



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ



Μαρία Λαμπροπούλου

Χημικός

**ΣΥΝΘΕΣΗ, ΔΟΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ
ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΕΙΔΙΚΩΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ
ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΩΝ. ΜΕΛΕΤΕΣ ΜΟΡΙΑΚΟΥ
ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ
ΦΑΡΜΑΚΩΝ**

Διδακτορική Διατριβή

Αθήνα 2009

Μαρία Λαμπροπούλου

Χημικός

**ΣΥΝΘΕΣΗ, ΔΟΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ
ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΕΙΔΙΚΩΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ
ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΩΝ. ΜΕΛΕΤΕΣ ΜΟΡΙΑΚΟΥ
ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ
ΦΑΡΜΑΚΩΝ**

Ο επιβλέπων Καθηγητής:

Ηλίας Κουλαδούρος (Καθηγητής, Γ.Π.Α., Γενικό Τμήμα)

Η εξεταστική επιτροπή:

Κωνσταντίνα Γιαννακοπούλου (Ερευνήτρια Α', Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»)

Μόσχος Πολυσίου (Καθηγητής Γ.Π.Α., Γενικό Τμήμα)

Ειρήνη Μαυρίδου (Ερευνήτρια Α', Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»)

Σέρκο Χαρουτουνιάν (Καθηγητής Γ.Π.Α., Γενικό Τμήμα)

Αικατερίνη Αντωνιάδου-Βυζά (Καθηγήτρια Ε.Κ.Π.Α., Φαρμακευτικό Τμήμα)

Αθανάσιος Γκιμήσης (Επ. Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α., Τμήμα Χημείας)

Στη μνήμη της Άννας

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Γενικό Τμήμα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα»

Νόμος 5343/32, άρθρο 202§2

Ευχαριστίες

Η παρούσα ερευνητική εργασία εκπονήθηκε κατά το χρονικό διάστημα Ιανουάριος 2006 - Δεκέμβριος 2009 στο Εργαστήριο Δομικής και Υπερμοριακής Χημείας του Ινστιτούτου Φυσικοχημείας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», με χρηματοδότηση του προγράμματος ΠΕΝΕΔ 2004 (ΕΔ959) (συγχρηματοδότηση κατά 75% από την Ευρωπαϊκή Ένωση – Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο, 25% από το Ελληνικό Δημόσιο – Υπουργείο Ανάπτυξης – Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας).

Θέλω να ευχαριστήσω θερμώς όλα τα μέλη της επταμελούς επιτροπής για τις παρατηρήσεις και το ενδιαφέρον τους.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες απευθύνω στον Καθηγητή Η. Κουλαδούρο για τη συμμετοχή του στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή, την επίβλεψη της διατριβής και την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεχίσω τις σπουδές μου.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της τριμελούς επιτροπής για τις πολύτιμες παρατηρήσεις τους.

Ευχαριστώ ιδιαίτερω τη Δρ. Κ. Γιαννακοπούλου για την αμέριστη συμπαράσταση και διαρκή συμβολή της κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής της παρούσας διατριβής. Χωρίς την καθοδήγηση και την προτροπή της η εργασία αυτή δεν θα είχε ολοκληρωθεί. Την ευχαριστώ θερμά για τις πολύτιμες συμβουλές της, για την υπομονή της και για όσα με δίδαξε.

Θερμές ευχαριστίες απευθύνω στη Διευθύντρια Ερευνών του Εργαστηρίου Δρ. Ε. Μαυρίδου για τις πολύτιμες συμβουλές της.

Ευχαριστώ τον Δρ. Κ. Μισιακό (Ινστιτούτο Μικροηλεκτρονικής του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος») για την πολύτιμη βοήθειά του κατά την εκτέλεση των πειραμάτων του οπτικού συμβολόμετρου.

Ευχαριστώ τη Δρ. Μ. Παραβατού (Ινστιτούτο Ραδιοϊσοτόπων και Ραδιοδιαγνωστικών Προϊόντων του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος») για την πολύτιμη βοήθειά της κατά την εκτέλεση των βιολογικών πειραμάτων.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Δομικής και Υπερμοριακής Χημείας, την Δρ. Αναστασία Παυλίδου, την κ. Χρυσή Αγγελίδου, την κ. Μαλαματένια Μανουηλίδου, την κ. Κατερίνα Φωτιάδου, τον Δρ. Σπύρο Χατζηευθυμίου, τον Δρ. Μανώλη Σαρειδάκη, τον Δρ. Νίκο Μούρτζη, τον Δρ. Davide

Maffeo, τον Δρ. Lasse Kyllönen και τον κ. Eduard Baquero για τη βοήθεια που μου προσέφεραν και κυρίως για τη φιλία τους. Ευχαριστώ την φίλη και συνάδελφο Βέρα Βιδάλη για τις συμβουλές της και τη φιλία της.

Τέλος θέλω να ευχαριστήσω με όλη μου την καρδιά τους γονείς μου Μαίρη και Κώστα, τον αδερφό μου Ανδρέα και τον σύντροφό μου Γιάννη για την πολύτιμη συμπαράστασή τους, την υπομονή τους και την αγάπη τους.

Περίληψη

Τα αντιβιοτικά είναι φάρμακα τα οποία μέσω συγκεκριμένων μηχανισμών αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των μικροβίων που μολύνουν τους οργανισμούς. Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας των μικροβίων στα αντιβιοτικά είναι ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που έχουν ανακύψει στην θεραπεία των μικροβιακών μολύνσεων. Η παρούσα διατριβή έχει ως σκοπό να συνεισφέρει στην αντιμετώπιση των μικροβιακών μολύνσεων με νέες ουσίες. Οι ουσίες αυτές βασίζονται στις κυκλοδεξτρίνες (CDs), οι οποίες είναι υδατοδιαλυτά κυκλικά ολιγομερή της γλυκόζης. Οι CDs έχουν υδρόφιλο εξωτερικό μέρος και υδρόφοβη κοιλότητα, στην οποία εγκλωβίζουν πληθώρα μορίων, δρουν δηλαδή ως μοριακοί ξενιστές. Οι φυσικές CDs και μερικά απλά παράγωγά τους είναι ήδη εγκεκριμένοι φορείς φαρμάκων.

Τα μικρόβια εγκαθίστανται στους ιστούς μέσω πολύπλοκων μηχανισμών που περιλαμβάνουν την αναγνώριση μικροβιακών λεκτινών από σάκχαρα των επιθηλιακών κυττάρων του ξενιστή οργανισμού. Η σύνδεση λεκτινών-σακχάρων βασίζεται στην μοριακή αναγνώριση, συγκεκριμένων σακχάρων από συγκεκριμένες λεκτίνες. Η αλληλεπίδραση αυτή αλλά και πολλές άλλες διαδικασίες αναγνώρισης στον βιολογικό κόσμο ενισχύονται από το φαινόμενο της πολυδυναμικότητας (multivalency), δηλαδή την ενδυνάμωση της σύνδεσης μέσω αύξησης του αριθμού των ασθενών αλληλεπιδράσεων.

