοτε αναστολέα, που αντιστοιχεί στη συγκέντρωση αναστολέα η οποία οδηγεί σε μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου κατά 50% και συσχετίζεται άμεσα με την ισχύ πρόσδεσης. Το σύνολο των κινητικών πειραμάτων πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας μυϊκή φωσφορυλάση που έχει απομονωθεί από τους ιστούς κουνελιού (rabbit muscle glycogen phosphorylase, RMGP).²⁵⁷ Οι κινητικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο της Δρ Ευαγγελίας Χρυσίνα στο Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας του ΕΙΕ, από τον μεταπτυχιακό φοιτητή Διονύση Νεόφυτο.

4.1.1 C-γλυκοζίτες

Για την οικογένεια των C-γλυκοζιτικών αναλόγων, και ειδικά για την ένωση **170a** (Ψ-GLAC), πριν την αρχή της σύνθεσης και στα πλαίσια μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης,⁵⁷ είχαν πραγματοποιηθεί, σε συνεργασία με τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Ιωάννα Πετροπούλου, *in silico* μελέτες, τόσο μέσω μοριακής πρόσδεσης μέσω του προγράμματος Glide,¹²² όσο και μέσω μελέτης ποσοτικών σχέσεων δομής δράσης (QSAR) με το πρόγραμμα Sybyl. Οι μελέτες αυτές είχαν υποδείξει ότι οι νέοι αναστολείς όπως οι ενώσεις **170a**, **170b**

(**Εικόνα 4.3**) αναμενόταν να δώσουν ισχυρές σταθερές αναστολής με μικρή διαφοροποίηση ως προς την ικανότητα πρόσδεσής τους με το καταλυτικό κέντρο της GP από τους *N*-γλυκοζίτες οι οποίοι είχαν συντεθεί μέχρι τώρα, όπως οι ενώσεις **17a**, **17c** (**Εικόνα 4.3**). Το καταλυτικό κέντρο της RMGP έχει μεγάλη συγγένεια για το μόριο της γλυκόζης και η διευθέτησή της διατηρείται σε όλους τους *N*-γλυκοζιτικούς αναστολείς οι οποίοι έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα στο εργαστήριό μας. Το ίδιο αναμένεται να ισχύει και για τα *C*-γλυκοζιτικά παράγωγα. Επίσης, αναμένεται μια ανάλογη διαμόρφωση, με αυτή που έχει βρεθεί σε κρυσταλλογραφικές δομές συμπλόκων RMGP:*N*-γλυκοζιτικού αναστολέα, και για το αρωματικό τμήμα. Έχοντας συνθέσει με επιτυχία 5 νέους αναστολείς με δομή *C*-γλυκοζίτη, προχωρήσαμε στη μελέτη της δράσης τους.

Η μελέτη της δράσης των νέων γλυκοζιτών ξεκίνησε με την *in vitro* κινητική μελέτη των νέων ενώσεων, ως πρώτο βήμα για την εξαγωγή σχέσεων δομής-δράσης των νέων μορίων. Η μελέτη ξεκίνησε με τα *C*-γλυκοπυρανοζυλο-ανάλογα των νουκλεοζιτών **158** και **161**, όπως επίσης και με το παράγωγο **3** (**Εικόνα 4.1**).



Εικόνα 4.1: Σύγκριση σταθερών αναστολής IC₅₀ *N*- και *C*-β-D-γλυκοπυρανοζυλο αναλόγων ουριδίνης (**16** και **158**) και κυτοσίνης/ισοκυτοσίνης (**276** και **168**).

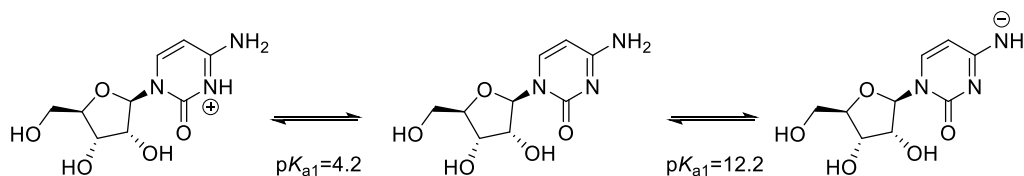
Παρατηρήθηκε σημαντική ελάττωση της ανασταλτικής δράσης των νέων C-γλυκοπυρανοζιτικών παραγώγων σε σχέση με τα N-γλυκοζιτικά ανάλογά τους (**Εικόνα 4.3**). Ενώ για την περίπτωση του αναστολέα **158** η διαφορά είναι μάλλον μικρή (88.5 έναντι 10.9 μM , περίπου 8 φορές ασθενέστερη πρόσδεση), στην περίπτωση του **161** είναι εντυπωσιακή (396 μM έναντι 13.6 μM , 29 φορές ασθενέστερη). Είναι ενδιαφέρον ότι ενώ οι N-γλυκοζίτες **16** και **276** παρουσιάζουν παραπλήσια μεταξύ τους ανασταλτική δράση, στην περίπτωση των αντίστοιχων C-γλυκοζιτικών αναλόγων ο αναστολέας **161** είναι σχεδόν 5 φορές ασθενέστερος του **158**.

Η μικρή διαφοροποίηση μεταξύ των **158** και **16** μπορεί να εξηγηθεί πιθανόν μέσω της αλλαγής στους πιθανούς δεσμούς van der Waals οι οποίοι σχηματίζονται με τα κατάλοιπα των αμινοξέων του καταλυτικού κέντρου που προκύπτουν από την ανταλλαγή του μεθυνίου 6 στον κλασικό αναστολέα **16** με τη νΗ-ομάδα 1, κι αντίστοιχα από το άτομο αζώτου N-1 στον αναστολέα **276**, παρόμοια με το πυριμιδινικό τμήμα για τον αναστολέα Ψ -GLAC που περιγράφεται παρακάτω λεπτομερέστερα. Επιπλέον, η μετακίνηση της ομάδας καρβονυλίου από τη θέση 4 των N-γλυκοζιτικών παραγώγων στη θέση 2 στα νέα παράγωγα, ενδέχεται να μειώνει την ισχύ του, ιδιαίτερα σημαντικού για την ανασταλτική δράση, δεσμού υδρογόνου του ατόμου οξυγόνου της πυριμιδίνης με το κατάλοιπο αμινοξέος Leu136.

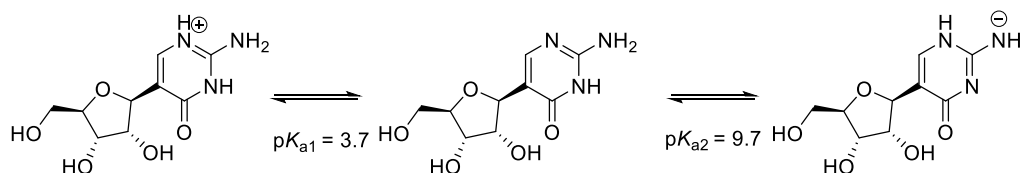
Ωστόσο, η πολύ μεγαλύτερη διαφοροποίηση στις τιμές αναστολής των παραγώγων **161** και **276**, υποδεικνύει ότι λαμβάνει χώρα κάποια επιπλέον αλλαγή στον τρόπο με τον οποίο η ένωση **161** αλληλεπιδρά με το καταλυτικό κέντρο.

Μια πιθανή εξήγηση μπορεί να βρεθεί συγκρίνοντας τις ενώσεις **161** και **276** με τα ριβονουκλεοζιτικά ανάλογα τους (**Εικόνα 4.2**). Στην περίπτωση της κυτιδίνης και ισοκυτιδίνης (**277** και **279**) η περιστροφή του δακτυλίου οδηγεί σε αλλαγή της σταθεράς ιοντισμού pK_{a1} από 4.2 και της pK_{a2} από 12, σε 9.7.¹⁵⁷ Αντίστοιχη διαφοροποίηση αναμένεται και ανάμεσα στους αναστολείς **161** και **276** και είναι πιθανό αυτή η αλλαγή στις σταθερές διάστασης να έχει συνέπειες στη σταθερά αναστολής. Ειδικά η αλλαγή της pK_{a2} είναι ιδιαίτερα σημαντική. Προηγούμενες μελέτες μας έχουν υποδείξει ότι πιθανόν το καταλυτικό κέντρο της GP

συμπεριφέρεται ως ένα ισχυρά αλκαλικό περιβάλλον.⁵² Σαν συνέπεια, η αρκετά χαμηλότερη pK_{a2} θα μπορούσε να οδηγήσει σε αλλοίωση κάποιας σημαντικής οξεοβασικής ισορροπίας, όπως πχ τον σχηματισμό διανιόντος της ένωσης **161** που να οδηγεί σε απωστικές αλληλεπιδράσεις με το καταλυτικό κέντρο, οι οποίες μειώνουν σημαντικά την προσδετική ισχύ της.



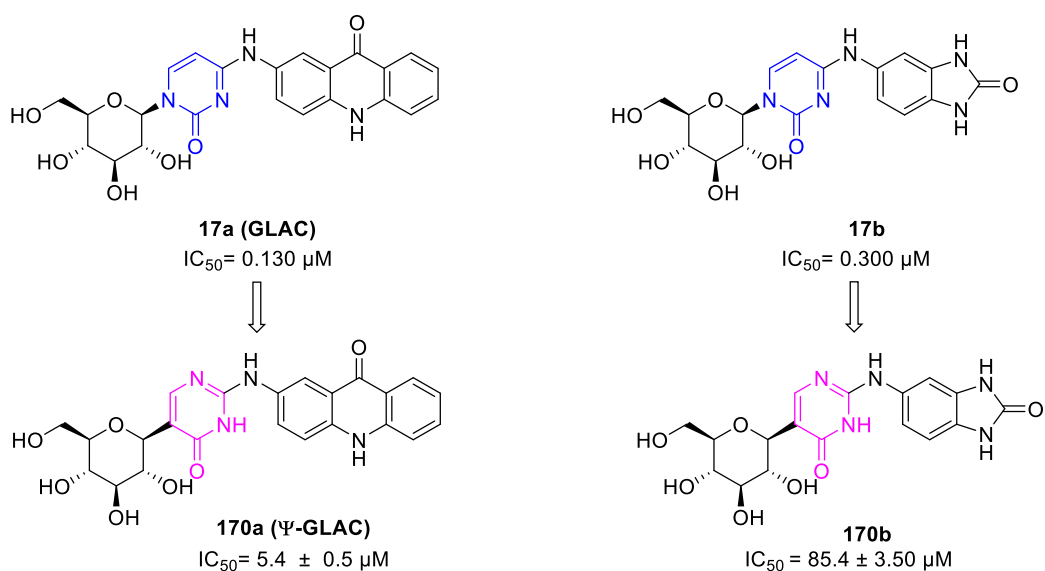
277, Cytidine



279, Isocytidine

Εικόνα 4.2: Σταθερές ιοντισμού της κυτιδίνης και ισοκυτιδίνης.¹⁵⁷

Η υποκατάσταση του πυριμιδινικού δακτυλίου από αρυλαμίνες οδήγησε σε ακόμη πιο σημαντικές διαφορές στην ισχύ της πρόσδεσης στο καταλυτικό κέντρο (**Εικόνα 4.3**).



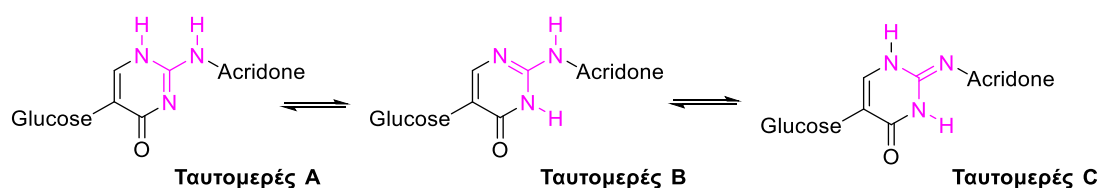
Εικόνα 4.3: Σύγκριση σταθερών αναστολής IC_{50} αρυλαμινοϋποκατεστημένων *N*- (ενώσεις **17a,b**) και *C*- (ενώσεις **170a,b**) β-D-γλυκοπυρανοζυλο- παραγώγων.

Ο αναστολέας **170a** (Ψ-GLAC) παρουσιάζει 40 φορές ασθενέστερη δράση από τον αντίστοιχο *N*-γλυκοζίτη **17a** (GLAC). Έκπληξη προκάλεσαν τα αποτελέσματα για τον αναστολέα **170b**, ο οποίος εμφανίζει ασθενέστερη αναστολή κατά 284 φορές από το *N*-γλυκοζιτικό ανάλογό του (ένωση **17b**). Μέρος της εξήγησης θα μπορούσε να οφείλεται στους παράγοντες οι οποίοι συζητήθηκαν ήδη παραπάνω για την ένωση **161**. Οι σταθερές ιοντισμού των ενώσεων **170a** και **170b** αναμένεται να επιδείξουν παρόμοια μείωση σε σχέση με αυτές οι οποίες έχουν μετρηθεί για τις ενώσεις **17a** ($pK_{a2} = 2.7$, $pK_{a2} = 12.2$)⁵² και **17b** ($pK_{a2} = 3.0$, $pK_{a2} = 11.4$),⁵⁹ με παρόμοια δυσμενή επίπτωση στην προσδετική ισχύ των νέων ενώσεων, αν και πιθανά αυτός δεν είναι ο μοναδικός λόγος για την παρατηρούμενη διαφορά.

Διαμορφωτική Ανάλυση

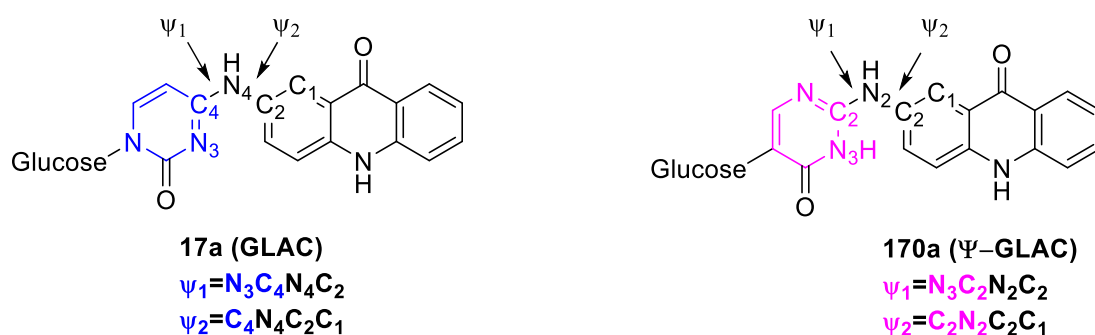
Η σημαντική επιδείνωση της ικανότητας αναστολής των νέων μορίων αποτέλεσε έκπληξη, ενώ έρχεται σε άμεση αντίθεση με τις μελέτες μοριακής πρόσδεσης και QSAR που είχαν προηγηθεί.⁵⁷ Ειδικά στη περίπτωση του αναστολέα **170a**, οι μελέτες μοριακής πρόσδεσης υπέδειξαν ότι, λαμβάνοντας υπόψιν ότι ο αναστολέας μπορεί να υιοθετήσει μία από τρεις πιθανές ταυτομερικές μορφές (**Εικόνα 4.4**), οι προβλεπόμενες τιμές IC₅₀ ήταν 213 nM για το ταυτομερές **A**, 239 nM για το **B** και 262 nM για το **C**, τιμές οι οποίες δεν επιβεβαιώθηκαν από τα κινητικά πειράματα. Ο αναστολέας GLAC, (**17a**) αποτελεί τη ναυαρχίδα του εργαστηρίου μας, καθότι αποτελεί τον ισχυρότερο αναστολέα της GP που έχει συντεθεί από την ομάδα μας μέχρι σήμερα. Πρόκειται για φθορίζουσα ένωση η οποία εμφανίζει επίσης ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα φασματοσκοπική συμπεριφορά στο φάσμα ορατού-υπεριώδους και έχει αποτελέσει αντικείμενο προηγούμενων εργασιών της ομάδας μας,⁵² ενώ έχει πραγματοποιηθεί εκτενής υπολογιστική και διαμορφωτική μελέτη των θεμελιωδών και διεγερμένων καταστάσεων του με σκοπό τη διαλεύκανση των φασματοσκοπικών του χαρακτηριστικών.²⁵⁸ Αποφασίστηκε να επεκταθούν οι θεωρητικές μελέτες στον αναστολέα Ψ-GLAC (**170a**), σε μια προσπάθεια να εξηγηθούν τα δεδομένα των κινητικών μελετών μέσα από την ενεργειακή σύγκριση των ουδέτερων, θεμελιωδών καταστάσεων των δυο αυτών συγγενικών αναστολέων.

Οι μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με τον ερευνητή Alessandro Venturini από το Ινστιτούτο Οργανικής Χημείας και Φωτοχημείας του Εθνικού Συμβουλίου Έρευνας της Ιταλίας. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε μια πλήρης διαμορφωτική ανάλυση του Ψ-GLAC (**170a**), στις τρεις πιθανές ταυτομερικές μορφές του (**Εικόνα 4.4**), καθώς ανάλογα με τη δομή που επικρατεί αναμένεται να επηρεάζεται η διεδρη γωνία ανάμεσα στο τμήμα της πυριμιδίνης και της ακριδόνης, η οποία έχει άμεση επίδραση στην ισχύ πρόσδεσης στο καταλυτικό κέντρο.



Εικόνα 4.4: Πιθανά ταυτομερή του αναστολέα Ψ-GLAC.

Η συγκριτική μελέτη των δύο αναστολέων (**170a**, **17a**) επικεντρώθηκε στις σχετικές ακραίες διαμορφώσεις των δύο χρωμοφώρων του συστήματος (πυριμιδίνη και ακριδόνη) και συγκεκριμένα στις τιμές των γωνιών ψ_1 και ψ_2 (**Εικόνα 4.5**).

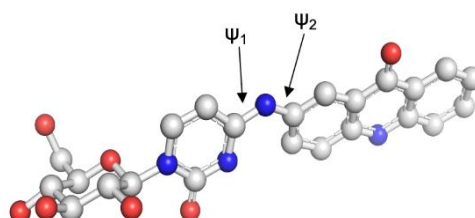


διαμόρφωση **s-cis**: $\psi_1 = 0-90^\circ$
διαμόρφωση **s-trans**: $\psi_2 = 90-180^\circ$

Εικόνα 4.5: Οι κρίσιμες γωνίες μεταξύ των δακτυλίων των αναστολέων, ψ_1 και ψ_2 .

Από πειράματα κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ του συμπλόκου RMGPb:GLAC, έχει βρεθεί ότι κατά την πρόσδεση στο καταλυτικό κέντρο της GP, τα χρωμοφόρα του GLAC διευθετούνται στη διαμόρφωση $\psi_1(\text{s-cis})/\psi_2(\text{s-trans})$ (**Εικόνα 4.6**). Από τη μελέτη της κρυσταλλογραφικής δομής, προκύπτει επίσης ότι τα δύο χρωμοφόρα υιοθετούν πρακτικά ομοεπίπεδη γεωμετρία ($\psi_2 =$

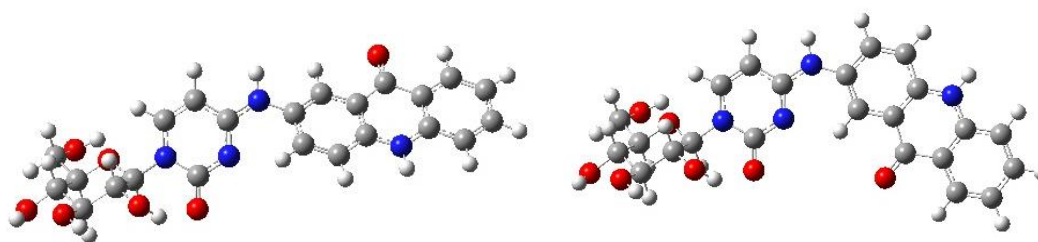
168.1°), μέτρηση η οποία συμφωνεί με την αντίστοιχη γωνία από τις κρυσταλλογραφικές δομές μιας ποικιλίας *N*²-αρυλο-υποκατεστημένων-*N*¹-β-D-γλυκοπυρανοζυλο-κυτοσινών που έχουν μελετηθεί προγενέστερα, κι άρα φαίνεται να είναι ιδανική για την πρόσδεση αναστολέων στο καταλυτικό κέντρο.



$$\psi_1(\text{s-cis}) = -7.7^\circ, \psi_2(\text{s-trans}) = 168.1^\circ$$

Εικόνα 4.6: Διαμόρφωση του αναστολέα GLAC στο καταλυτικό κέντρο της GP

Από τη διαμορφωτική μελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο DFT, προκύπτει ότι σε υδατικό διάλυμα ο αναστολέας GLAC μπορεί να υιοθετήσει μία από τέσσερις διαμορφώσεις ελάχιστης ενέργειας (s-cis/s-trans, s-cis/s-cis, s-trans/s-trans και s-trans/s-cis) (**Εικόνα 4.7**). Η σταθερότερη από αυτές, με πληθυσμό 50.0% υπολογίστηκε ότι είναι η διαμόρφωση $\psi_1(\text{s-cis})/\psi_2(\text{s-trans})$ με $\psi_2 = 148.0^\circ$ παρόμοια με τη διαμόρφωση η οποία παρατηρείται στο καταλυτικό κέντρο της GP. Για την πλήρη προσαρμογή στο καταλυτικό κέντρο ($\psi_1 = -7.7^\circ$, $\psi_2 = 168.1^\circ$) απαιτείται μια μικρή επιπλέον δαπάνη ενέργειας της τάξης του $\Delta E = 0.4 \text{ kcal/mol}$.



$$\psi_1(\text{s-cis}) = 2.0^\circ, \psi_2(\text{s-trans}) = 148.0^\circ$$

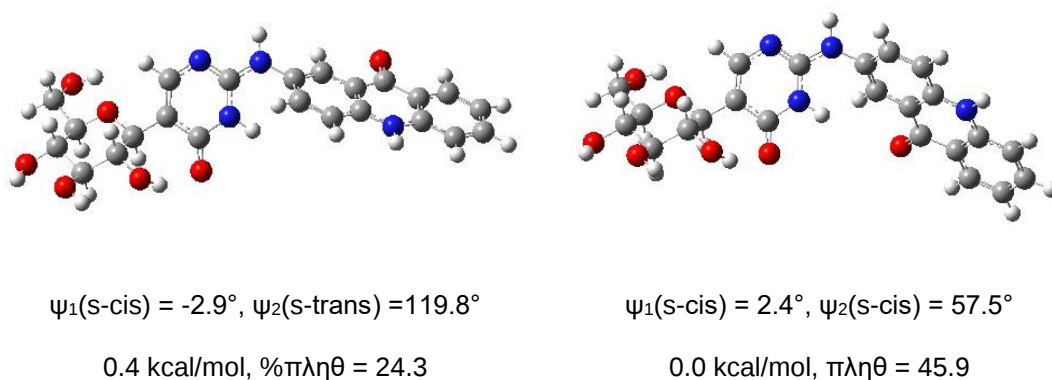
$$0.0 \text{ kcal/mol}, \% \text{πληθ} = 50.0$$

$$\psi_1(\text{s-cis}) = 0.2^\circ, \psi_2(\text{s-cis}) = 2.7^\circ$$

$$0.4 \text{ kcal/mol}, \% \text{πληθ} = 27.4$$

Εικόνα 4.7: Σταθερές διαμορφώσεις αναστολέα GLAC σε υδατικό διάλυμα (DFT)

Για κάθε ένα από τα τρία πιθανά ταυτομερή του αναστολέα Ψ-GLAC υπολογίστηκε ότι υπάρχει αντίστοιχος αριθμός διαμορφώσεων. Από τους υπολογισμούς προέκυψε ότι επικρατεί η ταυτομερική μορφή **B**, γεγονός αναμενόμενο αν ληφθεί υπόψη ότι στη μορφή **B** εντοπίζεται και η εκτενέστερη συζυγία του συστήματος. Τα παραπάνω συμφωνούν και με τα πειραματικά δεδομένα φασματοσκοπίας $^1\text{H-NMR}$. Συγκεκριμένα, επικράτηση του ταυτομερούς **A** θα οδηγούσε σε εμφανή σχάση της κορυφής του πρωτονίου *H*-6 από το αμιδικό πρωτόνιο *N*¹-*H*, όπως παρατηρείται για παράδειγμα στην περίπτωση της Ψ-GU (**16**) (Ενότητα 2.2.7.1), όπου η κορυφή που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο *H*-6 εμφανίζεται στα 7.52 ppm και με σχάση ($J = 5.1 \text{ Hz}$), η οποία συναντάται και στο αμιδικό πρωτόνιο. Αντίθετα, στο βενζυλιωμένο ανάλογο του Ψ-GLAC, το πρωτόνιο *H*-6 εμφανίζεται ως μία απλή κορυφή στα 7.85 ppm, που υποδεικνύει ότι πρωτονιωμένο βρίσκεται το άζωτο στη θέση 3 του δακτυλίου.



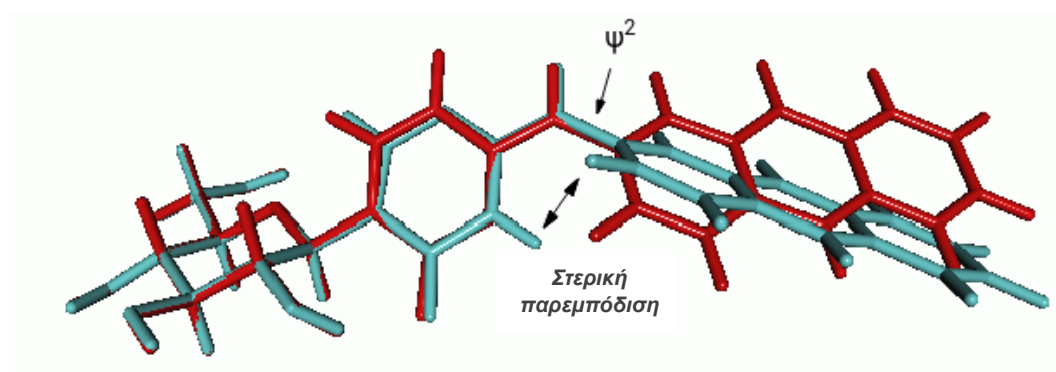
Εικόνα 4.8: Σταθερές διαμορφώσεις του ταυτομερούς **B** του αναστολέα Ψ-GLAC σε υδατικό διάλυμα (DFT).

Σύμφωνα με τους υπολογισμούς, το σταθερότερο διαμορφομερές για την ένωση Ψ-GLAC στην ταυτομερική μορφή **B** είναι το $\psi_1(\text{s-cis})/\psi_2(\text{s-cis})$ με πληθυσμό 45.9%, ακολουθούμενο άμεσα από το s-cis/s-trans (πληθυσμός 24.3 %), με διαφορά ενέργειας 0.4 kcal/mol (**Εικόνα 4.8**). Η μετατροπή του επικρατέστερου διαμορφομερούς s-cis/s-cis στο επιθυμητό, για την πρόσδεση στο καταλυτικό κέντρο, s-cis/s-trans μέσω περιστροφής γύρω από τη γωνία ψ_2 , απαιτεί να ξεπεραστεί ένας ενεργειακός φραγμός μεγέθους 1.9 kcal/mol. Επιπλέον, ακόμη και στην ευνοϊκότερη διαμόρφωση s-cis/s-trans, η κρίσιμη γωνία ψ_2 υπολογίστηκε στις 119.8° , σημαντικά μικρότερη από την αντίστοιχη

γωνία που παίρνει ο GLAC στο καταλυτικό κέντρο (168.1°). Αυτό οφείλεται πιθανότατα στη στεreoχημική παρεμπόδιση μεταξύ των πρωτονίων N^3-H και C^3-H , η οποία εμποδίζει τα δύο χρωμοφόρα να αποκτήσουν την επιθυμητή ομοεπίπεδη γεωμετρία. Συγκρίνοντας τη ΔΕ της ελαχιστοποιημένης δομής s-cis/s-trans στο Ψ-GLAC με τη ΔΕ μιας «κλειδωμένης» διαμόρφωσης με $\psi_1 = -7.7^\circ$ και $\psi_2 = 168.1^\circ$, τις γωνίες δηλαδή οι οποίες υιοθετούνται από τον αναστολέα GLAC κατά την πρόσδεσή του στο καταλυτικό κέντρο, γίνεται εμφανές ότι απαιτείται ένα επιπλέον ποσό ενέργειας ($\Delta E = 3.3$ kcal/mol). Τα παραπάνω αποτελούν μια πιθανή εξήγηση της σημαντικής επιδείνωσης της σταθεράς αναστολής του αναστολέα Ψ-GLAC σε σχέση με τον GLAC.

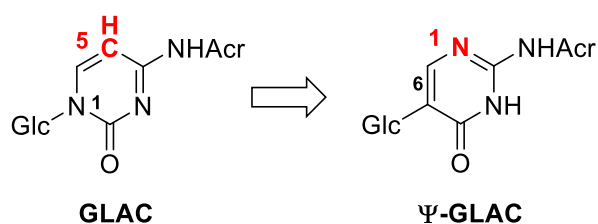
Μια άλλη παράμετρος που πρέπει να ληφθεί υπόψιν, είναι η πιθανή η ταυτομερείωση της μορφής **B** προς το, υψηλότερο ενεργειακά, ταυτομερές **A** (**Εικόνα 4.4**), στο οποίο απουσιάζει το πρωτόνιο του αζώτου N^3 και το οποίο θα μπορούσε να περιστραφεί, παρόμοια με τον αναστολέα GLAC, ώστε να υιοθετήσει μία περισσότερο ομοεπίπεδη διαμόρφωση s-cis/s-trans. Ωστόσο, η διαμόρφωση s-cis/s-trans του ταυτομερούς **A** βρίσκεται ήδη 2.3 kcal/mol (ΔE) υψηλότερα από την περισσότερο σταθερή διαμόρφωση s-cis/s-cis του ταυτομερούς **B**, και απαιτούνται επιπλέον $\Delta E = 0.4$ kcal/mol ώστε οι γωνίες ψ_1/ψ_2 να αποκτήσουν τις "ιδανικές" για την πρόσδεση τιμές. Κατ' επέκταση, σε αυτή τη συζήτηση θεωρούμε σημαντικό αποκλειστικά το ταυτομερές **B**.

Μια επιπλέον διαφοροποίηση θα μπορούσε πιθανά να προκύπτει από την υποκατάσταση του $C^{1'}-N^1$ γλυκοζιτικού δεσμού στον GLAC από τον δεσμό $C^{1'}-C^5$ στον Ψ-GLAC, καθώς η διαμόρφωση ειδικά του τμήματος της γλυκοπυρανόζης στο καταλυτικό κέντρο είναι αυστηρά καθορισμένη, με μικρές αλλαγές να μπορούν ενδεχομένως να οδηγήσουν σε μεγάλη εξασθένιση της πρόσδεσης. Ωστόσο, στις δομές των θεωρητικών μοντέλων των GLAC και Ψ-GLAC στις αντίστοιχες, ευνοϊκότερες διαμορφώσεις GLAC and Ψ-GLAC, ψ_1 (s-cis)/ ψ_2 (s-trans) (**Εικόνα 4.9**) καθίσταται εμφανές ότι τόσο το σακχαρικό, όσο και το πυριμιδινικό τμήμα των δύο ενώσεων πρακτικά ταυτίζεται διαμορφωτικά. Αντίθετα, υπάρχει μεγάλη απόκλιση στη διαμόρφωση του τμήματος της ακριδόνης, όπως αναφέρθηκε παραπάνω.



Εικόνα 4.9: Υπέρθωση των δομών GLAC (κόκκινο) και Ψ-GLAC (κυανό).

Μια ακόμη δομική διαφοροποίηση η οποία παίζει πιθανόν δευτερεύοντα ρόλο στη μείωση των σταθερών αναστολής είναι η περιστροφή του πυριμιδινικού δακτυλίου (**Εικόνα 4.10**). Ειδικά για τον Ψ-GLAC, κύρια αλλαγή δημιουργείται από την «ανταλλαγή» της θέσης της ομάδας C^5H του πυριμιδινικού δακτυλίου με το άζωτο N^1 στα νέα μόρια.



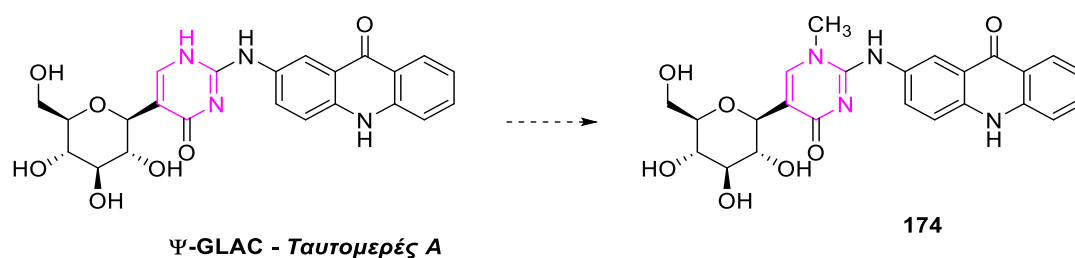
Εικόνα 4.10: Οι δομικές διαφοροποιήσεις του πυριμιδινικού δακτυλίου.

Στον GLAC και τα συγγενή N^1 -γλυκοζιτικά παράγωγα, η ομάδα C^5H συμμετέχει σε έναν αριθμό αλληλεπιδράσεων Van der Waals με τα κατάλοιπα των αμινοξέων του καταλυτικού κέντρου της GP. Ειδικότερα, η ομάδα C^5H παρουσιάζει αλληλεπίδραση μη-διπόλου/μη-διπόλου με το μεθύλιο CG2 του καταλοίπου Thr 378 (3.8 Å), και το μεθυλένιο της His 377 (3.8 Å). Σχηματίζεται επίσης αλληλεπίδραση μη-διπόλου/διπόλου με το άτομο οξυγόνου OD2 του Asp 339 (3.8 Å). Η ανταλλαγή της ομάδας C^5H από το άζωτο N^1 οδηγεί στην αντικατάσταση των αλληλεπιδράσεων μη-διπόλου/μη-διπόλου από διπόλου/μη-διπόλου, που ωστόσο δεν αναμένεται να οδηγήσουν σε σημαντική διαφοροποίηση της ενέργειας πρόσδεσης. Η αλληλεπίδραση μεταξύ του "νέου" N^1 με το καρβοξυλικό οξυγόνο OD2 του Asp 339 αναμένεται να είναι απωστική,

ωστόσο, βάσει προηγούμενων δομών κρυσταλλογραφίας, είναι γνωστό ότι η καρβοξυλομάδα του Asp 339 είναι ευκίνητη και μπορεί να περιστραφεί, μειώνοντας την ισχύ της άπωσης.

Οι παραπάνω παράγοντες οι οποίοι προκύπτουν από τη σύγκριση των GLAC και Ψ-GLAC μπορούν πιθανόν να γενικευτούν και σε άλλες ενώσεις της νέας οικογένειας των C-γλυκοζιτικών παραγώγων. Γενικά, αναμένεται για όλους τους N^2 -αρυλοϋποκατεστημένους αναστολείς, ότι η στερική παρεμπόδιση η οποία προκύπτει από την παρουσία του πρωτονίου N^3H θα επηρεάζει την αντίστοιχη σταθερά αναστολής. Πράγματι, παρατηρήθηκε ότι και η ένωση **170b** (Εικόνα 4.3) επιδεικνύει σημαντικά μειωμένη δράση σε σχέση με την αντίστοιχη **17b**.

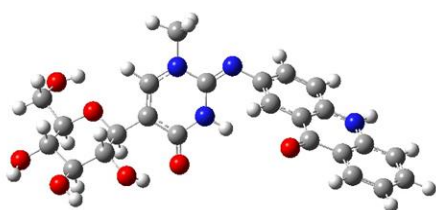
Από τα παραπάνω, εξάγεται το συμπέρασμα ότι στην προσπάθεια να βελτιωθεί η φαρμακοκινητική συμπεριφορά των νέων μορίων, «θυσιάστηκε» η ανασταλτική ισχύς. Η διαμορφωτική ανάλυση, ωστόσο, έδωσε μια σημαντική πληροφορία, η οποία θα μπορούσε να βοηθήσει ώστε να “επαναφέρουμε” την ισχυρή ικανότητα πρόσδεσης. Συγκεκριμένα, οδηγεί στην πρόταση ότι η παρεμπόδιση που δημιουργείται από την παρουσία του πρωτονίου N^3-H μπορεί να αποφευχθεί “κλειδώνοντας” τον δακτύλιο της πυριμιδίνης στην επιθυμητή ταυτομερική μορφή **A** (Εικόνα 4.11) μέσω εκλεκτικής μεθυλίωσης της θέσης 1 του δακτυλίου. Συντέθηκε έτσι το ανάλογο **174** (Ενότητα 2.2.7.2). Κατά την περίοδο της συγγραφής η ένωση **174** βρίσκεται στο στάδιο κινητικής και κρυσταλλογραφικής μελέτης, ώστε να επιβεβαιωθεί η παραπάνω υπόθεση.



Εικόνα 4.11: «Παραγωγοποίηση» στην επιθυμητή ταυτομερική μορφή **A** μέσω τοποεκλεκτικής μεθυλίωσης.

Πραγματοποιήθηκε επίσης θεωρητική διαμορφωτική μελέτη για το μόριο **174** (Εικόνα 4.12). Είναι ενδιαφέρον ότι η προτιμώμενη μορφή της ένωσης σε διάλυμα φαίνεται να ομοιάζει προς το ταυτομερές **A** (Εικόνα 4.4) του μη

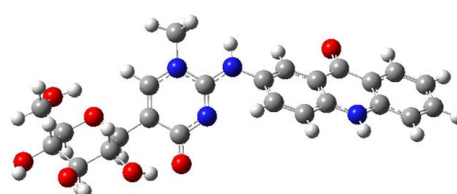
μεθυλιωμένου Ψ-GLAC. Ενθαρρυντικό αποτέλεσμα όμως αποτελούν τα δεδομένα για την επιθυμητή μορφή (Tautomer "A", **Εικόνα 4.12**). Συγκεκριμένα, από τη διαμορφωτική μελέτη για την ταυτομερική μορφή "A" στην επιθυμητή για την πρόσδεση διαμόρφωση s-cis/s-trans καθορίστηκε ότι η σημαντική για την πρόσδεση γωνία ψ_2 μετρά 133.7°. Βρίσκεται, έτσι, πολύ πιο κοντά στην, «ιδανική» για πρόσδεση στο καταλυτικό κέντρο, γωνία 168.1° (**Εικόνα 4.6**), ενώ η τιμή βρίσκεται στις αντίστοιχες τιμές που υπολογίστηκαν για το GLAC (148°, **Εικόνα 4.7**) και το Ψ-GLAC (119.8°, **Εικόνα 4.8**). Αντισταθμίζεται έτσι μερικώς η στεरिकή παρεμπόδιση του N^3-H σε υδατικό διάλυμα, που αναμένεται ότι θα οδηγήσει σε σημαντική βελτίωση της προσδετικής ισχύος της ένωσης **174** έναντι του Ψ-GLAC.



$$\psi_1(\text{s-cis}) = -3.5^\circ, \psi_2(\text{s-cis}) = -63.3^\circ$$

$$0.0 \text{ kcal/mol}, \% \text{πληθ} = 51.8$$

Ταυτομερές "C"



$$\psi_1(\text{s-cis}) = 0.9^\circ, \psi_2(\text{s-trans}) = 133.7^\circ$$

$$1.3 \text{ kcal/mol}, \% \text{πληθ} = 6.4$$

Ταυτομερές "A"

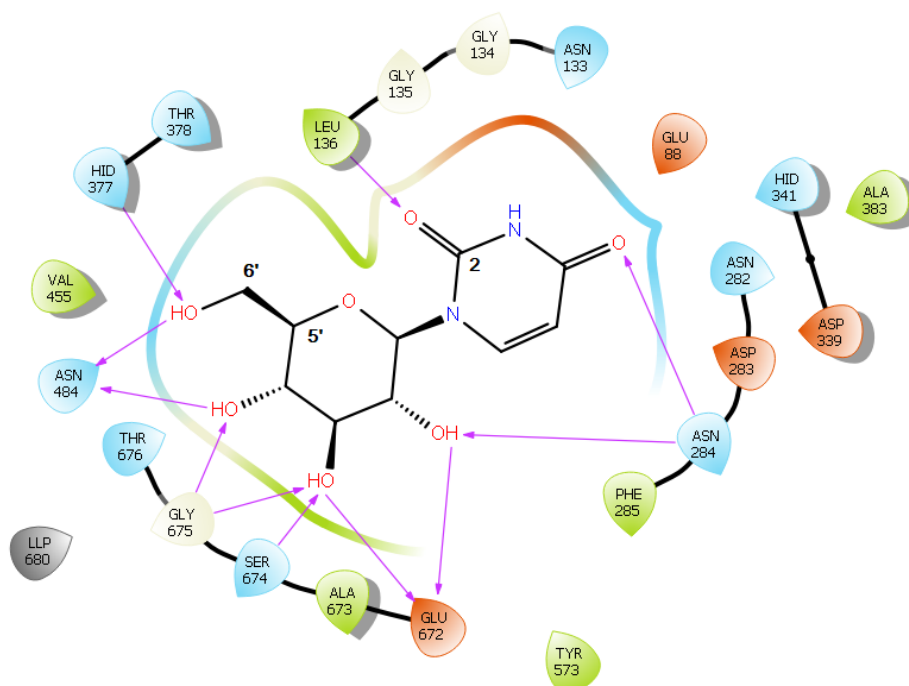
Εικόνα 4.12: Δύο από τις σταθερές διαμορφώσεις του παραγώγου **174** σε υδατικό διάλυμα (DFT).