Οι νέες ουσίες που συντέθηκαν είναι παράγωγα κυκλοδεξτρινών με σάκχαρα (υδατανθρακικά συμπλέγματα, glycoclusters), τα οποία συνδυάζουν (α) παρουσία κοιλότητας για μεταφορά και εγκλεισμό φαρμάκων (β) κατάλληλα σάκχαρα αναγνώρισης για στόχευση μικροβιακών λεκτινών (γ) αυξημένη ικανότητα σύνδεσης με λεκτίνες λόγω ύπαρξης πολλών σακχάρων σε μία κυκλοδεξτρίνη (πολυδυναμικότητα). Οι ουσίες που συντέθηκαν είναι επτα-, οκτα-, δωδεκα-, δεκατετρα- και δεκαεξα- υποκατεστημένα παράγωγα α-, β- και γ- κυκλοδεξτρίνης, συνδεδεμένα μέσω μικρών γεφυρών (linkers) με τα σάκχαρα D-(+)-μαννόζη (Man), D-(+)-γαλακτόζη (Gal), D-(+)-γλυκόζη (Glc), L-(-)-φουκόζη (Fuc), N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνη (GlcNAc), N-ακετυλο-D-γαλακτοζαμίνη (GalNAc). Προέκυψαν 19 νέα υδατανθρακικά συμπλέγματα, τα οποία ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία NMR 1Δ (^1H , ^{13}C) και 2Δ (COSY, HSQC, HMBC, ROESY, NOESY) καθώς και

φασματομετρία μάζας (MS). Για την σύνθεση των ενώσεων προαπαιτήθηκε τροποποίηση των φυσικών κυκλοδεξτρινών σε καρβόξυ και αμίνο υποκατεστημένα παράγωγα, γνωστά από την βιβλιογραφία, αλλά και σε νέα παράγωγα τύπου EDTA, δηλαδή εξάκις-, επτάκις- και οκτάκις- [δι(καρβοξυμεθυλο)αμινο]κυκλοδεξτρίνες, οι οποίες μάλιστα εμφάνισαν εξαιρετικές ιδιότητες ως προς την δέσμευση λανθανιδών και άλλων μετάλλων. Οι ανωτέρω CDs, συνδέθηκαν με τα τροποποιημένα σάκχαρα μέσω αμιδικών δεσμών. Για την τροποποίηση των σακχάρων ακολουθήθηκαν βιβλιογραφικές μέθοδοι με πολλές βελτιώσεις και τροποποιήσεις.

Τα υδατανθρακικά συμπλέγματα, όπως έδειξαν πειράματα με διάταξη φασματοσκοπίας ανάκλασης λευκού φωτός (WLRs), συνδέονται ισχυρότερα με επιλεγμένες λεκτίνες όταν φέρουν πολλά σάκχαρα αναγνώρισης σε σύγκριση με μονο-υποκατεστημένα ανάλογα, επιβεβαιώνοντας την αποτελεσματικότητα της πολυδυναμικότητας. Η ισχύς της σύνδεσης (K) κυμαίνεται μεταξύ 10^4 M^{-1} και $\sim 10^6 \text{ M}^{-1}$, ανάλογα με τον αριθμό των μονοσακχαριτών που φέρει η CD. Επιπλέον *in vitro* πειράματα όπου υδατανθρακικά συμπλέγματα επισημασμένα με φθορίζουσα ουσία επώασθησαν με δύο επιλεγμένα στελέχη μικροβίων *Aeromonas caviae* (ATCC 15468) και *Ralstonia solanacearum* (ATCC 11696), έδειξαν ότι οι ενώσεις προσκολλώνται στα τοιχώματα των βακτηρίων και μάλιστα τόσο περισσότερο, όσο περισσότερα σάκχαρα φέρουν, όπως έδειξαν πειράματα φθορισμομετρίας και μικροσκοπίας φθορισμού. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει την ικανότητα στόχευσης (targeting) των ενώσεων και την αποτελεσματικότητα της πολυδυναμικότητας (multivalency). Επιπροσθέτως, πειράματα ενζυμικής υδρόλυσης του αντιβιοτικού αμπικιλλίνη έδειξαν αναστολή υδρόλυσης έως και 30% παρουσία υδατανθρακικών συμπλεγμάτων. Τέλος προκαταρκτική εξέταση της αποτελεσματικότητας παρουσία σιπροφλοξασίνης, λεβοφλοξασίνης και οξολινικού οξέος μερικών από τις τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες σε ικανό αριθμό νοσοκομειακών μικροβιακών στελεχών έδειξε μικρή θετική επίδραση στην MIC (minimum inhibition concentration).

Abstract

Antibiotics are drugs that inhibit via specific mechanisms the multiplication of bacteria that infect organisms. Development of resistance to antibiotics is one of the major problems encountered in the treatment of microbial infections. The current thesis aims to contribute with new substances in the treatment of microbial infections. The new substances are based on natural cyclodextrins (CDs). The CDs are water soluble cyclic oligomers of glucose with hydrophilic exterior and hydrophobic cavity that can encapsulate a variety of molecules. The natural CDs and some simple derivatives are already approved drug carriers.

Microbes adhere to the tissues of the host organism through complex mechanisms that include recognition by microbial lectins of the sugars found on the surface of epithelial cells. The interaction between lectins and carbohydrates is based on molecular recognition, of specific sugars from specific lectins. This and many other biological recognition processes rely on the multivalency effect, which is responsible for enhancement of weak interactions.

CD derivatives with sugars (glycoclusters) were synthesised, which can combine (a) presence of a cavity for drug delivery and inclusion (b) suitable recognition sugars for targeting microbial lectins (c) increased ability to interact with lectins due to numerous sugars on a cyclodextrin (multivalency effect). These substances are hepta-, octa-, dodeca-, tetradeca- and hexadeca- substituted derivatives of α -, β - and γ - cyclodextrin, connected via short linkers with the sugars D-(+)-mannose (Man), D-(+)-galactose (Gal), D-(+)-glucose (Glc), L-(-)-fucose (Fuc), *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc), *N*-acetyl-D-galactosamine (GalNAc). Thus, 19 new glycoclusters were synthesized and identified by detailed analysis of their NMR and MS spectra. For the synthesis of glycoclusters the natural cyclodextrins were modified either to known carboxy and amino- substituted derivatives or to new EDTA-type compounds, i.e. to hexakis-, heptakis- and octakis- [bis(carboxymethyl)amino] cyclodextrins. The EDTA-CDs showed excellent properties in terms of binding lanthanide and other metal cations. These CDs were coupled with suitably modified sugars via amide linkages. For the modification of sugars literature methods were adopted with several alterations and improvements.

White Light Reflectance Spectroscopy (WLRS) experiments showed that the glycoclusters interact stronger with selected lectins when they bear more than one recognition sugar (multivalency effect). The binding constant K , was found to range between 10^4 M^{-1} and $\sim 10^6 \text{ M}^{-1}$, depending on the glycocluster. In addition *in vitro* experiments using glycoclusters labeled with a fluorescent molecule and incubated with two selected microbial strains *Aeromonas caviae* (ATCC 15468) and *Ralstonia solanacearum* (ATCC 11696), showed by fluorimetry and fluorescence microscopy that the interactions between the bacterial cell wall and the compound of interest are enhanced by increasing the number of sugars. This proves the targeting ability of compounds and the effectiveness of multivalency. In addition, enzymatic hydrolysis experiments of ampicillin in the presence of glycoclusters showed 30% inhibition. Finally, preliminary examination of the effectiveness of ciprofloxacin, levofloxacin and oxolinic acid in the presence of some modified cyclodextrins using a number of hospital microbial strains showed a limited positive effect in the MIC (minimum inhibition concentration) values.

Συντομογραφίες

CD	κυκλοδεξτρίνη
α CD	α -κυκλοδεξτρίνη
β CD	β -κυκλοδεξτρίνη
γ CD	γ -κυκλοδεξτρίνη
HO β CD	υδροξυπροπυλο- β -κυκλοδεξτρίνη
Me β CD	μεθυλο- β -κυκλοδεξτρίνη
Malt. β CD	μαλτοζυλο- β -κυκλοδεξτρίνη
apBr	εξακίς(6-βρωμο-6-δεοξυ)- α -κυκλοδεξτρίνη
apN ₃	εξακίς(6-αζίδο-6-δεοξυ)- α -κυκλοδεξτρίνη
apNH ₂	εξακίς(6-αμινο-6-δεοξυ)- α -κυκλοδεξτρίνη
DMapN ₃	εξακίς(6-αζίδο-6-δεοξυ-2,3-δι- <i>O</i> -μεθυλο)- α -κυκλοδεξτρίνη
DMapNH ₂	εξακίς(6-αμινο-6-δεοξυ-2,3-δι- <i>O</i> -μεθυλο)- α -κυκλοδεξτρίνη
aedta	εξακίς[6- <i>N,N'</i> -δι(καρβοξυμεθυλο)](2,3-δι- <i>O</i> -μεθυλο)-6-δεοξυ- α -κυκλοδεξτρίνη
bpBr	επτακίς(6-βρωμο-6-δεοξυ)- β -κυκλοδεξτρίνη
bpI	επτακίς(6-ιωδο-6-δεοξυ)- β -κυκλοδεξτρίνη
bpN ₃	επτακίς(6-αζίδο-6-δεοξυ)- β -κυκλοδεξτρίνη
bpNH ₂	επτακίς(6-αμινο-6-δεοξυ)- β -κυκλοδεξτρίνη
bpsp	επτακίς[6-(καρβοξυαιθυλοθειο)-6-δεοξυ]- β -κυκλοδεξτρίνη
bmsp	μονο[6-(καρβοξυαιθυλοθειο)-6-δεοξυ]- β -κυκλοδεξτρίνη
bguan	επτακίς(6-δεοξυ-6-γουανιδινο)- β -κυκλοδεξτρίνη
bpen	επτακίς[6-(αμινοαιθυλαμινο)-6-δεοξυ]- β -κυκλοδεξτρίνη
DM β pN ₃	επτακίς(6-αζίδο-6-δεοξυ-2,3-δι- <i>O</i> -μεθυλο)- β -κυκλοδεξτρίνη
DM β pNH ₂	επτακίς(6-αμινο-6-δεοξυ-2,3-δι- <i>O</i> -μεθυλο)- β -κυκλοδεξτρίνη
bedta	επτακίς[6- <i>N,N'</i> -δι(καρβοξυμεθυλο)](2,3-δι- <i>O</i> -μεθυλο)-6-δεοξυ- β -κυκλοδεξτρίνη
gpBr	οκτακίς(6-βρωμο-6-δεοξυ)- γ -κυκλοδεξτρίνη
gpN ₃	οκτακίς(6-αζίδο-6-δεοξυ)- γ -κυκλοδεξτρίνη
gpNH ₂	οκτακίς(6-αμινο-6-δεοξυ)- γ -κυκλοδεξτρίνη
gpsp	οκτακίς[6-(καρβοξυαιθυλοθειο)-6-δεοξυ]- γ -κυκλοδεξτρίνη
gpen	οκτακίς[6-(αμινοαιθυλαμινο)-6-δεοξυ]- γ -κυκλοδεξτρίνη

gpren	οκτακίς[6-(αμινοπροπυλαμινο)-6-δεοξυ]-γ-κυκλοδεξτρίνη
DMγpN ₃	οκτακίς(6-αζίδο-6-δεοξυ-2,3-δι- <i>O</i> -μεθυλο)-γ-κυκλοδεξτρίνη
DMγpNH ₂	οκτακίς(6-αμινο-6-δεοξυ-2,3-δι- <i>O</i> -μεθυλο)-γ-κυκλοδεξτρίνη
gedta	οκτακίς[6- <i>N,N'</i> -δι(καρβοξυμεθυλο)](2,3-δι- <i>O</i> -μεθυλο)-6-δεοξυ-γ-κυκλοδεξτρίνη
Man	D(+)-μαννόζη
Gal	D-(+)-γαλακτόζη
Fuc	L-(-)-φουκόζη
Glc	D-(+)-γλυκόζη
GlcNAc	<i>N</i> -ακετυλο-D-(+)-γλυκοζαμίνη
GalNAc	<i>N</i> -ακετυλο-D-(+)-γαλακτοζαμίνη
NeuNAc	<i>N</i> -ακετυλονευραμινικό οξύ
Lac	λακτόζη
Rha	ραμνόζη
cipro	σιπροφλοξασίνη
levo	λεβοφλοξασίνη
oxo	οξολινικό οξύ
WGA	Wheat Germ (<i>triticum vulgare</i>) Agglutinin
EcorL	<i>Erythrina corallodendron</i> Lectin
AAL	<i>Aleuria Aurantia</i> Lectin
Ph ₃ P	τριφαινυλοφωσφίνη
Ph ₃ P=O	οξείδιο της τριφαινυλοφωσφίνης
HBTU	τετραμεθυλοουρονικό άλας του εξαφθοροφωσφορικού- <i>O</i> -βενζοτρίαζολίου
<i>i</i> Pr ₂ NET	δισοπροπυλική αιθυλαμίνη
DSC	ανθρακικός εστέρας του <i>N,N'</i> -διηλεκτρολυοϊμιδίου
HOBt	υδροξυβενζοτρίαζόλιο
HATU	τετραμεθυλοουρονικό άλας του εξαφθοροφωσφορικού αζαβενζοτρίαζολίου
DCC	δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμίδιο
DMF	διμεθυλοφορμαμίδιο
DIPEA	<i>N,N'</i> -δισοπροπυλαιθυλαμίνη
MeONa	μεθοξείδιο του νατρίου

MeOH	μεθανόλη
EtOH	αιθανόλη
NMP	<i>N</i> -μεθυλοπυρρολιδινόνη-2
DMAP	4-διμεθυλοαμινοπυριδίνη
AcOEt	οξικός αιθυλεστέρας
DMSO	διμεθυλοσουλφοξείδιο
DCM	διχλωρομεθάνιο
D ₂ O	οξείδιο του δευτερίου
CD ₃ OD	δευτεριωμένη μεθανόλη
CDCl ₃	δευτεριωμένο χλωροφόρμιο
COSY	COrrrelation SpectroscopY
ROESY	Rotating-frame Overhauser Effect SpectroscopY
NOESY	Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
FITC	ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη
r.t	θερμοκρασία δωματίου
Ts ₂ O	τοσυλοανυδρίτης
2Δ φάσμα NMR	2 διαστάσεων φάσμα NMR

Πίνακας Περιεχομένων

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	i
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	iii
ABSTRACT	v
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	vii
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	x
ΜΕΡΟΣ Ι-ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 - ΥΠΕΡΜΟΡΙΑΚΗ ΧΗΜΕΙΑ-ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΕΣ-ΦΟΡΕΙΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ	2
1.1 Υπερμοριακή Χημεία	3
1.2 Κυκλοδεξτρίνες	4
1.3 Τροποποιημένες Κυκλοδεξτρίνες	6
1.3.1 Μονοϋποκατεστημένες Κυκλοδεξτρίνες	6
1.3.2 Πλήρως υποκατεστημένες Κυκλοδεξτρίνες	8
1.4 Οι κυκλοδεξτρίνες ως φορείς Φαρμάκων	10
1.5 Συμπεράσματα	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ-ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ	15
2.1 Εισαγωγή	16
2.2 Τρόπος δράσης των αντιβιοτικών	17
2.2.1 Κινολόνες και β-λακταμικά αντιβιοτικά	17
2.2.2 Αμινογλυκοσίδες	18
2.3 Μηχανισμοί βακτηριακής ανθεκτικότητας	21
2.4 Συμπεράσματα	22