Η παραπάνω ανάλυση των δομικών διαφορών των νέων αναστολέων βασίζεται σε θεωρητικά κυρίως δεδομένα. Φυσικά, απαιτείται ολοκλήρωση της κρυσταλλογραφικής μελέτης συμπλόκου των νέων ενώσεων με τη RMGP, η οποία καθυστέρησε λόγω της παρούσας πανδημίας COVID-19, ώστε να μπορεί να γίνει μια περισσότερο εμπειριστατωμένη μελέτη των αλληλεπιδράσεων με το καταλυτικό κέντρο. Ωστόσο πιστεύουμε ότι η παραπάνω διαμορφωτική μελέτη παρέχει σημαντικές πληροφορίες οι οποίες εξηγούν τις παρατηρούμενες αλλαγές σε ικανοποιητικό βαθμό.

4.1.2 Καρβοκυκλικά ανάλογα

Η κινητική μελέτη των καρβοκυκλικών παραγώγων **258**, **±272**, **±275a** και **±275ab** (Εικόνα 4.14 και Εικόνα 4.16) αναμενόταν να είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα. Καθώς το αρωματικό τμήμα της *N*⁴-αρυλοπυριμιδίνης των καρβοκυκλικών παραγώγων είναι πανομοιότυπο με αυτό των αντίστοιχων *N*-γλυκοζιτικών ανάλογων (Εικόνα 4.13), η διαφοροποίηση της σταθεράς αναστολής των νέων μορίων οφείλεται κατά κύριο λόγο στις αλλαγές του σακχαρικού τμήματος. Η GP έχει βρεθεί ότι παρουσιάζει ιδιαίτερα υψηλή εξειδίκευση στο καταλυτικό της κέντρο για παράγωγα βασιζόμενα στη β-D-γλυκοπυρανόζη, με πολύ λίγες εξαιρέσεις (με αντιπροσωπευτικό παράδειγμα το DAB (**12**) (Ενότητα 1.3).

Στους D-γλυκοπυρανοζίτες, το υδροξύλιο-6 συμμετέχει σε δύο κρίσιμους δεσμούς υδρογόνου (Εικόνα 4.13), και συγκεκριμένα συνδέεται με το άζωτο ND1 της HIS377 (μήκος δεσμού ~2.7 Å) και με το καρβονύλιο του ASP484 (~2.9 Å) του καταλυτικού κέντρου.



Εικόνα 4.13: Δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται ανάμεσα στη *N*¹-β-D-γλυκοπυρανοζυλο-ουρακίλη και τα κατάλοιπα αμινοξέων του καταλυτικού κέντρου της RMGP.

Στα νέα καρβοκυκλικά μόρια, τη θέση της 6-υδροξυμεθυλενομάδας των γνωστών γλυκοζιτικών παραγώγων παίρνει μια υδροξυομάδα, στη θέση 5 του δακτυλίου στην ένωση **258**, στη θέση 6 για τις ενώσεις **±272**, **±245a** και **b** (**Εικόνα 4.14**). Τόσο το άτομο άνθρακα C-6, όσο και το υδροξύλιο 6 της γλυκόζης συμμετέχουν σε έναν μεγάλο αριθμό αλληλεπιδράσεων van der Waals. Οι αλληλεπιδράσεις διαφορετικών γλυκοζιτικών αναστολέων της GP με τα κατάλοιπα των αμινοξέων του καταλυτικού κέντρου, και ειδικά οι αλληλεπιδράσεις του τμήματος της γλυκοκυρανόζης, έχει μελετηθεί ιδιαίτερα διεξοδικά στη βιβλιογραφία με τη χρήση κρυσταλλογραφικών μοντέλων συμπλόκων των αναστολέων με τη RMGP.^{259,260}

Έχει βρεθεί ότι το υδροξύλιο-6 της γλυκόζης σχηματίζει δεσμούς διπόλου-μη διπόλου με τα άτομα άνθρακα CE1 και CG της His377, τους CB, CG1, CG2 της Val455 και με το άτομο άνθρακα CG του Asp484.

Το άτομο άνθρακα C6 της υδροξυμεθυλενομάδας της γλυκόζης, σχηματίζει δεσμό μη διπόλου/ διπόλου με το άτομο αζώτου ND1 της His377, δεσμό μη διπόλου/ διπόλου με το άτομο οξυγόνου OD1 του Asp484, δεσμό μη διπόλου/ διπόλου με το άτομο οξυγόνου O της Gly135, αλληλεπίδραση μη-διπόλου/ μη διπόλου με τον άνθρακα της Gly135, όπως επίσης και με ένα διατηρητέο μόριο ύδατος (X3) το οποίο είναι σταθερά συμπλεγμένο στο καταλυτικό κέντρο και συμμετέχει στις αλληλεπιδράσεις.

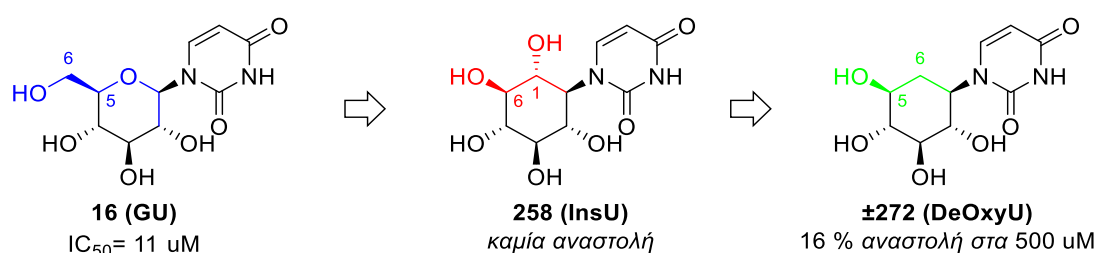
Χρησιμοποιώντας τα παραπάνω κρυσταλλογραφικά δεδομένα N-γλυκοζιτικών αναστολέων προσδεδμένων στο καταλυτικό κέντρο, μετρήθηκαν οι αποστάσεις των καταλοίπων τα οποία συμμετέχουν στις παραπάνω κρίσιμες αλληλεπιδράσεις από την τροποποιημένη υδροξυομάδα των νέων μορίων **258 ±272**, **±245a** και **b**. Βρέθηκε ότι η νέα υδροξυομάδα που αντικαθιστά τη νέα υδροξυμεθυλενομάδα, βρίσκεται εκτός εμβέλειας δεσμού υδρογόνου (3-3.5 Å) με τα γεινιάζοντα κατάλοιπα των αμινοξέων του καταλυτικού κέντρου (π.χ., HID377, ASN484), ενώ στη κρυσταλλογραφική δομή δεν φαίνεται να υπάρχουν άλλοι πλησιέστεροι δέκτες/δότες δεσμού υδρογόνου.

Έτσι, η υποκατάσταση της 6-υδροξυμεθυλενομάδας, από το νέο υδροξύλιο αναμενόταν να οδηγήσει σε σημαντικές διαφοροποιήσεις στην προσδετική ισχύ

των νέων ενώσεων.

Επιπρόσθετα, στις νέες ενώσεις το οξυγόνο-5 του δακτυλίου της γλυκόζης αντικαθίσταται από μια μεθυλενομάδα (θέση 1 για την ένωση **258**, θέση 6 για τις **±272**, **±245a** και **b**). Αν και κρυσταλλογραφικές μελέτες δείχνουν το συγκεκριμένο O-5 να μην συμμετέχει σε κάποιον κρίσιμο δεσμό υδρογόνου, φαίνεται ότι σχηματίζει αλληλεπιδράσεις van der Waals (διπόλου/διπόλου με το άτομο αζώτου *N* της Lys136, διπόλου/διπόλου με το άτομο αζώτου *ND1* και διπόλου/μη διπόλου με το άτομο άνθρακα *CB* της H377), οι οποίες αναμένεται ότι θα αντικατασταθούν από ασθενέστερες αλληλεπιδράσεις μη διπόλου/διπόλου και μη διπόλου/μη διπόλου στις νέες ενώσεις.

Οι διαφοροποιήσεις αυτές πράγματι αποτυπώθηκαν και στην πράξη κατά την κινητική μελέτη των νέων ενώσεων **258** και **±272**. (Εικόνα 4.14)

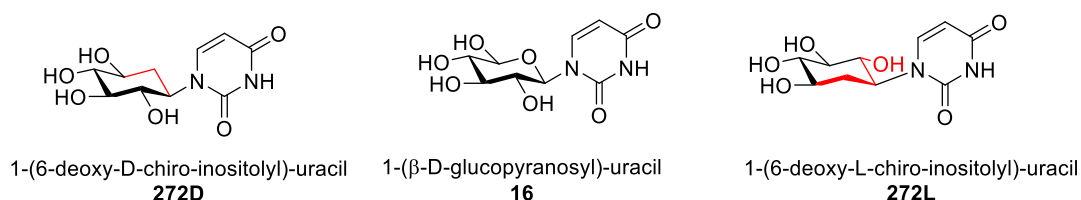


Εικόνα 4.14: Σύγκριση ανασταλτικής ισχύος D-γλυκοπυρανοζυλο- (**16**), *scyllo*-ινοσιτολυλο- (**258**) και 2-δεοξυ-*chiro*-ινοσιτολυλο- (**±272**) παραγώγων της ουρακίλης επί της GP.

Η πλήρης ανικανότητα πρόσδεσης του παραγώγου **258**, πιθανότατα εξηγείται με την παρουσία της νέας υδροξυλομάδας στη θέση 1, κάτω από το επίπεδο που ορίζει ο δακτύλιος της ινοσιτόλης, η οποία ενδέχεται να αναπτύσσει απωστικές αλληλεπιδράσεις με γειτονικά κατάλοιπα αμινοξέων του καταλυτικού κέντρου.

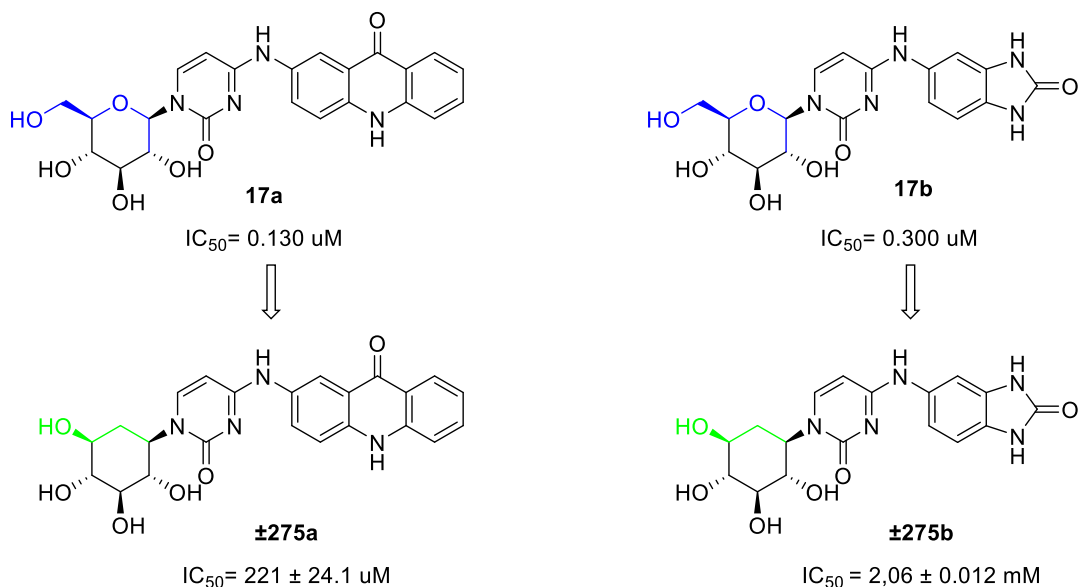
Αν και το παράγωγο ουρακίλης **258** αποτελεί μη χειρόμορφη μεσομορφή, τα παράγωγα ουρακίλης **±272**, και *N*⁴-αρυλοϋποκατεστημένης κυτοσίνης **±275a** και **±275b** αποτελούν ρακεμικά μίγματα και υποβλήθηκαν σε κινητική μελέτη ως έχουν, με την παραδοχή ότι μονάχα το ένα εναντιομερές συνεισφέρει σε τυχόν ανασταλτική δράση (Ενότητα 3.3.3.1). Συγκεκριμένα, αναμένεται ότι, π.χ., από τις δυο εναντιομερείς δομές του **258**, μόνο στη D-*chiro*-ινοσιτολυλο-ουρακίλη **272D** (Εικόνα 4.15) το σάκχαρο λαμβάνει μια ικανοποιητική

διαμόρφωση η οποία ευνοεί τη σύνδεση στο καταλυτικό κέντρο, ενώ στην εναντιομερή L-*chiro*-ινোসιτολυλο-ουρακίλη **272L**, η ίδια διαμόρφωση περιέχει τη 2-υδροξυ-ομάδα στη θέση του ενδοκυκλικού οξυγόνου της D-γλυκοπυρανόζης, συνεισφέροντας πιθανόν σε δυσμενείς αλληλεπιδράσεις όπως συμβαίνει για την ένωση **258** (Εικόνα 4.14), και επιπρόσθετα απουσιάζει το υδροξύλιο στη θέση-2 της D-γλυκοπυρανόζης.



Εικόνα 4.15: Διαμορφώσεις των δύο εναντιομερών της **272** οι οποίες αναμένονται στο καταλυτικό κέντρο της RMGPb

Παρόμοια εξασθένιση της ικανότητας πρόσδεσης παρατηρήθηκε και στα παράγωγα **±275a** (περίπου 1700 φορές) και **±275b** (περίπου 6000 φορές) (Εικόνα 4.16).

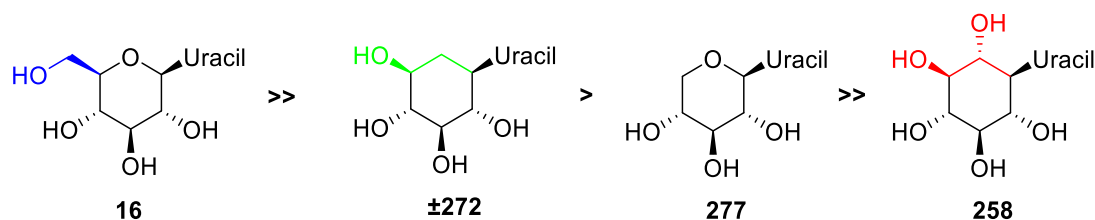


Εικόνα 4.16: Σύγκριση ανασταλτικής ισχύος *N*⁴-αρυλοϋποκατεστημένων D-γλυκοπυρανόζυλο- (**17a**, **17b**) και 2-δεοξυ-*scyllo*-ινোসιτολυλοπαραγώγων (**±275a**, **±275b**) της ουρακίλης επί της GP.

Η αύξηση των τιμών IC_{50} για αυτή την οικογένεια ενώσεων ήταν αναμενόμενη. Καθώς το αρωματικό τμήμα των δυο χρωμοφόρων, πυριμιδίνης και αρυλαμίνης

παρουσιάζουν πανομοιότυπη διευθέτηση με τα αντίστοιχα *N*-γλυκοζιτικά ανάλογά τους, καθίσταται εμφανές ότι η συμπεριφορά των νέων μορίων οφείλεται κατά κύριο λόγο στις αλλαγές του σακχαρικού τμήματος.

Η πλήρης ανάλυση των αλληλεπιδράσεων μπορεί να γίνει με πληρότητα μόνο μετά την ολοκλήρωση της κρυσταλλογραφικής μελέτης συμπλόκου των νέων ενώσεων με το ένζυμο, καθότι υπάρχει πάντα το ενδεχόμενο τα νέα μόρια να παρουσιάζουν διαφορετική από την αναμενόμενη διαμόρφωση σε πραγματικές συνθήκες.



Εικόνα 4.17: Δομική σύγκριση παραγώγων που έχουν παρασκευαστεί σε σειρά μειούμενης προσδετικής ικανότητας.

Χρησιμοποιώντας για σύγκριση παράγωγα ουρακίλης, από προηγούμενη εργασία,²⁶¹ είχε ήδη φανεί ότι υποκατάσταση της D-γλυκοπυρανόζης του μορίου **16** από D-ξυλοπυρανόζη (**277**, **Εικόνα 4.17**), η οποία δεν περιέχει την κρίσιμη 6-υδροξυμεθυλενομάδα, οδηγεί σε σημαντική επιδείνωση της ικανότητας πρόσδεσης των μορίων σε σχέση με τον D-γλυκοπυρανοζίτη **16**. Η προσθήκη της υδροξυλομάδας στη νέα ένωση **±272** εμφανίστηκε να βελτιώνει την προσδετική ικανότητα αυτών των παραγώγων.

4.2 Βιολογική μελέτη

Όπως έχει αναφερθεί στο Κεφάλαιο 1, αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου επηρεάζουν τη βιωσιμότητα καρκινικών κυττάρων, αποτελώντας μια υποσχόμενη κατηγορία νέων θεραπειών. Για τον λόγο αυτό και στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, αποφασίστηκε να εξεταστούν για πρώτη φορά αναστολείς του καταλυτικού κέντρου της GP που έχουν παρασκευαστεί από το εργαστήριό μας ως προς την πιθανή αντικαρκινική τους δράση.

Ιδανικά, αναμενόταν οι ενώσεις οι οποίες θα δοκιμάζονταν να επιδείξουν κυτταροστατική δράση, να περιορίζεται δηλαδή ο κυτταρικός

πολλαπλασιασμός, και όχι κυτταροτοξική δράση, καθότι η κυτταροτοξικότητα αποτελεί φαινόμενο περισσότερο γενικό και δύσκολα συσχετίζεται με συγκεκριμένο μηχανισμό δράσης. Πρέπει να σημειωθεί ότι η ύπαρξη του β-D-γλυκοπυρανοζυλο υποκαταστάτη στους αναστολείς καθιστά πιθανή την πρόσδεση αυτού του τμήματος των ενώσεων σε διαφορετικές δομές του κυττάρου που συμμετέχουν στον μεταβολισμό της γλυκόζης, όπως για παράδειγμα σε μεμβρανικούς μεταφορείς γλυκόζης (GLUTs), συνεισφέροντας σε πιθανή κυτταροστατική δράση.²⁶² Ένας δείκτης ο οποίος αναμενόταν να φανεί χρήσιμος για να συσχετιστεί πιθανή κυτταροστατική δράση με αναστολή της GP στις κυτταρικές σειρές, θα ήταν η κυτταροστατική δράση να συνοδεύεται από συσσώρευση γλυκογόνου στο κυτταρικό περιβάλλον.

4.2.1 Επιλογή κατάλληλων κυτταρικών σειρών

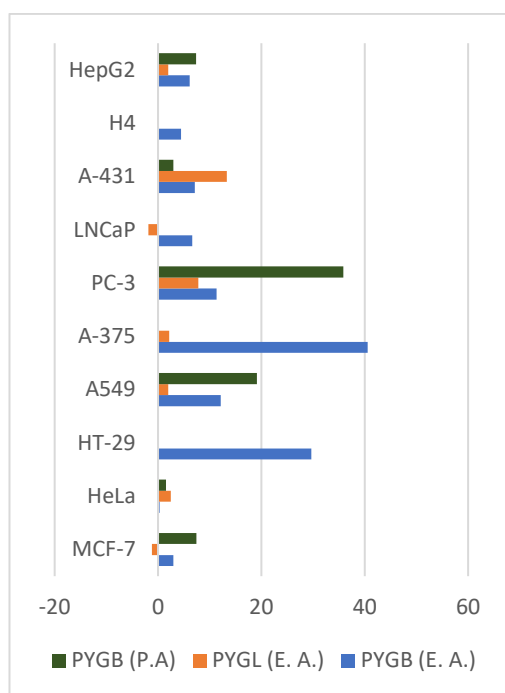
Με βάση τη βιβλιογραφία, εξετάστηκε ένας αριθμός καρκινικών κυτταρικών σειρών ως προς την έκφραση των τριών ισομορφών της GP, με στόχο τη σύγκριση με τις διαθέσιμες για πειράματα κυτταρικές σειρές. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει κυρίως η έκφρασή της εγκεφαλικής ισομορφής της GP, επειδή όπως έχει αναφερθεί (**Ενότητα 1.2.2**) η μη-φυσιολογική έκφραση της συσχετίζεται ισχυρά με την ανάπτυξη νεοπλασιών, όπως επίσης και η ηπατική ισομορφή που εκφράζεται από ορισμένους καρκινικούς ιστούς σε συνθήκες στρες.

Για τις σειρές όπου δεν υπάρχουν πληροφορίες στη βιβλιογραφία, αξιοποιήθηκαν δεδομένα που συλλέχθηκαν με τη βοήθεια μεθόδων βιοπληροφορικής, οι οποίες γνωρίζουν ιδιαίτερη άνθιση τα τελευταία χρόνια.²⁶³ Υπάρχουν διαδικτυακές βάσεις με έναν πραγματικά τεράστιο αριθμό δεδομένων γονιδιακής έκφρασης σε πληθώρα κυτταρικών σειρών. Παραδείγματα αποτελούν η βάση Expression Atlas του Ευρωπαϊκού Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας (EMBL),²⁶⁴ όπως επίσης και η βάση Human Protein Atlas.²⁶⁵ Οι βάσεις αυτές διαθέτουν ποσοτικές πληροφορίες για την έκφραση των mRNA που αφορούν στις επιθυμητές πρωτεΐνες, που στην περίπτωση της GP, μεταφράζεται σε ποσότητα τελικά μεταφραζόμενης πρωτεΐνης. Τα δεδομένα του Human Protein Atlas είναι κανονικοποιημένα ως

5. 11. 1951 11. 1951, 1951,

1. *Journal of the American Medical Association*, 2000; 284: 2689-2695.

Figure 6



Εικόνα 4.19: Έκφραση ηπατικής (PYGL) και εγκεφαλικής (PYGB) GP όπως προκύπτει από κανονικοποίηση δεδομένων του EMBL Expression Atlas, και ποιοτική σύγκριση με τα δεδομένα του Protein Atlas.

Σε κάθε περίπτωση επιλέχθηκαν κυρίως καρκινικές κυτταρικές σειρές οι οποίες ενώ εκφράζουν GP, προέρχονται από ιστούς που είτε δεν την εκφράζουν καθόλου ή την εκφράζουν ελάχιστα κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Άλλωστε, η συγκεκριμένη διαφοροποίηση της λειτουργίας φυσιολογικών κυττάρων σε σχέση με καρκινικά κύτταρα του ίδιου ιστού είναι αυτή η οποία καθιστά τους αναστολείς της GP δυνάμει εκλεκτικά αντικαρκινικά φάρμακα με χαμηλή τοξικότητα για τους υγιείς ιστούς.

4.2.2 Μελέτη κυτταροστατικής δράσης

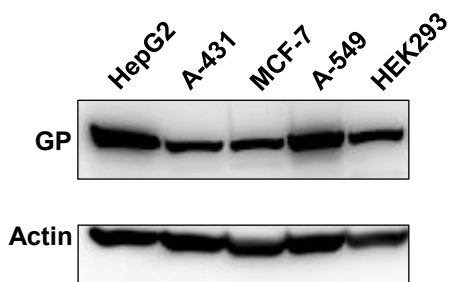
Για τα πειράματα κυτταροτοξικής δράσης χρησιμοποιήθηκε η κλασική μέθοδος χρώσης των κυττάρων με MTT που αποτελεί μακράν την πλέον διαδεδομένη μέθοδο προσδιορισμού βιωσιμότητας. Σύμφωνα με τη μέθοδο, τα κύτταρα επωάζονται για ορισμένο χρονικό διάστημα με τα προς μελέτη μόρια. Μετά το πέρας της περιόδου επώασης προστίθεται στα κύτταρα η φαιά χρωστική βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζόλιο, η οποία απορροφάται από τα ζωντανά κύτταρα και μεταβολίζεται προς το αντίστοιχο φορμαζάνιο. Απόρριψη του θρεπτικού υλικού, λύση των κυττάρων και διαλυτοποίηση των κρυστάλλων του φορμαζανίου οδηγεί σε ιώδη διαλύματα, με την ένταση της χρώσης να είναι σε άμεση αναλογία με τον πληθυσμό των ζωντανών κυττάρων, και μπορεί να ποσοτικοποιηθεί φωτομετρικά.

Τα πρώτα πειράματα πραγματοποιήθηκαν από τον υποψήφιο διδάκτορα στο Τμήμα Βιολογίας, σε συνεργασία με την Αν. Καθηγήτρια κα Παναγιώτα Παπαζαφείρη και με τη βοήθεια της μεταπτυχιακής φοιτήτριας κας Αθηνάς

Σαμαρά, του τομέα Φυσιολογίας Ζώων, με μία σειρά από αναστολείς με δομή N^2 -αρυλο-υποκατεστημένης N^1 -β-D-γλυκοπυρανοζυλοκυτοσίνης οι οποίοι είχαν παρασκευαστεί παλαιότερα στο εργαστήριό μας, συμπεριλαμβανομένου του GLAC (**17a**) που αναφέρεται παραπάνω, του ισχυρότερου αναστολέα της GP ο οποίος έχει παρασκευαστεί από το εργαστήριό μας και του Benz (**17c**). Στις πρώτες δοκιμές χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές A-549 (καρκίνος του πνεύμονα), A-431 (δερματικός καρκίνος) και MCF-7 (καρκίνος του μαστού). Στις κλασικές συνθήκες οι οποίες δοκιμάστηκαν αρχικά (πλήρες θρεπτικό υλικό κι επώαση των κυττάρων με τους αναστολείς για 48 ώρες) δεν έγινε εμφανής κάποια κυτταροστατική δράση.

Στη συνέχεια δοκιμάστηκε στέρση γλυκόζης στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων, υποθέτοντας ότι η ενεργειακή ένδεια θα καθιστούσε περισσότερο εμφανή τα αποτελέσματα αναστολής της GP, μοναδική οδό τροφοδότησης ενέργειας. Δοκιμάστηκε επίσης η προσομοίωση υποξίας με χρήση χλωριούχου κοβαλτίου σε κύτταρα MCF-7, επειδή, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, έχει παρατηρηθεί ότι σε συνθήκες υποξίας είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην αναστολή δράσης της GP.³⁶ Και σε αυτά τα πειράματα δεν φάνηκε σημαντική κυτταροστατική δράση. Μονάχα μετά από επώαση για 72 ώρες φάνηκε κάποια χαμηλή δράση ($IC_{50} = 230 \mu M$ σε κύτταρα A-431, $>400 \mu M$ στις άλλες δύο σειρές), ωστόσο τα αποτελέσματα δεν ήταν επαναλήψιμα. Η μεγάλη διάρκεια επώασης άλλωστε οδηγεί σε υπερπληθυσμό των κυττάρων ο οποίος εκτός του ότι δυσκολεύει τη φωτομετρική μέτρηση η οποία απαιτείται από τη μέθοδο, συχνά επιδρά απρόβλεπτα στη συμπεριφορά και βιωσιμότητα των κυττάρων. Σε κάθε περίπτωση είναι σαφές ότι οι αναστολείς με δομή N^2 -αρυλο-υποκατεστημένης N^1 -β-D-γλυκοπυρανοζυλοκυτοσίνης δεν εμφανίζουν σημαντική κυτταροστατική δράση. Μία πιθανή εξήγηση για την απουσία δράσης μπορεί να βρίσκεται στη χημική αστάθεια του *N*-γλυκοζιτικού δεσμού, η οποία θα μπορούσε να οδηγήσει σε ενζυματική υδρόλυση των μορίων πριν ή μετά την εισαγωγή τους στο κυτταρόπλασμα. Η επίλυση ακριβώς αυτής της αστάθειας αποτέλεσε άλλωστε και το αντικείμενο της παρούσας διατριβής.

Μετά την επιτυχημένη σύνθεση και κινητική μελέτη των νέων C -β-D-γλυκοπυρανοζυλο-αναστολέων **170a** (Ψ-GLAC) και **170b** (Ψ-BENZ) (**Εικόνα**



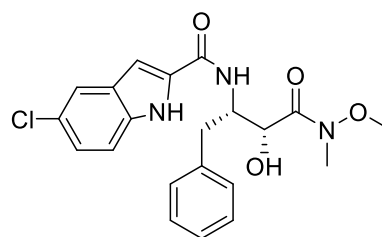
Εικόνα 4.20: Αποτελέσματα Western Blot για την έκφραση GP στις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν

(ηπατικό καρκίνωμα), ενώ ως πρότυπο μιας σειράς φυσιολογικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν αθανатоποιημένα κύτταρα νεφρού HEK-293. Όλες οι σειρές εξετάστηκαν με τη μέθοδο Western Blot και βρέθηκαν να εκφράζουν την εγκεφαλική ισομορφή της GP, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα των πειραμάτων βιοπληροφορικής (**Εικόνα 4.20**).

Πέρα από τους αναστολείς **170a**, **170a**, **±275a** και **±275a**, πραγματοποιήθηκαν πειράματα χρησιμοποιώντας ως θετικό μάρτυρα τον αναστολέα **CP-316819** (**276**, **Εικόνα 4.20**), εμπορικά διαθέσιμο, αλλοστερικό αναστολέα της GP, με σταθερά αναστολής $K_i = 40$ nM (**Εικόνα 4.21**). Παρόμοιοι δομικά αναστολείς έχουν δείξει κυτταροστατική δράση σε καρκινικές σειρές που εκφράζουν GP στο παρελθόν.^{34,35} Η ένωση αναφοράς (αναστολέας CP-316819) επέδειξε την αναμενόμενη μείωση στη βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων (**Πίνακας 6**).

Πραγματοποιήθηκαν επίσης πειράματα με χρήση της χρωστικής Trypan Blue, η οποία βάφει επιλεκτικά νεκρά κύτταρα σε κύτταρα A431 και HepG2. Παρατηρήθηκε απουσία νεκρών κυττάρων, που επιβεβαιώνει ότι η μείωση των βιώσιμων κυττάρων οφείλεται σε κυτταροστατική, παρά σε μη ειδική κυτταροτοξική δράση. Τέλος, μέτρηση της συγκέντρωσης γλυκογόνου με τη μέθοδο της

4.3), όπως επίσης και τον καρβοκυκλικών αναλόγων τους **±275a** (CARB-GLAC) και **±275a** (CARB-BENZ) (**Εικόνα 4.16**), ξεκίνησε μια νέα σειρά πειραμάτων βιωσιμότητας, από την υπ. διδάκτορα Μαρία Πάσχου στο εργαστήριο της κας Παπαζαφείρη. Πέρα από τις κυτταρικές σειρές της πρώτης σειράς πειραμάτων (A-549, A-431 και MCF-7), τα πειράματα επεκτάθηκαν στις κυτταρικές σειρές HepG2



276, CP-316819

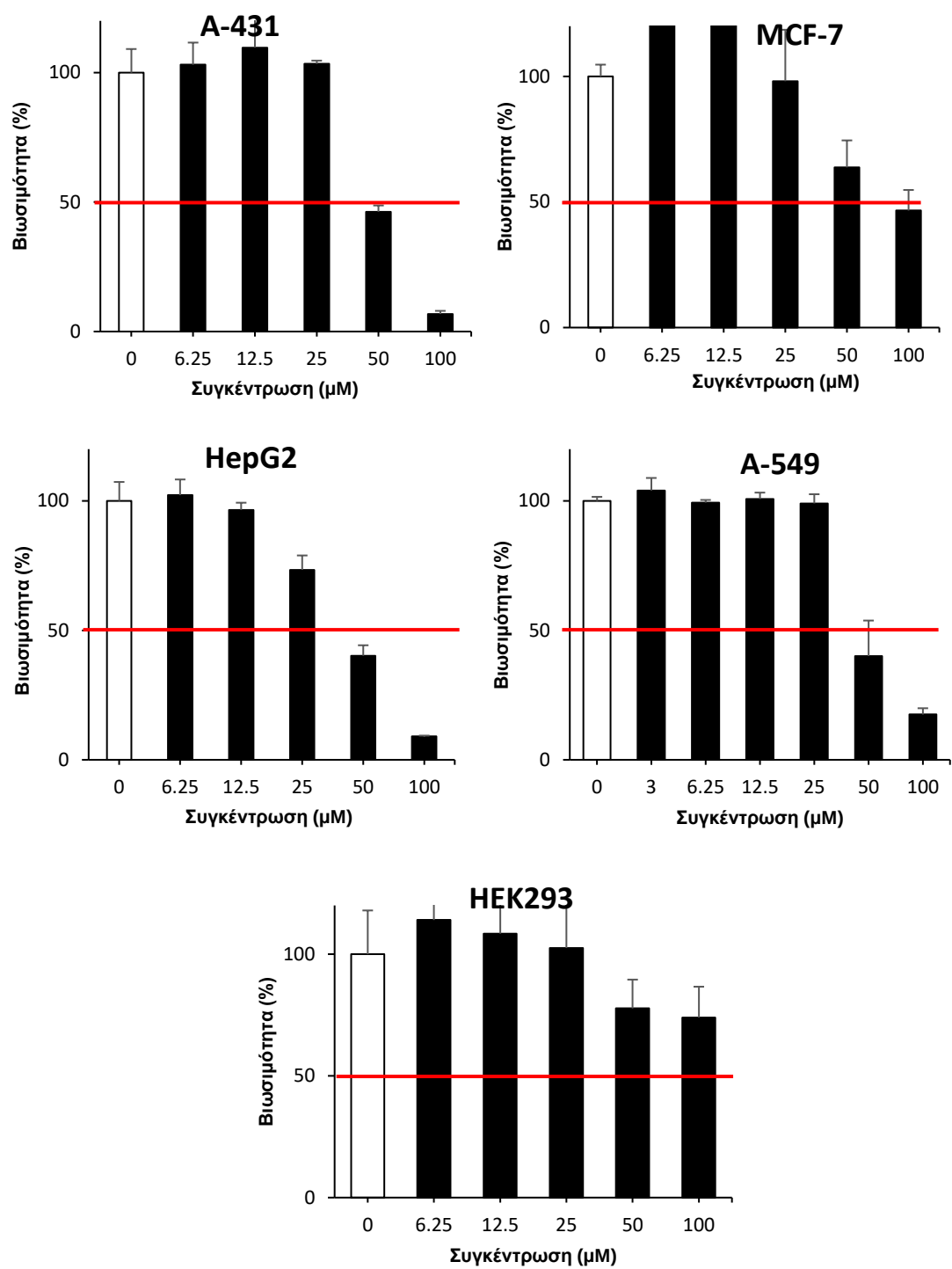
Εικόνα 4.21: Εμπορικός αλλοστερικός αναστολέας τη GP.

φαινόλης (**Πίνακας 7**),²⁶⁷ επιβεβαίωσε ότι η κυτταροστατική δράση συνοδεύεται από συσσώρευση γλυκογόνου.

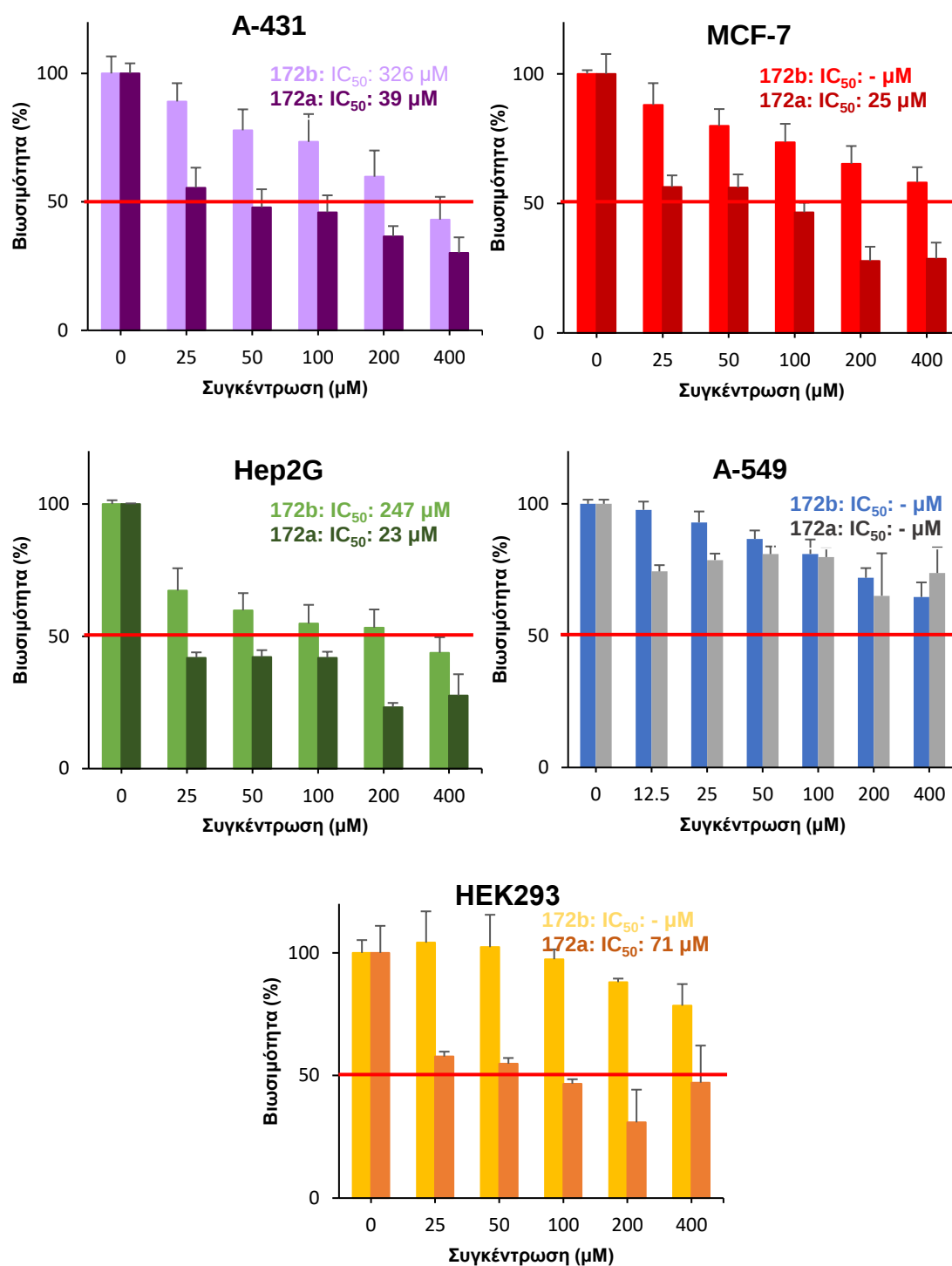
Τα αποτελέσματα για τους νέους αναστολείς, και ειδικά για τον αναστολέα Ψ-GLAC (**170a**) ήταν εξαιρετικά ενθαρρυντικά (**Εικόνα 4.22**). Πειράματα με τις κυτταρικές σειρές A-431 και HepG2 και χρησιμοποιώντας χρώση με Trypan Blue, υποδεικνύουν ότι οι νέοι όλοι οι αναστολείς έδειξαν κυτταροστατική, παρά κυτταροτοξική δράση. Ειδικά ο **170a** επέδειξε δράση σε όλες τις κυτταρικές σειρές που εξετάστηκαν, με εμφανώς ηπιότερη κυτταροστατική δράση στα κύτταρα ελέγχου HEK-293. Μοναδική εξαίρεση αποτέλεσαν τα κύτταρα A-459, στα οποία η ένωση **170a** επέδειξε μηδενική δράση.