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΡΟΛΟΣ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ - ΛΕΚΤΙΝΩΝ ΣΤΗΝ	
ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΜΟΛΥΝΣΗ	24
3.1 Λεκτίνες και Συγκολλητίνες	25
3.2 Υδατάνθρακες ως υποσχόμενα αντι-συγκολλητικά φάρμακα για αντιμετώπιση μολυσματικών ασθενειών	28
3.3 Συμπεράσματα	29
ΜΕΡΟΣ ΙΙ - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 - 6-ΠΕΡΙ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΩΝ ΜΕ	
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ	31
4.1 Εισαγωγή	32
4.2 Σύνθεση και φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός αμίνo και καρβόξυ παραγώγων κυκλοδεξτρινών	33
4.3 Σύνθεση νέων καρβόξυ παραγώγων α-, β- και γ- κυκλοδεξτρινών τύπου EDTA	37
4.4 Ιδιότητες των aedta , bedta και gedta	49
4.5 Συμπεράσματα	50
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 - ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΜΟΝΟΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ	51
5.1 Εισαγωγή	52
5.2 Τροποποίηση σακχάρων με αμινοάλκυλο ομάδες	60
5.2.1 Σύνθεση αμίνo παραγώγων D-(+)-μαννόζης	61
5.2.2 Σύνθεση αμίνo παραγώγων D-(+)-γαλακτόζης	66
5.2.3 Σύνθεση αμίνo παραγώγων L-(-)-φουκόζης	69
5.2.4 Σύνθεση αμίνo παραγώγων N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνης	71
5.2.5 Σύνθεση αμίνo παραγώγων N-ακετυλο-D-γαλακτοζαμίνης	73
5.3 Τροποποίηση σακχάρων με καρβοξυλοάλκυλο ομάδες	74
5.3.1 Σύνθεση καρβόξυ παραγώγων D-(+)-μαννόζης	75
5.3.2 Σύνθεση καρβόξυ παραγώγων D-(+)-γαλακτόζης	76
5.3.3 Σύνθεση καρβόξυ παραγώγων D-(+)-γλυκόζης	78
5.4 Συμπεράσματα	80

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 – ΟΜΟΙΟΠΟΛΙΚΗ ΣΥΝΔΕΣΗ ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΩΝ ΜΕ ΣΑΚΧΑΡΑ ΜΕΣΩ ΑΜΙΔΙΚΩΝ ΔΕΣΜΩΝ– ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΙΚΩΝ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΩΝ (GLYCOCLUSTERS)	82
6.1 Εισαγωγή	83
6.2 Σύνδεση αμίνο σακχάρων με καρβόξυ κυκλοδεξτρίνες	91
6.3 Σύνδεση καρβόξυ σακχάρων με αμίνο κυκλοδεξτρίνες	100
6.4 Σύνθεση υδατανθρακικών συμπλεγμάτων χρησιμοποιώντας τα νέα καρβόξυ παράγωγα α-, β-, γ- κυκλοδεξτρίνης τύπου EDTA	109
6.5 Επισημάνση των υδατανθρακικών συμπλεγμάτων με φλουορεσκεΐνη	114
6.6 Συμπεράσματα	119
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 – ΜΕΛΕΤΕΣ ΕΓΚΛΩΒΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΤΗΣ ΑΜΠΙΚΙΛΛΙΝΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΙΚΩΝ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΩΝ	120
7.1 Εισαγωγή	121
7.2 Επίδραση τροποποιημένων κυκλοδεξτρινών και υδατανθρακικών συμπλεγμάτων στην ταχύτητα της υδρόλυσης της αμπικιλλίνης παρουσία του ενζύμου β-λακταμάση	124
7.2.1 Επεξεργασία των γραφικών παραστάσεων	132
7.3 Συμπεράσματα	136
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 – ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ/ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΙΚΩΝ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΩΝ ΜΕ ΛΕΚΤΙΝΕΣ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ	138
8.1 Εισαγωγή	139
8.2 Μελέτες αλληλεπιδράσεων υδατανθρακικών συμπλεγμάτων/ λεκτινών με συμβολόμετρο λευκού φωτός	139
8.3 Μικροσκοπία Φθορισμού	154
8.4 Παράγωγα κυκλοδεξτρινών ως μοριακοί μεταφορείς αντιμικροβιακών παραγόντων. Μελέτες σε στελέχη μικροβίων	169
8.5 Συμπεράσματα	171

ΜΕΡΟΣ ΙΙΙ – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ	172
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9 - ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	173
9.1 Γενικά δεδομένα για τη σύνθεση και το χαρακτηρισμό παραγώγων κυκλοδεξτρινών	174
9.1.1 Αντιδραστήρια	174
9.1.2 Οργανολογία	175
9.1.3 Παράμετροι λήψης φασμάτων NMR δύο διαστάσεων	175
9.2 Σύνθεση 6-περι-υποκατεστημένων κυκλοδεξτρινών με λειτουργικές ομάδες	176
9.2.1 Σύνθεση παραγώγων α-κυκλοδεξτρίνης	176
9.2.2 Σύνθεση παραγώγων β-κυκλοδεξτρίνης	179
9.2.3 Σύνθεση παραγώγων γ-κυκλοδεξτρίνης	186
9.3 Τροποποίηση σακχάρων αναγνώρισης με λειτουργικές ομάδες	190
9.3.1 Σύνθεση παραγώγων D-(+)-μαννόζης	190
9.3.2 Σύνθεση παραγώγων D-(+)-γαλακτόζης	195
9.3.3 Σύνθεση παραγώγων L-(-)-φουκόζης	198
9.3.4 Σύνθεση παραγώγων N-ακετυλο-D-(+)-γλυκοζαμίνης	201
9.3.5 Σύνθεση παραγώγων N-ακετυλο-D-(+)-γαλακτοζαμίνης	203
9.3.6 Σύνθεση παραγώγων D-(+)-γλυκόζης	204
9.4 Ομοιοπολική σύνδεση κυκλοδεξτρινών με σάκχαρα μέσω αμιδικών δεσμών - Δημιουργία υδατανθρακικών συμπλεγμάτων (glycoclusters)	206
9.4.1 Σύνδεση αμίνιο σακχάρων με καρβόξυ κυκλοδεξτρίνες	206
9.4.2 Σύνδεση καρβόξυ σακχάρων με αμίνιο κυκλοδεξτρίνες	217
9.5 Επισήμανση υδατανθρακικών συμπλεγμάτων με φλουορεσκεΐνη	221
9.6 Μελέτες υδρόλυσης της αμικιλλίνης παρουσία του ενζύμου β-λακταμάσης	225
9.7 Μελέτες με Οπτικό Συμβολόμετρο	226
9.8 Βιολογικές Μελέτες	227
9.8.1 Μελέτες με Μικροσκοπία Φθορισμού	227
9.8.1.1 Υλικά	227
9.8.1.2 Πειραματικά βήματα	228

9.8.2 Μελέτες με Φθορισμομετρία	229
9.8.2.1 Υλικά	229
9.8.2.2 Πειραματικά βήματα	229
9.9 Μελέτες δράσης αντιβιοτικών σε μικροβιακά στελέχη παρουσία επιλεγμένων βCDs	229
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1. Πίνακες μέτρησης MIC μικροβιακών στελεχών με λεβοφλοξασίνη, σιπροφλοξασίνη και οξολινικό οξύ	231
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2. Σύνθεση Τοκοτριενολών	240
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3. Δομές βιοδραστικών ουσιών	253
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	257

ΜΕΡΟΣ Ι
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ

1

ΥΠΕΡΜΟΡΙΑΚΗ ΧΗΜΕΙΑ
ΚΥΚΛΟΔΕΤΡΙΝΕΣ
ΦΟΡΕΙΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΥΠΕΡΜΟΡΙΑΚΗ ΧΗΜΕΙΑ-ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΕΣ- ΦΟΡΕΙΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

1.1 Υπερμοριακή Χημεία¹

«Η Υπερμοριακή Χημεία θα μπορούσε να ορισθεί ως η Χημεία πέραν του μορίου»

J. M. Lehn (Nobel Χημείας 1987)

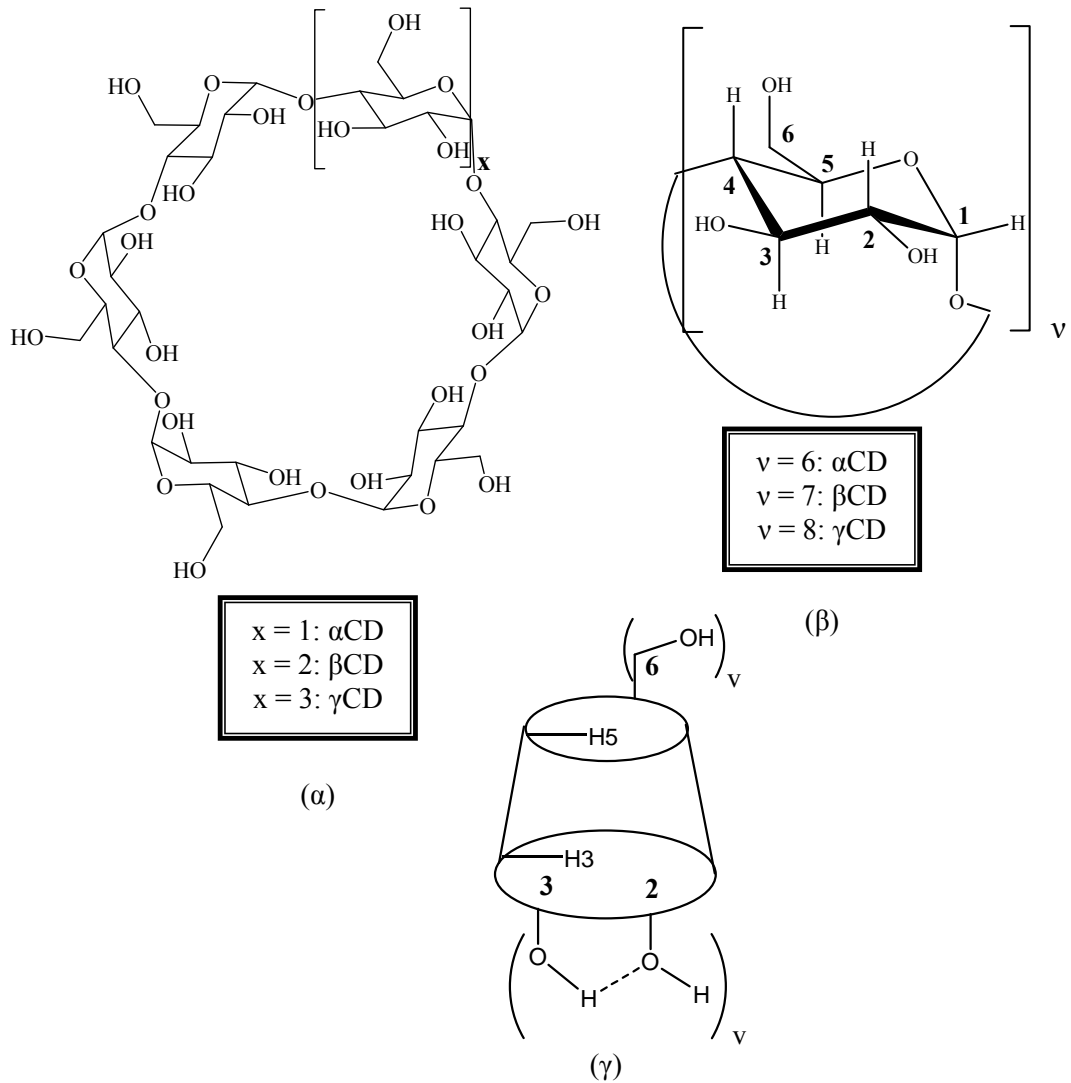
Τα υπερμόρια είναι οργανωμένες μονάδες ανώτερης πολυπλοκότητας, αποτελούμενες από δύο και περισσότερα μόρια, συνεπώς προκύπτουν από τη μη ομοιοπολική σύνδεση δύο ή περισσότερων χημικών ειδών μέσω διαμοριακών δυνάμεων. Τα υπερμόρια σταθεροποιούνται μέσω των συστατικών μοριακής αναγνώρισης και έχουν συγκεκριμένες ιδιότητες συνήθως διαφορετικές από αυτές των επιμέρους μορίων.² Η μοριακή αναγνώριση είναι εκλεκτικό φαινόμενο και βασίζεται στη χωρική συμπληρωματικότητα και τη χημική συγγένεια των αλληλεπιδρώντων χημικών ειδών, εκφράζεται δε μέσω διαμοριακών δυνάμεων. Οι διαμοριακές δυνάμεις περιλαμβάνουν υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, ηλεκτροστατικές δυνάμεις, δεσμούς υδρογόνου και δυνάμεις Van der Waals.³

Μία μεγάλη κατηγορία υπερμορίων αποτελούν τα σύμπλοκα εγκλεισμού, των οποίων ο σχηματισμός είναι αποτέλεσμα αναγνώρισης και μη ομοιοπολικής σύνδεσης τουλάχιστον δύο μορίων. Το ένα από αυτά τα μόρια διαθέτει κάποιου είδους κοιλότητα και καλείται ξενιστής (π.χ. κυκλοδεξτρίνες, κυκλοφάνια, κρυπτάνια κλπ.⁴) και το άλλο ξενιζόμενο μόριο (συνήθως μικρό οργανικό μόριο ή τμήμα μορίου),⁵ ο δε εγκλεισμός χαρακτηρίζεται ως μοριακός. Το ρόλο ξενιστών μπορούν να παίζουν και ανόργανες ουσίες, όπως οι ζεόλιθοι και ο γραφίτης, οι οποίες σχηματίζουν κοιλότητες και πόρους όπου εισέρχονται τα ξενιζόμενα μόρια, οπότε ο εγκλεισμός είναι μακροσκοπικός.