Πίνακας 6: Συνοπτικά αποτελέσματα προσδιορισμού IC₅₀ κυτταροστατικής δράσης των ενώσεων **170a** και **170b** και του εμπορικού αναστολέα CP-316819.

α/α	Κυτταρική σειρά	Ψ-GLAC (170a)	Ψ-BENZ (170b)	Carba-GLAC (275a)	Carba-Benz (275b)	CP-316819 (276)
1	A431	39 μM	326 μM	19 μM	>400 μM	47 μM
2	MCF7	25 μM	>400 μM	-	-	89 μM
3	HepG2	23 μM	247 μM	>400 μM	>400 μM	43 μM
4	A549	>400 μM	>400 μM	-	-	45 μM
5	HEK	71 μM	>400 μM	-	-	>100 μM



Εικόνα 4.22: Αποτελέσματα μελέτης βιωσιμότητας δράσης του εμπορικού αναστολέα **276**.



Εικόνα 4.23: Αποτελέσματα μελέτης βιωσιμότητας δράσης των αναστολέων **170a** και **170b**.

Είναι ενδιαφέρον ότι σύγκριση της δράσης των Ψ-GLAC (**170a**) και Ψ-BENZ (**170b**) στις κυτταρικές σειρές A431 (**α/α 1, Πίνακας 6**) και HEPG2 (**α/α 3, Πίνακας 6**) δείχνει ότι οι τιμές IC₅₀ εμφανίζουν διαφορά μίας τάξης μεγέθους. Παρόμοια διαφορά μίας τάξης μεγέθους οι δύο ενώσεις εμφανίζουν και στην αναστολή της δράσης της GP (**Εικόνα 4.3**), όπως προκύπτει από τα in vitro κινητικά πειράματα, γεγονός που θα μπορούσε να θεωρηθεί ένδειξη της εμπλοκής της GP στο μηχανισμό κυτταροστατικής δράσης. Ενδιαφέρουσα ήταν επίσης η κυτταροστατική δράση επί των κυττάρων HEK-293 του αναστολέα Ψ-GLAC (**170a**) (**α/α 5, Πίνακας 6**), που δεν συναντάται στον εμπορικό αναστολέα, είναι ωστόσο ασθενέστερη από ότι στις καρκινικές σειρές.

Ενδιαφέρουσα συμπεριφορά έδειξαν και τα καρβοκυκλικά παράγωγα **±275a** και **±275b**. Ειδικά η ένωση **±275a**, ο ισχυρότερος από τους δύο αναστολείς, έδειξε κυτταροστατική δράση με IC₅₀ = 24 μM στα κύτταρα A-431 (**α/α 1, Πίνακας 6**). Η τιμή αυτή είναι κατά πολύ χαμηλότερη από την αντίστοιχη IC₅₀ επί της RMGP (221 μM).

Ως πρώτη προσπάθεια διαλεύκανσης του μηχανισμού δράσης των μορίων, πραγματοποιήθηκε και με το σύνολο των αναστολέων μελέτη συσώρευσης γλυκογόνου σε κυτταρικές σειρές A431 και HepG2 (**Πίνακας 7**). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με συγκεντρώσεις αναστολέων τις IC₅₀ που εξήχθησαν από τα πειράματα βιωσιμότητας, ώστε οι τιμές να είναι συγκρίσιμες.

Για τους ισχυρότερους αναστολείς 170a, 170b, **±275a** (**α/α 1, 2, 3, Πίνακας 7**) πράγματι παρατηρήθηκε συσώρευση γλυκογόνου σε σχέση με το δείγμα κυττάρων χωρίς αναστολέα (**α/α 5, Πίνακας 7**). Παρατηρείται ωστόσο ότι για συγκρίσιμες συγκεντρώσεις, η συσώρευση είναι μικρότερη από τον εμπορικό αναστολέα **276** (**α/α 4, Πίνακας 7**). Η διαφορά αυτή θα μπορούσε να οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι η δράση των αναστολέων εκδηλώνεται μέσω περισσότερων του ενός μηχανισμών, όπως θα μπορούσε να είναι για παράδειγμα η πρόσδεση στους μεμβρανικούς μεταφορείς γλυκόζης (GLUTs). Σχεδιάζονται νέα πειράματα κυτταρικής πρόσδεσης με έναν αριθμό πιθανών βιολογικών στόχων, που θα μπορούσαν να δώσουν πληροφορίες για άλλους πιθανούς μηχανισμούς δράσης των νέων αναστολέων.

Το βασικό, ωστόσο, συμπέρασμα το οποίο θα μπορούσε να προκύψει τόσο από τα κυτταρικά πειράματα των C-γλυκοπυρανοζυλο-αναστολέων Ψ-GLAC (**172a**) και Ψ-BENZ (**172b**), όσο και των CARB-GLAC (**275a**) και CARB-BENZ (**275b**), είναι η επιτυχημένη αύξηση της βιολογικής σταθερότητας σε σχέση με τα κλασικά N-β-D-γλυκοπυρανοζιτικά παράγωγα. Φαίνεται, έτσι, να έχει κατ' αρχήν επιτευχθεί ο βασικός στόχος της παρούσας διατριβής.

Πίνακας 7: Μέτρηση γλυκογόνου (mg γλυκόζης/10⁶ κύτταρα)

A/A	Όνομα	HepG2	A431
1	Ψ-GLAC 170a	6.30±0.27	4.52±0.22
2	Ψ-Benz 170b	6.86±0.34	3.76±0.17
3	Carb-GLAC 275a	-	4.83±0.24
4	CP-316819 276	8.29±0.51	9.05±0.42
5	Τυφλό	5.71±0.31	2.85±0.14

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Συμπεράσματα και μελλοντικές κατευθύνσεις.

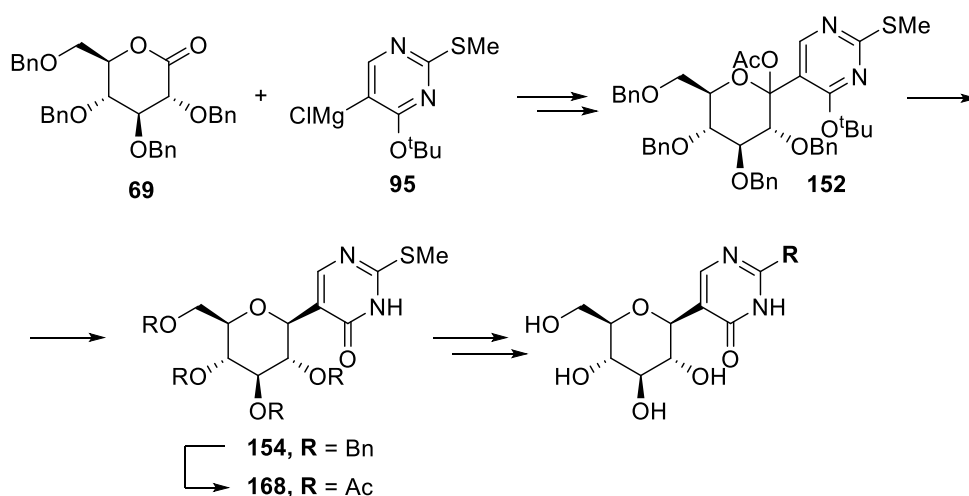
Στόχος της παρούσας διατριβής, ήταν η σύνθεση νέων, μεταβολικά σταθερών αναστολέων της GP. Χρησιμοποιώντας ως ενώσεις-οδηγούς ισχυρούς αναστολείς με δομή N^4 -αρυλο-υποκατεστημένων β-D-γλυκοπυρανοζυλοκυτοσινών που έχουν παρασκευαστεί στο εργαστήριό μας, αναπτύχθηκαν συνθετικές μεθοδολογίες για δύο νέες οικογένειες πιθανών αναστολέων, στοχεύοντας στη διατήρηση της ανασταλτικής ισχύος με παράλληλη βελτίωση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων μέσω χημικής τροποποίησης του γλυκοζιτικού δεσμού των παραπάνω ενώσεων.

Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν α) C-β-D-γλυκοπυρανοζυλο-ανάλογα των προηγούμενων μορίων, που συντέθηκαν μέσω οργανομεταλλικής σύζευξης κατάλληλα προστατευμένου γλυκοζιτικού και πυριμιδινικού τμήματος, αναγωγή του ενδιαμέσου μέσω σιλανίου-οξέος Lewis και υποκατάσταση από αρυλαμίνες όπως και β) καρβοκυκλικά ανάλογα βασιζόμενα στη σύζευξη κατάλληλα τροποποιημένης ινositόλης και πυριμιδίνης, ακολουθούμενη από περαιτέρω παραγωγή. Οι νέες ενώσεις υποβλήθηκαν σε κινητικές μελέτες και βρέθηκαν να αναστέλλουν τη δράση της GP. Βάσει σύγκρισης με τις προηγούμενες ενώσεις και με τη βοήθεια θεωρητικής διαμορφωτικής ανάλυσης, πραγματοποιήθηκε μια πρώτη ανάλυση της σχέσης δομής-δράσης των νέων μορίων. Οι ισχυρότεροι από τους νέους αναστολείς χρησιμοποιήθηκαν επίσης σε μελέτες κυτταροτοξικότητας σε καρκινικά κύτταρα, όπου παρατηρήθηκε για πρώτη φορά κυτταροστατική δράση αναστολέων του καταλυτικού κέντρου της GP. Παρακάτω συνοψίζονται τα αποτελέσματα από τις δύο κατηγορίες αναστολέων.

A) C-γλυκοζίτες

Η σύνθεση των μορίων με δομή C-γλυκοζίτη είχε επιχειρηθεί πρώτη φορά κατά την εκπόνηση του μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης του συγγράφοντα. Στην πορεία της παρούσας διατριβής, η σύνθεση C-γλυκοπυρανοζυλοπυριμιδινών διερευνήθηκε εκτενώς. Αντιμετωπίστηκαν και λύθηκαν τα

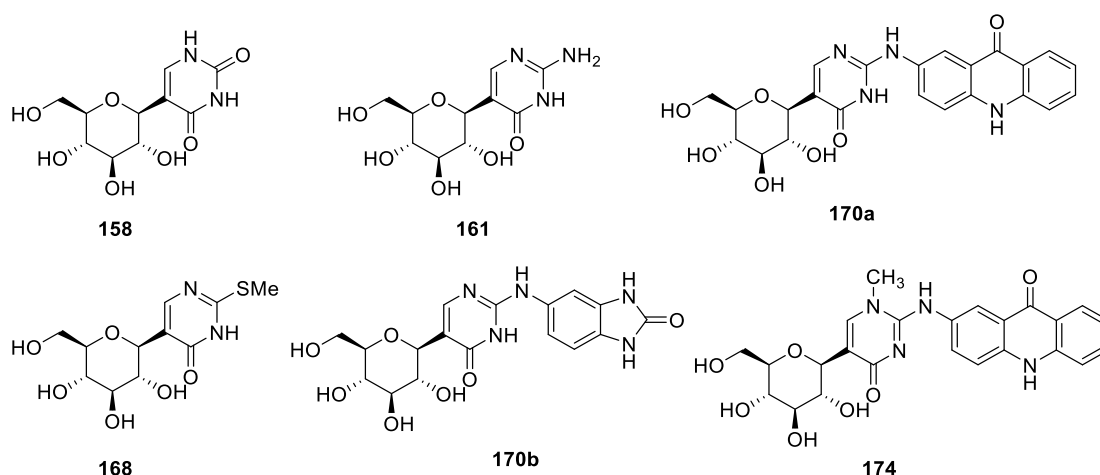
προβλήματα επαναληψιμότητας σε στάδια κλειδιά της σύνθεσης (**Σχήμα 5.1**), όπως είναι η αναγωγή του ανωμερικού υδροξυλίου του ενδιαμέσου που προκύπτει από την οργανομεταλλική σύζευξη πυριμιδινικού και σακχαρικού τμήματος. Πραγματοποιήθηκαν επίσης αντιδράσεις παραγωγοποίησης κι υποκατάστασης του πυριμιδινικού δακτυλίου. Ενώ συναντήθηκαν σοβαρά προβλήματα στο βήμα της τελικής αποπροστασίας, η αλλαγή προστασίας από βενζυλο- σε ακετυλο-προστατευτικές ομάδες σε ένα βήμα, επέτρεψε την εύκολη αποπροστασία των τελικών μορίων στόχων ακόμη και όταν παρουσίαζαν χαμηλή διαλυτότητα.



Σχήμα 5.1: Συνοπτικό συνθετικό σχήμα νέων C-γλυκοπυρανοζυλο-αναστολέων της GP.

Οδηγηθήκαμε έτσι στην ανάπτυξη ενός στιβαρού, γενικού συνθετικού σχήματος που επέτρεψε τη σύνθεση συνολικά 6 νέων αναστολέων του καταλυτικού κέντρου της GP (**Σχήμα 5.2**).

Κινητικές μελέτες των νέων μορίων απέδειξαν ότι πράγματι δρουν ως αναστολείς της GP, ασθενέστεροι ωστόσο από τις αντίστοιχες N-γλυκοζιτικές ενώσεις-οδηγούς. Η σύγκριση με τις δομές των ενώσεων οδηγών, σε συνδυασμό με θεωρητική μελέτη, οδήγησε στη διαπίστωση ότι ανάμεσα σε έναν αριθμό αλλαγών στις νέες ενώσεις, η παρουσία του N^3 πρωτονίου στον πυριμιδινικό δακτύλιο εμποδίζει τα χρωμοφόρα να λάβουν την απαραίτητη για την πρόσδεση στο καταλυτικό κέντρο, ομοεπίπεδη διεύθετηση.



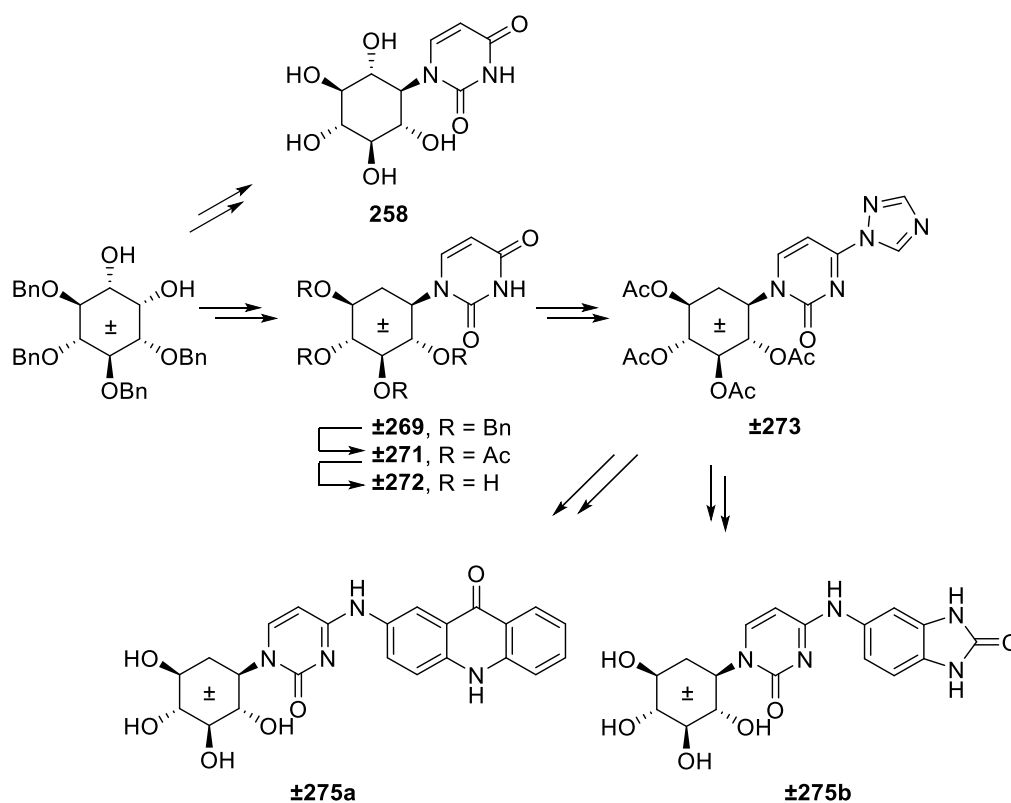
Σχήμα 5.2: Νέοι αναστολείς με δομή C-γλυκοζίτη που παρασκευάστηκαν κατά την εκπόνηση της διατριβής.

Οι νέες ενώσεις υποβλήθηκαν επίσης σε πειράματα κυτταροτοξικότητας με έναν αριθμό καρκινικών κυτταρικών σειρών. Αντίθετα από τους αναστολείς με δομή *N*-γλυκοζίτη, οι νέες ενώσεις παρουσίασαν εμφανή κυτταροστατική δράση. Ειδικά η ένωση **170a** επέδειξε σημαντική κυτταροστατική δράση, με παράλληλη συσσώρευση γλυκογόνου στα κύτταρα. Είναι η πρώτη φορά που τέτοια δράση διαπιστώνεται υπό την επίδραση αναστολέων που στοχεύουν στο καταλυτικό κέντρο της GP. Φαίνεται επίσης ότι επιτεύχθηκε η αύξηση της βιολογικής σταθερότητας των αναστολέων, τουλάχιστον σε επίπεδο κυτταροκαλλιέργειας.

Στους μελλοντικούς στόχους, συμπεριλαμβάνεται η ολοκληρωμένη κρυσταλλογραφική μελέτη των συμπλόκων των νέων ενώσεων με τη RMGPb που θα επιτρέψει την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων για τη σχέση δομής-δράσης, και θα βοηθήσει πιθανόν την επίλυση των προβλημάτων πρόσδεσης αυτής της οικογένειας. Μια πρώτη προσπάθεια ήδη ξεκίνησε, στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, βασισμένη στη διαμορφωτική ανάλυση που έχει περιγραφεί, με τη σύνθεση του *N*¹-μεθυλιωμένου παραγώγου **174** (Ενότητα 2.2.7.2), ενώ έχουν σχεδιαστεί προς μελλοντική σύνθεση παράγωγα τα οποία κλειδώνουν και το αμιδικό πρωτόνιο της γέφυρας *N*²-H μεταξύ των δύο χρωμοφώρων.

Β) Καρβασακχαρικά παράγωγα

Δεύτερο κύριο αντικείμενο της διατριβής αποτέλεσε η, για πρώτη φορά από την ομάδα μας, προσπάθεια σύνθεσης καρβοκυκλικών αναλόγων των προηγούμενων αναστολέων με δομή *N*⁴-αρυλο-υποκατεστημένων β-D-γλυκοπυρανοζυλο-κυτοσινών που είχαν παρασκευαστεί στο εργαστήριο. Μετά από αρχικές δοκιμές, επιλέχθηκε να συντεθούν παράγωγα ξεκινώντας από *myo*-ινοσιτόλη (**Σχήμα 5.3**).



Σχήμα 5.3: Συνοπτικό συνθετικό σχήμα νέων καρβοκυκλικών-αναστολέων της GP.

Αναστολείς όπου το τμήμα της γλυκόζης υποκαταστάθηκε από *scyllo*-ινοσιτόλη, όπως ο **258**, δεν έδειξαν ανασταλτική δράση. Αντίθετα, χρησιμοποιώντας, ως καρβασακχαρικό τμήμα, τη 2-δεοξυ-*chiro*-ινοσιτόλη, παρασκευάστηκαν τρεις νέες ενώσεις (**±272**, **±275a,b**) με ανασταλτική δράση επί της GP, αν και κατά πολύ χαμηλότερη τόσο από τις αντίστοιχες *N*-γλυκοζιτικές ενώσεις οδηγούς, όσο και από τους C-γλυκοζίτες που παρασκευάστηκαν στο Τμήμα (Α), ενώ έδειξαν περιορισμένη κυτταροστατική δράση, που βάσει των πειραμάτων, ωστόσο, δεν φαίνεται να συνδέεται ισχυρά με αναστολή της GP. Θεωρούμε τη σύνθεση κι εδώ επιτυχημένη, καθώς είναι

η πρώτη φορά που περιγράφονται καρβοκυκλικοί αναστολείς της GP, και μία από τις λίγες περιπτώσεις (με βάση τη βιβλιογραφία) όπου η αντικατάσταση της D-γλυκόζης από διαφορετικά ανάλογα οδήγησε σε λειτουργικούς αναστολείς. Μια μελλοντική ερευνητική κατεύθυνση, η οποία σχεδιάζεται στο εργαστήριό μας, είναι η υποκατάσταση του τμήματος της ινοσιτόλης από καρβα-D-γλυκόζη, που αναμένεται να οδηγήσει σε σημαντική αύξηση της ισχύος πρόσδεσης των σχετικών παραγώγων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Πειραματικό μέρος

6.1 Γενικά

Όλα τα αντιδραστήρια και διαλύτες ήταν εμπορικά προϊόντα και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό εκτός κι αν αναφέρεται διαφορετικά. Όπου αναφέρεται η χρήση άνυδρων διαλυτών, διατηρούνται άνυδροι με φύλαξη υπεράνω μοριακών κόσκινων και τιτλοδοτούνται πριν τη χρήση ως προς την περιεκτικότητά τους σε υγρασία με μέθοδο Karl Fischer σε κουλόμετρο 831 KF Coulometer της εταιρίας MetrOhm. Το σύνολο των αντιδράσεων, με εξαίρεση τις αντιδράσεις που εκτελέστηκαν σε υδατικά διαλύματα, πραγματοποιήθηκαν υπό ατμόσφαιρα αργού σε σκεύη που είχαν πρώτα ξηρανθεί με χρήση φλόγας υπό κενό αντλίας λαδιού. Οι χρωματογραφικοί καθαρισμοί πραγματοποιήθηκαν υπό πίεση σε silica 40–60 μm , 60 Å. Τα φάσματα μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού ελήφθησαν σε φασματόμετρο Varian Mercury 200 (στα 200 MHz για ^1H και στα 50 MHz για ^{13}C) και Bruker Avance 400 (στα 400 MHz για ^1H και στα 101 MHz για ^{13}C). Η χημικές μετατοπίσεις δίνονται σε ppm, χρησιμοποιώντας ως πρότυπο τις κορυφές του εκάστοτε διαλύτη. Οι σταθερές σύζευξης (J) εκφράζονται σε Hz, ενώ τα σύμβολα που χρησιμοποιήθηκαν για την περιγραφή της πολλαπλότητας των κορυφών είναι: (s) απλές, (d) διπλές, (dd) διπλές διπλών, (ddd) διπλές διπλών διπλών, (dddd) διπλές διπλών διπλών διπλών, (t) τριπλές, (dt) διπλές τριπλών, (q) τετραπλές (m) πολλαπλές. Τα φάσματα μάζας καταγράφηκαν σε φασματόμετρο ThermoFinnigan Surveyor MSQ Plus με την τεχνική του ιονισμού μέσω ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS) κι αναφέρονται με ακρίβεια 2 δεκαδικών (ακρίβεια μηχανήματος). Τα φάσματα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRMS) ελήφθησαν στο εργαστήριο του καθηγητή κου Θωμαΐδη στο εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του ΕΚΠΑ σε φασματογράφο Q-TOF Bruker MaXis Impact HR-Mass Spectrometer.

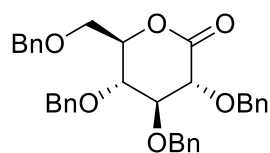
Οι ειδικές γωνίες στροφής μετρήθηκαν σε κυψελίδα διαδρομής 10 cm σε όργανα Perkin Elmer 343 και Optical Activity AA-65 σε θερμοκρασία δωματίου και μήκος διαδρομής κυψελίδας 10 cm,

Τα ακόλουθα αντιδραστήρια παρασκευάστηκαν ακολουθώντας βιβλιογραφικές πορείες: πιβαλικός ανυδρίτης,¹¹⁰ υδροχλωρικό DMAP,¹¹¹ διάλυμα DMDO,¹⁶⁰ 2-μεθυλοθειοπυριμιδιν-4(3*H*)-όνη (**96**),¹¹⁴ 5-Βρωμο-2-μεθυλοθειοπυριμιδιν-4(3*H*)-όνη (**97**),¹¹⁵ μουκοβρωμικό οξύ (**111**),¹²⁰ θειική μεθουλαρία (**113**),¹²¹ 4-μεθυλενοκαρβόξυ-2-μεθυλοθειοπυριμιδίνη (**109**),¹²¹ αντιδραστήριο Bredereck (**132**) και σχετικά αντιδραστήρια,^{132–134,268} 5-αμινοβενζιμιδαζολόνη (**162b**),²⁶⁹ 4-αμινοακρινόνη (**162a**),^{270–274}, βοριοϋδρίδιο του τετρα-η-βουτυλοαμμωνίου,²⁴⁴ *N*³-βενζοϋλο-ουρακίλη (**239c**),²⁰⁴ 5-χλωροουρακίλη (**239b**),²²⁵ καμφανοϋλοχλωρίδιο,²⁵¹ (±) 3,4,5,6-τετρα-*O*-βενζυλο-*m*γο-ινοσιπόλη (**237**),^{221,223} 2,3,4,6-τετρα-*O*-βενζυλο-*D*-γλυκοπυρανόζη (**84**).^{103–105}

6.2 Πειραματικές πορείες

6.2.1 C-Γλυκοζίτες – Συνθέσεις αρχικών αντιδραστηρίων και σύζευξη

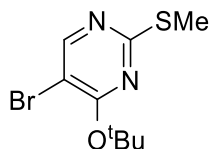
6.2.1.1 2,3,4,6-Τετρα-*O*-βενζυλο-*D*-γλυκονο-δ-λακτόνη (**69**)



Σε διάλυμα 2,3,4,6-τετρα-*O*-βενζυλο-*D*-γλυκοπυρανόζης (5.41 g, 10.0 mmol) σε 150 ml άνυδρου διχλωρομεθάνιο προστέθηκαν ενεργοποιημένα μοριακά κόσκινα 4 Å (10 g) και το αιώρημα αφέθηκε να αναδεύεται για 30 λεπτά υπό αργό. Στη συνέχεια προστέθηκε PCC (10.0 g, 46.4 mmol). Μετά το πέρας της αντίδρασης (1 ώρα), στο σκουρόχρωμο αιώρημα προστέθηκαν 150 ml κυκλοεξάνιο και 300 ml διαιθυλαιθέρα και το μίγμα διηθήθηκε από 50 g silica. Το διήθημα συμπυκνώθηκε, ξηράνθηκε υπό υψηλό κενό και παραλήφθηκαν 5.23 g (97%) προϊόν παραλήφθηκε ως άχρωμο έλαιο. Τα φασματοσκοπικά

δεδομένα συμφωνούν με τη βιβλιογραφία όπου η ένωση έχει παρασκευαστεί με διαφορετική μέθοδο.²⁷⁵

6.2.1.2 5-Βρωμο-2-μεθυλοθειο-4-*tert*-βουτοξυ-πυριμιδίνη (95)



Μέθοδος Α

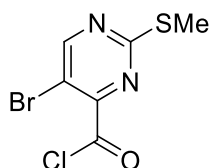
Σε 5-βρωμο-2-μεθυλοθειοπυριμιδιν-4(3*H*)-όνη (1.00 g, 4.52 mmol) προστέθηκε απεσταγμένος οξυχλωριούχος φωσφόρος (1.27 ml, 13.6 mmol) και το μίγμα θερμάνθηκε υπό ζωήρη αναρροή για 2 ώρες. Στη συνέχεια η περίσσεια του χλωριωτικού αποστάχθηκε, το υπόλειμμα διαλύθηκε σε διαιθυλαιθέρα και η οργανική φάση εκπλύθηκε τρεις φορές με κορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου, αποχωρίστηκε και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το ελαιώδες υπόλειμμα (ΠΡΟΣΟΧΗ: Ισχυρός ευαισθητοποιητής) διαλύθηκε 10 ml άνυδρο τετραϋδροφουράνιο και ψύχθηκε σε πάγο. Προστέθηκε *tert*-βουτοξυκάλιο (585 mg, 5.20 mmol) ως διάλυμα 1.45 M σε τετραϋδροφουράνιο, σε διάστημα 45 λεπτών, οπότε το μίγμα φέρθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και αφέθηκε να αναδεύεται για 16 ώρες. Στη συνέχεια ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό, το υπόλειμμα διαλύθηκε σε διαιθυλαιθέρα, η οργανική στοιβάδα εκπλύθηκε μία φορά με διάλυμα καυστικού νατρίου 1 M, τρεις φορές με απιονισμένο νερό, ξηράνθηκε υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και συμπυκνώθηκε. Το κίτρινο υπόλειμμα αποστάχθηκε υπό κενό υδραντλίας ώστε να παραληφθούν 1.13 g (90% από τη 5-βρωμο-2-μεθυλοθειοπυριμιδιν-4(3*H*)-όνη) προϊόν **95** ως υποκίτρινο ελαίο το οποίο στερεοποιήθηκε σταδιακά μετά από πολυήμερη παραμονή στην κατάψυξη.

Μέθοδος Β

Σε 2-μεθυλοθειοπυριμιδιν-4(3*H*)-όνη (7.66 g, 50.0 mmol) προστέθηκε απεσταγμένος οξυχλωριούχος φωσφόρος (14 ml, 150 mmol) και το μίγμα θερμάνθηκε υπό ζωήρη αναρροή για 3 ώρες. Στη συνέχεια η περίσσεια του χλωριωτικού αποστάχθηκε, το υπόλειμμα διαλύθηκε σε διαιθυλαιθέρα και η

οργανική φάση εκπλύθηκε τρεις φορές με κορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου, αποχωρίστηκε και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το ελαιώδες υπόλειμμα διαλύθηκε 100 ml άνυδρο τετραϋδροφουράνιο και ψύχθηκε σε πάγο. Προστέθηκε *tert*-βουτοξυκάλιο (6.45 g, 57.5 mmol) ως διάλυμα 1.45 M σε τετραϋδροφουράνιο, σε διάστημα 45 λεπτών, οπότε το μίγμα φέρθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και αφέθηκε να αναδεύεται για 16 ώρες. Στη συνέχεια ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό, το υπόλειμμα διαλύθηκε σε διαιθυλαιθέρα, Το υπόλειμμα διαλύθηκε σε ml χλωροφόρμιο και προστέθηκε *N*-βρωμοσουλφοναμίδια. (10.68 g, 93.5 mmol) Μετά από 6 ώρες το μίγμα αραιώθηκε με χλωροφόρμιο, εκπλύθηκε δύο φορές με διάλυμα καυστικού νατρίου 2 M, τρεις φορές με απιονισμένο νερό, ξηράνθηκε υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και συμπυκνώθηκε. Το υπόλειμμα φορτώθηκε σε στήλη χρωματογραφίας με 200 g silica κι εκλούστηκε με 3 % διαιθυλαιθέρα σε πετρελαϊκό αιθέρα. Συλλέχθηκαν 8 κλάσματα των 100 ml. Μετά τη συμπύκνωση των κατάλληλων κλασμάτων παραλήφθηκαν 11.5 g (83 %) προϊόν **95** ως υπόλευκο έλαιο. $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 8.3 (s, 1H), 2.5 (s, 3H), 1.6 (s, 9H). $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ 169.8, 164.1, 158.0, 102.7, 84.0, 28.2, 14.6. **MS (ESI) m/z:** ($[\text{M} + \text{H}]^+$ 277.01, 279.31. **HRMS (ESI) m/z:** ($[\text{M} + \text{H}]^+$ Θεωρητικό για $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{BrN}_2\text{OS}^+$ 277.0005; Πειραματικό 277.0008.

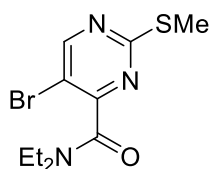
6.2.1.3 (5-Βρωμο-2-μεθυλοθειοπυριμιδιν-4-υλο)καρβονυλοχλωρίδιο (120)



Σε αιώρημα (5-βρωμο-2-μεθυλοθειοπυριμιδιν-4-υλο)καρβοξυλικού οξέος (250 mg, 1.00 mmol) σε 5 ml άνυδρου DCM προστέθηκε μία σταγόνα διμεθυλοφορμαμίδιο και το μίγμα ψύχθηκε σε παγόλουτρο. Προστέθηκε οξαλυλοχλωρίδιο (120 μl , 1.40 mmol) και το μίγμα αφέθηκε να αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για δύο ώρες. Το διάλυμα συμπυκνώθηκε υπό κενό. Πραγματοποιήθηκαν δύο συναποστάξεις με άνυδρο διχλωρομεθάνιο

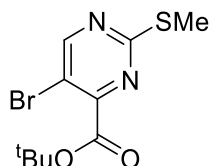
προς απομάκρυνση της περίσσειας του χλωριωτικού. Το χλωρίδιο χρησιμοποιήθηκε απευθείας χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

6.2.1.4 (5-Βρωμο-2-μεθυλοθειοπυριμιδιν-4-υλο)*N,N'*-δισαιθυλο-καρβοξαμίδιο (118)



Διάλυμα (5-βρωμο-2-μεθυλοθειοπυριμιδιν-4-υλο)καρβονυλοχλωριδίου (268 mg, 1.00 mmol) σε 5 ml άνυδρο διχλωρομεθάνιο φέρθηκε σε παγόλουτρο και προστέθηκε στάγδην δισαιθυλαμίνη (310 μl, 3.00 mmol). Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (1 ώρα) το μίγμα συμπυκνώθηκε υπό κενό, επαναδιαλύθηκε σε οξικό αιθυλεστέρα, φέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη και η οργανική στιβάδα εκπλύθηκε διαδοχικά με υδατικό υδροχλώριο 1M, απιονισμένο νερό, διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου και κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου, αποχωρίστηκε, ξηράνθηκε υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Παραλήφθηκαν 286 mg (98%) φασματοσκοπικά καθαρό προϊόν ως εύτηκτο υπόλευκο στερεό. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 8.60 (s, 1H), 3.57 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.14 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.53 (s, 3H), 1.27 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.15 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 171.8, 164.5, 161.6, 159.4, 111.0, 42.7, 39.3, 14.6, 14.1, 12.7.

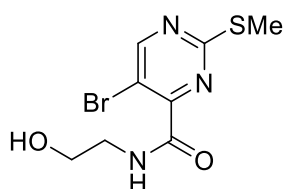
6.2.1.5 (5-Βρωμο-2-μεθυλοθειοπυριμιδιν-4-υλο)καρβοξυλικός *tert*-βουτυλεστέρας (119)



Διάλυμα (5-βρωμο-2-μεθυλοθειοπυριμιδιν-4-υλο)καρβονυλοχλωριδίου (268 mg, 1.00 mmol) σε 5 ml άνυδρο τετραϋδροφουράνιο φέρθηκε σε παγόλουτρο

και προστέθηκε στάγδην διάλυμα 1,4 M *tert*-βουτοξυκάλιο σε άνυδρο THF (790 μl, 1.10 mmol). Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (2 ώρες) το μίγμα συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το υπόλειμμα αιωρήθηκε σε διχλωρομεθάνιο, φέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη και η οργανική στιβάδα εκπλύθηκε 4 φορές με απιονισμένο νερό. Η υδατική στιβάδα αποχωρίστηκε, ξηράνθηκε υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Παραλήφθηκαν 266 mg (87%) φασματοσκοπικά καθαρό προϊόν ως σκουρόχρωμο έλαιο. **¹H NMR (200 MHz, CDCl₃)** δ 8.63 (s, 1H), 2.55 (s, 3H), 1.62 (s, 9H). **¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃)** δ 171.9, 162.8, 160.2, 157.8, 110.8, 85.2, 28.3, 14.7.

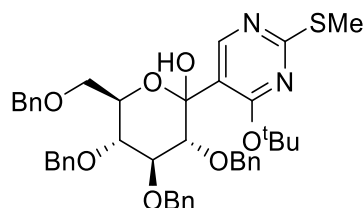
6.2.1.6 (5-Βρωμο-2-μεθυλοθειοπυριμιδιν-4-υλο)-2-υδροξυαιθυλο-καρβοξαμίδιο (121)



Διάλυμα (5-βρωμο-2-μεθυλοθειοπυριμιδιν-4-υλο)καρβονυλοχλωριδίου (268 mg, 1.00 mmol) και τριαιθυλαμίνης (280 μl, 2.00 mmol) σε 5 ml άνυδρο διχλωρομεθάνιο φέρθηκε σε παγόλουτρο και προστέθηκε στάγδην 2-αιθανολαμίνη (70 μl, 1.16 mmol). Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (1 ώρα) το μίγμα αραιώθηκε με διχλωρομεθάνιο, φέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη και η οργανική στιβάδα εκπλύθηκε διαδοχικά με υδατικό υδροχλώριο 1 M, απιονισμένο νερό και κορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου, αποχωρίστηκε, ξηράνθηκε υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Παραλήφθηκαν 298 mg (91%) φασματοσκοπικά καθαρό προϊόν ως υπόλευκο κηρώδες στερεό.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 8.73 (s, 1H), 3.83 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H), 3.59 (q, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.77 (s, 1H), 2.55 (s, 3H). **¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃)** δ 170.7, 162.9, 162.8, 153.2, 112.3, 61.7, 42.4, 14.7.

6.2.1.7 2,3,4,6-Τετρα-Ο-βενζυλο-1-(4-*tert*-βουτοξυ-2-μεθυλοθειοπυριμιδιν-5-υλο)-D-γλυκοπυρανόζη (144d)



Μέθοδος Α

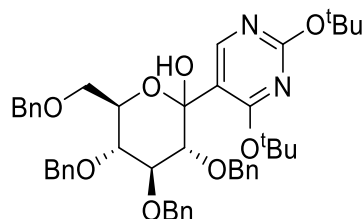
Σε διάλυμα 5-βρωμο-4-*tert*-βουτυλο-2-μεθυλοθειοπυριμιδίνης (316 mg, 1.15 mmol, 1.1 eq) σε 10 ml άνυδρο THF στους -78 °C και υπό ατμόσφαιρα αργού προστέθηκε στάγδην *n*-BuLi (0.52 ml, 1.15 mmol, 1.1 eq) (ως διάλυμα σε εξάνιο). Μετά την ολοκλήρωση της λιθίωσης (~25 min), προστέθηκε στάγδην και σε διάστημα μισής ώρας, ψυγμένη στους -78 °C, 2,3,4,6-τετρα-Ο-βενζυλο-D-γλυκονο-δ-λακτόνη (560 mg, 1.04 mmol, 1 eq) διαλυμένη σε 10 ml άνυδρου THF. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε να θερμανθεί στους 0 °C. Προστέθηκε 1 ml *tert*-βουτανόλης, και το μίγμα αφέθηκε να θερμανθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το μίγμα αραιώθηκε με οξικό αιθυλεστέρα κι εκπλύθηκε δύο φορές, μία με νερό ημικορεσμένο και μία με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Οι υδατικές στιβάδες επανεκχυλίστηκαν 2 φορές με οξικό αιθυλεστέρα. Οι συνδυασμένες οργανικές στιβάδες ξηράθηκαν υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και συμπυκνώθηκαν. Το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό καθαρισμό (30-60% οξικός αιθυλεστέρας σε πετρελαϊκό αιθέρα) για να παραληφθεί το προϊόν ως κίτρινο έλαιο, σε απόδοση 39%.