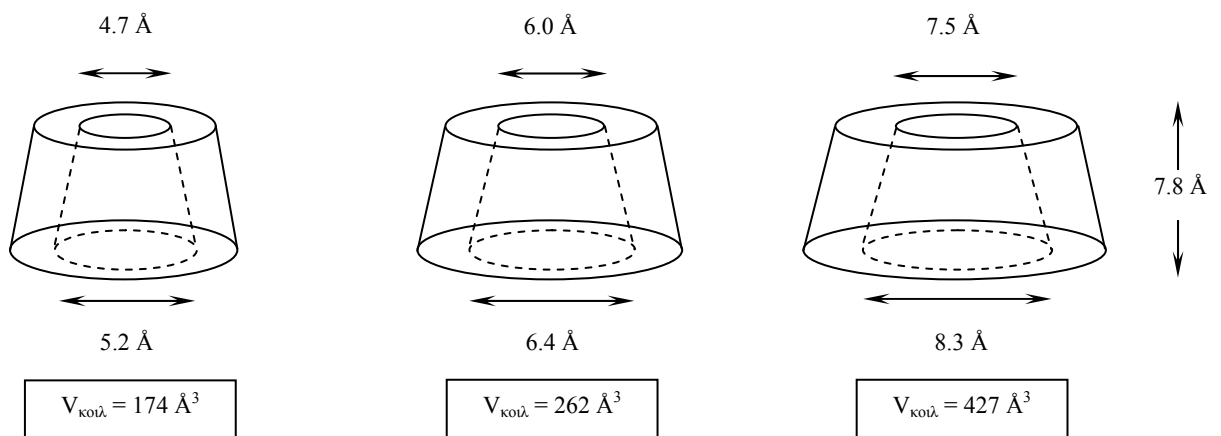
1.2 Κυκλοδεξτρίνες

Οι φυσικές κυκλοδεξτρίνες (CDs) είναι μία κατηγορία κυκλικών μη αναγόντων ολιγοσακχαριτών που αποτελούνται από μονάδες α-D-γλυκοπυρανόζης (Σχήμα 1.1α) σε διαμόρφωση ανακλίντρου 4C_1 (Σχήμα 1.1β). Οι γλυκοπυρανοζιτικοί δακτύλιοι ενώνονται μεταξύ τους με α-1,4-γλυκοζιτικό δεσμό και ανάλογα με τον αριθμό των μονάδων γλυκόζης, 6, 7, 8 διακρίνονται σε αCD, βCD και γCD, αντιστοίχως.^{6,7,8,9} Δεν έχει αναφερθεί η ύπαρξη κυκλοδεξτρινών με λιγότερες από 6 γλυκοπυρανόζες, ενώ είναι γνωστές κυκλοδεξτρίνες με περισσότερες από 8 μονάδες, όπως οι δ-, ε-, ζ- CDs (με 9, 10, 11 και 12 μονάδες α-D-γλυκοπυρανόζης αντιστοίχως).^{10,11} Οι φυσικές κυκλοδεξτρίνες παρασκευάζονται με αποικοδόμηση της αμυλόζης, συστατικό του αμύλου, και επακόλουθη σύνδεση των τελικών μονάδων γλυκόζης με γλυκοζιτικό δεσμό από το ένζυμο γλυκοζυλοτρανσφεράση, το οποίο παράγεται από αρκετά είδη μικροοργανισμών, όπως οι *Bacillus macerans*, *Klebsiella oxytoca*, *Bacillus circulans* και *Alkalophylic bacillus*.¹²

Η δομή των κυκλοδεξτρινών έχει σχήμα κόλουρου κώνου (Σχήμα 1.1γ) με δύο υδρόφιλες βάσεις, εκ των οποίων η μία ευρύτερη και η άλλη στενότερη, και με υδρόφοβη κοιλότητα. Η ευρύτερη βάση σχηματίζεται από τις δευτεροταγείς ομάδες υδροξυλίων των C2 και C3 και η στενότερη βάση σχηματίζεται από τις πρωτοταγείς ομάδες υδροξυλίων των C6 (Σχήμα 1.1α). Το μακροκυκλικό μόριο σταθεροποιείται μέσω δεσμών υδρογόνου μεταξύ των υδροξυλίων $OH_{2(v)} \dots OH_{3(v+1)}$ γειτονικών γλυκοπυρανοζών.^{6,8,10} Στο εσωτερικό της κοιλότητας κατευθύνονται τα άτομα H3 και H5, τα οποία σχηματίζουν δύο νοητούς δακτυλίους, μεταξύ των οποίων βρίσκεται ο δακτύλιος των γλυκοζιτικών ατόμων O1 και O4.¹³ Η υδρόφοβη κοιλότητα (Σχήμα 1.2), δύναται να φιλοξενήσει υδρόφοβα μόρια ή μέρος μορίων και να σχηματίσει σύμπλοκο εγκλεισμού. Τα ως άνω σύμπλοκα σχηματίζονται σε υδατικό διάλυμα, καθότι οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις σε συνδυασμό με τις δυνάμεις Van der Waals, τους δεσμούς υδρογόνου, τις αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου καθώς και τυχόν ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, αποτελούν ισχυρή κινητήρια δύναμη για το σχηματισμό και είναι υπεύθυνες για τη σταθερότητα των συμπλόκων εγκλεισμού.



Σχήμα 1.1 (α) Κυκλική δομή των τριών κύριων φυσικών κυκλοδεξτρινών, (β) δομική μονάδα των κυκλοδεξτρινών η α-D-γλυκοκυρανόζη, (γ) σχηματική αναπαράσταση κυκλοδεξτρίνης υπό μορφή κώλου, όπου φαίνεται η θέση των σημαντικότερων ατόμων και ομάδων.



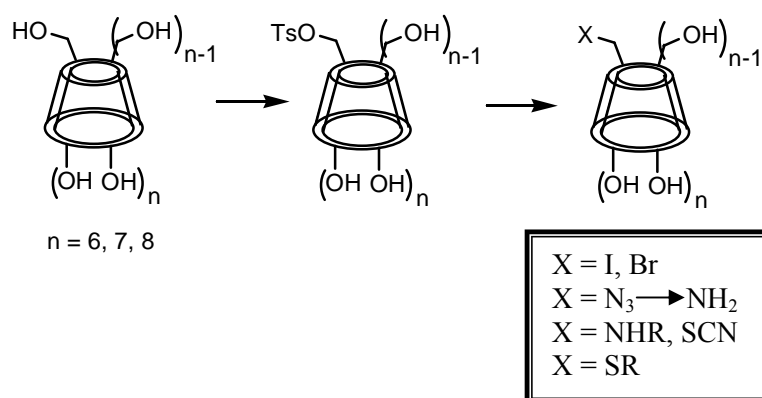
Σχήμα 1.2 Διαστάσεις της κοιλότητας κυκλοδεξτρινών, όπως προκύπτουν από την αφαίρεση των ακτίνων van der Waals των ατόμων.

1.3 Τροποποιημένες Κυκλοδεξτρίνες

Οι φυσικές κυκλοδεξτρίνες είναι σχετικά άκαμπτα υδατοδιαλυτά μόρια και οι δυνατότητές τους ως προς το μέγεθος των μορίων που δύνανται να εγκλείσουν στην κοιλότητά τους είναι περιορισμένες. Επομένως η σύνθεση τροποποιημένων κυκλοδεξτρινών κρίνεται απαραίτητη, προκειμένου να εισαχθούν ομάδες που επιφέρουν μεταβολές στο σχήμα και στο μέγεθος της κοιλότητας και που σε πολλές περιπτώσεις αυξάνουν τη διαλυτότητα στο νερό ή σε άλλους διαλύτες. Η τροποποίηση των κυκλοδεξτρινών συνίστανται στην εισαγωγή ομάδων στην πρωτοταγή ή και στη δευτεροταγή τους πλευρά είτε με μερική ή με πλήρη υποκατάσταση.

1.3.1 Μονοϋποκατεστημένες Κυκλοδεξτρίνες

Η περίπτωση της μερικής υποκατάστασης είναι η πιο περίπλοκη, τόσο από πλευράς ποικιλίας προϊόντων όσο και από πλευράς σύνθεσης. Οι πιο συχνές περιπτώσεις είναι εκείνες των μονο-, δι- και τριυποκατεστημένων κυκλοδεξτρινών. Στο σχήμα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι συνηθέστεροι τρόποι μονοϋποκατάστασης στην πρωτοταγή πλευρά και περιγράφεται περιληπτικά η κάθε περίπτωση (Σχήμα 1.3).



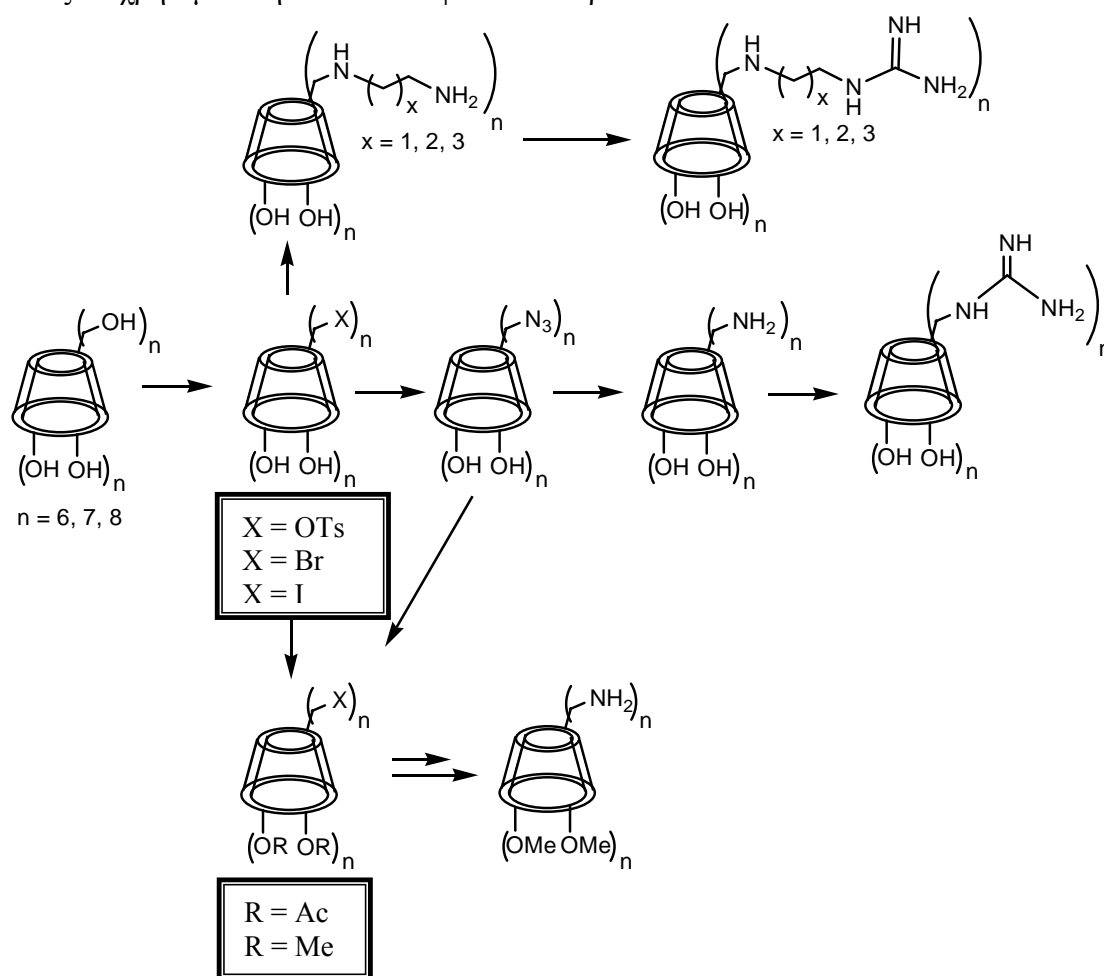
Σχήμα 1.3: Συνοπτική παρουσίαση μεθόδων μονοϋποκατάστασης στην πρωτοταγή πλευρά

Η συνηθέστερη μέθοδος για μονοϋποκατάσταση στην πρωτοταγή πλευρά είναι μέσω προσβολής μίας ένωσης με πυρηνόφιλη ομάδα στην μονο-6-τολουυλοσουλφονυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (μονο-6-TsO-βCD). Η τελευταία αποτελεί πολύ χρήσιμο και δραστικό ενδιάμεσο προϊόν και σχηματίζεται κατά τη σχεδόν 100% εκλεκτική τροποποίηση μίας και μόνον ομάδας -OH της πρωτοταγούς πλευράς, έπειτα από επίδραση ενός ισοδύναμου *p*-TsCl σε υδατικό διάλυμα βάσης για μικρό χρονικό διάστημα και τον επακόλουθο καθαρισμό με ανακρυστάλλωση.¹⁴ Το προϊόν επίσης μπορεί να σχηματιστεί και με επίδραση *p*-τολουυλοσουλφονικού ανυδρίτη σε βασικό υδατικό διάλυμα.¹⁵ Ο σχηματισμός μονο-6-TsO-βCD σε καθαρή μορφή αποδίδεται στην *in situ* συμπλοκοποίηση ενός ισοδύναμου του αντιδραστήριου, λόγω υδατικού διαλύτη, που αναγκαστικά δίνει μονο-υποκατάσταση στον C6. Το τίμημα είναι μέτρια-χαμηλή απόδοση λόγω υδρόλυσης του προϊόντος, στις συνθήκες της αντίδρασης. Σε παλαιότερη βιβλιογραφία το προϊόν αυτό είχε παρασκευασθεί σε βασικό οργανικό διαλύτη πυριδίνη αλλά με παράλληλο σχηματισμό δι-υποκατεστημένων παραγώγων.¹⁶ Η πυρηνόφιλη ομάδα που προσβάλλει τον C6 της μονο-6-TsO-βCD μπορεί να είναι -I, -N₃⁻, -NHR, -SR, κλπ., παρέχοντας αντιστοίχως μονο-6-ιωδο-,¹⁷ -αζιδο-,¹⁸ -αμινο-, -θειο-¹⁹ β-κυκλοδεξτρίνη. Η μονο-6-φορμυλοκυκλοδεξτρίνη, προκύπτει από το ίδιο παράγωγο, μονο-6-TsO-βCD έπειτα από οξείδωσή του σε DMSO/κολλιδίνη. Ιδιαίτερα σημαντικά μόνο-παραγώγα των κυκλοδεξτρινών είναι τα μονο-6-άμινο-παραγώγα. Αυτά λαμβάνονται από τα αντίστοιχα μονοαζίδια με αναγωγή παρουσία τριφαινυλοφωσφίνης σε υδατικό διάλυμα αμμωνίας (αντίδραση Staudinger)²⁰ και χρησιμοποιούνται σε αντιδράσεις σύζευξης στην πρωτοταγή πλευρά με τη μέθοδο του καρβοδιϊμιδίου (DCC)^{21,22} με καρβοξυλικές ενώσεις.

Τα μονοπαραγώγα των κυκλοδεξτρινών στερούνται μοριακής συμμετρίας και τα φάσματα ¹H και ¹³C NMR είναι ιδιαίτερα πολύπλοκα καθώς η προσάρτηση ενός υποκαταστάτη σε μια γλυκοζιτική μονάδα οδηγεί σε διαφοροποίηση των συχνοτήτων συντονισμού των αντίστοιχων πρωτονίων κάθε γλυκόζης. Το φαινόμενο αυτό επιτείνεται από φαινόμενα αυτοεγκλεισμού (ο υποκαστάτης εγκλείεται στην δική του ή σε άλλη κοιλότητα), οπότε τα φάσματα ¹H NMR γίνονται πιο δυσανάγνωστα λόγω αλλαγής μετατοπίσεων των ατόμων H της κοιλότητας.