Μέθοδος Β

Διάλυμα 5-βρωμο-4-*tert*-βουτυλο-2-μεθυλοθειοπυριμιδίνης (1.80 g, 6.50 mmol) σε 6 ml άνυδρο τετραϋδροφουράνιο ψύχθηκε στους -22 °C, και προστέθηκε ισοπροπυλομαγνησιοχλωρίδιο-χλωριούχο λίθιο (διάλυμα 1.3 M σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο, 6.5 ml, 8.45 mmol) σε διάστημα 30 λεπτών. Το μίγμα αφέθηκε υπό ανάδευση για διάστημα 3 ωρών, μετά το πέρας των οποίων η τρανσμεταλλίωση ολοκληρώθηκε (TLC). Στην ίδια θερμοκρασία προστέθηκε

διάλυμα 2,3,4,6-τετρα-Ο-βενζυλο-D-γλυκονο-δ-λακτόνης (2.69 g, 5.00 mmol) σε 5 ml άνυδρο τετραϋδροφουράνιο σε διάστημα 40 λεπτών. Η αντίδραση αφέθηκε να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου και η ανάδευση συνεχίστηκε για 16 ώρες. Το μίγμα εξουδετερώθηκε με προσθήκη κορεσμένου διαλύματος χλωριούχου αμμωνίου. Το τετραϋδροφουράνιο απομακρύνθηκε υπό κενό, το υπόλειμμα αραιώθηκε με 40 ml διχλωρομεθανίου. Οι στοιβάδες διαχωρίστηκαν, η υδατική φάση επανεκχυλίστηκε με 20 ml διχλωρομεθανίου και η οργανική στοιβάδα προστέθηκε στην προηγούμενη. Οι οργανικές φάσεις πλύθηκαν μία φορά με απιονισμένο νερό, μία φορά με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου, απομονώθηκαν, ξηράθηκαν υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και συμπυκνώθηκαν υπό κενό. Στο κίτρινο έλαιο που παραλήφθηκε προστέθηκαν 100 ml διαλύματος 5% οξικού αιθυλεστέρα σε πετρελαϊκό αιθέρα και το μίγμα αφέθηκε να αναδεύεται μέχρι να ολοκληρωθεί ο σχηματισμός λευκού στερεού. Το στερεό που σχηματίστηκε διηθήθηκε και παραλήφθηκαν 2,73 g (74%) φασματοσκοπικά καθαρό προϊόν **144d**. **Σ.τ.:** 91-92 °C, $[\alpha]^{24}_D +2,7^\circ$ (c = 0.1, EtOAc). **^1H NMR (400 MHz, Acetone- d_6)** δ 8.57 (s, 1H), 7.39–7.24 (m, 15H), 7.20–7.17 (m, 3H), 7.07–7.01 (m, 2H), 5.52 (s, 1H), 4.92 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 4.90 (s, 2H), 4.75 (d, J = 11.1 Hz, 1H), 4.66 (d, J = 11.3 Hz, 1H), 4.59 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 4.54 (d, J = 12.1 Hz, 1H), 4.26 (d, J = 11.3 Hz, 1H), 4.24 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 4.08 (t, J = 9.2, 9.2 Hz, 1H), 4.08 (dt, J = 9.9, 1.9, 1.9 Hz, 1H), 3.82 (dd, J = 10.6, 3.6 Hz, 1H), 3.80 (t, J = 9.6, 9.6 Hz, 1H), 3.66 (dd, J = 10.8, 1.9 Hz, 1H), 2.52 (s, 3H), 1.58 (s, 9H). **^{13}C NMR (101 MHz, Acetone- d_6)** δ 171.8, 166.5, 157.3, 140.1, 139.8, 139.6, 139.1, 129.05 (3C), 129.02 (2C), 128.90, 128.89, 128.7 (2C), 128.59 (2C), 128.55 (2C), 128.49, 128.48, 128.3, 128.21, 128.20, 128.18 (2C), 119.3, 97.54, 97.52, 84.5, 83.6, 81.9, 79.2, 76.0, 75.40, 75.38, 73.84, 72.80, 70.0, 28.8, 14.3. **MS (ESI) m/z:** $[\text{M} + \text{H}]^+$ 737.33. **HRMS (ESI/Q-TOF) m/z:** $[\text{M} + \text{Na}]^+$ Θεωρητικό για $\text{C}_{43}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_7\text{SNa}^+$ 759.3074, Πειραματικό: 759.3090.

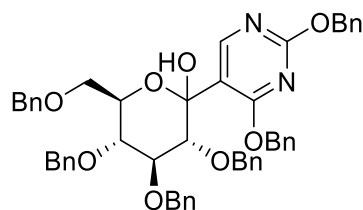
6.2.1.8 2,3,4,6-Τετρα-Ο-βενζυλο-1-(2,4-δι(tert-βουτοξυ)πυριμιδιν-5-υλο)-D-γλυκοπυρανόζη (144b)



Όπως **6.2.1.7**. Υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό καθαρισμό (10-40% οξικός αιθυλεστέρας σε πετρελαϊκό αιθέρα). Παραλήφθηκε ως σκουρόχρωμο έλαιο. Μέθοδος A: 22 % Μέθοδος B: 46%

¹H NMR (200 MHz, Acetone-*d*₆) δ 8.98 (s, 1H), 7.87 – 7.36 (m, 20H), 6.03 (s, 1H), 5.38 (d, *J* = 10.7 Hz, 3H), 5.19 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H), 5.11 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H), 5.05 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H), 4.97 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.78 – 4.61 (m, 2H), 4.62 – 4.45 (m, 2H), 4.37 – 4.19 (m, 2H), 4.11 (dd, *J* = 10.7, 1.8 Hz, 1H), 2.05 (s, 9H), 2.01 (s, 9H). **¹³C NMR (50 MHz, Acetone-*d*₆)** δ 168.3, 164.8, 158.0, 140.1, 139.7, 139.5, 139.1, 129.0, 128.96, 128.8, 128.6, 128.53, 128.50, 128.2, 128.1, 117.2, 97.6, 84.4, 82.9, 82.0, 80.4, 79.1, 75.9, 75.4, 75.3, 73.7, 72.6, 69.9, 28.6, 28.5. **HRMS (ESI/Q-TOF) *m/z*:** [M + Na]⁺ Θεωρητικό για C₄₆H₅₅N₂O₈⁺ 763.3953, Πειραματικό 763.3953.

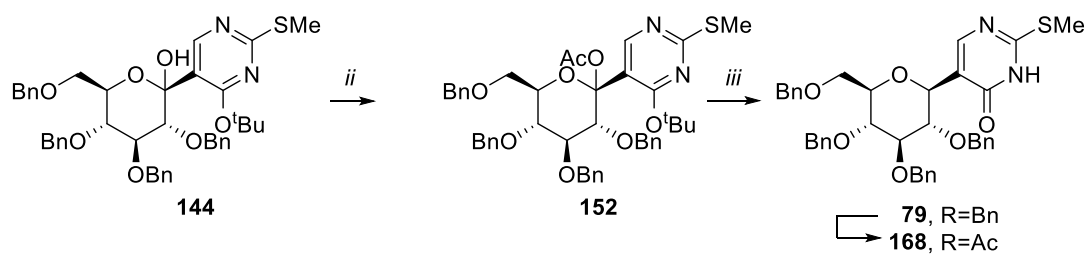
6.2.1.9 2,3,4,6-Τετρα-Ο-βενζυλο-1-(2,4-δι-βενζυλοξυπυριμιδιν-5-υλο)-D-γλυκοπυρανόζη (144c)



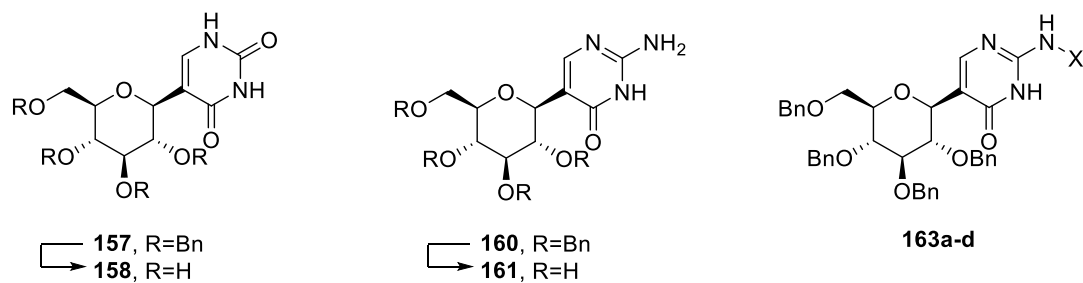
Όπως **6.2.1.7**. Υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό καθαρισμό (10-40% οξικός αιθυλεστέρας σε πετρελαϊκό αιθέρα). Μέθοδος B: 31% **¹H NMR (200 MHz, Acetone-*d*₆)** δ 8.60 (s, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.75 – 6.79 (m, 30H), 5.65 (s, 2H), 5.49 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H), 5.42 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 5.36 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H),

5.27 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H), 4.89 (s, 2H), 4.88 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H), 4.69 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H), 4.56 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H), 4.48 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H), 4.27 – 4.05 (m, 4H), 3.89 – 3.73 (m, 1H), 3.65 (dd, $J = 10.9, 1.9$ Hz, 1H). **MS (ESI) m/z :** $[M + H]^+$ 831.33. **HRMS (ESI/Q-TOF) m/z :** $[M + H]^+$ Θεωρητικό για $C_{52}H_{51}N_2O_8^+$ 831.3640, Πειραματικό 831.3642.

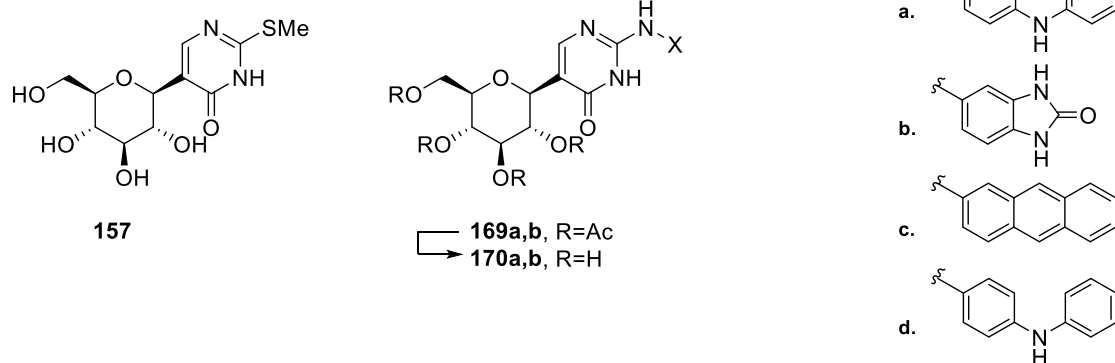
6.2.2 C-Γλυκοζίτες – Ανωμερική αναγωγή και περαιτέρω παραγωγοποίηση



From **79**:

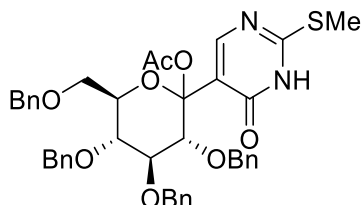


From **168**:



Σχήμα 6.1: Συνοπτικό συνθετικό σχήμα παραγωγοποίησης C-γλυκοζιτών.

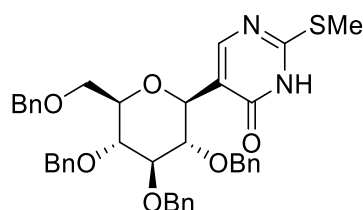
6.2.2.1 1-Ο-Ακετυλο-2,3,4,6-τετρα-Ο-βενζυλο-1-(4-*tert*-βουτοξυ-2-μεθυλοθειοπυριμιδιν-5-υλο)-D-γλυκοπυρανόζη (152)



Υδρίδιο του νατρίου (60% μίγμα με παραφινέλαιο, 140 mg, 3.50 mmol) εκπλύθηκε από το παραφινέλαιο αιωρώντας το σε πετρελαϊκό αιθέρα και αποχύνοντας τον διαλύτη τρεις φορές, και το στερεό ξηράνθηκε υπό ροή αργού. Προστέθηκαν 3 ml άνυδρου τετραϋδροφουρανίου, το αιώρημα ψύχθηκε σε μίγμα πάγου-νερού και στη συνέχεια προστέθηκε στάγδην διάλυμα 2,3,4,6-τετρα-Ο-βενζυλο-1-(4-*tert*-βουτοξυ-2-μεθυλοθειοπυριμιδιν-5-υλο)-D-γλυκοπυρανόζης (500 mg, 0.679 mmol) σε 3 ml άνυδρο τετραϋδροφουράνιο. Μετά από μία ώρα προστέθηκε στάγδην οξικός ανυδρίτης (285 μ l, 3.00 mmol), το μίγμα αφέθηκε να έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και η ανάδευση συνεχίστηκε για 96 ώρες. Το μίγμα εξουδετερώθηκε με στάγδην προσθήκη 1 ml απιονισμένου νερού, το τετραϋδροφουράνιο συμπυκνώθηκε υπό κενό και το υπόλειμμα εκχυλίστηκε δύο φορές με 20 ml διαιθυλαιθέρα. Οι οργανικές φάσεις πλύθηκαν δύο φορές με απιονισμένο νερό, μία φορά με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου, απομονώνονται, ξηράνθηκαν υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και συμπυκνώθηκαν υπό κενό. Το προϊόν **152** παραλήφθηκε ποσοτικά και επαρκώς καθαρό ώστε να χρησιμοποιηθεί στο επόμενο βήμα χωρίς περαιτέρω καθαρισμό, ως υποκίτρινο έλαιο. **¹H NMR (400 MHz, Acetone-*d*₆)** δ 8.28 (s, 1H), 7.47 – 7.08 (m, 20H), 4.90 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 4.89 (s, 2H), 4.71 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 4.69 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.63 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H), 4.59 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H), 4.28 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.12 (t, *J* = 8.9 Hz, 1H), 3.91 – 3.80 (m, 1H), 3.80 – 3.73 (m, 1H), 3.70 (dd, *J* = 10.7, 1.4 Hz, 1H), 2.52 (s, 3H), 2.24 (s, 3H), 1.53 (s, 9H). **¹³C NMR (50 MHz, Acetone – DEPT 135)** δ 171.1 (C), 168.0 (C), 165.3 (C), 157.0 (CH), 139.6, 139.4, 139.3, 138.9 (each C), 129.0, 128.8, 128.73, 128.7, 128.41, 128.35, 128.22, 128.20, 128.1 (each

CH), 116.0 (CH), 101.8 (CH), 84.0 (CH), 83.6 (CH), 83.3 (C), 78.4 (CH), 75.9 (CH₂), 75.6 (CH₂), 75.4 (CH₂), 74.1 (CH), 73.7 (CH₂), 69.2 (CH₂), 28.6 (CH₃), 21.8 (CH₃), 14.2 (CH₃). **MS (ESI):** [M+H]⁺ 779.41. **HRMS (ESI/Q-TOF) m/z:** [M + H]⁺ Θεωρητικό για C₄₅H₅₀N₂O₈S⁺ 778.3288, Πειραματικό 779.3361.

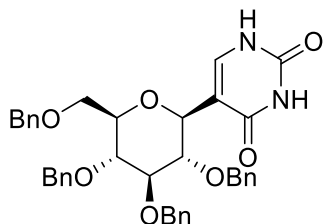
6.2.2.2 5-(2,3,4,6-Τετρα-Ο-βενζυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-2-μεθυλοθειοπυριμιδιν-4(3H)-όνη (79a)



Σε διάλυμα 1-Ο-ακετυλο-2,3,4,6-τετρα-Ο-βενζυλο-1-(4-*tert*-βουτοξυ-2-μεθυλοθειοπυριμιδιν-5-υλο)-D-γλυκοπυρανόζης (778.9 mg, 1.00 mmol) και τριαιθυλοσιλανίου (1.6 ml, 1.16 g, 10.0 mmol) σε 11 ml άνυδρου διχλωρομεθανίου προστέθηκαν 700 mg ενεργοποιημένα μοριακά κόσκινα 4 Å. Στη συνέχεια προστέθηκε στάγδην τριφθορομεθανοσουλφονικός τριμεθυλοσιλυλεστέρας (622 mg, 2.80 mmol). Το μίγμα αφέθηκε να αναδεύεται για μία ώρα και μετά εξουδετερώθηκε με κορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου. Το μίγμα αραιώθηκε με διχλωρομεθάνιο, διηθήθηκε και η οργανική στοιβάδα απομονώθηκε, εκπλύθηκε δύο φορές με απιονισμένο νερό, ξηράνθηκε υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (1:1 οξικός αιθυλεστέρας: πετρελαϊκός αιθέρας) και απομονώθηκαν 532 mg (80%) το προϊόν **79a** ως λευκό στερεό. (Εναλλακτικά το προϊόν μπορεί να ανακρυσταλλωθεί από ακετόνη). **Σ.τ.** 104-106 °C, $[\alpha]_D^{22} + 5.3^\circ$ (c = 1.00 σε διοχλωρομεθάνιο) **¹H NMR (200 MHz, Acetone-d₆)** δ 7.92 (s, 1H), 7.45 – 7.07 (m, 20H), 4.89 (d, J = 11.2 Hz, 3H), 4.74 (d, J = 11.2 Hz, 1H), 4.69 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 4.63 (d, J = 12.3 Hz, 1H), 4.51 (d, J = 12.1 Hz, 1H), 4.48 (d, J = 11.4 Hz, 1H), 4.44 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 3.95 (t, J = 8.9 Hz, 1H), 3.84 – 3.52 (m, 5H), 2.54 (s, 3H). **¹³C NMR (50 MHz, Acetone)** δ 206.2, 163.0, 162.1, 153.7, 140.0, 139.7, 139.5, 129.0, 128.9, 128.8, 128.7, 128.5, 128.5, 128.4, 128.3, 128.1, 128.1, 121.7, 87.9, 82.3,

80.2, 79.2, 75.8, 75.4, 75.3, 75.0, 73.8, 70.1, 13.3. **MS (ESI) m/z:** $[M + H]^+$ 665.26. **HRMS (ESI/Q-TOF) m/z:** $[M + H]^+$ Θεωρητικό για $C_{39}H_{41}N_2O_6S^+$ 665.2680, Πειραματικό 665.2674.

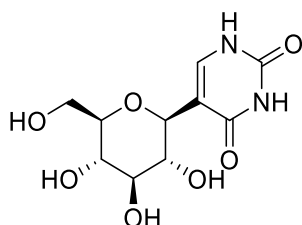
6.2.2.3 5-(2,3,4,6-Τετρα-Ο-βενζυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)ουρακίλη (157)



Σε διάλυμα 5-(2,3,4,6-τετρα-Ο-βενζυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-2-μεθυλοθειοπυριμιδιν-4(3*H*)-όνης (133 mg, 0.20 mmol) σε 1.5 ml παγόμορφου οξικού οξέος προστέθηκε διάλυμα 30% υπεροξειδίου του υδρογόνου (68 μl, 0.640 mmol). Το μίγμα αφέθηκε να αναδεύεται για 1.5 ώρες και στη συνέχεια θερμάνθηκε στους 70 °C για δύο επιπλέον ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα της αντίδρασης συμπυκνώθηκε υπό κενό και στο υπόλειμμα προστέθηκε κορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου μέχρι διακοπής του αφρισμού. Το μίγμα εκχυλίστηκε με 20 ml διχλωρομεθανίου. Η οργανική στοιβάδα απομονώθηκε, εκπλύθηκε μία φορά με κορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου και τρεις με απιονισμένο νερό, ξηράνθηκε υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και συμπυκνώθηκε. Το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό καθαρισμό (50 – 80% οξικός αιθυλεστέρας σε πετρελαϊκό αιθέρα) και απομονώθηκαν 110 mg (87%) προϊόν **157** ως λευκό στερεό. **Σ.τ.** 97-103 °C, $[\alpha]_D^{22} - 8.7^\circ$ ($c = 1,00$ σε διχλωρομεθάνιο) **1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6)** δ 11.13 (s, 1H), 10.92 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 7.52 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 7.38 – 7.21 (m, 16H), 7.19 (dd, $J = 7.2, 2.2$ Hz, 2H), 7.12 (dd, $J = 7.2, 2.4$ Hz, 2H), 4.82 (s, 2H), 4.75 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 4.65 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H), 4.56 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.53 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H), 4.46 (d, $J = 12.1$ Hz, 1H), 4.42 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H), 4.25 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H), 3.89 (t, $J = 9.3, 9.3$ Hz, 1H), 3.69 (t, $J = 8.7, 8.7$ Hz, 1H), 3.66 – 3.58 (m, 2H), 3.58 – 3.47 (m, 2H). **^{13}C NMR (101**

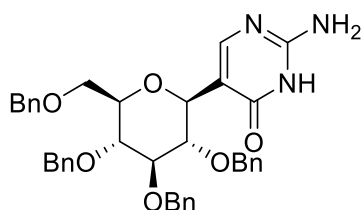
MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.6, 150.9, 141.6, 138.7, 138.3, 138.23, 138.21, 128.20, 128.1, 127.8, 127.7, 127.54, 127.52, 127.41, 127.40, 109.9, 86.2, 80.5, 78.3, 78.0, 74.4, 74.0, 73.5, 72.3, 69.0. **HRMS (ESI/Q-TOF) *m/z*:** [M + Na]⁺ Θεωρητικό C₃₈H₃₈N₂NaO₇⁺ 657.2577; Πειραματικό 657.2571.

6.2.2.4 5-(β-D-Γλυκοπυρανοζυλο)ουρακίλη (158)



Σε διάλυμα 5-(2,3,4,6-τετρα-*O*-βενζυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)ουρακίλης (100 mg, 0.158 mmol) σε μεθανόλη με μικρή ποσότητα διχλωρομεθανίου προστέθηκε παλλάδιο σε άνθρακα (10%, 30 mg) και το υδρογονώθηκε για διάστημα 16 ωρών. Το μίγμα διηθήθηκε από Celite προς απομάκρυνση του καταλύτη και το διήθημα συμπυκνώθηκε. Παραλήφθηκαν 43 mg (ποσοτικά) προϊόν προϊόντος ως φασματοσκοπικά καθαρό λευκό στερεό. **Σ.τ.** 156-158 °C. **[α]_D²²** + 14.7° (c = 1.00 σε μεθανόλη). **¹H NMR (400 MHz, Deuterium Oxide)** δ 7.72 (s, 1H, *H*₆), 4.22 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, *H*_{1'}), 3.92 – 3.77 (m, 1H), 3.71 (dd, *J* = 12.3, 3.0 Hz, 2H, *H*_{6'}), 3.61 – 3.40 (m, 3H). **¹³C NMR (50 MHz, CD₃OD)** δ 166.5, 153.7, 143.6, 112.1, 82.2, 79.8, 76.5, 74.2, 71.4, 62.8. **MS (ESI) *m/z*:** [M - H]⁻ 295.02. **HRMS (ESI/Q-TOF) *m/z*:** [M + Na]⁺ Θεωρητικό για C₁₀H₁₄N₂NaO₇ 297.0693 ; Πειραματικό 297.0693.

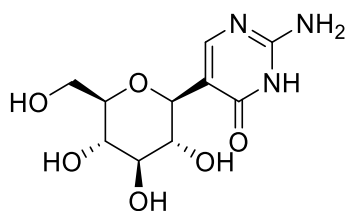
6.2.2.5 5-(2,3,4,6-Τετρα-*O*-βενζυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)ισοκυτοσίνη (160)



Διάλυμα 5-(2,3,4,6-τετρα-*O*-βενζυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-2-μεθυλοθειοπυριμιδιν-4(3*H*)-όνης (336 mg, 0.499 mmol) σε 5 ml διχλωρομεθανίου αφέθηκε να

αναδεύεται έντονα με λειοτριβημένο οξικό αμμώνιο (5.00 g, 64.9 mmol) για 10 λεπτά. Στη συνέχεια το μίγμα συμπυκνώθηκε και η σφαιρική φιάλη με το υπόλειμμα θερμάνθηκε στους 140 °C, οπότε το μίγμα υγροποιείται. Το μίγμα αφέθηκε να αναδεύεται για 16 ώρες. Στη συνέχεια αφέθηκε να κρυώσει, προστέθηκαν νερό και διχλωρομεθάνιο, η οργανική στοιβάδα αποχωρίστηκε, εκπλύθηκε 4 φορές με απιονισμένο νερό, ξηράνθηκε υπεράνω άνυδρου θειικού αμμωνίου και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό καθαρισμό (70-100% οξικός αιθυλεστέρας σε πετρελαϊκό αιθέρα), για να παραληφθούν 246 mg (78%) προϊόν ως λευκό στερεό. **Σ.τ.** 74-75 °C, $[\alpha]_D^{22} + 2,1^\circ$ (c = 1,00 σε διχλωρομεθάνιο). **¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆)** δ 10.93 (broad s, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.43 – 7.17 (m, 18H), 7.11 (dd, *J* = 7.2, 2.5 Hz, 2H), 6.57 (s, 2H), 4.84 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H), 4.81 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.77 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H), 4.61 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H), 4.59 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H), 4.54 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H), 4.48 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H), 4.41 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H), 4.25 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H), 3.95 (t, *J* = 9.3, 9.3 Hz, 1H), 3.70 (t, *J* = 8.6, 8.6 Hz, 1H), 3.67 (dd, *J* = 11.1, 2.0 Hz, 1H), 3.63 (dd, *J* = 11.1, 4.2 Hz, 1H), 3.54 (q, *J* = 9.2, 9.2, 8.8 Hz, 1H), 3.55 – 3.47 (m, 1H). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆)** δ 161.9, 155.8, 154.8, 138.7, 138.4, 138.32, 138.31, 127.96, 127.91, 127.88, 127.81, 127.3, 127.4, 127.3, 127.2, 127.18, 127.17, 127.0, 127.02, 126.9, 112.0, 86.1, 78.4, 78.3, 74.7, 74.0, 73.6, 73.1, 72.4, 69.4. **MS (ESI) *m/z*:** [*M* - *H*]⁻ 632.35. **HRMS (ESI/Q-TOF) *m/z*:** [*M* + *Na*]⁺ Θεωρητικό για C₃₈H₃₉N₃O₆Na 656.2731; Πειραματικό 656.2749.

6.2.2.6 5-(β-D-Γλυκοπυρανοζυλο)ισοκυτοσίνη (161)

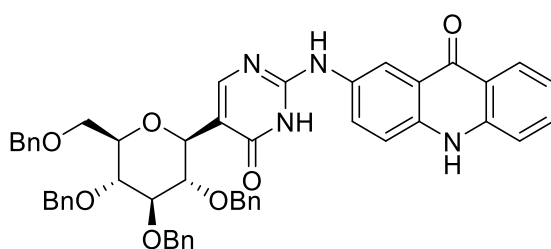


Σε διάλυμα 5-(2,3,4,6-τετρα-*O*-βενζυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)ισοκυτοσίνης (100 mg, 0.158 mmol) σε μεθανόλη με μικρή ποσότητα διχλωρομεθανίου προστέθηκε παλλάδιο σε άνθρακα (10%, 100 mg) και το μίγμα αφέθηκε να υδρογονωθεί. Μετά από 24 ώρες, προστέθηκε επιπλέον υδροξείδιο του

παλλαδίου σε άνθρακα (20%, 100 mg) και το μίγμα αφέθηκε σε ατμόσφαιρα υδρογόνου για 72 επιπλέον ώρες. Στη συνέχεια το μίγμα διηθήθηκε από Celite και συμπυκνώθηκε. Το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό καθαρισμό (μεθανόλη : νερό : ακετονιτρίλιο : οξικός αιθυλεστέρας 1.5 : 1.5 : 1.5 : 5.5) και παραλήφθηκαν 28 mg (65%) προϊόν ως λευκό στερεό. **Σ.τ.** 232-245 °C (τήξη με παράλληλη αποσύνθεση), $[\alpha]_D^{22} + 17,4^\circ$ (c = 1,00 σε νερό). **¹H NMR (400 MHz, D₂O, 60 °C)** δ 7.73 (s, 1H, *H*6), 4.24 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H, *H*1'), 3.84 (dd, *J* = 12.4, 1.6 Hz, 1H, *H*6a'), 3.78 (dd, *J* = 9.9, 8.5 Hz, 1H, *H*2'), 3.71 (ddd, *J* = 12.5, 4.0, 2.0 Hz, 1H, *H*6b'), 3.60 – 3.42 (m, 3H, *H*3',4',5').

δ 7.7 (s, 1H, *H*6), 4.2 (d, 1H), 3.9 – 3.8 (m, 1H), 3.7 (dd, 2H), 3.6 – 3.4 (m, 3H). **¹³C NMR (101 MHz, D₂O, 60 °C)** δ 167.9, 156.5, 151.7, 111.8, 80.4, 78.1, 75.8, 71.9, 70.2, 61.4. **MS (ESI) m/z:** [M + Na]⁺ 296.24. **HRMS (ESI/Q-TOF) m/z:** [M + H]⁺ Θεωρητικό για C₁₁H₁₅N₃O₆ 274.1034 ; Πειραματικό 274.1039.

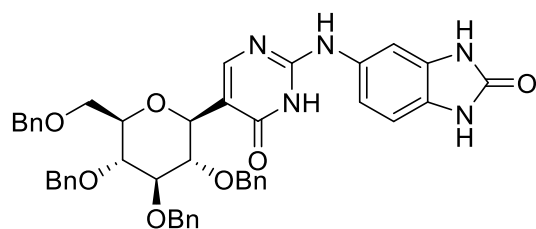
6.2.2.7 *N*²-[(Ακριδιν-9(10*H*)-ον-2-υλο)αμινο]-5-(2,3,4,6-τετρα-*O*-βενζυλο-β-*D*-γλυκοπυρανοζυλο)ισοκυτοσίνη (163a)



Αιώρημα της 5-(2,3,4,6-τετρα-*O*-βενζυλο-β-*D*-γλυκοπυρανοζυλο)-2-μεθυλοθειοπυριμιδιν-4(3*H*)-όνης (200 mg, 0.300 mmol) και 2-αμινοακριδόνης (79 mg, 0.375 mmol) σε 2 mL πιβαλικού οξέος θερμάνθηκαν στους 120 °C για 16 ώρες. Ο διαλύτης αποστάχθηκε υπό κενό αντλίας λαδιού. Το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης δύο φορές (80% οξικός αιθυλεστέρας σε πετρελαϊκό αιθέρα, έπειτα 3 % μεθανόλη σε διχλωρομεθάνιο), οπότε παραλήφθηκαν 151 mg (61%) προϊόν ως κίτρινο κηρώδες στερεό. **Σ.τ.** 134-135°C, $[\alpha]_D^{22} + 1,4^\circ$ (c = 1,00 σε διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 1-1). **¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆)** δ 11.78 (s, 1H), 9.15 (s, 1H), 8.42 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.24 (dd, *J* = 8.2, 1.6 Hz, 1H), 7.93 (dd, *J* = 8.9, 2.6 Hz, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.71 (ddd, *J* = 8.5, 6.8, 1.6 Hz, 1H), 7.56 (t, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.38–7.15 (m, 18H), 7.14–7.08 (m, 2H), 4.82 (s, 2H),

4.76 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H), 4.65 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H), 4.57 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H), 4.55 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 4.47 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.42 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H), 4.32 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 3.97 (t, $J = 9.6$ Hz, 1H), 3.71 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H), 3.68–3.48 (m, 4H). **^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6)** δ 176.3, 163.1 (HMBC), 140.7, 138.7, 138.4, 138.3 (2C), 138.0, 137.9, 137.4, 133.3, 131.9, 128.2 (7C), 128.0 (2C), 127.8 (2C), 127.7 (2C), 127.5 (2C), 127.4 (4C), 127.3, 126.0, 120.9, 120.6, 120.0, 118.0, 117.3, 116.3, 114.8, 97.2, 86.3, 80.5, 78.4, 78.2, 74.5, 74.0, 73.6, 72.4 (2C), 69.1. **MS (ESI) m/z :** $[M + H]^+$ 827.41. **HRMS (ESI/Q-TOF) m/z :** $[M + H]^+$ Θεωρητικό για $\text{C}_{51}\text{H}_{47}\text{N}_4\text{O}_7^+$ 827.3439; Πειραματικό 827.3442.

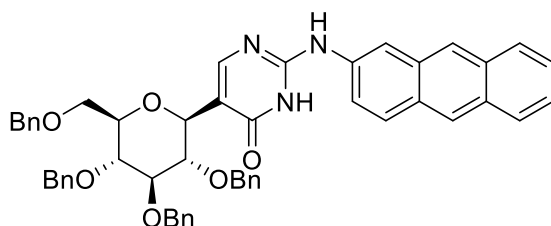
6.2.2.8 N^2 -[(1,3-Διυδρο-βενζο[d]ιμιδαζολ-2-ον-5-υλο)-5-(2,3,4,6-τετρα-Ο-βενζυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)]ισοκυτοσίνη (163b)



Όπως **6.2.2.7** με 5-αμινο-1,3-διυδρο-βενζο[d]ιμιδαζολ-2-ονη (57 mg, 0.375 mmol) και θέρμανση για 10 ώρες. Μετά από χρωματογραφία (2-6% μεθανόλη σε διχλωρομεθάνιο) παραλήφθηκαν 227 mg (79%) προϊόν ως τεφρό στερεό. **Σ.τ.** 178-183 °C (τήξη με παράλληλη αποσύνθεση), $[\alpha]_D^{22} + 4,3^\circ$ ($c = 1,00$ σε νερό). **^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6)** δ 10.79 (s, 1H), 10.58 (s, 1H), 10.52 (s, 1H), 8.65 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.44 – 6.98 (m, 20H), 6.95 – 6.69 (m, 3H), 4.80 (s, 2H), 4.74 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 4.62 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 4.54 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H), 4.53 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H), 4.49 (d, $J = 10.3$ Hz, 1H), 4.38 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H), 4.25 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H), 3.95 (t, $J = 9.1$ Hz, 1H), 3.74 – 3.42 (m, 5H). **^{13}C NMR (50 MHz, DMSO)** δ 163.5, 161.6, 155.6, 155.2, 153.7, 138.8, 138.5, 138.30, 138.27, 131.6, 129.9, 128.3, 128.2, 128.1, 128.0, 127.9, 127.8, 127.8, 127.6, 127.51, 127.45, 125.9, 114.0, 113.4, 108.4, 102.3, 86.3, 80.5, 78.4, 78.2, 74.6, 74.1, 73.6, 72.4 (2C), 69.1. **MS (ESI) m/z :** $[M + H]^+$ 766.21. **HRMS (ESI/Q-**

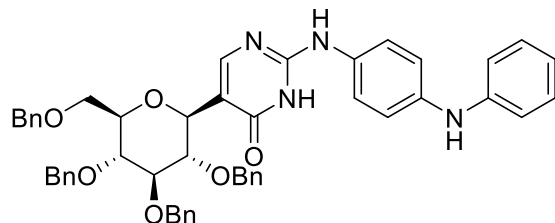
TOF) m/z: $[M + H]^+$ Θεωρητικό για $C_{47}H_{46}N_5O_6^+$ 766.3235, Πειραματικό 766.3225.

6.2.2.9 *N*²-[(Ανθρακεν-2-υλο)-5-(2,3,4,6-τετρα-*O*-βενζυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)]ισοκυτοσίνη (163c)



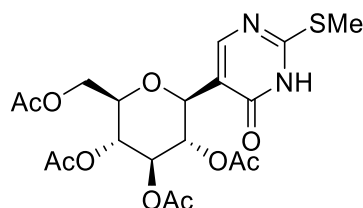
Όπως **6.2.2.7**, με 2-αμινο-ανθρακένιο (75 mg, 0.375 mmol) και θέρμανση για 12 ώρες. Μετά από χρωματογραφία (50-70% οξικός αιθυλεστέρας σε πετρελαϊκό αιθέρα) παραλήφθηκαν 227 mg (79%) προϊόν ως υπόλευκο υαλώδες στερεό. **¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆)** δ 9.29 (s, 1H), 8.57 – 8.38 (m, 3H), 8.05 (t, *J* = 8.3 Hz, 3H), 7.95 (s, 1H), 7.57 (dd, *J* = 9.1, 2.1 Hz, 1H), 7.47 (p, *J* = 6.6 Hz, 2H), 7.38 – 7.06 (m, 21H), 4.83 (s, 2H), 4.77 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 4.66 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H), 4.58 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 4.55 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H), 4.48 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H), 4.43 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H), 4.35 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H), 3.98 (t, *J* = 9.4 Hz, 1H), 3.73 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H), 3.70 – 3.52 (m, 4H). **¹³C NMR (101 MHz DMSO-*d*₆)** δ 162.0, 157.8, 151.2, 138.7, 138.4, 138.3, 138.2, 134.9, 134.5, 134.1, 133.5, 133.2, 133.1, 132.0, 131.7, 131.6, 130.5, 129.0, 128.6, 128.5, 128.2, 128.1, 128.0, 127.8, 127.7, 127.5, 127.4, 127.4, 127.4, 127.3, 127.0, 126.7, 126.6, 125.9, 125.7, 125.03, 124.98, 122.0, 115.4, 100.9, 86.2, 80.6, 78.4, 78.1, 74.5, 74.0, 73.6, 72.4, 69.1. **MS (ESI) m/z:** $[M - H]^-$ 808.35.

6.2.2.10 N^2 -[(4-Φαινυλαμινοφαινυλο)-5-(2,3,4,6-τετρα-*O*-βενζυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)]ισοκυτοσίνη (163c)



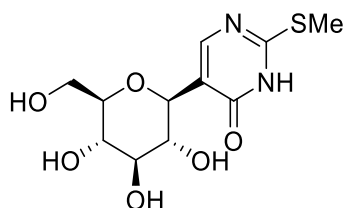
Όπως **6.2.2.7** με 4-φαινυλαμινοανιλίνη (70 mg, 0.375 mmol) και θέρμανση για 3 ώρες, οπότε η αμίνη καταναλώθηκε. Προστέθηκαν 35 mg 4-φαινυλαμινοανιλίνης κάθε φορά που παρατηρήθηκε κατανάλωση της αμίνης, μέχρι πλήρη κατανάλωση του αρχικού μορίου **79a**. Χρειάστηκαν συνολικά 207 mg (1.135 mmol) αμίνης. Μετά από χρωματογραφία (1-4% μεθανόλη σε διχλωρομεθάνιο) παραλήφθηκαν 227 mg (79%) προϊόν ως ιώδες, υαλώδες στερεό. **^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6)** δ 10.79 (s, 1H), 8.61 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.42 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.36 – 7.15 (m, 20H), 7.13 – 6.98 (m, 5H), 6.77 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 4.82 (s, 2H), 4.76 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 4.63 (d, J = 11.3 Hz, 1H), 4.57 (d, J = 10.9 Hz, 1H), 4.54 (d, J = 11.4 Hz, 1H), 4.46 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 4.41 (d, J = 11.4 Hz, 1H), 4.28 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 3.97 (t, J = 9.3 Hz, 2H), 3.70 (t, J = 8.5 Hz, 1H), 3.67 – 3.59 (m, 2H), 3.58 – 3.49 (m, 2H). **^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6)** δ 168.9, 159.6, 155.5, 152.0, 144.0, 139.1, 138.7, 138.4, 138.3, 130.7, 129.1, 128.2, 128.0, 127.8, 127.7, 127.54, 127.49, 127.41, 127.37, 127.3, 122.0, 119.1, 117.8, 115.9, 113.9, 86.3, 80.5, 78.8, 78.2, 76.9, 75.3, 74.0, 73.5, 71.2 (2C), 69.8. **MS (ESI) m/z :** $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 823.23.

6.2.2.11 5-(2,3,4,6-Τετρα-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-2-μεθυλοθειοπυριμιδιν-4(3H)-όνη (168)



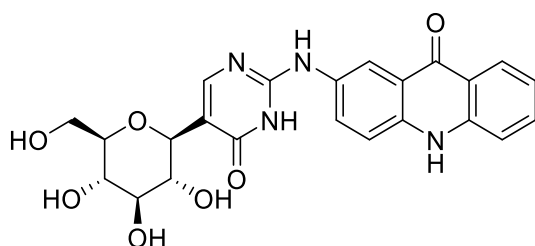
Σε διάλυμα 5-(2,3,4,6-τετρα-Ο-βενζυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-2-μεθυλοθειοπυριμιδιν-4(3H)-όνης (674 mg, 1.00 mmol) σε 5 ml άνυδρο διχλωρομεθάνιο προστέθηκε οξικός ανυδρίτης (15 ml, 1.65 mol), το μίγμα ψύχθηκε σε πάγο και προστέθηκε τριφθορομεθανοσουλφονικός τριμεθυλοσιλυλεστέρας (1.45 ml, 8 mmol) στάγδην. Το παγόλουτρο αφαιρέθηκε και το μίγμα αφέθηκε να αναδεύεται υπό αργό για 24 ώρες. Το σκουρόχρωμο μίγμα ξαναψύχθηκε και προστέθηκε στάγδην ίσος όγκος κορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου. Μετά από 30 λεπτά το μίγμα συμπυκνώθηκε υπό κενό, το υπόλειμμα διαλύθηκε σε οργανικό αιθυλεστέρα και η οργανική στοιβάδα εκπλύθηκε 3 φορές με κορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου, μία με απιονισμένο νερό και μία με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηράνθηκε υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και συμπυκνώθηκε. Το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό καθαρισμό (διχλωρομεθάνιο: οξικός αιθυλεστέρας: πετρελαϊκός αιθέρας 20:50:30) και παραλήφθηκαν 360 mg (76%) προϊόν ως λευκό στερεό. **Σ.τ.** 171-173 °C, $[\alpha]_D^{22} + 8.7^\circ$ (c = 1,00 σε διχλωρομεθάνιο). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)** δ 12.39 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 5.34 (t, J = 9.2 Hz, 1H), 5.27 (t, J = 9.5 Hz, 1H), 5.16 (t, J = 9.6 Hz, 1H), 4.70 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 4.23 (dd, J = 12.4, 4.8 Hz, 1H), 4.13 (dd, J = 12.4, 2.2 Hz, 1H), 3.81 (ddd, J = 10.2, 4.9, 2.1 Hz, 1H), 2.58 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.91 (s, 3H). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** δ 170.8, 170.4, 169.7, 163.1, 163.0, 153.8, 118.5, 76.3, 74.4, 72.5, 71.6, 68.7, 62.4, 20.9, 20.8, 20.7, 13.4. **MS (ESI) m/z:** [M + H]⁺ 472.98. **HRMS (ESI/Q-TOF) m/z:** [M + H]⁺ Θεωρητικό για C₂₀H₂₄N₂O₁₀S 473.1224, Πειραματικό 473.1212.

6.2.2.12 5-(β-D-Γλυκοπυρανοζυλο)-2-μεθυλοθειοπυριμιδιν-4(3H)-όνη (168b)



Μεθανολικό διάλυμα αμμωνίας 7N (3 ml) αφέθηκε να αντιδράσει με 5-(2,3,4,6-τετρα-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-2-μεθυλοθειοπυριμιδιν-4(3H)-όνη (100 mg, 0.212 mmol) για 16 ώρες. Στη συνέχεια το μίγμα συμπυκνώθηκε και το στερεό αιωρήθηκε σε οξικό αιθυλεστέρα και διηθήθηκε (5 φορές) ώστε να παραληφθούν 45 mg (70%) προϊόν ως υπόλευκο στερεό. **Σ.τ.** 240 °C (αποσύνθεση), **¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄)** δ 7.92 (s, 1H, *H*6), 4.27 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H, *H*1'), 3.85 (dd, *J* = 12.0, 2.1 Hz, 1H, *H*6a'), 3.70 (dd, *J* = 12.0, 5.2 Hz, 1H, *H*6b'), 3.64 (t, *J* = 9.1 Hz, 1H, *H*2'), 3.50 – 3.39 (m, 2H, *H*3',4'), 3.37 (dq, *J* = 6.7, 3.4, 2.7 Hz, 1H, *H*5'), 2.56 (s, 3H, -SMe). **¹³C NMR (101 MHz, Methanol-*d*₄)** δ 165.9, 164.3, 152.4, 121.0, 82.3, 79.9, 76.9, 74.4, 71.5, 62.9, 13.4. **MS (ESI) *m/z*:** [M + H]⁺ 305.59. **HRMS (ESI/Q-TOF) *m/z*:** [M + Na]⁺ Θεωρητικό για C₁₁H₁₆N₂O₆SN⁺ 327.0621, Πειραματικό 327.0626.

6.2.2.13 N²-(Ακριδ-9-ον-2-υλο)-5-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)ισοκυτοσίνη (170a)

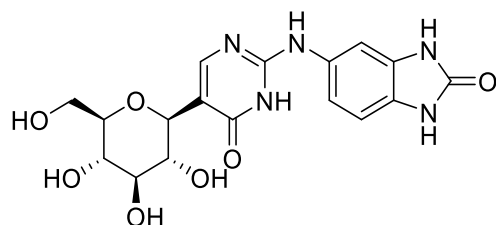


Μίγμα 5-(2,3,4,6-τετρα-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-2-μεθυλοθειοπυριμιδιν-4(3H)-όνης (100 mg, 0.212 mmol) και 4-αμινοακριδ-9-όνης (60 mg, 0.286 mmol) σε 2 ml πιβαλικού οξέος θερμάνθηκαν στους 140 °C για 4 ώρες. Στη συνέχεια το πιβαλικό οξύ απομακρύνθηκε υπό κενό αντλίας λαδιού και στο

υπόλειμμα προστέθηκαν 5 ml μεθανολικού διαλύματος αμμωνίας 7N. Μετά από 16 ώρες το κίτρινο διάλυμα συμπυκνώθηκε υπό κενό και το υπόλειμμα επαναιωρήθηκε 7 φορές σε οξικό αιθυλεστέρα και 5 σε μεθανόλη και παραλήφθηκε με φυγοκέντρηση για να παραληφθεί το προϊόν (69 mg, 61%) ως κίτρινο στερεό. **Σ.τ.** 262 °C (αποσύνθεση), $[\alpha]_D^{22} + 18.7^\circ$ (c = 1,00 σε διμεθυλοσουλφοξείδιο).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , Deuterium Oxide) δ 8.42 (s, 1H, $H1'$), 8.21 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, $H8'$), 7.86 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, $H3'$), 7.72 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, $H4'$, $H6'$), 7.53 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, $H6$, $H5'$), 7.26 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H, $H7'$), 4.08 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H, $H1''$), 3.64 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H, $H6a''$), 3.49 (t, $J = 9.2$ Hz, 1H, $H2''$), 3.42 (dd, $J = 12.0, 4.4$ Hz, 1H, $H6b''$), 3.24 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H, $H3''$), 3.20 – 3.12 (m, 2H, $H4''$, $H5''$). **^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6 , Deuterium Oxide)** δ 177.7, 164.6, 150.1, 140.9, 137.0, 133.1, 128.7, 126.4, 122.8, 120.8, 120.1, 118.4, 117.3, 115.4, 81.2, 78.6, 75.1, 71.6, 69.8, 60.1. **HRMS (ESI/Q-TOF) m/z:** [M + Na] $^+$ Θεωρητικό για $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_7\text{Na}^+$ 489.1381; Πειραματικό 489.1385

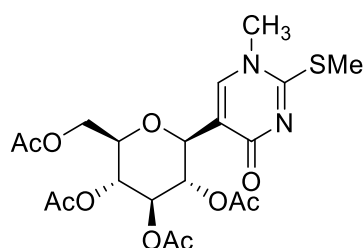
6.2.2.14 **N^2 -(1,3-Διυδρο-βενζο[d]ιμιδαζολ-2-ον-5-υλο)-5- β -D-γλυκοκυρανοζυλο)ισοκυτοσίνη (169b)**



Όπως **6.2.2.13** με 5-αμινο-1,3-διυδρο[d]βενζιμιδαζολ-2-όνη (42 mg, 0.288 mmol). Μετά την αποπροστασία πραγματοποιήθηκε χρωματογραφικός καθαρισμός (μεθανόλη:νερό:ακετονιτρίλιο:οξικός αιθυλεστέρας, 1:1:1:2) για να παραληφθούν 85 mg (87%) προϊόν ως τεφρό στερεό. **Σ.τ.** 340-345 °C (τήξη με παράλληλη αποσύνθεση), $[\alpha]_D^{22} + 1.4^\circ$ (c = 1,00 σε διμεθυλοσουλφοξείδιο). **^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6)** δ 7.66 (s, 1H, $H6$), 7.45 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, $H4'$), 6.95 (dd, $J = 8.3, 2.1$ Hz, 1H, $H6'$), 6.85 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, $H7'$), 4.09 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H, $H1''$), 3.64 (dd, $J = 11.8, 1.7$ Hz, 1H, $H6a''$), 3.37 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, $H2''$), 3.20 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, $H3''$), 3.17 – 3.05 (m, 2H, $H4''$, $H5''$).

δ 10.55 (s, 1H), 10.47 (s, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.48 (s, 1H), 6.97 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 6.84 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 4.97 – 4.83 (m, 2H), 4.41 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H), 4.11 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 3.67 (dd, $J = 11.7, 5.2$ Hz, 1H), 3.49 – 3.37 (m, 2H), 3.22 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H), 3.18 – 3.02 (m, 2H). **^{13}C NMR (101 MHz, DMSO)** δ 155.6, 155.5, 154.4, 152.8, 132.2, 129.7, 125.5, 114.8, 113.3, 108.5, 102.1, 81.2, 78.6, 74.7, 72.6, 70.4, 61.4. **HRMS (ESI/Q-TOF) m/z :** $[\text{M} + \text{H}]^+$ Θεωρητικό για $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_7^+$ 406.3745; Πειραματικό 406.1370.

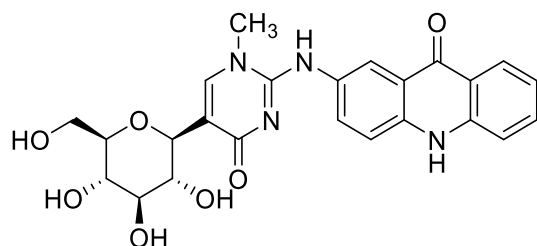
6.2.2.15 1-Μεθυλο-5-(2,3,4,6-τετρα-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-2-μεθυλοθειοπυριμιδιν-4-όνη (172)



Σε διάλυμα 5-(2,3,4,6-τετρα-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-2-μεθυλοθειοπυριμιδιν-4(3*H*)-όνης (118 mg, 0.250 mmol) σε 3 ml άνυδρο διχλωρομεθάνιο προστέθηκε διισοπροπυλοαιθυλαμίνη (90 μl, 0.06 mol). Μετά από 30 λεπτά προστέθηκε στάγδην ιωδομεθάνιο (45 μl, 0.758 mmol). Το μίγμα αφέθηκε να αναδεύεται υπό αργό για 16 ώρες. Το μίγμα αραιώθηκε με διχλωρομεθάνιο, μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη και η οργανική στοιβάδα εκπλύθηκε διαδοχικά με διάλυμα υδροχλωρίου 0.1 N και κορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου, ξηράνθηκε υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και συμπυκνώθηκε. Το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό καθαρισμό (διχλωρομεθάνιο:οξικός αιθυλεστέρας 50:50 και στη συνέχεια διχλωρομεθάνιο:μεθανόλη 90:10) και παραλήφθηκαν 92 mg (76%) το προϊόν ως λευκό στερεό. **^1H NMR (400 MHz, CDCl_3)** δ 7.34 (s, 1H), 5.35 (dd, $J = 9.8, 8.9$ Hz, 1H), 5.10 (t, $J = 9.8$ Hz, 1H), 5.06 – 4.97 (m, 1H), 4.85 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H), 4.26 (dd, $J = 12.4, 5.2$ Hz, 1H), 4.08 (dd, $J = 12.4, 2.1$ Hz, 1H), 3.82 (ddd, $J = 10.2, 5.2, 2.0$ Hz, 1H), 3.55 (s, 3H), 2.59 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.96 (s, 3H). **^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3)** δ 170.8, 170.5, 170.7, 169.9, 166.8, 164.0,

143.1, 117.7, 75.8, 74.1, 72.7, 72.1, 68.8, 62.5, 40.4, 20.9, 20.9, 20.8, 20.7, 14.8. **MS (ESI) m/z:** $[M + H]^+$ 478.27.

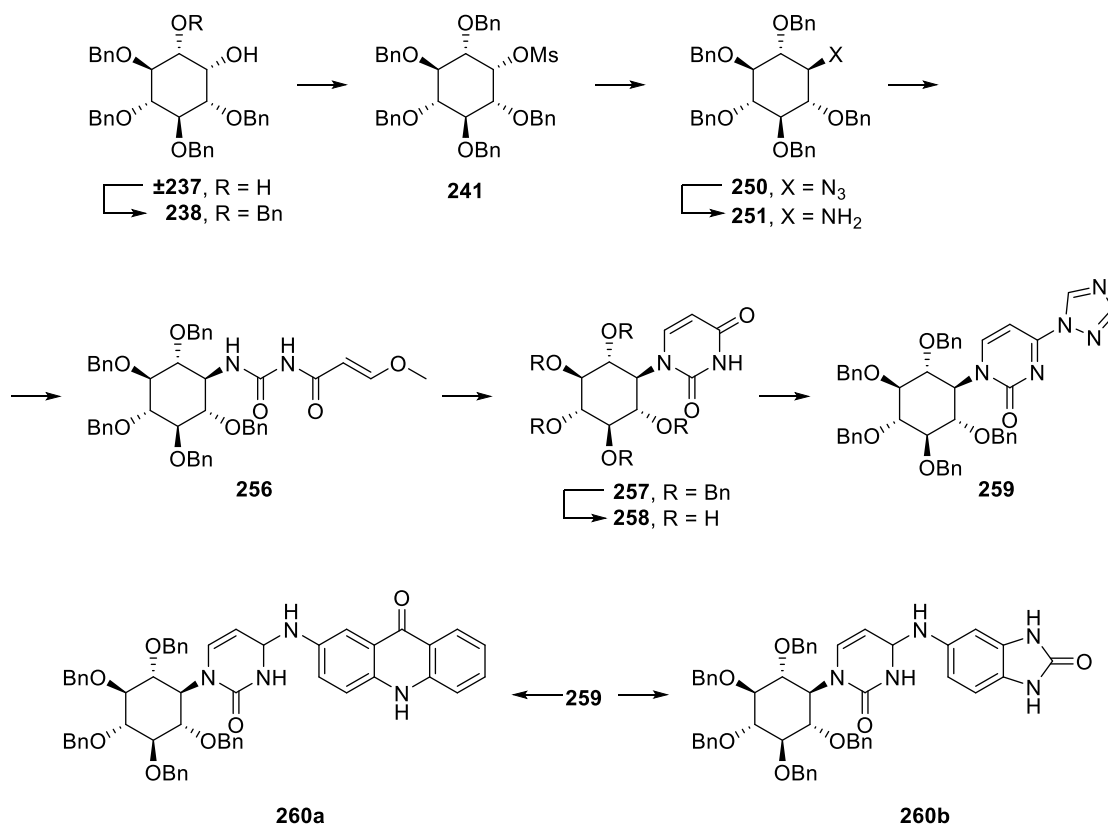
6.2.2.16 N^2 -(Ακριδ-9-ον-2-υλο)5-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-1-μεθυλο-ισοκυτοσίνη (174)



Μίγμα 1-μεθυλο-5-(2,3,4,6-τετρα-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-2-μεθυλοθειοπυριμιδιν-4(3*H*)-όνης (90 mg, 0.189 mmol) και 4-αμινοακριδ-9-όνης (52 mg, 0.246 mmol) σε 2 ml πιβαλικού οξέος θερμάνθηκαν στους 140 °C για 5 ώρες. Στη συνέχεια το πιβαλικό οξύ απομακρύνθηκε υπό κενό αντλίας λαδιού και στο υπόλειμμα προστέθηκαν 5 ml μεθανολικού διαλύματος αμμωνίας 7*N*. Μετά από 16 ώρες το κίτρινο διάλυμα συμπυκνώθηκε υπό κενό και το υπόλειμμα καθαρίστηκε μέσω παρασκευαστικής χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (φόρτωση ως διάλυμα σε διμεθυλοφορμαμίδιο. Έκλουση διαδοχικά με μεθανόλη:νερό:ακετονιτρίλιο:οξικός αιθυλεστέρας 1:1:1:8, 1:1:1:7 και 1:1:1:6. Το προϊόν παραλήφθηκε ως κίτρινο στερεό (12 mg, 13 %).

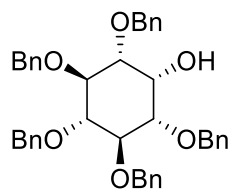
^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.28 (s, 1H), 8.22 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.72 (ddd, J = 8.5, 6.7, 1.5 Hz, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.54 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.26 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 4.14 – 4.09 (m, 1H), 3.64 (s, 1H), 3.61 – 3.56 (m, 3H), 3.43 (dd, J = 11.9, 4.8 Hz, 1H), 3.35 – 3.27 (m, 1H), 3.24 (t, J = 8.1 Hz, 1H), 3.14 (t, J = 4.1 Hz, 2H).

6.2.3 Καρβασακχαρικά παράγωγα – Παράγωγα ινοσιτόλης



Σχήμα 6.2: Συνοπτικό συνθετικό σχήμα παραγώγων ινοσιτόλης.

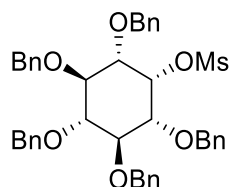
6.2.3.1 1,3,4,5,6-Πεντα-Ο-βενζυλο-μγο-ινοσιτόλη (238)



Αιώρημα ($\pm$)-3,4,5,6-τετρα-Ο-βενζυλο-μγο-ινοσιτόλης (2.70 g, 5.00 mmol) και οξειδίου του δι(*n*-βουτυλο)κασσίτερου (132 mg, 0.500 mmol) σε 50 ml άνυδρο τολουόλιο θερμάνθηκαν υπό αναρροή έως ότου διαλυθούν τα στερεά (30 λεπτά). Το διάλυμα συμπυκνώθηκε υπό κενό και το υπόλειμμα διαλύθηκε σε

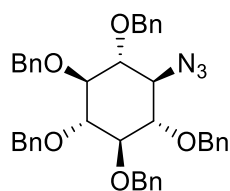
20 ml άνυδρο ακετονιτρίλιο. Προστέθηκαν ανθρακικό κάλιο (1.04 g, 7.50 mmol), βρωμιούχο τετρα-*n*-πεντυλοαμμώνιο (187 mg, 0.5 mmol) και βενζυλοβρωμίδιο (1.2 ml, 10.1 mmol) και το μίγμα θερμάνθηκε υπό αναρροή για 2 ώρες. Το μίγμα αφέθηκε να ψυχθεί, διηθήθηκε, το διήθημα συμπυκνώθηκε υπό κενό και το υπόλειμμα ανακρυσταλλώθηκε από μεθανόλη. Παραλήφθηκαν 5.93 g (94%) φασματοσκοπικά καθαρό προϊόν ως λευκό στερεό. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα συμφωνούν με τα βιβλιογραφικά όπου το ίδιο προϊόν συντέθηκε με διαφορετική μέθοδο.²⁷⁶

6.2.3.2 1,3,4,5,6-Πεντα-*O*-βενζυλο-2-*O*-μεθανοσουλφονυλο-*myo*-ινοσιτόλη (241)



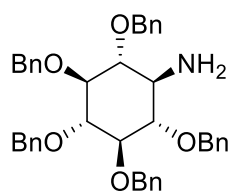
Διάλυμα 1,3,4,5,6-πεντα-*O*-βενζυλο-*myo*-ινοσιτόλης (8.94 g, 14.2 mmol) σε 70 ml άνυδρης πυριδίνης ψύχθηκαν σε παγόλουτρο και προστέθηκε στάγδην μεθανοσουλφονυλοχλωρίδιο (5.0 ml, 64.0 mmol) και το μίγμα αφέθηκε να αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 24 ώρες. Στη συνέχεια το μίγμα φέρθηκε ξανά σε πάγο, προστέθηκαν αργά συνολικά 50 ml μίγματος πάγου νερού και το μίγμα αφέθηκε να αναδεύεται για μία ώρα. Το μίγμα συμπυκνώθηκε, το υπόλειμμα διαλύθηκε σε οξικό αιθυλεστέρα και η οργανική φάση εκπλύθηκε μία φορά με υδατικό υδροχλώριο 1N, τρεις φορές με απιονισμένο νερό, μία φορά με κορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου και μία με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Η οργανική στιβάδα ξηράνθηκε υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Παραλήφθηκαν 9.87 g (98%) φασματοσκοπικά καθαρό προϊόν ως υπόλευκο στερεό. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα συμφωνούν με τα βιβλιογραφικά όπου το ίδιο προϊόν συντέθηκε με διαφορετική μέθοδο.²⁷⁷

6.2.3.3 2-Αζιδο-2-δεοξυ-1,3,4,5,6-πεντα-Ο-βενζυλο-*scyllo*-ινοσιτόλη (250)



Σε μίγμα 1,3,4,5,6-πεντα-Ο-βενζυλο-2-Ο-μεθανοσουλφονυλο-*myo*-ινοσιτόλης (1.42 g, 2.00 mmol) και νατραζιδίου (780 mg, 12.0 mmol) προστέθηκαν 15 ml άνυδρου DMF και το μίγμα θερμάνθηκε στους 90 °C για 16 h. Το μίγμα διηθήθηκε, συμπυκνώθηκε υπό κενό και το υπόλειμμα αιωρήθηκε σε οξικό αιθυλεστέρα- απιονισμένο νερό. Η οργανική στιβάδα εκπλύθηκε 5 φορές με απιονισμένο νερό και μία με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηράνθηκε υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το υπόλειμμα ανακρυσταλλώθηκε από μεθανόλη και παραλήφθηκαν 1.21 g (92 %) προϊόν ως λευκό στερεό. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα συμφωνούν με τα βιβλιογραφικά όπου το ίδιο προϊόν συντέθηκε με διαφορετική μέθοδο.²⁷⁸

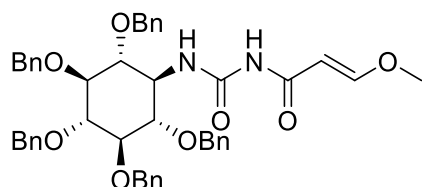
6.2.3.4 2-Αμινο-2-δεοξυ-1,3,4,5,6-πεντα-Ο-βενζυλο-*scyllo*-ινοσιτόλη (251)



Σε διάλυμα 2-αζιδο-2-δεοξυ-1,3,4,5,6-πεντα-Ο-βενζυλο-*scyllo*-ινοσιτόλης (3.00 g, 4.56 mmol) και τριφαινυλοφωσφίνης (1.80 g, 6.88 mmol) σε 70 ml τετραϋδροφουρανίου προστέθηκαν 10 ml απιονισμένο νερό και το μίγμα θερμάνθηκε στους 50 °C για 16 ώρες. Το μίγμα ψύχθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, προστέθηκαν 5 σταγόνες διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου 30% προς κατανάλωση της περίσσειας φωσφίνης και το μίγμα συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το μίγμα φορτώθηκε σε στήλη χρωματογραφίας και το προϊόν εκλούστηκε με 30-50% οξικό αιθυλεστέρα σε πετρελαϊκό αιθέρα, για να παραληφθούν 2.73 g (95%) προϊόν ως λευκό στερεό. Τα φασματοσκοπικά

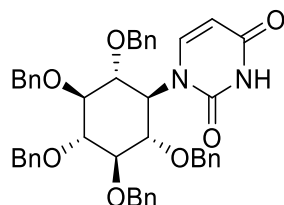
δεδομένα συμφωνούν με τα βιβλιογραφικά όπου το ίδιο προϊόν συντέθηκε με διαφορετική μέθοδο.²⁷⁸

6.2.3.5 (*E*)-3-Μεθοξυ-*N*-[(2-δεοξυ-1,3,4,5,6-πεντα-*O*-βενζυλο-*scyllo*-ινοσιτολ-2-υλο)καρβαμouλ]ακρυλαμίδιο (256)



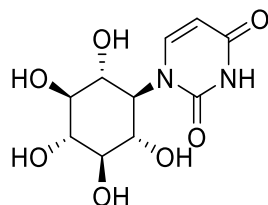
Διάλυμα 2-αμινο-2-δεοξυ-1,3,4,5,6-πεντα-*O*-βενζυλο-*scyllo*-ινοσιτόλης (630 mg, 1.00 mmol) σε 10 ml άνυδρου διχλωρομεθανίου ψύχθηκε σε παγόλουτρο και προστέθηκε ισοκυανικός 3-μεθοξυ-ακρυλικός εστέρας (2.00 mmol) ως διάλυμα σε 15 ml τολουόλιο (από το προηγούμενο βήμα). Η αντίδραση φέρθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και αφέθηκε να αναδεύεται για 16 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (TLC, 30% ακετόνη σε τολουόλιο) το μίγμα της αντίδρασης διηθήθηκε από βαμβάκι. Στο διήθημα προστέθηκαν 40 ml μεθανόλη, και το καταβυθιζόμενο ίζημα διηθήθηκε, επαναδιαλύθηκε στην ελάχιστη ποσότητα θερμού χλωροφορμίου και καταβυθίστηκε ξανά με μεθανόλη. Παραλήφθηκαν 665 mg (88%) φασματοσκοπικά καθαρό προϊόν ως λευκό στερεό. **Σ.τ.:** 180-190 °C. **¹H NMR (200 MHz, CDCl₃)** δ 10.52 (s, 1H), 9.23 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.91 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H), 7.66 – 7.30 (m, 25H), 5.62 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H), 5.26 – 4.85 (m, 10H), 4.24 (t, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.06 – 3.64 (m, 8H). **¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃)** δ 168.3, 163.1, 156.4, 138.3, 137.9, 128.5, 128.4, 128.3, 128.0, 127.9, 127.7, 97.6, 84.0, 82.7, 80.1, 77.8, 77.2, 76.5, 75.9, 57.3, 55.5. **MS (ESI) *m/z*:** [*M* + *H*]⁺ 757.33. **HRMS (ESI/Q-TOF) *m/z*:** [*M*+*H*]⁺ Θεωρητικό για C₄₆H₄₉N₂O₈⁺ 757.3483, Πειραματικό: 757.3501.

6.2.3.6 1-(2-Δεοξυ-(1,3,4,5,6-πεντα-Ο-βενζυλο)scyllo-ινοσιτολ-2-υλο)ουρακίλη (257)



Διάλυμα (*E*)-3-μεθοξυ-*N*-[(2-δεοξυ-1,3,4,5,6-πεντα-Ο-βενζυλο-*scyllo*-ινοσιτολ-2-υλο)καρβαμοϋλο]ακρυλαμιδίου (1.77 g, 2.34 mmol) και *p*-τολουολοσουλφονικού οξέος (100 mg, 0.585 g) σε 25 ml διοξανίου θερμάνθηκαν στους 80 °C για 24 ώρες. Το μίγμα εξουδετερώθηκε με στερεό ανθρακικό νάτριο, συμπυκνώθηκε και το υπόλοιπο μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη με διχλωρομεθάνιο. Η οργανική στιβάδα εκπλύθηκε 3 φορές με απιονισμένο νερό, συμπυκνώθηκε υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και συμπυκνώθηκε. Το στερεό διαλύθηκε σε θερμό χλωροφόρμιο και καταβυθίστηκε. Το στερεό διηθήθηκε και ξηράνθηκε υπό κενό και παραλήφθηκαν 1.39 g (82 %) φασματοσκοπικά καθαρό προϊόν ως λευκό στερεό. **Σ.τ.:** 161-162 °C **¹H NMR (200 MHz, CDCl₃)** δ 8.39 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.46 – 7.02 (m, 25H), 6.91 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.55 (dd, *J* = 7.9, 2.1 Hz, 1H), 4.98 (d, *J* = 10.9 Hz, 2H), 4.90 (d, *J* = 10.8 Hz, 2H), 4.87 (d, *J* = 10.8 Hz, 2H), 4.79 (d, *J* = 11.4 Hz, 2H), 4.57 – 4.39 (m, 4H), 3.70 (q, *J* = 9.8 Hz, 1H), 3.54 (t, *J* = 9.3 Hz, 2H), 3.22 (t, *J* = 10.5 Hz, 1H). **¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃)** δ 163.9, 150.6, 148.7, 138.9, 138.1, 129.24, 129.21, 128.8, 128.7, 128.5, 128.4, 101.9, 85.2, 82.9, 78.4, 76.8, 76.6, 76.2, 71.4. **MS (ESI) *m/z*:** [M+H]⁺ 725.33.

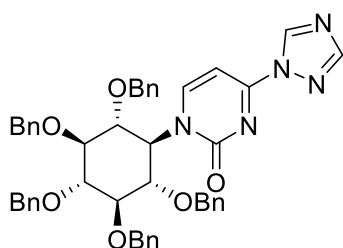
6.2.3.7 1-(2-Δεοξυ-scyllo-ινοσιτολ-2-υλο)ουρακίλη (258)



Σε διάλυμα (2-δεοξυ-1,3,4,5,6-πεντα-Ο-βενζυλο-*scyllo*-ινοσιτολ-2-υλο)ουρακίλης (120 mg, 0.166 mmol) σε 50 ml μίγματος διχλωρομεθανίου-μεθανόλης 1:4

προστέθηκε παλλάδιο σε άνθρακα 10% (40 mg) και το μίγμα αφέθηκε σε ατμόσφαιρα υδρογόνου για 16 ώρες. Το μίγμα διηθήθηκε από κελίτη, για να παραληφθεί το προϊόν σε ποσοτική απόδοση (45 mg). **Σ.τ.:** 210 °C (Αποσύνθεση). **¹H NMR (200 MHz, D₂O)** δ 7.78 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, *H*6), 5.96 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, *H*5), 4.59 (t, *J* = 10.7 Hz, 1H), 4.29 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 3.68 (t, *J* = 9.7 Hz, 1H), 3.51 (t, *J* = 8.9 Hz, 1H), 3.45 – 3.30 (m, 2H). **HRMS (ESI/Q-TOF) *m/z*:** [*M* + Na]⁺ Θεωρητικό για C₁₀H₁₄N₂NaO₇⁺ 297.0693, Πειραματικό 297.0700.

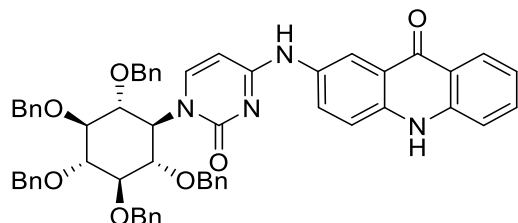
6.2.3.8 1-(2-Δεοξυ-1,3,4,5,6-πεντα-*O*-βενζυλο-*scyllo*-ινοσιτολ-2-υλο)-4-(1,2,4-τριαζολ-1-υλο)πυριμιδ-2-όνη



Σε μίγμα (2-δεοξυ-1,3,4,5,6-πεντα-*O*-βενζυλο-*scyllo*-ινοσιτολ-2-υλο)ουρακίλης (730 mg, 1.00 mmol), λειοτριβημένου 1,2,4-τριαζολίου (765 mg, 11.1 mmol) και τριαιθυλαμίνης (1.6 ml, 11.1 mmol) σε προστέθηκε στάγδην οξυχλωριούχος φωσφόρος (330 μl, 3.53 mmol). Το μίγμα αφέθηκε να αναδεύεται για 9 ώρες, αραιώθηκε με διχλωρομεθάνιο και φέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη. Η οργανική στιβάδα εκχυλίστηκε μία φορά με κορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου, τρεις φορές με απιονισμένο νερό, αποχωρίστηκε, ξηράνθηκε υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το προϊόν παραλήφθηκε ως λευκό στερεό (773 mg, ποσοτικά) και χρησιμοποιήθηκε ως έχει στο επόμενο βήμα.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 9.17 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.48 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.73 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 5.12 – 4.67 (m, 7H), 4.55 – 4.28 (m, 2H), 3.81 (q, *J* = 9.2, 8.7 Hz, 1H), 3.60 (t, *J* = 9.4 Hz, 2H), 3.40 (t, *J* = 10.4 Hz, 1H).

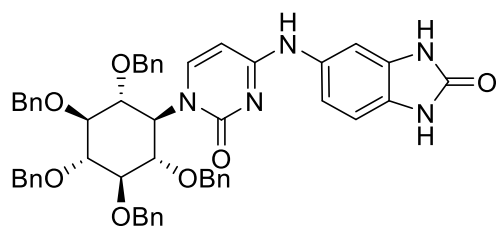
6.2.3.9 *N*⁴-(Ακριδ-9-ον-2-υλο)-1-(2-δεοξυ-(1,3,4,5,6-πεντα-*O*-βενζυλο)-*scyllo*-ινοσιτολ-2-υλο)κυτοσίνη (259)



Σε διάλυμα 1-(2-δεοξυ-1,3,4,5,6-πεντα-*O*-βενζυλο-*scyllo*-ινοσιτολ-2-υλο)– (1,2,4-τριαζολ-1-υλο)πυριμιδ-2-όνης (200 mg, 0.258 mmol) σε 0.5 ml άνυδρου DMSO σε σκεύος αντιδραστήρα μικροκυμάτων προστέθηκε 2-αμινοακριδόνη (64 mg, 0.300 mmol). Το μίγμα ακτινοβολήθηκε επαναλαμβανόμενα για 10 λεπτά στους 140 °C, 100 watt μέχρι ανάλωσης του σακχαρίτη (συνολικά 6 επαναλήψεις). Το προϊόν απομονώθηκε με επαναλαμβανόμενες καταβυθίσεις από ισοπροπανόλη, για να απομονωθούν 140 mg (59%) κίτρινο στερεό. **HRMS (ESI/Q-TOF) m/z:** [M + H]⁺ Θεωρητικό για C₅₈H₅₃N₄O₇⁺ 917.3909, Πειραματικό 917.3917.

(Στα φάσματα ¹H & ¹³C NMR της ένωσης οι κορυφές ήταν εξαιρετικά διευρυμένες, ώστε να μην προκύπτουν χρήσιμες για τον χαρακτηρισμό πληροφορίες, τόσο σε DMSO-*d*₆, όσο και σε μίγμα CDCl₃-CD₃OD)

6.2.3.10 *N*⁴-(1,3-Διυδρο-βενζο[*d*]ιμιδαζολ-2-ον-5-υλο)-1-(2-δεοξυ-(1,3,4,5,6-πεντα-*O*-βενζυλο)-*scyllo*-ινοσιτολ-2-υλο)κυτοσίνη (259)



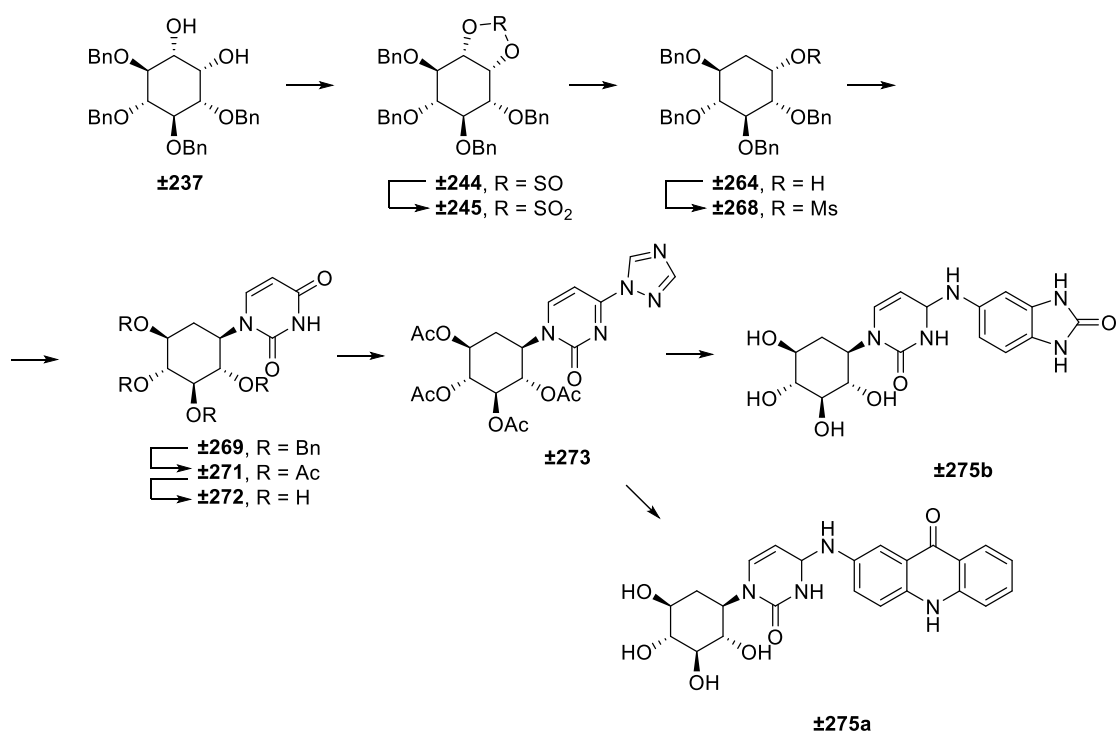
Σε διάλυμα 1-(2-δεοξυ-(1,3,4,5,6-πεντα-*O*-βενζυλο)-*scyllo*-ινοσιτολ-2-υλο)– (1,2,4-τριαζολ-1-υλο)-πυριμιδ-2-όνης (200 mg, 0.258 mmol) σε 0.5 ml άνυδρου DMSO σε σκεύος αντιδραστήρα μικροκυμάτων προστέθηκε 5-βενζιμιδαζολόνη (50 mg, 0.335 mmol). Το μίγμα ακτινοβολήθηκε επαναλαμβανόμενα για 10

λεπτά στους 140 °C, 100 watt μέχρι ανάλωσης του αρχικού (συνολικά 3 επαναλήψεις). Το προϊόν απομονώθηκε με επαναλαμβανόμενες καταβυθίσεις από ισοπροπανόλη, για να απομονωθούν 88 mg (40%) υπόλευκο στερεό.

HRMS (ESI/Q-TOF) m/z: $[M+H]^+$ Θεωρητικό για $C_{52}H_{49}N_5O_7^+$ 856.3705, Πειραματικό 856.3698.

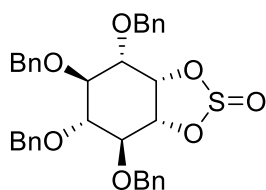
(Στα φάσματα 1H & ^{13}C NMR της ένωσης οι κορυφές ήταν εξαιρετικά διευρυμένες, ώστε να μην προκύπτουν χρήσιμες για τον χαρακτηρισμό πληροφορίες, τόσο σε DMSO- d_6 , όσο και σε μίγμα $CDCl_3$ - CD_3OD)

6.2.4 Καρβασακχαρικά παράγωγα – Παράγωγα δεοξυ-ινοσιτόλης



Σχήμα 6.3: Συνοπτική σύνθεση παραγώγων 2-δεοξυ-ινοσιτόλης.

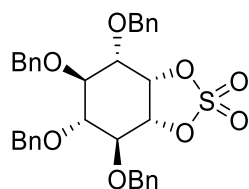
6.2.4.1 (±)-3,4,5,6-τετρα-Ο-βενζυλο-μγο-ινοσιτολ-1,2-υλο-θειώδης εστέρας (±244)



Διάλυμα (±)-3,4,5,6-τετρα-Ο-βενζυλο-μγο-ινοσιτόλης (10.8 g, 20.0 mmol) και τριαιθυλαμίνης (11.2 ml, 80.0 mmol) σε 50 ml άνυδρου διχλωρομεθανίου ψύχθηκε σε πάγο. Προστέθηκε στάγδην θειονυλοχλωρίδιο (2.2 ml, 30.0 mmol) και το μίγμα αφαιρέθηκε από τον πάγο. Μετά από 30 λεπτά το μίγμα αραιώθηκε με διχλωρομεθάνιο, μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη κι εκπλύθηκε διαδοχικά με απιονισμένο νερό, διάλυμα υδροχλωρίου 1 N, απιονισμένο νερό και κορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου. Η οργανική στιβάδα

αποχωρίστηκε, ξηράνθηκε υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Παραλήφθηκαν 11.7 g (ποσοτική αντίδραση) υποκίτρινο έλαιο ως μίγμα των *endo*- και *exo*- διαστερεομερών του προϊόντος, ελεύθερο προσμίξεων στο NMR. **¹H - 1D TOCSY NMR (400 MHz, CDCl₃) δ** 7.72 – 6.73 (m, 40H), 5.19 (dd, *J* = 6.8, 3.3 Hz, 1H, **A**), 5.01 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H, **A**), 4.96 – 4.66 (m, 16H), 4.73 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H, **B**), 4.62 (dd, *J* = 9.0, 4.2 Hz, 1H, **B**), 4.56 (dd, *J* = 9.5, 8.2 Hz, 1H, **B**), 4.09 (dd, *J* = 9.7, 6.8 Hz, 1H, **A**), 4.07 (t, *J* = 8.3 Hz, 1H, **B**), 3.91 (dd, *J* = 5.3, 3.2 Hz, 1H, **A**), 3.87 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, **A**) 3.86 (dd, *J* = 8.5, 3.8 Hz, 1H, **B**) 3.61 (dd, *J* = 9.7, 5.9 Hz, 1H, **A**), 3.48 (q, *J* = 15.6, 9.4, 8.1 Hz, 1H, **B**). **¹³C - HSQC NMR (50 MHz, CDCl₃) δ** 138.3, 138.2, 138.1 (2C), 137.8, 137.64, 137.55, 137.2, 128.5 (6C), 128.4 (8C), 128.0 (9C), 127.93 (6C), 127.85 (6C), 127.8 (5C), 127.7, 83.4 (**A**), 82.3 (2C, **A**, **B**), 82.0 (**B**), 81.8 (**B**), 81.4 (**A**), 80.5 (2C, **A**, **B**), 80.0 (2C, **A**, **B**), 78.0 (**A**), 75.8 (**A**), 75.4 (**A**), 75.3 (3C), 74.7, 74.1, 73.6 (2C), 73.1. **MS (ESI) *m/z*: [M + Na]⁺** 604.24. **HRMS (ESI/Q-TOF) *m/z*: [M+Na]⁺** Θεωρητικό για C₃₄H₃₄NaO₇S⁺ 609.1917, Πειραματικό 609.1934.

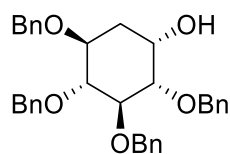
6.2.4.2 (±)-3,4,5,6-τετρα-Ο-βενζυλο-μγo-ινοσιτολ-1,2-υλο-θειικός εστέρας (±245)



Το προϊόν της προηγούμενης αντίδρασης (11.73 g, 20.0 mmol) διαλύθηκε σε μίγμα 60 ml ακετονιτριλίου και 60 ml χλωροφορμίου και φέρθηκε σε παγόλουτρο. Προστέθηκαν 90 ml απιονισμένου νερού, υπεριοδικό νάτριο (8.56 g, 40.00 mmol) και τριχλωριούχο ρουθίνιο (23 mg, 0.1 mmol) και το μίγμα αφέθηκε υπό έντονη ανάδευση για 2 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης, αποχωρίστηκε η οργανική στιβάδα, η υδατική στιβάδα επανεκχυλίστηκε με διαιθυλαιθέρα. Οι οργανικές στιβάδες εκπλύθηκαν με απιονισμένο νερό 3 φορές, ξηράνθηκαν υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου, διηθήθηκαν από silica

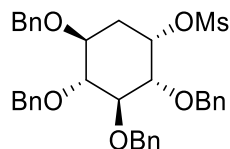
βαρύτητας προς απομάκρυνση αλάτων ρουθηνίου και το διήθημα συμπυκνώθηκε υπό κενό. Παραλήφθηκαν 11.69 g (97%) φασματοσκοπικά καθαρό προϊόν ως υπόλευκο έλαιο. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)** δ 7.43 – 6.97 (m, 20H), 5.01 (dd, *J* = 6.7, 3.2 Hz, 1H), 4.84 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 4.79 – 4.58 (m, 6H), 4.50 (s, 2H), 4.34 (dd, *J* = 9.9, 7.5 Hz, 1H), 3.81 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 3.77 (dd, *J* = 5.7, 3.1 Hz, 1H), 3.46 (dd, *J* = 9.9, 5.9 Hz, 1H). **¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃)** δ 137.9, 137.5, 137.4, 136.9, 128.7(2C), 128.6(2C), 128.52(2C), 128.49(2C), 128.3, 128.19(2C), 128.16, 128.10(2C), 128.05, 128.0(2C), 127.9(3C), 84.03, 80.73, 79.74, 79.66, 79.50, 74.92, 74.84, 74.75, 73.97, 73.70. **MS (ESI) *m/z*: [M + Na]⁺ 625.24.****HRMS (ESI/Q-TOF) *m/z*: [M + Na]⁺** Θεωρητικό για C₃₄H₃₄O₈NaS⁺ 625.1867, Πειραματικό 625.1889.

6.2.4.3 (±)-1-Δεοξυ-3,4,5,6-τετρα-Ο-βενζυλο-μυο-ινοσιτόλη (±264)



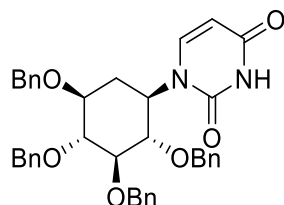
Διάλυμα (±)-3,4,5,6-τετρα-Ο-βενζυλο-μυο-ινοσιτολ-1,2-υλο-θειικού εστέρα (17.16 g, 28.5 mmol) σε 140 ml άνυδρου τετραϋδροφουρανίου ψύχθηκε σε πάγο και προστέθηκε σταδιακά βοριοϋδρίδιο του τετρα-κ-βουτυλαμμωνίου (7.33 g, 28.50 mmol) σε συνολικά 5 προσθήκες. Το μίγμα θερμάνθηκε στους 40 °C για 16 ώρες. Στο διάλυμα προστέθηκαν αργά (αφρισμός) 140 ml υδατικού θειικού οξέος 2N. Το μίγμα θερμάνθηκε στους 55 °C για 20 ώρες, έως ότου δεν παρατηρούνταν κηλίδες στη γραμμή βάσης του TLC (30% οξικός αιθυλεστέρας σε πετρελαϊκό αιθέρα). Το τετραϋδροφουράνιο συμπυκνώθηκε υπό κενό, προστέθηκαν 200 ml διχλωρομεθάνιο και το μίγμα μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη. Η οργανική στοιβάδα εκπλύθηκε τρεις φορές με υδατικό θειικό οξύ 2N, μία με απιονισμένο νερό και ξηράνθηκε υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου. Το διάλυμα συμπυκνώθηκε υπό κενό. Παραλήφθηκαν 13.5 g (87%) προϊόν ικανοποιητικής καθαρότητας ως υποκίτρινο, παχύρρευστο έλαιο. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα συμφωνούν με τα βιβλιογραφικά όπου το ίδιο προϊόν συντέθηκε με διαφορετική μέθοδο.²⁴⁵

6.2.4.4 (±)-1-Δεοξυ-2-Ο-μεθανοσουλφονυλο-3,4,5,6-τετρα-Ο-βενζυλο-*myo*-ινοσιτόλη (±268)



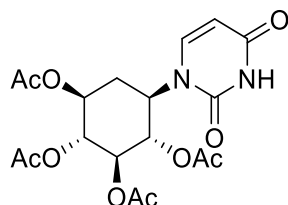
Διάλυμα (±)-1-δεοξυ-3,4,5,6-τετρα-Ο-βενζυλο-*myo*-ινοσιτόλης (8.94 g, 14.2 mmol) σε 70 ml άνυδρης πυριδίνης ψύχθηκαν σε παγόλουτρο και προστέθηκε στάγδην μεθανοσουλφονυλοχλωρίδιο (5.0 ml, 64.0 mmol) και το μίγμα αφέθηκε να αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 24 ώρες. Στη συνέχεια το μίγμα φέρθηκε ξανά σε πάγο, προστέθηκαν αργά συνολικά 50 ml μίγματος πάγου νερού και το μίγμα αφέθηκε να αναδεύεται για μία ώρα. Το μίγμα συμπυκνώθηκε, το υπόλειμμα διαλύθηκε σε οξικό αιθυλεστέρα και η οργανική φάση εκπλύθηκε μία φορά με υδατικό υδροχλώριο 1N, τρεις φορές με απιονισμένο νερό, μία φορά με κορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου και μία με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Η οργανική στιβάδα ξηράνθηκε υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Παραλήφθηκαν 9.87 g (98%) φασματοσκοπικά καθαρό προϊόν ως λευκό στερεό. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)** δ 7.34 (q, *J* = 5.8 Hz, 20H), 5.18 (t, *J* = 3.9 Hz, 1H), 4.97 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 4.89 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 4.89 (s, 2H), 4.78 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 4.72 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H), 4.71 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H), 4.67 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 3.92 (ddd, *J* = 11.6, 9.6, 4.8 Hz, 1H), 3.83 (t, *J* = 9.4 Hz, 1H), 3.64 – 3.42 (m, 2H), 2.97 (s, 2H), 2.50 (dt, *J* = 14.4, 4.4 Hz, 1H), 1.57 (t, *J* = 12.7 Hz, 1H). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** δ 138.8, 138.6, 138.3, 137.5, 128.6(2C), 128.54(2C), 128.46(4C), 128.3(2C), 128.2, 128.1(2C), 128.0(2C), 127.9(2C), 127.85, 127.76, 127.7, 85.5, 81.2, 80.7, 77.5, 77.4, 77.2, 76.84, 76.75, 76.1, 75.9, 73.5, 73.2, 39.0, 32.7.

6.2.4.5 1-(6-Δεοξυ-2,3,4,5-τετρα-O-βενζυλο)-DL-*chiro*- ινοσιτολυλο)ουρακίλη (±269)



Σε αιώρημα ουρακίλης (112 mg, 1.00 mmol) σε in 2.5 ml άνυδρου διμεθυλοφορμαμιδίου προστέθηκε DBU (111 μl, 0.750 mmol) κι αφέθηκε να αναδεύεται για 30 λεπτά στους 40 °C. Στη συνέχεια προστέθηκε (±) 1-δεοξυ-2-O-μεθανοσουλφονυλο-3,4,5,6-τετρα-O-βενζυλο-*myo*-ινοσιτόλη (262 mg, 0.500 mmol) και το μίγμα θερμάνθηκε στους 120 °C για 16 ώρες. Το μίγμα συμπυκνώθηκε υπό κενό αντλίας λαδιού, το υπόλειμμα διαλύθηκε σε διχλωρομεθάνιο, μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη κι εκπλύθηκε 2 φορές με υδατικό υδροχλώριο 1M, μία με κορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου και μία φορά με απιονισμένο νερό. Η οργανική στοιβάδα ξηράνθηκε υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (40-70% EtOAc σε διχλωρομεθάνιο) και απομονώθηκαν 247 mg (40%) ως λευκό στερεό. **Σ.τ.:** 121-123 °C. **¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 100°C)** δ 10.76 (s, 1H), 7.67 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.38 – 7.19 (m, 18H), 7.13 – 7.06 (m, 2H), 5.49 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.87 (t, *J* = 11.4 Hz, 2H), 4.78 (dd, *J* = 11.3, 5.8 Hz, 2H), 4.70 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H), 4.68 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H), 4.60 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H), 4.42 (s, 1H), 4.40 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H), 4.00 (t, *J* = 9.3 Hz, 1H), 3.67 (s, 1H), 3.65 – 3.56 (m, 2H), 2.20 (dt, *J* = 12.4, 4.4 Hz, 1H), 1.97 (q, *J* = 12.7, 12.0 Hz, 1H). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆, 100°C)** δ 162.2, 150.6, 142.7 (HSQC), 138.4, 138.27, 138.25, 137.8, 127.6(2C), 127.51(4C), 127.45(2C), 127.0(2C), 126.9(2C), 126.84, 126.81, 126.74(2C), 126.72, 126.68, 126.6, 100.9, 84.0, 83.1, 79.9, 77.1, 74.0, 73.8, 73.2, 70.8, 30.5. **MS (ESI) *m/z*:** [M+H]⁺ 619.37.

6.2.4.6 1-(6-Δεοξυ-2,3,4,5-τετρα-O-ακετυλο-DL-*chiro*- ινοσιτολυλο)ουρακίλη (± 271)

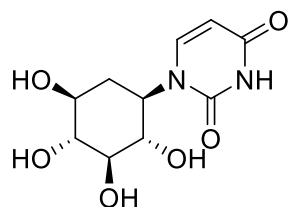


Σε διάλυμα 1-(6-δεοξυ-2,3,4,5-τετρα-O-βενζυλο-DL-*chiro*-ινοσιτολυλο)ουρακίλης (619 mg, 1.00 mmol) σε 5 ml άνυδρο διχλωρομεθάνιο προστέθηκε οξικός ανυδρίτης (15 ml, 1.65 mol), το μίγμα ψύχθηκε σε πάγο και προστέθηκε τριφθορομεθανοσουλφονικός τριμεθυλοσιλυλοεστέρας (1.45 ml, 8 mmol) στάγδην. Το παγόλουτρο αφαιρέθηκε και το μίγμα αφέθηκε να αναδεύεται υπό αργό για 24 ώρες. Το σκουρόχρωμο μίγμα ξαναψύχθηκε και προστέθηκε στάγδην ίσος όγκος κορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου. Μετά από 30 λεπτά το μίγμα συμπυκνώθηκε υπό κενό, το υπόλειμμα διαλύθηκε σε οργανικό αιθυλεστέρα και η οργανική στοιβάδα εκπλύθηκε 3 φορές με κορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου, μία με απιονισμένο νερό και μία με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηράνθηκε υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και συμπυκνώθηκε. Το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό καθαρισμό (40-70% οξικός αιθυλεστέρας σε διχλωρομεθάνιο).

Τα κλάσματα με μίγμα του επιθυμητού προϊόντος ± 271 και του μονοβενζυλιωμένου παραπροϊόντος ± 271 διαλύθηκαν σε μίγμα 1/2 μεθανόλης-διχλωρομεθανίου, προστέθηκε καταλύτης Pd(OH)₂/C (5%, 30 mg) και το μίγμα υδρογονώθηκε σε ατμοσφαιρική πίεση για 48 ώρες. Ο καταλύτης απομακρύνθηκε με διήθηση, το διάλυμα συμπυκνώθηκε και το υπόλειμμα διαλύθηκε σε 1 ml άνυδρης πυριδίνης. Προστέθηκε οξικός ανυδρίτης και καταλυτική ποσότητα DMAP. Μετά από 16 ώρες, το μίγμα συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού σε κενό αντλίας λαδιού. Το υπόλειμμα διαλύθηκε σε διχλωρομεθάνιο, μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη κι εκπλύθηκε μία φορά υδατικό υδροχλώριο 1M, μία με κορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου και μία φορά με απιονισμένο νερό. Η οργανική στοιβάδα ξηράνθηκε υπεράνω

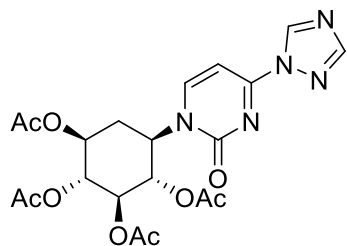
άνυδρου θειικού νατρίου και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Παραλήφθηκαν συνολικά 261 mg (61%) προϊόν **±271** ως λευκό στερεό. **Σ.τ.:** 174-179 °C. **¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 100°C)** δ 10.86 (s, 1H), 7.73 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.55 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.52 (dd, *J* = 10.7, 8.9 Hz, 1H), 5.30 – 5.22 (m, 2H), 5.19 – 5.08 (m, 1H), 4.84 (t, *J* = 11.6 Hz, 1H), 2.31 (q, *J* = 12.7, 12.3 Hz, 1H), 2.14 (dt, *J* = 12.3, 4.8 Hz, 1H), 1.98 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 1.95 (s, 3H), 1.89 (s, 3H). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆, 100°C)** δ 168.6(2C), 168.5, 168.4, 162.1, 150.31, 101.25, 71.8, 71.0, 70.6, 68.5, 68.1, 29.5, 19.8, 19.6, 19.5, 19.4. **MS (ESI):** [M-H]⁻ 425.22.

6.2.4.7 1-(6-Δεοξυ-DL-*chiro*-ινοσιτολυλο)ουρακίλη (**±272**)



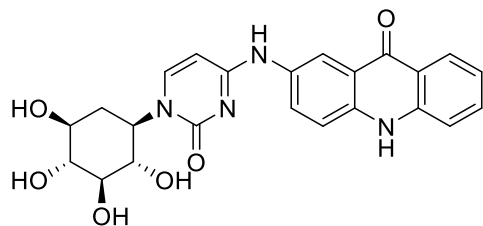
Ποσότητα 1-(6-Δεοξυ-(2,3,4,5-τετρα-*O*-ακετυλο)-DL-*chiro*-ινοσιτολυλο)-ουρακίλης (60 mg, 0.141 mmol) φέρθηκε σε 5 ml μεθανολικού διαλύματος αμμωνίας 7N. Μετά από 16 ώρες, ο διαλύτης συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το υπόλειμμα επαναιωρήθηκε 7 φορές σε οξικό αιθυλεστέρα παραλήφθηκε με φυγοκέντρηση για να παραληφθούν 23 mg (63 %) προϊόν **±272** ως υπόλευκο στερεό. **Σ.τ.:** 190 °C (Αποσύνθεση). **¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, D₂O, 100 °C)** δ 7.53 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, *H*5), 5.53 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, *H*6), 4.12 (ddd, *J* = 12.7, 10.6, 4.2 Hz, 1H, *H*3'), 3.60 (ddd, *J* = 10.6, 6.2, 2.6 Hz, 1H, *H*4'), 3.37 (dddd, *J* = 11.1, 8.9, 4.9, 2.7 Hz, 1H, *H*1'), 3.11 – 3.09 (m, 2H, *H*5',6'), 1.85 (dt, *J* = 12.3, 4.5 Hz, 1H, *H*2a'), 1.73 (q, *J* = 12.3 Hz, 1H, *H*2b'). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆, D₂O, 100 °C)** δ 162.8, 150.9, 142.8, 100.8, 76.8, 75.5, 71.68, 69.2, 55.5, 34.0. **MS (ESI) *m/z*:** [M+H]⁺ 256.83.

6.2.4.8 1-(6-Δεοξυ-2,3,4,5-τετρα-Ο-ακετυλο-DL-*chiro*-ινοσιτολυλο)-4-(1,2,4-τριαζολ-1-υλο)πυριμιδ-2-όνη (±273)



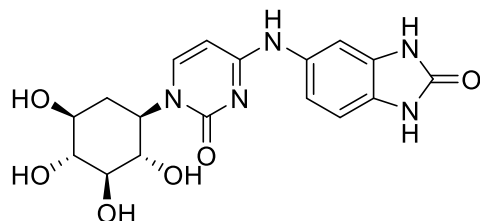
Σε μίγμα 1-(6-δεοξυ-2,3,4,5-τετρα-Ο-βενζυλο)-DL-*chiro*-ινοσιτολυλο)ουρακίλης (310 mg, 0.500 mmol), λειοτριβημένου 1,2,4-τριαζολίου (345 mg, 5.00 mmol) και τριαιθυλαμίνης (700 μl, 5.00 mmol) σε 4 ml άνυδρου διοξάνιου προστέθηκε στάγδην οξυχλωριούχος φωσφόρος (140 μl, 1.50 mmol). Το μίγμα αφέθηκε να αναδεύεται για 6 ώρες, εξουδετερώθηκε με κορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου και το διοξάνιο συμπυκνώθηκε υπό κενό. Η υδατική φάση εκχυλίστηκε με μίγμα διχλωρομεθανίου/ οξικού αιθυλεστέρα 5/2 και η οργανική στιβάδα εκπλύθηκε τρεις φορές με απιονισμένο νερό, αποχωρίστηκε, ξηράνθηκε υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Παραλήφθηκαν 232 mg (97%) φασματοσκοπικά καθαρό προϊόν ως λευκό στερεό που χρησιμοποιήθηκε στο επόμενο βήμα ως έχει. **¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 100 °C)** δ 9.31 (s, 1H), 8.56 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 8.31 (s, 1H), 6.95 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 5.69 (ddt, *J* = 12.3, 8.3, 4.2 Hz, 1H), 5.39 – 5.27 (m, 2H), 5.27 – 5.03 (m, 2H), 2.42 (t, *J* = 12.4 Hz, 1H), 2.26 (dt, *J* = 12.2, 4.8 Hz, 1H), 1.991 (s, 3H), 1.987 (s, 3H), 1.96 (s, 3H), 1.84 (s, 3H). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆, 100 °C)** δ 168.7, 168.64, 168.61, 168.4, 158.2, 153.5, 151.0, 143.0, 93.7, 71.8, 70.5, 67.5, 29.7, 19.8, 19.6, 19.4, 19.3.

6.2.4.9 *N*⁴-(Ακριδ-9-ον-2-υλο)-1-(6-δεοξυ-DL-*chiro*-ινοσιτολυλο)κυτοσίνη (±275a)



Μίγμα 1-(6-δεοξυ-2,3,4,5-τετρα-*O*-ακετυλο-DL-*chiro*-ινοσιτολυλο)-4-(1,2,4-τριαζολ-1-υλο)πυριμιδ-2-όνης (100 mg, 0.212 mmol) και 2-αμινοακριδ-9-όνης (60 mg, 0.286 mmol) σε 2 ml πιβαλικού οξέος θερμάνθηκαν στους 140 °C για 4 ώρες. Στη συνέχεια το πιβαλικό οξύ απομακρύνθηκε υπό κενό αντλίας λαδιού και στο υπόλειμμα προστέθηκαν 5 ml μεθανολικού διαλύματος αμμωνίας 7N. Μετά από 16 ώρες το κίτρινο διάλυμα συμπυκνώθηκε υπό κενό και το υπόλειμμα επαναιωρήθηκε 7 φορές σε οξικό αιθυλεστέρα και 3 σε μεθανόλη και παραλήφθηκε με φυγοκέντρηση για να παραληφθούν 69 mg (61%) προϊόν **±275a** ως κίτρινο στερεό. **Σ.τ.:** 256-259. °C. **¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, D₂O, 100 °C)** δ 8.47 (s, 1H, *H*1'), 8.24 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, *H*8'), 8.12 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.68 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, *H*3'), 7.64 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, *H*4', *H*6'), 7.53 (dd, *J* = 8.9, 3.6 Hz, 2H, *H*5, *H*5'), 7.23 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, *H*7'), 5.99 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, *H*6), 4.27 (t, *J* = 10.1 Hz, 1H, *H*3''), 3.69 (t, *J* = 8.7 Hz, 1H, *H*4''), 3.50 – 3.29 (m, 1H, *H*1''), 3.18 – 3.11 (m, 2H, *H*5'', 6''), 1.91 (dt, *J* = 12.6, 4.5 Hz, 1H, *H*2a''), 1.72 (q, *J* = 12.1 Hz, 1H, *H*2b''). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆, D₂O, 100 °C)** δ 176.7, 161.5, 155.8, 143.4, 140.5, 137.2, 133.0, 128.0, 125.9, 120.8, 120.5, 120.0, 117.4, 117.1, 116.5, 94.7, 77.0, 75.8, 72.0, 69.4, 56.5, 34.6. **MS (ESI)** ***m/z*:** [M + H]⁺ 451.15.

6.2.4.10 *N*⁴-(1,3-Διυδρο-βενζο[*d*]ιμιδαζολ-2-ον-5-υλο)-1-(6-δεοξυ-DL-*chiro*-ινοσιτολυλο)κυτοσίνη (±275b)



Όπως **6.2.1.9** με 5-αμινο-1,3-διυδρο[*d*]βενζιμιδαζολ-2-όνη (1.3 eq). Μετά την αποπροστασία πραγματοποιήθηκε χρωματογραφικός καθαρισμός (μεθανόλη : νερό : ακετονιτρίλιο : οξικός αιθυλεστέρας 2 : 2 : 2 : 4) για να παραληφθεί το προϊόν ως τεφρό στερεό (45 mg, 54%). **Σ.τ.:** 290 °C (Αποσύνθεση). **¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, D₂O, 100 °C)** δ 7.57 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.52 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.08 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 1H), 6.86 (dd, *J* = 8.3, 0.5 Hz, 1H), 5.88 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 4.24 (ddd, *J* = 14.4, 11.4, 4.0 Hz, 1H, *H*3''), 3.65 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, *H*4''), 3.44 – 3.33 (m, 1H, *H*1''), 3.14 – 3.09 (m, 2H, *H*5'', 6''), 1.87 (dt, *J* = 12.3, 4.4 Hz, 1H, *H*2a''), 1.69 (q, *J* = 12.2 Hz, 1H, *H*2b''). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆, D₂O, 100 °C)** δ 162.9, 160.5, 155.3, 142.7, 131.7, 129.4, 125.6, 113.5, 107.8, 102.5, 93.9, 76.8, 75.6, 71.8, 69.2, 56.7, 34.5. **MS (ESI) *m/z*:** [*M* + *H*]⁺ 390.15.

6.3 Κινητικά πειράματα

Για τα κινητικά πειράματα χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά αντιδραστήρια και RMGP που απομονώθηκε από μυϊκό ιστό κουνελιού στο εργαστήριο της Κύριας Ερευνήτριας κας Ευαγγελίας Χρυσίνα στο ΕΙΕ. Οι σταθερές αναστολές μετρήθηκαν από τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Διονύση Νεόφυτο σύμφωνα με γνωστό πρωτόκολλο.^{256,257}

6.4 Βιολογικά πειράματα

Τα πειράματα κυτταροτοξικότητας και συσσώρευσης γλυκογόνου πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο της αν. καθηγήτριας κας Παναγιώτας Παπαζαφείρη στον Τομέα Φυσιολογίας Ανθρώπου στο τμήμα Βιολογίας του ΕΚΠΑ. Για τα βιολογικά πειράματα χρησιμοποιήθηκαν εμπορικές κυτταρικές σειρές και θρεπτικά υλικά.

Η σειρά πειραμάτων με τους αναστολές με δομή *N*-γλυκοζίτη πραγματοποιήθηκε από τον συγγράφοντα με τη βοήθεια της κας Παπαζαφείρη και της μεταπτυχιακής φοιτήτριας κας Αθηνάς Σαμαρά.

Οι επιλεγμένες κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν αρχικά σε τρυβλίο 10 cm με θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) με 10% βόειο εμβρυακό ορό (Fetal Bovine Serum, FBS) και μίγμα αντιβιοτικών (100 U/ml πενικιλίνη, 100 μg/ml στρεπτομυκίνη). Μετά από θρυψινοποίηση (0.25%, 1 mM EDTA) τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε τρυβλίο 96 βοθρίων στο ίδιο θρεπτικό. Μετά την επιτυχή προσκόλληση των κυττάρων στα βοθρία (24 ώρες), το θρεπτικό ανανεώθηκε και στα κύτταρα χορηγήθηκε με διαδοχικές αραιώσεις με θρεπτικό υλικό, ο εκάστοτε αναστολέας ως διάλυμα 1% σε DMSO. Μετά την πάροδο της περιόδου επώασης (24, 48, 72 ώρες) τα κύτταρα επώαστηκαν με MTT για 4 ώρες, το θρεπτικό υλικό απορρίφθηκε και προστέθηκε DMSO προς διαλυτοποίηση της χρωστικής. Μετά από ανάδευση 10 λεπτών, η απορρόφηση των βοθρίων μετρήθηκε σε plate reader στα 545 nm.

Η δεύτερη σειρά πειραμάτων με τα *C*-γλυκοζιτικά και καρβοκυκλικά παράγωγα πραγματοποιήθηκε από την υπ. διδ. Κα Μαρία Πάσχου, ακολουθώντας το

παραπάνω πρωτόκολλο κι εφαρμόζοντας επώαση με τα μόρια για 48 ώρες. Η χορήγηση των φαρμάκων συνοδεύτηκε από αλλαγή του θρεπτικού μέσου σε DMEM με 1% FBS.

Για την ποσοτικοποίηση γλυκογόνου οι συνθήκες καλλιέργειας ήταν ίδιες με τις συνθήκες για τη βιωσιμότητα (MTT). Χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία καλλιέργειας διαμέτρου 10εκ. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν αντιστοιχούσαν στις τιμές IC_{50} για την εκάστοτε ένωση, και συγκέντρωση 200 μM για τις ενώσεις για τις οποίες δεν ήταν δυνατός ο καθορισμός IC_{50} .

Με τη συμπλήρωση 48 ωρών, τα κύτταρα και το υπερκείμενο θρεπτικό συλλέχθηκαν και με τη χρωστική trypan blue μετρήθηκαν τα νεκρά/ζωντανά κύτταρα. Σε όλες τις περιπτώσεις, μετρήθηκαν 3-7% νεκρά κύτταρα, επιβεβαιώνοντας την κυτταροστατική δράση των ενώσεων. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν και το ίζημα χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση γλυκογόνου με τη μέθοδο της «φαινόλης».²⁶⁷ Εν συντομία, τα κύτταρα διαλυτοποιήθηκαν με διάλυμα καυστικού καλίου 30% για 20 λεπτά στους 95 °C και προστέθηκε αιθανόλη. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε και στο ξηρό υπόλειμμα προστέθηκαν υδατικό θειικό οξύ και φαινόλη, προς υδρόλυση του γλυκογόνου και συμπλοκοποίηση της παραγόμενης γλυκόζης. Μετά από επώαση στους 95 °C για 20 λεπτά μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα στα 492 nm. Η ποσοτικοποίηση έγινε με βάση καμπύλη αναφοράς που χαράχτηκε από δείγματα με γνωστή περιεκτικότητα σε γλυκόζη.

Συντμήσεις, αρκτικόλεξα και ακρωνύμια

ΣΔΤ1	Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1
ΣΔΤ2	Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2
Ac	Acetyl - Ακέτυλο
AIBN	Azo-bis(isobutylnitrile) - Αζω-δισ(ισοβουτυρονιτριλιο)
AMP	Adenosine Monophosphate - Μονοφωσφορική αδενοσίνη
ATP	Adenosine Triphosphate - Τριφωσφορική αδενοσίνη
Bn	Benzyl - Βένζυλο
Bu	Butyl - Βούτυλο
Bz	Benzoyl - Βενζόυλο
Camph	Camphanoyl - Καμφανόυλο
CDI	Carbonyldiimidazole - Καρβονυλοδιιμιδαζόλιο
COVID-19	Corona Virus Disease 2019 - Ασθένεια Κορονοϊού 2019
Cp	Cyclopentadienyl – Κυκλοπενταδιένυλο
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene - 1,8-διαζαδικυκλο[5.4.0]ενδεκάνιο
DCM	Dichloromethane - Διχλωρομεθάνιο
DIAD	Di(isopropyl) azadicarboxylate - Αζαδικαρβοξυλικός διισοπροπυλεστέρας
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamine - <i>N,N</i> -δισοπροπυλαιθυλαμίνη
DMAP	4 – Dimethylaminopyridine - 4 - Διμεθυλαμινοπυριδίνη
DMDO	Dimethyldioxirane - Διμεθυλοδιοξιράνιο
DMF	<i>N,N'</i> -dimethylformamide – <i>N,N'</i> -Διμεθυλοφορμαμίδιο
DMP	2,2-Dimethoxypropane - 2,2-Διμεθοξυπροπάνιο
DMSO	Dimethylsulfoxide - Διμεθυλοσουλφοξείδιο
EOM	Ethoxymethyl - Αιθοξυμέθυλο
Et	Ethyl – Αίθυλο
G-1-P	Glucose-1-Phosphate - 1-φωσφορική γλυκόζη
G-6-P	Glucose-6-Phosphate - 6-φωσφορική γλυκόζη
GLP-1	Glucagon-like Peptide 1 - Γλουκαγονομιμητικό πεπτίδιο-1
GLUT	Glucose Transporter - Μεμβρανικός μεταφορέας γλυκόζης

GP	Glycogen Phosphorylase - Φωσφορυλάση του γλυκογόνου
GSH	Glutathione - Γλουταθειόνη
HMBC	Homonuclear Multiple Bond Correlation – Ομοπυρηνικός συσχετισμός πολλαπλών δεσμών
HMDS	Hexamethyldisilazane - Εξαμεθυλοδισιλαζάνιο
Me	Methyl – Μέθυλο
m-CPBA	Meta-Chloroperoxybenzoic acid - <i>meta</i> -χλωροϋπερβενζοϊκό οξύ
MOM	Methoxymethyl – Μεθοξυμέθυλο
Ms	Mesyl – Μέσυλο
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide – Βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλτετραζόλιο
MW	Microwave radiation - Μικροκυματική ακτινοβολία
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate - φωσφορικό νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο
NBS	<i>N</i> -Bromosuccinimide - <i>N</i> -βρωμοσουκκινιμίδιο
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy – Φασματοσκοπία πυρηνικού φαινομένου Overhauser
PCC	Pyridinium Chlorochromate – Χλωροχρωμική Πυριδίνη
PE	Πετρελαϊκός αιθέρας
Piv	Pivaloyl - Πιβαλόυλο (τριμεθυλοακέτυλο)
PMP	<i>Paramethoxyphenyl</i> – <i>para</i> -μεθοξυβένυλο
Pn	Pentyl - Πέντυλο
PPA	Polyphosphoric Acid - Πολυφωσφορικό οξύ
Pr	Propyl – Πρόπτυλο
PYGB	Glycogen Phosphorylase, Brain Associated - Εγκεφαλική φωσφορυλάση του γλυκογόνου
PYGL	Glycogen Phosphorylase, Liver Associated - Ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου
PYGM	Glycogen Phosphorylase, Muscle Associated - Μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου
RMGP _b	Rabbit Muscle Glycogen Phosphorylase <i>b</i> - Φωσφορυλάση του γλυκογόνου <i>b</i> , από μυϊκό ιστό κουνελιού
ROS	Reactive Oxygen Species - Δραστικές μορφές οξυγόνου
r.t	Room Temperature - Θερμοκρασία δωματίου
SGLT	Sodium-Glucose co-Transporters - Συμμεταφορείς νατρίου-γλυκόζης
THF	Tetrahydrofuran - Τετραϋδροφουράνιο

TBAI	Tetra-n-butylammonium iodide - Ιωδιούχο τετρα-n-βουτυλαμμώνιο
TBS	<i>Tert</i> -butyl-trimethylsilyl - Τετ-βουτυλο-τριμεθυλοσίλυλο
TES	Triethylsilyl – Τριαιθυλοσίλυλο
Tf	Trifluoromethanesulfonyl – τριφθορομεθανοσουλφόνυλο
TLC	Thin Layer Chromatography - Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας
TMS	Trimethylsilyl – Τριμεθυλοσίλυλο
TMSOTf	Trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate - Τριφθορομεθανοσουλφονικός τριμεθυλοσιλυλοεστέρας
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy – Φασματοσκοπία Πλήρους Συσχέτισης

Αναφορές

- (1) Komoda, T.; Matsunaga, T. Glycogen Metabolism Metabolic Pathways in the Human Body. In *Biochemistry for Medical Professionals*; Elsevier, 2015; pp 25–63. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801918-4.00004-9>.
- (2) Oikonomakos, N. G.; Somsák, L. Advances in Glycogen Phosphorylase Inhibitor Design. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2008**, 9 (4), 379–395.
- (3) Μαμάης, Μ. Σύνθεση, Κινητική Και Κρυσταλλογραφική Μελέτη Δυνάμει Αναστολέων Της Φωσφορυλάσης Του Γλυκογόνου., Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2015.
- (4) Shulman, R. G.; Rothman, D. L. The “Glycogen Shunt” in Exercising Muscle: A Role for Glycogen in Muscle Energetics and Fatigue. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, 98 (2), 457–461. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.2.457>.
- (5) Bak, L. K.; Walls, A. B.; Schousboe, A.; Waagepetersen, H. S. Astrocytic Glycogen Metabolism in the Healthy and Diseased Brain. *J. Biol. Chem.* **2018**, 293 (19), 7108–7116. <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.803239>.
- (6) Swanson, R. A. Brain Glycogen – Vestigial No More. *Metab. Brain Dis.* **2015**, 30 (1), 251–253. <https://doi.org/10.1007/s11011-014-9596-2>.
- (7) Shulman, R. G.; Hyder, F.; Rothman, D. L. Cerebral Energetics and the Glycogen Shunt: Neurochemical Basis of Functional Imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, 98 (11), 6417–6422. <https://doi.org/10.1073/pnas.101129298>.
- (8) Özen, H. Glycogen Storage Diseases: New Perspectives. *World J. Gastroenterol.* **2007**, 13 (17), 2541. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i18.2541>.
- (9) Gayathri, N.; Krishnamoorthy, N.; Yasha, T.; Shankar, S.; Taly, A.; Santosh, V.; Mahadevan, A.; Jethwani, D.; Bhanu, K. Glycogen Storage Disease Type V (Mc Ardle’s Disease): A Report on Three Cases. *Neurol. India* **2011**, 59 (6), 884. <https://doi.org/10.4103/0028-3886.91370>.
- (10) Labrador, E.; Weinstein, D. A. *Glycogen Storage Disease Type VI*; 1993.
- (11) Kemp, D. M. Chapter 1. Type 2 Diabetes: Disease Overview; 2012; pp 1–14. <https://doi.org/10.1039/9781849735322-00001>.
- (12) World Health Organization. *Global Report on Diabetes*; 2016. <https://doi.org/ISBN 978 92 4 156525 7>.
- (13) Rines, A. K.; Sharabi, K.; Tavares, C. D. J.; Puigserver, P. Targeting Hepatic Glucose Metabolism in the Treatment of Type 2 Diabetes. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, 15 (11), 786–804. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.151>.

- (14) Hwang, J.; Weiss, R. E. Steroid-Induced Diabetes: A Clinical and Molecular Approach to Understanding and Treatment. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* **2014**, 32 (30), 96–102. <https://doi.org/10.1002/dmrr>.
- (15) Orgel, E.; Mittelman, S. D. The Links Between Insulin Resistance, Diabetes, and Cancer. *Curr. Diab. Rep.* **2013**, 13 (2), 213–222. <https://doi.org/10.1007/s11892-012-0356-6>.
- (16) Israili, Z. H. Advances in the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Am. J. Ther.* **2011**, 18 (2), 117–152. <https://doi.org/10.1097/MJT.0b013e3181afb5f1>.
- (17) Pałasz, A.; Cież, D.; Trzewik, B.; Miszczak, K.; Tynor, G.; Bazan, B. In the Search of Glycoside-Based Molecules as Antidiabetic Agents. *Top. Curr. Chem.* **2019**, 377 (4), 19. <https://doi.org/10.1007/s41061-019-0243-6>.
- (18) Gloster, T. M.; Davies, G. J. Glycosidase Inhibition: Assessing Mimicry of the Transition State. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8 (2), 305–320. <https://doi.org/10.1039/B915870G>.
- (19) Mosi, R.; Sham, H.; Uitdehaag, J. C. M.; Ruiterkamp, R.; Dijkstra, B. W.; Withers, S. G. Reassessment of Acarbose as a Transition State Analogue Inhibitor of Cyclodextrin Glycosyltransferase †. *Biochemistry* **1998**, 37 (49), 17192–17198. <https://doi.org/10.1021/bi981109a>.
- (20) Chao, E. C.; Henry, R. R. SGLT2 Inhibition — a Novel Strategy for Diabetes Treatment. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, 9 (7), 551–559. <https://doi.org/10.1038/nrd3180>.
- (21) Shubbrook, J.; Baradar-Bokaie, B.; Adkins, S. Empagliflozin in the Treatment of Type 2 Diabetes: Evidence to Date. *Drug Des. Devel. Ther.* **2015**, 9, 5793. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S69926>.
- (22) Bays, H. Sodium Glucose Co-Transporter Type 2 (SGLT2) Inhibitors: Targeting the Kidney to Improve Glycemic Control in Diabetes Mellitus. *Diabetes Ther.* **2013**, 4 (2), 195–220. <https://doi.org/10.1007/s13300-013-0042-y>.
- (23) Belete, T. M. A Recent Achievement In the Discovery and Development of Novel Targets for the Treatment of Type-2 Diabetes Mellitus. *J. Exp. Pharmacol.* **2020**, Volume 12, 1–15. <https://doi.org/10.2147/JEP.S226113>.
- (24) Praly, J.-P.; Vidal, S. Inhibition of Glycogen Phosphorylase in the Context of Type 2 Diabetes, with Focus on Recent Inhibitors Bound at the Active Site. *Mini-Reviews Med. Chem.* **2010**, 10 (12), 1102–1126. <https://doi.org/10.2174/1389557511009011102>.
- (25) Treadway, J. L.; Mendys, P.; Hoover, D. J. Expert Opinion on Investigational Drugs Glycogen Phosphorylase Inhibitors for Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2001**, 10 (3), 439–454.
- (26) Nagy, L.; Márton, J.; Vida, A.; Kis, G.; Bokor, É.; Kun, S.; Gönczi, M.;

- Docsa, T.; Tóth, A.; Antal, M.; Gergely, P.; Csóka, B.; Pacher, P.; Somsák, L.; Bai, P. Glycogen Phosphorylase Inhibition Improves Beta Cell Function. *Br. J. Pharmacol.* **2018**, *175* (2), 301–319. <https://doi.org/10.1111/bph.13819>.
- (27) Warburg, O. On the Origin of Cancer Cells. *Science* (80-.). **1956**, *123* (3191), 309–314. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>.
- (28) Rousset, M.; Chevalier, G.; Rousset, J. P.; Dussaulx, E.; Zweibaum, A. Presence and Cell Growth-Related Variations of Glycogen in Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Lines in Culture. *Cancer Res.* **1979**, *39* (2 I), 531–534.
- (29) Rousset, M.; Paris, H.; Chevalier, G.; Terrain, B.; Murat, J. C.; Zweibaum, A. Growth-Related Enzymatic Control of Glycogen Metabolism in Cultured Human Tumor Cells. *Cancer Res.* **1984**, *44* (1), 154–160. <https://doi.org/10.3390/cancers11122023>.
- (30) Rousset, M.; Zweibaum, A.; Fogh, J. Presence of Glycogen and Growth-Related Variations in 58 Cultured Human Tumor Cell Lines of Various Tissue Origins. *Cancer Res.* **1981**, *41* (3), 1165–1170.
- (31) Williams, J. P. G. Interrelation of Epithelial Glycogen, Cell Proliferation and Cellular Migration with Cyclic Adenosine Monophosphate in Epithelial Wound Healing. *Cell Differ.* **1972**, *1* (5–6), 317–323. [https://doi.org/10.1016/0045-6039\(72\)90007-3](https://doi.org/10.1016/0045-6039(72)90007-3).
- (32) Shimada, S.; Tashima, S.; Yamaguchi, K.; Matsuzaki, H.; Ogawa, M. Carcinogenesis of Intestinal-Type Gastric Cancer and Colorectal Cancer Is Commonly Accompanied by Expression of Brain (Fetal)-Type Glycogen Phosphorylase. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **1999**, *18* (1), 111–118.
- (33) Zhou, Y.; Jin, Z.; Wang, C. Glycogen Phosphorylase B Promotes Ovarian Cancer Progression via Wnt/ β -Catenin Signaling and Is Regulated by MiR-133a-3p. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *120*, 109449. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109449>.
- (34) Schnier, J. B.; Nishi, K.; Monks, A.; Gorin, F. A.; Bradbury, E. M. Inhibition of Glycogen Phosphorylase (GP) by CP-91,149 Induces Growth Inhibition Correlating with Brain GP Expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *309* (1), 126–134. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)01542-0](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)01542-0).
- (35) Lee, W.-N. P.; Guo, P.; Lim, S.; Bassilian, S.; Lee, S. T.; Boren, J.; Cascante, M.; Go, V. L. W.; Boros, L. G. Metabolic Sensitivity of Pancreatic Tumour Cell Apoptosis to Glycogen Phosphorylase Inhibitor Treatment. *Br. J. Cancer* **2004**, *91* (12), 2094–2100. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602243>.
- (36) Favaro, E.; Bensaad, K.; Chong, M. G.; Tennant, D. A.; Ferguson, D. J. P.; Snell, C.; Steers, G.; Turley, H.; Li, J.-L. L.; Günther, U. L.; Buffa, F. M.; McIntyre, A.; Harris, A. L. Glucose Utilization via Glycogen Phosphorylase Sustains Proliferation and Prevents Premature

- Senescence in Cancer Cells. *Cell Metab.* **2012**, 16 (6), 751–764. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.10.017>.
- (37) Zois, C. E.; Favaro, E.; Harris, A. L. Glycogen Metabolism in Cancer. *Biochem. Pharmacol.* **2014**, 92 (1), 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.09.001>.
- (38) Shulman, R. G.; Rothman, D. L. The Glycogen Shunt Maintains Glycolytic Homeostasis and the Warburg Effect in Cancer. *Trends in Cancer* **2017**, 3 (11), 761–767. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.09.007>.
- (39) Zois, C. E.; Harris, A. L. Glycogen Metabolism Has a Key Role in the Cancer Microenvironment and Provides New Targets for Cancer Therapy. *J. Mol. Med.* **2016**, 94 (2), 137–154. <https://doi.org/10.1007/s00109-015-1377-9>.
- (40) Favaro, E.; Harris, A. L. Targeting Glycogen Metabolism: A Novel Strategy to Inhibit Cancer Cell Growth? *Oncotarget* **2013**, 4 (1), 3–4. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.841>.
- (41) Philips, K. B.; Kurtoglu, M.; Leung, H. J.; Liu, H.; Gao, N.; Lehrman, M. A.; Murray, T. G.; Lampidis, T. J. Increased Sensitivity to Glucose Starvation Correlates with Downregulation of Glycogen Phosphorylase Isoform PYGB in Tumor Cell Lines Resistant to 2-Deoxy-d-Glucose. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2014**, 73 (2), 349–361. <https://doi.org/10.1007/s00280-013-2358-8>.
- (42) Khan, T.; Sullivan, M. A.; Gunter, J. H.; Kryza, T.; Lyons, N.; He, Y.; Hooper, J. D. Revisiting Glycogen in Cancer: A Conspicuous and Targetable Enabler of Malignant Transformation. *Front. Oncol.* **2020**, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.592455>.
- (43) Hoover, D. J.; Lefkowitz-Snow, S.; Burgess-Henry, J. L.; Martin, W. H.; Armento, S. J.; Stock, I. A.; McPherson, R. K.; Genereux, P. E.; Gibbs, E. M.; Treadway, J. L. Indole-2-Carboxamide Inhibitors of Human Liver Glycogen Phosphorylase †. *J. Med. Chem.* **1998**, 41 (16), 2934–2938. <https://doi.org/10.1021/jm980264k>.
- (44) Donnier-Maréchal, M.; Vidal, S. Glycogen Phosphorylase Inhibitors: A Patent Review (2013 - 2015). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2016**, 26 (2), 199–212. <https://doi.org/10.1517/13543776.2016.1131268>.
- (45) GlaxoSmithKline. A Randomized, Open-Label Study to Evaluate the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of GSK1362885 in Subjects With Type 2 Diabetes Mellitus <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01013766?term=glycogen+phosphorylase&draw=2&rank=3> (accessed Mar 5, 2021).
- (46) Vasist, L. S.; J., L.; Stuart, J. S.; Byerly, R. L.; Swan, S. K.; Thomson, S. .; Terschan, F.; Cannon, C.; Clark, R.V, P. Effectiveness of GSK1362885, a Novel Glycogen Phosphorylase Inhibitor, Demonstrated in Single Dose Suppression of a Glucagon Stimulated Glucose Rise In Healthy Volunteers. ENDO 2010 Abstracts. *Endocr. Rev.* **2010**, 31 (Supplement), S1–S2558. <https://doi.org/10.1093/edrv/31.suppl.s1>.

- (47) Zhang, L.; Song, C.; Miao, G.; Zhao, L.; Yan, Z.; Li, J.; Wang, Y. Novel Liver-Targeted Conjugates of Glycogen Phosphorylase Inhibitor PSN-357 for the Treatment of Diabetes: Design, Synthesis, Pharmacokinetic and Pharmacological Evaluations. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 42251. <https://doi.org/10.1038/srep42251>.
- (48) Jensen, R.; Nielsen, J.; Ørtenblad, N. Inhibition of Glycogenolysis Prolongs Action Potential Repriming Period and Impairs Muscle Function in Rat Skeletal Muscle. *J. Physiol.* **2020**, *598* (4), 789–803. <https://doi.org/10.1113/JP278543>.
- (49) Oikonomakos, N. G.; Tiraidis, C.; Leonidas, D. D.; Zographos, S. E.; Kristiansen, M.; Jessen, C. U.; Nørskov-Lauritsen, L.; Agius, L. Iminosugars as Potential Inhibitors of Glycogenolysis: Structural Insights into the Molecular Basis of Glycogen Phosphorylase Inhibition. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (19), 5687–5701. <https://doi.org/10.1021/jm060496g>.
- (50) Barford, D.; Schwabe, J. W. R.; Oikonomakos, N. G.; Acharya, K. R.; Hajdu, J.; Papageorgiou, A. C.; Martin, J. L.; Knott, J. C. A.; Vasella, A.; Johnson, L. N. Channels at the Catalytic Site of Glycogen Phosphorylase b: Binding and Kinetic Studies with the .Beta.-Glycosidase Inhibitor D-Gluconohydroximo-1,5-Lactone N-Phenylurethane. *Biochemistry* **1988**, *27* (18), 6733–6741. <https://doi.org/10.1021/bi00418a014>.
- (51) Bokor, É.; Kun, S.; Docsa, T.; Gergely, P.; Somsák, L. 4(5)-Aryl-2- C -Glucopyranosyl-Imidazoles as New Nanomolar Glucose Analogue Inhibitors of Glycogen Phosphorylase. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6* (12), 1215–1219. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.5b00361>.
- (52) Mamais, M.; Degli Esposti, A.; Kouloumoundra, V.; Gustavsson, T.; Monti, F.; Venturini, A.; Chrysina, E. D.; Markovitsi, D.; Gimisis, T. A New Potent Inhibitor of Glycogen Phosphorylase Reveals the Basicity of the Catalytic Site. *Chem. - A Eur. J.* **2017**, *23* (37), 8800–8805. <https://doi.org/10.1002/chem.201701591>.
- (53) Goyard, D.; Kónya, B.; Czifrák, K.; Larini, P.; Demontrond, F.; Leroy, J.; Balzarín, S.; Tournier, M.; Tósch, D.; Petit, P.; Duret, C.; Maurel, P.; Docsa, T.; Gergely, P.; Somsák, L.; Praly, J.-P.; Azay-Milhau, J.; Vidal, S. Glucose-Based Spiro-Oxathiazoles as in Vivo Anti-Hyperglycemic Agents through Glycogen Phosphorylase Inhibition. *Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18* (5), 931–940. <https://doi.org/10.1039/C9OB01190K>.
- (54) Gimisis, T. Synthesis of N-Glucopyranosidic Derivatives as Potential Inhibitors That Bind at the Catalytic Site of Glycogen Phosphorylase. *Mini-Reviews Med. Chem.* **2010**, *10* (12), 1127–1138. <https://doi.org/10.2174/1389557511009011127>.
- (55) Mamais, M.; Kouloumoundra, V.; Smyrli, E.; Grammatopoulos, P.; Chrysina, E. D.; Gimisis, T. Synthesis of N4-Aryl-β-D-Glucopyranosylcytosines: A Methodology Study. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56* (41), 5549–5552. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2015.08.037>.
- (56) Μαυρέας, Κ. Φ. ΜΔΕ: Σύνθεση C-Γλυκοπυρανοζυλο- Αναλόγων Φυσικών Νουκλεοζιτών Με Πιθανή Φαρμακολογική Δράση, Εθνικό και

- Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2016.
- (57) Πετροπούλου, Ι. Ερευνητική Εργασία Διπλώματος Ειδίκευσης, ΕΚΠΑ, 2016.
 - (58) Εμμανουήλ, Ε.; Μηναδάκης, Μ. Πτυχιακή Εργασία, ΕΚΠΑ, 2017.
 - (59) Κορόμπα, Α.; Μπαλιμάς, Π. Πτυχιακή Εργασία, ΕΚΠΑ, 2018.
 - (60) Patel, D.; Patel, K.; Kumar, R.; Gadewar, M.; Tahilyani, V. Pharmacological and Analytical Aspects of Bergenin: A Concise Report. *Asian Pacific J. Trop. Dis.* **2012**, 2 (2), 163–167. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(12\)60037-1](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(12)60037-1).
 - (61) Kimura, Y.; Sumiyoshi, M.; Taniguchi, M.; Baba, K. Antitumor and Antimetastatic Actions of Anthrone-C-Glucoside, Cassialoin Isolated from Cassia Garrettiana Heartwood in Colon 26-Bearing Mice. *Cancer Sci.* **2008**, 99 (11), 2336–2348. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00938.x>.
 - (62) Sezaki, M.; Kondo, S.; Maeda, K.; Umezawa, H.; Ohno, M. The Structure of Aquayamycin. *Tetrahedron* **1970**, 26 (22), 5171–5190. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)98726-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)98726-5).
 - (63) Acharya, P. P.; Khatri, H. R.; Janda, S.; Zhu, J. Synthesis and Antitumor Activities of Aquayamycin and Analogues of Derhodinosylurdamycin A. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, 17 (10), 2691–2704. <https://doi.org/10.1039/C9OB00121B>.
 - (64) Atabey, H.; Sari, H.; Al-Obaidi, F. N. Protonation Equilibria of Carminic Acid and Stability Constants of Its Complexes with Some Divalent Metal Ions in Aqueous Solution. *J. Solution Chem.* **2012**, 41 (5), 793–803. <https://doi.org/10.1007/s10953-012-9830-7>.
 - (65) Mueller, E. G.; Ferré-D'Amaré, A. R. Pseudouridine Formation, the Most Common Transglycosylation in RNA.
 - (66) Yoshikawa, T.; Kimura, S.; Hatano, T.; Okamoto, K.; Hayatsu, H.; Arimoto-Kobayashi, S. Pseudouridine, an Antimutagenic Substance in Beer towards N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine (MNNG). *Food Chem. Toxicol.* **2002**, 40 (8), 1165–1170. <https://doi.org/S0278691502000601> [pii].
 - (67) Monobe, M.; Arimoto-Kobayashi, S.; Ando, K. Beta-Pseudouridine, a Beer Component, Reduces Radiation-Induced Chromosome Aberrations in Human Lymphocytes. *Mutat. Res.* **2003**, 538 (1–2), 93–99. <https://doi.org/S1383571803000949> [pii].
 - (68) Czudnochowski, N.; Ashley, G. W.; Santi, D. V.; Alian, A.; Finer-Moore, J.; Stroud, R. M. The Mechanism of Pseudouridine Synthases from a Covalent Complex with RNA, and Alternate Specificity for U2605 versus U2604 between Close Homologs. *Nucleic Acids Res.* **2014**, 42 (3), 2037–2048. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1050>.
 - (69) Anderson, B. R.; Muramatsu, H.; Nallagatla, S. R.; Bevilacqua, P. C.; Sansing, L. H.; Weissman, D.; Karikó, K. Incorporation of Pseudouridine

- into mRNA Enhances Translation by Diminishing PKR Activation. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38* (17), 5884–5892. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq347>.
- (70) Lundstrom, K. The Current Status of COVID-19 Vaccines. *Front. Genome Ed.* **2020**, *2*. <https://doi.org/10.3389/fgeed.2020.579297>.
- (71) Kitamura, K.; Ando, Y.; Matsumoto, T.; Suzuki, K. Total Synthesis of Aryl C-Glycoside Natural Products: Strategies and Tactics. *Chem. Rev.* **2018**, *118* (4), 1495–1598. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00380>.
- (72) Zeng, J.; Ma, J.; Xiang, S.; Cai, S.; Liu, X.-W. Stereoselective β -C-Glycosylation by a Palladium-Catalyzed Decarboxylative Allylation: Formal Synthesis of Aspergillide A. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2013**, *52* (19), 5134–5137. <https://doi.org/10.1002/anie.201210266>.
- (73) Xu, L.-Y.; Fan, N.-L.; Hu, X.-G. Recent Development in the Synthesis of C-Glycosides Involving Glycosyl Radicals. *Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18* (27), 5095–5109. <https://doi.org/10.1039/D0OB00711K>.
- (74) Liao, H.; Ma, J.; Yao, H.; Liu, X.-W. Recent Progress of C-Glycosylation Methods in the Total Synthesis of Natural Products and Pharmaceuticals. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16* (11), 1791–1806. <https://doi.org/10.1039/C8OB00032H>.
- (75) Yang, Y.; Yu, B. Recent Advances in the Chemical Synthesis of C-Glycosides. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (19), 12281–12356. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00234>.
- (76) Du, Y.; Linhardt, R. J. Recent Advances in Stereoselective C-Glycoside Synthesis. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 9913–9959.
- (77) Hurd, C. D.; Bonner, W. A. The Reaction of Tetraacetylglucosyl Chloride with Aromatic Hydrocarbons in the Presence of Aluminum Chloride. *J. Am. Chem. Soc.* **1945**, *67* (10), 1664–1668. <https://doi.org/10.1021/ja01226a015>.
- (78) Yepremyan, A.; Salehani, B.; Minehan, T. G. Concise Total Syntheses of Aspalathin and Nothofagin. *Org. Lett.* **2010**, *12* (7), 1580–1583. <https://doi.org/10.1021/ol100315g>.
- (79) Nishikawa, T.; Koide, Y.; Kajii, S.; Wada, K.; Ishikawa, M.; Isobe, M. Stereocontrolled Syntheses of α -C-Mannosyltryptophan and Its Analogues. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3* (4), 687–700. <https://doi.org/10.1039/B414905J>.
- (80) Brenna, E.; Fuganti, C.; Grasselli, P.; Serra, S.; Zambotti, S. A Novel General Route for the Synthesis of C-Glycosyl Tyrosine Analogues. *Chem. - A Eur. J.* **2002**, *8* (8), 1872. [https://doi.org/10.1002/1521-3765\(20020415\)8:8<1872::AID-CHEM1872>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1521-3765(20020415)8:8<1872::AID-CHEM1872>3.0.CO;2-A).
- (81) Takhi, M.; Abdel Rahman, A. A.-H.; Schmidt, R. R. Yb(OTf)₃-Catalyzed C-Glycosylation: Highly Stereoselective Synthesis of C-Pseudoglycals. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42* (24), 4053–4056. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)00628-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)00628-1).

- (82) Kometani, T.; Kondo, H.; Fujimori, Y. Boron Trifluoride-Catalyzed Rearrangement of 2-Aryloxytetrahydropyrans: A New Entry to C-Arylglycosidation. *Synthesis (Stuttg)*. **1988**, 1988 (12), 1005–1007. <https://doi.org/10.1055/s-1988-27788>.
- (83) Krishna, P. R.; Lavanya, B.; Jyothi, Y.; Sharma, G. V. M. Radical Mediated Diastereoselective Synthesis of Benzothiazole Sulfonyl Ethyl C-Glycosides. *J. Carbohydr. Chem.* **2003**, 22 (6), 423–431. <https://doi.org/10.1081/CAR-120025328>.
- (84) Chiara, J. L.; Sesmilo, E. Samarium Diiodide-Mediated Reductive Coupling of Epoxides and Carbonyl Compounds: A Stereocontrolled Synthesis of C-Glycosides from 1,2-Anhydro Sugars. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2002**, 41 (17), 3242–3246. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020902\)41:17<3242::AID-ANIE3242>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020902)41:17<3242::AID-ANIE3242>3.0.CO;2-I).
- (85) Mabit, T.; Siard, A.; Legros, F.; Guillarme, S.; Martel, A.; Lebreton, J.; Carreaux, F.; Dujardin, G.; Collet, S. Stereospecific C-Glycosylation by Mizoroki–Heck Reaction: A Powerful and Easy-to-Set-Up Synthetic Tool to Access α - and β -Aryl- C -Glycosides. *Chem. – A Eur. J.* **2018**, 24 (53), 14069–14074. <https://doi.org/10.1002/chem.201803674>.
- (86) Friesen, R. W.; Sturino, C. F. Stereoselective Oxidative Spiroketalization of a C-Arylglucal Derived from Palladium-Catalyzed Coupling. Synthesis of the C-Arylglucoside Spiroketal Nucleus of the Papulacandins. *J. Org. Chem.* **1990**, 55 (23), 5808–5810. <https://doi.org/10.1021/jo00310a004>.
- (87) RajanBabu, T. V. Palladium(0)-Catalyzed C-Glycosylation: A Facile Alkylation of Trifluoroacetylglucal. *J. Org. Chem.* **1985**, 50 (19), 3642–3644. <https://doi.org/10.1021/jo00219a047>.
- (88) Nishikawa, T.; Adachi, M.; Isobe, M. C-Glycosylation-2. Nucleophilic Addition to Electrophilic Carbohydrate Derivatives. In *Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology*; Fraser-Reid, B. O., Tatsuta, K., Thiem, J., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2008; pp 755–811. https://doi.org/10.1007/978-3-540-30429-6_17.
- (89) Yokoyama, M.; Toyoshima, H.; Shimizu, M.; Mito, J.; Togo, H. Simple Synthesis of Aromatic β -C-Nucleosides via Coupling of Aryl Grignard Reagents with Sugar Fluorides. *Synthesis (Stuttg)*. **1998**, 1998 (04), 409–412. <https://doi.org/10.1055/s-1998-4487>.
- (90) Aguilón, A. R.; Mascarello, A.; Segretti, N. D.; de Azevedo, H. F. Z.; Guimaraes, C. R. W.; Miranda, L. S. M.; de Souza, R. O. M. A. Synthetic Strategies toward SGLT2 Inhibitors. *Org. Process Res. Dev.* **2018**, 22 (4), 467–488. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.8b00017>.
- (91) Zupancic, B.; Selic, L.; Cusak, A.; Richter, F. Stereoselective Synthesis of Intermediates in the Preparation of Beta-C-Arylglucosides. WO2015177083A1, 2015.
- (92) Coumbarides, G. S.; Motevalli, M.; Muse, W. A.; Wyatt, P. B. Stereoselective Synthesis of (E)-Mannosylidene Derivatives Using the Wittig Reaction. *J. Org. Chem.* **2006**, 71 (20), 7888–7891.

- <https://doi.org/10.1021/jo061178s>.
- (93) RajanBabu, T. V.; Reddy, G. S. 1-Methylene Sugars as C-Glycoside Precursors. *J. Org. Chem.* **1986**, *51* (26), 5458–5461. <https://doi.org/10.1021/jo00376a088>.
 - (94) Gómez, A. M.; Pedregosa, A.; Valverde, S.; López, J. C. Stereoselective Synthesis of Substituted Exo-Glycals from 1-Exo-Methylene Pyranoses. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44* (32), 6111–6116. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(03\)01455-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(03)01455-2).
 - (95) Lewis, M. D.; Cha, J. K.; Kishi, Y. Highly Stereoselective Approaches to α - and β -C-Glycopyranosides. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104* (18), 4976–4978. <https://doi.org/10.1021/ja00382a053>.
 - (96) Kraus, G. A.; Molina, M. T.; Teresa Molina, M. A Direct Synthesis of C-Glycosyl Compounds. *J. Org. Chem.* **1988**, *53* (4), 752–753. <https://doi.org/10.1021/jo00239a009>.
 - (97) Clarke, M. O. H.; Jordan, R.; Mackman, R. L.; Ray, A. S.; Siegel, D. Methods for Treating Flaviviridae Virus Infections. WO2017184668A1, 2017.
 - (98) Deslongchamps, P.; Rowan, D. D.; Pothier, N. The Acid-Catalyzed Oxido-Reduction of Spiroketal. Evidence for Stereoelectronic Control in Hydride Transfer to Cyclic Oxonium Ions. *Can. J. Chem.* **1981**, *59* (18), 2787–2802. <https://doi.org/10.1139/v81-403>.
 - (99) Terauchi, M.; Abe, H.; Matsuda, A.; Shuto, S. An Efficient Synthesis of β -C-Glycosides Based on the Conformational Restriction Strategy: Lewis Acid Promoted Silane Reduction of the Anomeric Position with Complete Stereoselectivity. *Org. Lett.* **2004**, *6* (21), 3751–3754. <https://doi.org/10.1021/ol048525>.
 - (100) Deshpande, P. P.; Ellsworth, B. A.; Buono, F. G.; Pullockaran, A.; Singh, J.; Kissick, T. P.; Huang, M. H.; Lobinger, H.; Denzel, T.; Mueller, R. H. Remarkable β -Selectivity in the Synthesis of β -1-C- Arylglucosides: Stereoselective Reduction of Acetyl-Protected Methyl 1-C-Arylglucosides without Acetoxy-Group Participation. *J. Org. Chem.* **2007**, *72* (25), 9746–9749. <https://doi.org/10.1021/jo071051i>.
 - (101) Deshpande, P. P.; Singh, J.; Pullockaran, A.; Kissick, T.; Ellsworth, B. a.; Gougoutas, J. Z.; Dimarco, J.; Fakes, M.; Reyes, M.; Lai, C.; Lobinger, H.; Denzel, T.; Ermann, P.; Crispino, G.; Randazzo, M.; Gao, Z.; Randazzo, R.; Lindrud, M.; Rosso, V.; Buono, F.; Doubleday, W. W.; Leung, S.; Richberg, P.; Hughes, D.; Washburn, W. N.; Meng, W.; Volk, K. J.; Mueller, R. H. A Practical Stereoselective Synthesis and Novel CocrySTALLizations of an Amphiphatic SGLT-2 Inhibitor. *Org. Process Res. Dev.* **2012**, *16* (4), 577–585. <https://doi.org/10.1021/op200306q>.
 - (102) Yu, J.; Cao, Y.; Yu, H.; Wang, J. A Concise and Efficient Synthesis of Dapagliflozin. *Org. Process Res. Dev.* **2019**, *23* (7), 1458–1461. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.9b00141>.
 - (103) Waschke, D.; Thimm, J.; Thiem, J. Highly Efficient Synthesis of

- Ketoheptoses. *Org. Lett.* **2011**, 13 (14), 3628–3631. <https://doi.org/10.1021/ol2012764>.
- (104) Damager, I.; Erik Olsen, C.; Lindberg Møller, B.; Saddik Motawia, M. Chemical Synthesis of 6'''- α -Maltotriosyl-Maltohexaose as Substrate for Enzymes in Starch Biosynthesis and Degradation. *Carbohydr. Res.* **1999**, 320 (1–2), 19–30. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(99\)00131-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(99)00131-7).
- (105) Dondoni, A.; Scherrmann, M. Thiazole-Based Synthesis of Formyl C-Glycosides. *J. Org. Chem.* **1994**, 59 (11), 6404–6412. <https://doi.org/10.1021/jo00100a050>.
- (106) Tang, M.; White, A. J. P.; Stevens, M. M.; Williams, C. K. Biomaterials from Sugars: Ring-Opening Polymerization of a Carbohydrate Lactone. *Chem. Commun.* **2009**, 3 (8), 941–943. <https://doi.org/10.1039/B817658B>.
- (107) Boymond, L.; Rottländer, M.; Cahiez, G.; Knochel, P. Preparation of Highly Functionalized Grignard Reagents by an Iodine-Magnesium Exchange Reaction and Its Application in Solid-Phase Synthesis. *Angew. Chemie Int. Ed.* **1998**, 37 (12), 1701–1703. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19980703\)37:12<1701::AID-ANIE1701>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19980703)37:12<1701::AID-ANIE1701>3.0.CO;2-U).
- (108) Krasovskiy, A.; Knochel, P. A LiCl-Mediated Br/Mg Exchange Reaction for the Preparation of Functionalized Aryl- and Heteroarylmagnesium Compounds from Organic Bromides. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2004**, 43 (25), 3333–3336. <https://doi.org/10.1002/anie.200454084>.
- (109) Joseph, C. C.; Regeling, H.; Zwanenburg, B.; Chittenden, G. J. . Syntheses of (3R,4R,5R,6R)-Tetrahydroxyazepane (1,6-Dideoxy-1,6-Imino-d-Mannitol) and (3S,4R,5R,6R)-Tetrahydroxyazepane (1,6-Dideoxy-1,6-Imino-d-Glucitol). *Tetrahedron* **2002**, 58 (34), 6907–6911. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(02\)00757-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(02)00757-3).
- (110) Serieys, A.; Botuha, C.; Chemla, F.; Ferreira, F.; Pérez-Luna, A. Zinc(0)/Dimethylformamide-Mediated Synthesis of Symmetrical Carboxylic Anhydrides from Acid Chlorides. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49 (36), 5322–5323. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2008.06.073>.
- (111) Liu, Z.; Ma, Q.; Liu, Y.; Wang, Q. 4-(N,N-Dimethylamino)Pyridine Hydrochloride as a Recyclable Catalyst for Acylation of Inert Alcohols: Substrate Scope and Reaction Mechanism. *Org. Lett.* **2014**, 16 (1), 236–239. <https://doi.org/10.1021/ol4030875>.
- (112) Horton, D.; Priebe, W. Synthetic Routes to Higher-Carbon Sugars. Reaction of Lactones with 2-Lithio-,3-Dithiane. *Carbohydr. Res.* **1981**, 94 (1), 27–41. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)85593-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)85593-7).
- (113) Cheshev, P.; Marra, A.; Dondoni, A. Direct Epoxidation of D-Glucal and d-Galactal Derivatives with in Situ Generated DMDO. *Carbohydr. Res.* **2006**, 341 (16), 2714–2716. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.09.003>.

- (114) Tibiletti, F.; Simonetti, M.; Nicholas, K. M.; Palmisano, G.; Parravicini, M.; Imbesi, F.; Tollari, S.; Penoni, A. One-Pot Synthesis of Meridianins and Meridianin Analogues via Indolization of Nitrosoarenes. *Tetrahedron* **2010**, 66 (6), 1280–1288. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2009.12.020>.
- (115) Barrett, H. W.; Goodman, I.; Dittmer, K. The Synthesis of 5-Halogeno-2-Thiouracil and 6-Methyl-5-Halogeno-2-Thiouracil Derivatives 1. *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, 70 (5), 1753–1756. <https://doi.org/10.1021/ja01185a024>.
- (116) Kofink, C. C.; Knochel, P. Synthesis of Functionalized Diarylmethanes via Copper-Catalyzed Phosphates Arylmagnesium Benzylic Typical Procedures for the Preparation of Functionalized Diarylmethanes : 1–71.
- (117) Aldrich, S. 5-Bromo-2,4-Dichloropyrimidine. *Material Safety Data Sheet*. 2019, pp 8–10.
- (118) Szabó, K. E.; Kyriakis, E.; Psarra, A.-M. G.; Karra, A. G.; Sipos, Á.; Docsa, T.; Stravodimos, G. A.; Katsidou, E.; Skamnaki, V. T.; Liggri, P. G. V.; Zographos, S. E.; Mándi, A.; Király, S. B.; Kurtán, T.; Leonidas, D. D.; Somsák, L. Glucopyranosylidene-Spiro-Imidazolinones, a New Ring System: Synthesis and Evaluation as Glycogen Phosphorylase Inhibitors by Enzyme Kinetics and X-Ray Crystallography. *J. Med. Chem.* **2019**, 62 (13), 6116–6136. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00356>.
- (119) Stathi, A.; Mamais, M.; Chrysina, E. D.; Gimisis, T. Anomeric Spironucleosides of β -d-Glucopyranosyl Uracil as Potential Inhibitors of Glycogen Phosphorylase. *Molecules* **2019**, 24 (12), 2327. <https://doi.org/10.3390/molecules24122327>.
- (120) Allen, C. F. H.; Spangler, F. W. Mucobromic Acid. *Org. Synth.* **1947**, 27 (September), 60. <https://doi.org/10.15227/orgsyn.027.0060>.
- (121) Barker, C. A.; Allison, S. E.; Zlitni, S.; Nguyen, N. D.; Das, R.; Melacini, G.; Capretta, A. A.; Brown, E. D. Degradation of MAC13243 and Studies of the Interaction of Resulting Thiourea Compounds with the Lipoprotein Targeting Chaperone LolA. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23 (8), 2426–2431. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.02.005>.
- (122) Asim, M.; Klonowska, D.; Choueiri, C.; Korobkov, I.; Carlson, K. E.; Katzenellenbogen, J. A.; Durst, T. BC-Spiro-Estradiols. Synthesis and Estrogen Receptor Binding Affinity of Four New Estradiol Isomers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22 (11), 3713–3717. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.04.022>.
- (123) Cox, C.; Danishefsky, S. J. Concise Synthesis of a Lactonamycin Model System by Diastereoselective Dihydroxylation of a Highly Functionalized Naphthoquinone. *Org. Lett.* **2001**, 3 (18), 2899–2902. <https://doi.org/10.1021/ol016361g>.
- (124) Habert, L.; Retailleau, P.; Gillaizeau, I. Rapid Synthesis of 3-Amino Isocoumarin Derivatives from Ynamides. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, 16 (40), 7351–7355. <https://doi.org/10.1039/C8OB02305K>.
- (125) Reuman, M.; Meyers, A. I. The Synthetic Utility of Oxazolines in Aromatic

- Substitution. *Tetrahedron* **1985**, *41* (5), 837–860. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)96401-4](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)96401-4).
- (126) Meyers, A. I.; Temple, D. L.; Haidukewych, D.; Mihelich, E. D. Oxazolines. XI. Synthesis of Functionalized Aromatic and Aliphatic Acids. Useful Protecting Group for Carboxylic Acids against Grignard and Hydride Reagents. *J. Org. Chem.* **1974**, *39* (18), 2787–2793. <https://doi.org/10.1021/jo00932a024>.
- (127) BROWN, T.; BLAKEMORE, R.; BLURTON, P.; DURANT, G.; GANELLIN, C.; PARSONS, M.; RASMUSSEN, A.; RAWLINGS, D.; WALKER, T. Isocytosine H₂-Receptor Histamine Antagonists II. Synthesis and Evaluation of Biological Activity at Histamine H₁- and H₂-Receptors of 5-(Heterocyclyl)Methylisocytosines. *Eur. J. Med. Chem.* **1989**, *24* (1), 65–72. [https://doi.org/10.1016/0223-5234\(89\)90166-9](https://doi.org/10.1016/0223-5234(89)90166-9).
- (128) Shestakov, A. N.; Pankova, A. S.; Golubev, P.; Khlebnikov, A. F.; Kuznetsov, M. A. Brønsted Acid Mediated Cyclizations of Ortho-Aryl(Ethynyl)Pyrimidines. *Tetrahedron* **2017**, *73* (27–28), 3939–3948. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2017.05.070>.
- (129) Sokolenko, L. V.; Yagupolskii, Y. L.; Kumanetska, L. S.; Marrot, J.; Magnier, E.; Lipetskij, V. O.; Kalinin, I. V. CF₃S(O) n -Containing Enaminones as Precursors for the Synthesis of Pyrimidine-4(3 H)-Ones. *Tetrahedron Lett.* **2017**, *58* (13), 1308–1311. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2017.02.046>.
- (130) Nakai, T.; Perl, N. R.; Barden, T. C.; Carvalho, A.; Fretzen, A.; Germano, P.; Im, G.-Y. J.; Jin, H.; Kim, C.; Lee, T. W.-H.; Long, K.; Moore, J.; Rohde, J. M.; Sarno, R.; Segal, C.; Solberg, E. O.; Tobin, J.; Zimmer, D. P.; Currie, M. G. Discovery of IWP-051, a Novel Orally Bioavailable SGC Stimulator with Once-Daily Dosing Potential in Humans. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, *7* (5), 465–469. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.5b00479>.
- (131) Rosso, G. B. Tert -Butoxy Bis(Dimethyl-Amino)Methane (Bredereck's Reagent). *Synlett* **2006**, No. 5, 0809–0810. <https://doi.org/10.1055/s-2006-933118>.
- (132) Bredereck, H.; Effenberger, F.; Simchen, G. Säureamid-Reaktionen, XXXII. Über Säureamid-Dialkylsulfat-Komplexe. *Chem. Ber.* **1963**, *96* (5), 1350–1355. <https://doi.org/10.1002/cber.19630960526>.
- (133) Bredereck, H.; Effenberger, F.; Simchen, G. Säureamid-Reaktionen, XLVI: Synthese Von N,N,N'-Trimethyl-Formamidin Und Bis-Dimethylamino-Methoxy-Methan (Aminalester). *Chem. Ber.* **1965**, *98* (4), 1078–1080. <https://doi.org/10.1002/cber.19650980411>.
- (134) Bredereck, H.; Simchen, G.; Rebsdats, S.; Kantlehner, W.; Horn, P.; Wahl, R.; Hoffmann, H.; Grieshaber, P. Säureamid-Reaktionen, I. Orthoamide, I Darstellung Und Eigenschaften Der Amidacetale Und Aminalester. *Chem. Ber.* **1968**, *101* (1), 41–50. <https://doi.org/10.1002/cber.19681010108>.

- (135) Wasserman, H. H.; Ives, J. L. Reaction of Singlet Oxygen with Enamino Carbonyl Systems. A General Method for the Synthesis of α -Keto Derivatives of Lactones, Esters, Amides, Lactams, and Ketones. *J. Org. Chem.* **1985**, *50* (19), 3573–3580. <https://doi.org/10.1021/jo00219a025>.
- (136) Szennyés, E.; Bokor, É.; Langer, P.; Gyémánt, G.; Docsa, T.; Sipos, Á.; Somsák, L. The First General Synthesis of 2- C -(β - d -Glycopyranosyl)Pyrimidines and Their Evaluation as Inhibitors of Some Glycoenzymes. *New J. Chem.* **2018**, *42* (21), 17439–17446. <https://doi.org/10.1039/C8NJ04035D>.
- (137) Szennyés, E.; Bokor, É.; Batta, G.; Docsa, T.; Gergely, P.; Somsák, L. Improved Preparation of 4(5)-Aryl-2-(β - d -Glucopyranosyl)-Imidazoles, the Most Efficient Glucose Analogue Inhibitors of Glycogen Phosphorylase. *RSC Adv.* **2016**, *6* (97), 94787–94794. <https://doi.org/10.1039/C6RA21839C>.
- (138) Kolarovič, A. Lithiations and Grignard Reactions on Pyrimidine and Quinazoline. In *Topics in Heterocyclic Chemistry*; 2012; Vol. 10, pp 21–64. https://doi.org/10.1007/7081_2012_94.
- (139) Hanessian, S.; Machaalani, R. A Highly Stereocontrolled and Efficient Synthesis of α - and β -Pseudouridines. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44* (45), 8321–8323. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2003.09.103>.
- (140) Chu, C. K.; Wempen, I.; Watanabe, K. A.; Fox, J. J. Nucleosides. 100. General Synthesis of Pyrimidine C-5 Nucleosides Related to Pseudouridine. Synthesis of 5-(β -D-Ribofuranosyl)Isocytosine (Pseudoisocytidine), 5-(β -D-Ribofuranosyl)-2-Thiouracil(2-Thiopseudouridine) and 5-(β -D-Ribofuranosyl)Uracil (Pseudou. *J. Org. Chem.* **1976**, *41* (17), 2793–2797.
- (141) Chang, Y.-C.; Herath, J.; Wang, T. H.-H.; Chow, C. S. Synthesis and Solution Conformation Studies of 3-Substituted Uridine and Pseudouridine Derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16* (5), 2676–2686. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.11.039>.
- (142) Buron, F.; Plé, N.; Turck, A.; Marsais, F. Metal-Halogen Exchange Using Tri- n -Butyl Lithium Magnesate in the Diazine Series: Diazine 49. *Synlett* **2006**, *2006* (10), 1586–1588. <https://doi.org/10.1055/s-2006-941580>.
- (143) Ulbricht, T. L. V. L. V. Syntheses with Pyrimidine-Lithium Compounds. *Tetrahedron* **1959**, *6* (3), 225–231. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(59\)80004-1](https://doi.org/10.1016/0040-4020(59)80004-1).
- (144) Knochel, P.; M. Barl, N.; Werner, V.; Sämann, C. The Halogen/Magnesium-Exchange Using IPrMgCl·LiCl and Related Exchange Reagents. *Heterocycles* **2014**, *88* (2), 827. [https://doi.org/10.3987/REV-13-SR\(S\)4](https://doi.org/10.3987/REV-13-SR(S)4).
- (145) Li-Yuan Bao, R.; Zhao, R.; Shi, L. Progress and Developments in the Turbo Grignard Reagent I-PrMgCl·LiCl: A Ten-Year Journey. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (32), 6884–6900. <https://doi.org/10.1039/c4cc10194d>.

- (146) Boudet, N.; Dubbaka, S. R.; Knochel, P. Oxidative Amination of Cuprated Pyrimidine and Purine Derivatives. *Org. Lett.* **2008**, *10* (9), 1715–1718. <https://doi.org/10.1021/ol800353s>.
- (147) Kofink, C. C.; Knochel, P. Synthesis of Functionalized Diarylmethanes via a Copper-Catalyzed Cross-Coupling of Arylmagnesium Reagents with Benzylic Phosphates. *Org. Lett.* **2006**, *8* (18), 4121–4124. <https://doi.org/10.1021/ol0616790>.
- (148) Boudet, N.; Knochel, P. Chemo- and Regioselective Functionalization of Uracil Derivatives. Applications to the Synthesis of Oxypurinol and Emivirine. *Org. Lett.* **2006**, *8* (17), 3737–3740. <https://doi.org/10.1021/ol061295+>.
- (149) Knochel, P.; Krasovskiy, A. Knochel_TurboGrignard_Patent.Pdf, 2005.
- (150) Xie, J.; Molina, A.; Czernecki, S. Alkylidenation of Sugar Lactones and Further Transformation to C-Glycosides. *J. Carbohydr. Chem.* **1999**, *18* (5), 481–498. <https://doi.org/10.1080/07328309908544013>.
- (151) Procopiou, P. A.; Baugh, S. P. D.; Flack, S. S.; Inglis, G. G. A. An Extremely Fast and Efficient Acylation Reaction of Alcohols with Acid Anhydrides in the Presence of Trimethylsilyl Trifluoromethanesulfonate as Catalyst. *Chem. Commun.* **1996**, *03* (23), 2625. <https://doi.org/10.1039/cc9960002625>.
- (152) Ishihara, K.; Kubota, M.; Kurihara, H.; Yamamoto, H. Scandium Trifluoromethanesulfonate as an Extremely Active Acylation Catalyst. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (15), 4413–4414. <https://doi.org/10.1021/ja00120a030>.
- (153) Huffman, C. W. Formylation of Amines. *J. Org. Chem.* **1958**, *23* (5), 727–729. <https://doi.org/10.1021/jo01099a023>.
- (154) Coxon, B. Developments in the Karplus Equation as They Relate to the NMR Coupling Constants of Carbohydrates. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **2009**, *62* (8), 17–82. [https://doi.org/10.1016/S0065-2318\(09\)00003-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2318(09)00003-1).
- (155) Cohn, W. E. 5-Ribosyl Uracil, a Carbon-Carbon Ribofuranosyl Nucleoside in Ribonucleic Acids. *Biochim. Biophys. Acta* **1959**, *32*, 569–571.
- (156) Khalifa, N. M.; Al-Omar, M. A.; Amr, A. E. Synthesis and Characterization of Novel 5-Allyl-6-[(Benzo[d]Thiazol-2-yl)methyl]-2-(Alkylsulfanyl)Oxopyrimidine Derivatives. *Russ. J. Gen. Chem.* **2016**, *86* (12), 2752–2758. <https://doi.org/10.1134/S1070363216120367>.
- (157) Hartono, Y. D.; Pabon-Martinez, Y. V.; Uyar, A.; Wengel, J.; Lundin, K. E.; Zain, R.; Smith, C. I. E.; Nilsson, L.; Villa, A. Role of Pseudoisocytidine Tautomerization in Triplex-Forming Oligonucleotides: In Silico and in Vitro Studies. *ACS Omega* **2017**, *2* (5), 2165–2177. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b00347>.
- (158) Dianova, L. N.; Koksharova, T. G.; Volkova, N. V. Some Nucleophilic

- Substitution Reactions of S-Triazolo[1,5-c]Pyrimidines. *Chem. Heterocycl. Compd.* **1992**, 28 (3), 321–323. <https://doi.org/10.1007/BF00529378>.
- (159) Grosjean, S.; Triki, S.; Meslin, J. C.; Julienne, K.; Deniaud, D. Synthesis of Nitrogen Bicyclic Scaffolds: Pyrimido[1,2-a]Pyrimidine-2,6- Diones. *Tetrahedron* **2010**, 66 (52), 9912–9924. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2010.10.059>.
- (160) Adam, W.; Bialas, J.; Hadjiarapoglou, L. A Convenient Preparation of Acetone Solutions of Dimethyldioxirane. *Chem. Ber.* **1991**, 124, 2377.
- (161) Cho, A.; Zhang, L.; Xu, J.; Babusis, D.; Butler, T.; Lee, R.; Saunders, O. L.; Wang, T.; Parrish, J.; Perry, J.; Feng, J. Y.; Ray, A. S.; Kim, C. U. Synthesis and Characterization of 2'-C-Me Branched C-Nucleosides as HCV Polymerase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22 (12), 4127–4132. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.04.065>.
- (162) Li, Y.; Manickam, G.; Ghoshal, A.; Subramaniam, P. More Efficient Palladium Catalyst for Hydrogenolysis of Benzyl Groups. *Synth. Commun.* **2006**, 36 (7), 925–928. <https://doi.org/10.1080/00397910500466199>.
- (163) Maddess, M.; Carter, R. SNAr Reactions of 2-Methylthio-4-Pyrimidinones in Pivalic Acid: Access to Functionalized Pyrimidinones and Pyrimidines. *Synthesis (Stuttg.)* **2012**, 44 (07), 1109–1118. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1289744>.
- (164) Meyer, A.; Fischer, K. Oxidative Transformation Processes and Products of Para-Phenylenediamine (PPD) and Para-Toluenediamine (PTD)—a Review. *Environ. Sci. Eur.* **2015**, 27 (1), 11. <https://doi.org/10.1186/s12302-015-0044-7>.
- (165) Jiang, Y. L.; Stivers, J. T. Novel Epimerization of Aromatic C-Nucleosides with Electron-Withdrawing Substituents with Trifluoroacetic Acid–Benzenesulfonic Acid Using Mild Conditions. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44 (21), 4051–4055. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(03\)00848-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(03)00848-7).
- (166) Alzeer, J.; Vasella, A. Oligosaccharide Analogues of Polysaccharides. Part 2. Regioselective Deprotection of Monosaccharide-Derived Monomers and Dimers. *Helv. Chim. Acta* **1995**, 78 (1), 177–193. <https://doi.org/10.1002/hlca.19950780117>.
- (167) Levy, D. E.; Fügedi, P. *The Organic Chemistry of Sugars*; CRC Press, 2005.
- (168) Chiba, S. A Historical Perspective for the Catalytic Reaction Mechanism of Glycosidase; So As to Bring about Breakthrough in Confusing Situation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2012**, 76 (2), 215–231. <https://doi.org/10.1271/bbb.110713>.
- (169) Miller, T. W.; Arison, B. H.; Albers-Schonberg, G. Isolation of a Cyclitol Antibiotic: 2,3,4,5-Tetrahydroxycyclohexanemethanol. *Biotechnol. Bioeng.* **1973**, 15 (6), 1075–1080. <https://doi.org/10.1002/bit.260150606>.

- (170) Roscales, S.; Plumet, J. Biosynthesis and Biological Activity of Carbasugars. *Int. J. Carbohydr. Chem.* **2016**, 2016 (8), 1–42. <https://doi.org/10.1155/2016/4760548>.
- (171) Chen, X.; Lu, Y.; Fan, Y.; Shen, Y. An Introduction to Validamycins and Their Derivatives. In *Validamycin and its Derivatives*; Elsevier, 2017; pp 1–8. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100999-4.00001-0>.
- (172) *Recent Trends for Enhancing the Diversity and Quality of Soybean Products, Chapter 10*; Krezhova, D., Ed.; InTech, 2011. <https://doi.org/10.5772/1005>.
- (173) Hoffmann-Ostenhof, O.; Pittner, F. The Biosynthesis of Myo -Inositol and Its Isomers. *Can. J. Chem.* **1982**, 60 (14), 1863–1871. <https://doi.org/10.1139/v82-259>.
- (174) Michell, R. H. Evolution of the Diverse Biological Roles of Inositols. *Biochem. Soc. Symp.* **2007**, 74 (1), 223. <https://doi.org/10.1042/BSS0740223>.
- (175) Yu, W.; Greenberg, M. L. Inositol Depletion, GSK3 Inhibition and Bipolar Disorder. *Future Neurol.* **2016**, 11 (2), 135–148. <https://doi.org/10.2217/fnl-2016-0003>.
- (176) Papaleo, E.; Unfer, V.; Baillargeon, J. P.; Chiu, T. T. Contribution of Myo-Inositol to Reproduction. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **2009**, 147 (2), 120–123. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2009.09.008>.
- (177) Croze, M. L.; Soulage, C. O. Potential Role and Therapeutic Interests of Myo-Inositol in Metabolic Diseases. *Biochimie* **2013**, 95 (10), 1811–1827. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.05.011>.
- (178) Titz, A. *Carbohydrates as Drugs*; Seeberger, P. H., Rademacher, C., Eds.; Topics in Medicinal Chemistry; Springer International Publishing: Cham, 2014; Vol. 12. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-08675-0>.
- (179) Ma, K.; Thomason, L. A. M.; McLaurin, J. Scyllo-Inositol, Preclinical, and Clinical Data for Alzheimer's Disease. In *Advances in Pharmacology*; Elsevier Inc., 2012; Vol. 64, pp 177–212. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394816-8.00006-4>.
- (180) Wu, J.; Tang, C.; Yao, S.; Zhang, L.; Ke, C.; Feng, L.; Lin, G.; Ye, Y. Anti-Inflammatory Inositol Derivatives from the Whole Plant of Inula Cappa. *J. Nat. Prod.* **2015**, 78 (10), 2332–2338. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00135>.
- (181) Mo, E. J.; Ahn, J. H.; Jo, Y. H.; Kim, S. B.; Hwang, B. Y. Inositol Derivatives and Phenolic Compounds from the Roots of Taraxacum Coreanum. *Molecules* **2017**, 22 (8), 1349. <https://doi.org/10.3390/molecules22081349>.
- (182) Tamegai, H.; Nango, E.; Kuwahara, M.; Yamamoto, H.; Ota, Y.; Kuriki, H.; Eguchi, T.; Kakinuma, K. Identification of L-Glutamine: 2-Deoxy-Scyllo-Inosose-Aminotransferase Required for the Biosynthesis of Butirosin in *Bacillus Circulans*. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **2002**, 55 (8), 707–

714. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.55.707>.
- (183) Ogawa, S.; Shibata, Y. Total Synthesis of Acarbose and Adiposin 2. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1988**, 189 (9), 605. <https://doi.org/10.1039/c39880000605>.
- (184) Martin, S. F.; Josey, J. A.; Wong, Y.; Dean, D. W. General Method for the Synthesis of Phospholipid Derivatives of 1,2-O-Diacyl-Sn-Glycerols. *J. Org. Chem.* **1994**, 59 (17), 4805–4820. <https://doi.org/10.1021/jo00096a023>.
- (185) Horne, G.; Mills, S. J.; Potter, B. V. L. First Derivatives of Myo-Inositol 1,4,6-Trisphosphate Modified at Positions 2 and 3: Structural Analogues of d-Myo-Inositol 1,4,5-Trisphosphate. *Carbohydr. Res.* **2004**, 339 (1), 51–65. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2003.09.008>.
- (186) Konieczny, V.; Stefanakis, J. G.; Sitsanidis, E. D.; Ioannidou, N.-A. T.; Papadopoulos, N. V.; Fylaktakidou, K. C.; Taylor, C. W.; Koumbis, A. E. Synthesis of Inositol Phosphate-Based Competitive Antagonists of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, 14 (8), 2504–2514. <https://doi.org/10.1039/C5OB02623G>.
- (187) Iselin, B. M. Synthesis of Inositol-5-Monophosphoric Acid and Scyllitol Monophosphoric Acid. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, 71 (11), 3822–3825. <https://doi.org/10.1021/ja01179a069>.
- (188) Mondal, S.; Prathap, A.; Sureshan, K. M. Vinylogy in Orthoester Hydrolysis: Total Syntheses of Cyclophellitol, Valienamine, Gabosine K, Valienone, Gabosine G, 1- Epi -Streptol, Streptol, and Uvamalol A. *J. Org. Chem.* **2013**, 78 (15), 7690–7700. <https://doi.org/10.1021/jo401272j>.
- (189) Chung, S.; Kwon, Y. Practical Synthesis of All Inositol Stereoisomers from Myo-Inositol. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9 (15), 2135–2140. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(99\)00348-0](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(99)00348-0).
- (190) Ferrier, R. J. Unsaturated Carbohydrates. Part 21. A Carbocyclic Ring Closure of a Hex-5-Enopyranoside Derivative. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1979**, 1455. <https://doi.org/10.1039/p19790001455>.
- (191) Chida, N. Ferrier Carbocyclization Reaction. *Mol. Rearrange. Org. Synth.* **2015**, 363–399. <https://doi.org/10.1002/9781118939901.ch12>.
- (192) RajanBabu, T. V. Stereochemistry of Intramolecular Free-Radical Cyclization Reactions. *Acc. Chem. Res.* **1991**, 24 (5), 139–145. <https://doi.org/10.1021/ar00005a003>.
- (193) Gómez, A. M.; Moreno, E.; Valverde, S.; López, J. C. A General Stereodivergent Strategy for the Preparation of Carbasugars. Syntheses of 5a-Carba- α -d-Glucose, α -d-Galactose, and β -l-Gulose Pentaacetates from d-Mannose. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43 (32), 5559–5562. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(02\)01121-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(02)01121-8).
- (194) Ito, H.; Motoki, Y.; Taguchi, T.; Hanzawa, Y. Zirconium-Mediated, Highly Diastereoselective Ring Contraction of Carbohydrate Derivatives: Synthesis of Highly Functionalized, Enantiomerically Pure Carbocycles.

- J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (19), 8835–8836.
<https://doi.org/10.1021/ja00072a045>.
- (195) Sudha, A. V. R. L.; Nagarajan, M. Carbohydrates to Carbocycles: An Expedient Synthesis of Pseudo-Sugars A Short and Versatile Synthesis of Pseudo-Sugars from Sugars Utilizing the Claisen Rearrangement as the Key Step Is. **1998**, 925–926.
- (196) Yu, S. H.; Chung, S. K. Divergent Syntheses of All 16 Carbasugar Stereoisomers via Stereoconversion of Carba- β -D-Altropyranose Derivatives. *Tetrahedron Asymmetry* **2005**, *16* (16), 2729–2747.
<https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2005.07.010>.
- (197) Shing, T. K. M.; Chen, Y.; Ng, W. L. Short and Efficient Syntheses of Gabosine I, Streptol, 7-O-AcetylStreptol, 1-Epi-Streptol, Gabosine K, and Carba α -D-Glucose from δ -D-Gluconolactone. *Synlett* **2011**, *2011* (9), 1318–1320. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1260547>.
- (198) Ng, W. L.; Li, H. C.; Lau, K. M.; Chan, A. K. N.; Lau, C. B. S.; Shing, T. K. M. Concise and Stereodivergent Synthesis of Carbasugars Reveals Unexpected Structure-Activity Relationship (SAR) of SGLT2 Inhibition. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05895-9>.
- (199) Jordheim, L. P.; Durantel, D.; Zoulim, F.; Dumontet, C. Advances in the Development of Nucleoside and Nucleotide Analogues for Cancer and Viral Diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12* (6), 447–464.
<https://doi.org/10.1038/nrd4010>.
- (200) A. Paquette, L.; E. Hartung, R. Direct Comparison of SN2 Mesylate Displacement versus the Mitsunobu Protocol for 2',3'-Dideoxyspirocarbanucleoside Construction. *Heterocycles* **2006**, *67* (1), 75. [https://doi.org/10.3987/COM-04-S\(T\)2](https://doi.org/10.3987/COM-04-S(T)2).
- (201) Yoneda, F.; Nagamatsu, T. New Syntheses of Fervenuin (1,3-Dimethyl-7-Azalumazine) and Analogs. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1975**, *48* (10), 2884–2887. <https://doi.org/10.1246/bcsj.48.2884>.
- (202) Schou, C.; Pedersen, E. B.; Nielsen, C.; Sillesen, A.; Casabó, J.; Coppens, P.; Buchardt, O. Synthesis of New Acyclic Nucleosides. *Acta Chem. Scand.* **1993**, *47*, 889–895.
<https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.47-0889>.
- (203) Swamy, K. C. K.; Kumar, N. N. B.; Balaraman, E.; Kumar, K. V. P. P. Mitsunobu and Related Reactions: Advances and Applications. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (6), 2551–2651. <https://doi.org/10.1021/cr800278z>.
- (204) Frieden, M.; Giraud, M.; Reese, C. B.; Song, Q. Synthesis of 1-[Cis-3-(Hydroxymethyl)Cyclobutyl]-Uracil, -Thymine and -Cytosine. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1998**, *1* (17), 2827–2832.
<https://doi.org/10.1039/a803878c>.
- (205) Jenny, T. F.; Previsani, N.; Benner, S. a. Carbocyclic Analogs of Nucleosides via Modified Mitsunobu Reactions. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32* (48), 7029–7032. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(91\)85031-Y](https://doi.org/10.1016/0040-4039(91)85031-Y).

- (206) Richichi, B.; Cicchi, S.; Chiacchio, U.; Romeo, G.; Brandi, A. Chemo-, Regio- and Stereoselective Mitsunobu Reaction of Unprotected Pyrimidine Bases with Hydroxypyrrolidines. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43* (22), 4013–4015. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(02\)00712-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(02)00712-8).
- (207) Crimmins, M. T.; King, B. W. An Efficient Asymmetric Approach to Carbocyclic Nucleosides: Asymmetric Synthesis of 1592U89, a Potent Inhibitor of HIV Reverse Transcriptase. *J. Org. Chem.* **1996**, *61* (13), 4192–4193. <https://doi.org/10.1021/jo960708p>.
- (208) Wang, J.; Herdewijn, P. Enantioselective Synthesis and Conformational Study of Cyclohexene Carbocyclic Nucleosides. *J. Org. Chem.* **1999**, *64* (21), 7820–7827. <https://doi.org/10.1021/jo9908288>.
- (209) Wang, J.; Froeyen, M.; Hendrix, C.; Andrei, G.; Snoeck, R.; De Clercq, E.; Herdewijn, P. The Cyclohexene Ring System as a Furanose Mimic: Synthesis and Antiviral Activity of Both Enantiomers of Cyclohexenylguanine. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (4), 736–745. <https://doi.org/10.1021/jm991171l>.
- (210) Aguilar, G. J.; Gelpi, M. E.; Cadenas, R. A. Nucleocyclitols. Synthesis of Substituted Purinyl- Muco -Inositol Derivatives. *J. Heterocycl. Chem.* **1992**, *29* (2), 401–405. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570290219>.
- (211) Somsák, L.; Bokor, É.; Juhász, L.; Kun, S.; Lázár, L.; Juhász-Tóth, É.; Tóth, M. New Syntheses towards C-Glycosyl Type Glycomimetics. *Pure Appl. Chem.* **2019**, *91* (7), 1159–1175. <https://doi.org/10.1515/pac-2019-0208>.
- (212) Glucobay <https://www.galinos.gr/web/drugs/main/drugs/glucobay> (accessed Feb 24, 2021).
- (213) Hur, Y.; Oh, J.-H.; Park, Y.-I. Preparation Method of Valienamine Using Solid Catalysts. WO2004108657 A1, 2004.
- (214) Dinculescu, A.; Balaban, A. T. 2,4,6-Triphenylpyrilium Hydrogen Sulfate. *J. Chem. Educ.* **1971**, *48* (5), 349. <https://doi.org/10.1021/ed048p349>.
- (215) Balaban, A. T. 2,4,6-Triphenylpyrylium Tetrafluoroborate. In *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2001; pp 2–6. <https://doi.org/10.1002/047084289X.rt384>.
- (216) Balaban, A. T. Nucleophilic Displacement of NH₂ Groups from Primary Amines via N-Substituted 2,4,6-Triphenylpyridinium. *Encycl. Reagents Org. Synth.* **2001**, 1–5. <https://doi.org/10.1002/047084289X>.
- (217) Junge, B.; Heiker, F.-R.; Kurz, J.; Müller, L.; Schmidt, D. D.; Wünsche, C. Untersuchungen Zur Struktur Des α -D-Glucosidaseinhibitors Acarbose. *Carbohydr. Res.* **1984**, *128* (2), 235–268. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(84\)85333-1](https://doi.org/10.1016/0008-6215(84)85333-1).
- (218) Kohne, B.; Marquardt, P.; Praefcke, K.; Psaras, P.; Stephan, W. Neuartige Discotisch-Flüssigkristalline, Polare Monothioscyllitol-Derivate [1,2] / Novel Discotic Liquid Crystalline, Polar Monothioscyllitol

- Derivatives [1,2]. *Zeitschrift für Naturforsch. B* **1987**, 42 (5), 628–642. <https://doi.org/10.1515/znb-1987-0519>.
- (219) Kurzer, F.; Chapman, D. The Oxidation of Partially Acylated Myoinositols. *Zeitschrift für Naturforsch. - Sect. B J. Chem. Sci.* **1996**, 51 (1), 68–78.
- (220) Koto, S.; Hirooka, M.; Yoshida, T.; Takenaka, K.; Asai, C.; Nagamitsu, T.; Sakuma, H.; Sakurai, M.; Masuzawa, S.; Komiya, M.; Sato, T.; Zen, S.; Yago, K.; Tomonaga, F. Syntheses of Penta-O-Benzyl- Myo-Inositols, O- β -L-Arabinosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-Sn-Myo-Inositol, O- α -D-Galactosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-Sn-Myo-Inositol, and O- α -D-Galactosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-O- α -D-Galactosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-Sn-Myo-Inositol. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2000**, 73 (11), 2521–2529. <https://doi.org/10.1246/bcsj.73.2521>.
- (221) James, D.; Massy, R.; Wyss, P. The Synthesis OfDL-1-(Hexadecanoyloxy)Methyl- and 1-O-Hexadecanoyl-Inositols as Potential Inhibitors of Phospholipase C. *Helv. Chim. Acta* **1990**, 73 (4), 1037–1057. <https://doi.org/10.1002/hlca.19900730428>.
- (222) Lee, K. J.; Boyd, S. A.; Radin, N. S. Improved Synthesis of Conduritol B Epoxide. *Carbohydr. Res.* **1985**, 144 (1), 148–154. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(85\)85015-1](https://doi.org/10.1016/0008-6215(85)85015-1).
- (223) Gigg, R.; Warren, C. D. Derivatives of 2,3,4,5,6-Penta-O-Benzyl-Myo-Inositol. *J. Chem. Soc. C Org.* **1969**, No. 19, 2367. <https://doi.org/10.1039/j39690002367>.
- (224) Xu, H.; Lu, Y.; Zhou, Y.; Ren, B.; Pei, Y.; Dong, H.; Pei, Z. Regioselective Benzylation of Diols and Polyols by Catalytic Amounts of an Organotin Reagent. *Adv. Synth. Catal.* **2014**, 356 (8), 1735–1740. <https://doi.org/10.1002/adsc.201301152>.
- (225) Gershon, H.; Braun, R.; Scala, A. Pyrimidines. III. Some 6-Substituted Di- and Trichloropyrimidines. *J. Med. Chem.* **1963**, 6 (1), 87–89. <https://doi.org/10.1021/jm00337a024>.
- (226) Suwiński, J.; Walczak, K. Salts of 5-Substituted Uracils with 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]-Undec-7-Ene: Convenient Reagents for Nucleophilic Addition and Substitution Reactions. *Synthesis (Stuttg)*. **2001**, 2001 (02), 0225–0228. <https://doi.org/10.1055/s-2001-10805>.
- (227) Boncel, S.; Gondela, A.; Walczak, K. Uracil as a Target for Nucleophilic and Electrophilic Reagents. *Curr. Org. Synth.* **2008**, 5 (4), 365–396. <https://doi.org/10.2174/157017908786241581>.
- (228) Myers, V. C. On the Salts of Cytosine, Thymine and Uracil. *J. Biol. Chem.* **1910**, 7 (4), 249–258. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)91561-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)91561-9).
- (229) Lohray, B. B. Cyclic Sulfites and Cyclic Sulfates: Epoxide like Synthons. *Synthesis (Stuttg)*. **1992**, 1992 (11), 1035–1052. <https://doi.org/10.1055/s-1992-26295>.
- (230) Kim, B. M.; Sharpless, K. B. Cyclic Sulfates Containing Acid-Sensitive Groups and Chemoselective Hydrolysis of Sulfate Esters. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30 (6), 655–658. <https://doi.org/10.1016/S0040->

4039(01)80274-4.

- (231) Tanaka, S.; Sugihara, Y.; Sakamoto, A.; Ishii, A.; Nakayama, J. Structures and Properties of Two Diastereomeric Cyclic Sulfites Derived From cis-3,4-Di-Tert-Butylthiolane-3,4-Diol and Thionyl Chloride. *Heteroat. Chem.* **2003**, *14* (7), 587–595. <https://doi.org/10.1002/hc.10192>.
- (232) Gao, Y.; Sharpless, K. B. Vicinal Diol Cyclic Sulfates: Like Epoxides Only More Reactive. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110* (22), 7538–7539. <https://doi.org/10.1021/ja00230a045>.
- (233) Yu, J.; Spencer, J. B. Stereoselective Deoxygenation of Myo -Inositol Monotosylates with Lithium Triethylborohydride. *J. Org. Chem.* **1996**, *61* (10), 3234–3235. <https://doi.org/10.1021/jo960413b>.
- (234) Santana, L.; Teijeira, M.; Uriarte, E. A Slightly Shorter Route to Carbocyclic Nucleosides. Synthesis of (±)- Trans -1-[2-(Hydroxymethyl)Cyclopentylmethyl]Uracil. *J. Heterocycl. Chem.* **1999**, *36* (1), 293–295. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570360146>.
- (235) Rejman, D.; Kovačková, S.; Pohl, R.; Dračinský, M.; Fiedler, P.; Rosenberg, I. A Convenient, High-Yield Synthesis of 1-Substituted Uracil and Thymine Derivatives. *Tetrahedron* **2009**, *65* (41), 8513–8523. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2009.08.019>.
- (236) Hameed P, S.; Patil, V.; Solapure, S.; Sharma, U.; Madhavapeddi, P.; Raichurkar, A.; Chinnapattu, M.; Manjrekar, P.; Shanbhag, G.; Puttur, J.; Shinde, V.; Menasinakai, S.; Rudrapatana, S.; Achar, V.; Awasthy, D.; Nandishaiah, R.; Humnabadkar, V.; Ghosh, A.; Narayan, C.; Ramya, V. K.; Kaur, P.; Sharma, S.; Werngren, J.; Hoffner, S.; Panduga, V.; Kumar, C. N. N.; Reddy, J.; Kumar KN, M.; Ganguly, S.; Bharath, S.; Bheemarao, U.; Mukherjee, K.; Arora, U.; Gaonkar, S.; Coulson, M.; Waterson, D.; Sambandamurthy, V. K.; de Sousa, S. M. Novel N-Linked Aminopiperidine-Based Gyrase Inhibitors with Improved HERG and in Vivo Efficacy against Mycobacterium Tuberculosis. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (11), 4889–4905. <https://doi.org/10.1021/jm500432n>.
- (237) Melman, A.; Zhong, M.; Marquez, V. E.; Jacobson, K. A. Synthesis of Enantiomerically Pure (S)-Methanocarbaribo Uracil Nucleoside Derivatives for Use as Antiviral Agents and P2Y Receptor Ligands. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (20), 8085–8088. <https://doi.org/10.1021/jo801224j>.
- (238) Sajiki, H.; Hirota, K. A Novel Type of Pd/C-Catalyzed Hydrogenation Using a Catalyst Poison: Chemoselective Inhibition of the Hydrogenolysis for O-Benzyl Protective Group by the Addition of a Nitrogen-Containing Base. *Tetrahedron* **1998**, *54* (46), 13981–13996. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(98\)00882-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(98)00882-5).
- (239) Nishimura, S. *Handbook of Heterogeneous Catalytic Hydrogenation for Organic Synthesis*; 2001; Vol. 5.
- (240) Shaw, G.; Warrenner, R. N. 32. Purines, Pyrimidines, and Glyoxalines. Part VII. New Syntheses of 2-Thiouracils and 2-Thiothymines. *J. Chem.*

- Soc. **1958**, 153. <https://doi.org/10.1039/jr9580000153>.
- (241) Song, G.; Naguib, F.; el Kouni, M.; Chu, C. Synthesis of Carbocyclic Orotidine Analogs as Potential Orotidine Decarboxylase Inhibitors. *Nucleosides. Nucleotides Nucleic Acids* **2001**, 20 (12), 1915–1925. <https://doi.org/10.1081/NCN-100108322>.
- (242) Pohl, R.; Rulíšek, L.; Rejman, D. The Stability and Reactivity of Activated Acryloylcarbamates as Reagents for the Synthesis of N-1 Substituted Thymine and Uracil - An NMR and DFT Study. *J. Phys. Org. Chem.* **2011**, 24 (5), 423–430. <https://doi.org/10.1002/poc.1775>.
- (243) Zegelaar-Jaarsveld, K.; van der Plas, S. C.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H. Preparation of Disaccharide Haptens Corresponding to Salmonella Serogroups B and D. *J. Carbohydr. Chem.* **1996**, 15 (6), 665–689. <https://doi.org/10.1080/07328309608005684>.
- (244) Tuck, K. L.; Tan, H. W.; Hayball, P. J. Synthesis of Tritium-Labeled Hydroxytyrosol, a Phenolic Compound Found in Olive Oil. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48 (9), 4087–4090. <https://doi.org/10.1021/jf000468l>.
- (245) Llebaria Soldevilla, A.; Bedia Girbes, C.; Harrak Serifi, Y.; Castano Garcia Angel, R.; Barra Quaglia, C. M.; Delgado, C. A. Aminocyclitol Compounds, Procedure for the Obtainment and Uses. EP2409966 (A1), 2012.
- (246) Offer, J. L.; Voorheis, H. P.; Metcalfe, J. C.; Smith, G. A. Synthesis and Tritium Radiolabelling of Fluorinated Analogues of Myo-Inositol. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1992**, No. 8, 953. <https://doi.org/10.1039/p19920000953>.
- (247) Desai, T.; Gigg, J.; Gigg, R.; Martín-Zamora, E.; Schnetz, N. The Synthesis and Resolution of (±)-1,4-DiO-Benzyl-2,3-O-Isopropylidene-Myo-Inositol. *Carbohydr. Res.* **1994**, 258 (9), 135–144. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(94\)84081-4](https://doi.org/10.1016/0008-6215(94)84081-4).
- (248) Billington, D. C.; Baker, R.; Kulagowski, J. J.; Mawer, I. M. Synthesis of Myo-Inositol 1-Phosphate and 4-Phosphate, and of Their Individual Enantiomers. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1987**, No. 4, 314. <https://doi.org/10.1039/c39870000314>.
- (249) Oppedal, H.; Tveit, I. C.; Fiksdahl, A. Nucleophilic Substitution of Chiral Amine N,N-Ditosyl derivatives. *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, 5 (5), 895–902. [https://doi.org/10.1016/S0957-4166\(00\)86241-2](https://doi.org/10.1016/S0957-4166(00)86241-2).
- (250) Varvogli, A.-A. C.; Fylaktakidou, K. C.; Farmaki, T.; Stefanakis, J. G.; Koumbis, A. E. Versatile Synthesis of 1- O -(ω-Aminolauryl)-l(4,5)P 2. *European J. Org. Chem.* **2012**, 2012 (29), 5855–5862. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201200726>.
- (251) Gerlach, H.; Kappes, D.; Boeckman, R. K. J.; Maw, G. Camphanoyl Chloride. *Org. Synth.* **1998**, 9 (September), 151. <https://doi.org/10.15227/orgsyn.071.0048>.
- (252) Bianchi, D.; Cesti, P.; Battistel, E. Anhydrides as Acylating Agents in

- Lipase-Catalyzed Stereoselective Esterification of Racemic Alcohols. *J. Org. Chem.* **1988**, *53* (23), 5531–5534. <https://doi.org/10.1021/jo00258a024>.
- (253) Berger, B.; Rabiller, C. G.; Königsberger, K.; Faber, K.; Griengl, H. Enzymatic Acylation Using Acid Anhydrides: Crucial Removal of Acid. *Tetrahedron: Asymmetry* **1990**, *1* (8), 541–546. [https://doi.org/10.1016/S0957-4166\(00\)80545-5](https://doi.org/10.1016/S0957-4166(00)80545-5).
- (254) Weber, H. K. K.; Faber, K. Stabilization of Lipases against Deactivation by Acetaldehyde Formed in Acyl Transfer Reactions. In *Methods in Enzymology*; 1997; Vol. 286, pp 509–518. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(97\)86026-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(97)86026-0).
- (255) Turcu, M. C.; Yliopisto, T. *Lipase-Catalyzed Approaches towards Secondary Alcohols: Intermediates for Enantiopure Drugs By*; 2010.
- (256) Saheki, S.; Takeda, A.; Shimazu, T. Assay of Inorganic Phosphate in the Mild pH Range, Suitable for Measurement of Glycogen Phosphorylase Activity. *Anal. Biochem.* **1985**, *148* (2), 277–281. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90229-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90229-5).
- (257) Oikonomakos, N. G.; Kontou, M.; Zographos, S. E.; Watson, K. A.; Johnson, L. N.; Bichard, C. J. F.; Fleet, G. W. J.; Acharya, K. R. N-Acetyl- β -D-Glucopyranosylamine: A Potent T-State Inhibitor of Glycogen Phosphorylase. A Comparison with α -D-Glucose. *Protein Sci.* **1995**, *4* (12), 2469–2477. <https://doi.org/10.1002/pro.5560041203>.
- (258) Maffei, V.; Mavreas, K.; Monti, F.; Mamais, M.; Gustavsson, T.; Chrysina, E. D.; Markovitsi, D.; Gimisis, T.; Venturini, A. Multiscale Time-Resolved Fluorescence Study of a Glycogen Phosphorylase Inhibitor Combined with Quantum Chemistry Calculations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2019**, *21* (14), 7685–7696. <https://doi.org/10.1039/C8CP07538G>.
- (259) Gregoriou, M.; Noble, M. E. M.; Watson, K. A.; Garman, E. F.; Johnson, L. N.; Krulle, T. M.; Fuetene, C. D. La; Fleet, G. W. J.; Oikonomakos, N. G. The Structure of a Glycogen Phosphorylase Glucopyranose Spirohydantoin Complex at 1.8 Å Resolution and 100 K: The Role of the Water Structure and Its Contribution to Binding. *Protein Sci.* **1998**, *7* (4), 915–927. <https://doi.org/10.1002/pro.5560070409>.
- (260) Watson, K. A.; Chrysina, E. D.; Tsitsanou, K. E.; Zographos, S. E.; Archontis, G.; Fleet, G. W. J.; Oikonomakos, N. G. Kinetic and Crystallographic Studies of Glucopyranose Spirohydantoin and Glucopyranosylamine Analogs Inhibitors of Glycogen Phosphorylase. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2005**, *61* (4), 966–983. <https://doi.org/10.1002/prot.20653>.
- (261) Κοντομάρκος, Δ. Ερευνητική Εργασία Διπλώματος Ειδίκευσης, ΕΚΠΑ, 2016.
- (262) Reckzeh, E. S.; Waldmann, H. Development of Glucose Transporter (GLUT) Inhibitors. *European J. Org. Chem.* **2020**, *2020* (16), 2321–2329. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201901353>.

- (263) Diniz, W. J. S.; Canduri, F. REVIEW-ARTICLE Bioinformatics: An Overview and Its Applications. *Genet. Mol. Res.* **2017**, *16* (1). <https://doi.org/10.4238/gmr16019645>.
- (264) Kapushesky, M.; Emam, I.; Holloway, E.; Kurnosov, P.; Zorin, A.; Malone, J.; Rustici, G.; Williams, E.; Parkinson, H.; Brazma, A. Gene Expression Atlas at the European Bioinformatics Institute. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38* (suppl_1), D690–D698. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp936>.
- (265) Uhlen, M.; Fagerberg, L.; Hallstrom, B. M.; Lindskog, C.; Oksvold, P.; Mardinoglu, A.; Sivertsson, A.; Kampf, C.; Sjostedt, E.; Asplund, A.; Olsson, I.; Edlund, K.; Lundberg, E.; Navani, S.; Szigartyo, C. A.-K.; Odeberg, J.; Djureinovic, D.; Takanen, J. O.; Hober, S.; Alm, T.; Edqvist, P.-H.; Berling, H.; Tegel, H.; Mulder, J.; Rockberg, J.; Nilsson, P.; Schwenk, J. M.; Hamsten, M.; von Feilitzen, K.; Forsberg, M.; Persson, L.; Johansson, F.; Zwahlen, M.; von Heijne, G.; Nielsen, J.; Ponten, F. Tissue-Based Map of the Human Proteome. *Science* (80-.). **2015**, *347* (6220), 1260419–1260419. <https://doi.org/10.1126/science.1260419>.
- (266) Pfaffl, M. W.; Tichopad, A.; Prgomet, C.; Neuvians, T. P. Determination of Stable Housekeeping Genes, Differentially Regulated Target Genes and Sample Integrity: BestKeeper--Excel-Based Tool Using Pair-Wise Correlations. *Biotechnol. Lett.* **2004**, *26* (6), 509–515. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000019559.84305.47>.
- (267) Rasouli, M.; Ostovar-Ravari, A.; Shokri-Afra, H. Characterization and Improvement of Phenol-Sulfuric Acid Microassay for Glucose-Based Glycogen. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2014**, *18* (14), 2020–2024.
- (268) Bredereck, H. Synthese von NAN-Trimethyl-Formamidin Und Bis-Dimethyl-. **1964**, 1964–1966.
- (269) Kym, O.; Ratner, L. Zur Kenntnis Substituierter A-Hydroxyl- Und A-Methyl-benzimidazole. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1912**, *45* (3), 3238–3255. <https://doi.org/10.1002/cber.19120450364>.
- (270) Mei, X.; August, A. T.; Wolf, C. Regioselective Copper-Catalyzed Amination of Chlorobenzoic Acids: Synthesis and Solid-State Structures of N-Aryl Anthranilic Acid Derivatives. *J. Org. Chem.* **2006**, *71* (1), 142–149. <https://doi.org/10.1021/jo0518809>.
- (271) Ullmann, F. Ueber Arylanthranilsäuren. *Justus Liebig's Ann. der Chemie* **1907**, *355* (3), 312–358. <https://doi.org/10.1002/jlac.19073550303>.
- (272) Donbrow, M.; Gore, P. H.; Hughes, G. K.; Longworth, W. R.; Plesch, P. H.; Amin, E. S.; Higginson, W. C. E.; Hill, M. P.; Pullman, B.; Chandra, A. K.; Basu, S.; Jones, W. J.; Orville-Thomas, W. J.; Opik, U.; Clark-Lewis, J. W.; Thompson, M. J.; Griffith, W. P.; Wilkinson, G.; Rees, A. H.; Lewis, J.; Bedford, G. R.; Partridge, M. W. Notes - A Quantitative Ulmann Reaction. *J. Chem. Soc.* **1959**, 1613. <https://doi.org/10.1039/jr9590001613>.
- (273) Sharples, D. Binding of N-Phenylanthranilic Acid Derivatives to Bovine Serum Albumin. *J. Pharm. Pharmacol.* **1982**, *34* (10), 681–683.

<https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1982.tb04704.x>.

- (274) Scherlin, S. M.; Bras, G. J.; Jakubowitsch, A. J.; Worobjowa, E. I.; Ssergejew, A. P. Acridyl-Arsonsaeuren Und Ihre Derivate. **1935**, 1786 (1924), 218–230.
- (275) Ho, T. C.; Kamimura, H.; Ohmori, K.; Suzuki, K. Total Synthesis of (+)-Vicenin 2. *Org. Lett.* **2016**, 18 (18), 4488–4490. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.6b02203>.
- (276) Lowe, G.; McPhee, F. Synthesis of [3H]-Labelled and Unlabelled 2-Deoxy-2-Fluoro-Myo-Inositol and 1-Deoxy-1-Fluoro-Scyllo-Inositol for Use in Studies of the Phosphoinositide Cycle. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1991**, No. 5, 1249. <https://doi.org/10.1039/p19910001249>.
- (277) Elamleh, David, R.; Shoup, Timothy, M. Acetylated Prodrugs for Delivery across the Blood Brain Barrier. WO2019/204808 A1, 2019.
- (278) Serrano, P.; Llebaria, A.; Delgado, A. Regio- and Stereoselective Synthesis of Aminoinositols and 1,2-Diaminoinositols from Conduritol B Epoxide. *J. Org. Chem.* **2005**, 70 (20), 7829–7840. <https://doi.org/10.1021/jo050521a>.