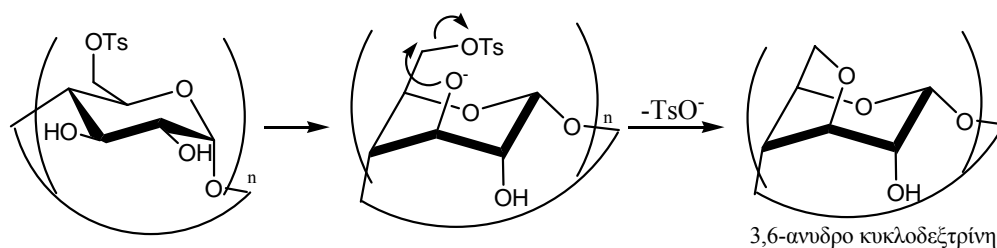
1.3.2 Πλήρως υποκατεστημένες Κυκλοδεξτρίνες

Οι ομάδες C6-OH είναι οι πλέον πυρηνόφιλες στο μόριο της κυκλοδεξτρίνης και για το λόγο αυτόν συμμετέχουν σε αντιδράσεις τροποποίησης αρκετά εύκολα. Η πλήρης υποκατάσταση στην πρωτοταγή πλευρά είναι σχετικώς ευκολότερη από ό,τι η μονο-, και ακόμα περισσότερο η δι-, ή τριυποκατάσταση, επειδή επιτυγχάνεται όταν η αντίδραση λάβει χώρα επί μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και χρησιμοποιηθεί η κατάλληλη ποσότητα (συνήθως περίσσεια) αντιδραστήριου τροποποίησης. Οι μέθοδοι εκλεκτικής τροποποίησης των κυκλοδεξτρινών μπορεί να κατηγοριοποιηθούν στην άμεση και στην έμμεση μέθοδο. Στην πρώτη λαμβάνεται απευθείας το επιθυμητό προϊόν, ενώ η δεύτερη απαιτεί διαδοχικές προστασίες και αποπροστασίες προκειμένου να μείνουν ελεύθερες οι επιθυμητές θέσεις για τροποποίηση. Στο σχήμα 1.4 περιγράφεται περιληπτικώς ο σχηματισμός μερικών από τις γνωστότερες και χρησιμότερες πλήρως υποκατεστημένες κυκλοδεξτρίνες, οι οποίες θα χρησιμοποιηθούν στο κεφ. 4 κατωτέρω.



Σχήμα 1.4: Συνοπτική παρουσίαση μεθόδων πλήρους υποκατάστασης στην πρωτοταγή πλευρά

Οι περι-6-τοσυλο-κυκλοδεξτρίνες (perTsCDs) είναι, όπως και τα αντίστοιχα μονοϋποκατεστημένα παράγωγα, πολύ σημαντικές ενδιάμεσες ενώσεις και παρασκευάζονται συνήθως με απ'ευθείας αντίδραση μεγάλης περισσειας *p*TsOCl με την κυκλοδεξτρίνη σε διαλύτη πυριδίνη. Το γεγονός ότι η τόσυλο ομάδα είναι πολύ καλή αποχωρούσα ομάδα αποτελεί βασικό μειονέκτημα του εν λόγω παραγώγου, καθώς κατά την παραμονή του, ακόμη και με ίχνη βάσης, σε θερμοκρασία δωματίου, μετατρέπεται στην 3,6-άνυδρο μορφή, μέσω αντίδρασης ενδομοριακής πυρηνόφιλης υποκατάστασης (Σχήμα 1.5),²³ η οποία προαπαιτεί αφαίρεση πρωτονίου από το OH3 της δευτεροταγούς πλευρά και περιλαμβάνει αλλαγή στην διαμόρφωση της γλυκοζιτικής μονάδας (Σχήμα 1.5). Για το λόγο αυτόν, οι perTsCDs πρέπει να χρησιμοποιούνται για περαιτέρω τροποποίηση αμέσως μετά την παρασκευή τους. Σε παράγωγο, το οποίο διαθέτει καλή αποχωρούσα ομάδα στον C6, είναι πιθανόν να προκύψει η άνυδρο μορφή παρουσία βάσης.



Σχήμα 1.5: Ενδομοριακή πυρηνόφιλη υποκατάσταση

Υποκατάσταση των ομάδων TsO- στη θέση 6 με κατάλληλες πυρηνόφιλες ομάδες, οδηγεί στα αντίστοιχα περι-6-δεοξυ-6-υποκατεστημένα παράγωγα. Συγκεκριμένα, πλήρως αλογονωμένα στην πρωτοταγή πλευρά παράγωγα παρασκευάζονται με επίδραση NaX (X = Cl, Br, I) σε περι-6-τοσυλο κυκλοδεξτρίνες σε διαλύτη DMF.²⁴ Πιο άμεσος τρόπος σύνθεσης περι-6-δεόξυ-6-αλογονο CDs είναι η αντίδραση στοιχειακού Br₂ (ή I₂) και Ph₃P με τη φυσική κυκλοδεξτρίνη, σε άνυδρο DMF, οπότε σχηματίζεται το αντιδραστήριο Vilsmeier [Me₂N=CHBr]⁺Br⁻ *in situ*, το οποίο επιτελεί τη βρωμίωση.^{25,26} Η αντίδραση αυτή είναι προτιμητέα για σύνθεση περι-6-βρωμο ή περι-6-ιωδο-κυκλοδεξτρινών, καθώς υπό κατάλληλες συνθήκες δίνει σε ένα βήμα καθαρά προϊόντα σε καλές αποδόσεις.

Οι περι-6-δεοξυ-6-αλογονο-κυκλοδεξτρίνες αποτελούν πολύ σημαντικά παράγωγα, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην εκλεκτική τροποποίηση της πρωτοταγούς πλευράς, λόγω της μεγαλύτερης σταθερότητάς τους σε σχέση με τα

αντίστοιχα περι-6-τοσυλο- παράγωγα. Διαλύονται πολύ καλά σε πολικούς διαλύτες όπως DMF, DMSO αλλά όχι σε H₂O, ενώ η χρήση τους περιορίζεται λόγω της μικρής διαλυτότητάς τους σε άπολους διαλύτες. Βέβαια το πρόβλημα αυτό μπορεί να αντιμετωπισθεί με τροποποίηση της δευτεροταγούς πλευράς. Η δευτεροταγής πλευρά μπορεί να προστατευθεί είτε με ακέτυλο ή με μέθυλο ομάδες. Κατά αυτόν τον τρόπο προσδίδεται διαλυτότητα των CDs σε οργανικούς διαλύτες και προσφέρεται η δυνατότητα καθαρισμού των προϊόντων με κλασικές χρωματογραφικές μεθόδους ώστε να προκύψουν καθαρότερα προϊόντα. Αντικατάσταση των ομάδων αλογόνου οδηγεί σε πληθώρα παραγώγων. Παραδείγματος χάριν, επίδραση διαφόρων διαμινών σε υψηλές συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας οδηγεί στα αντίστοιχα αμινοαλκυλαμινο παράγωγα²⁷, ενώ επίδραση NaN₃ σε διαλύτη DMF και θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία οδηγεί σε περι-6-δεοξυ-6-αζιδο-κυκλοδεξτρίνες^{28,29} οι οποίες με αναγωγή (Ph₃P/υδατική NH₃ ή καταλυτική υδρογόνωση αντιστοίχως) δίνουν τα περι-6-δεοξυ-6-αμινο-παραγωγα.²⁸ Επιπλέον είναι δυνατόν η μετατροπή των αμινο- ή των αμινοαλκυλαμινο παραγώγων στα αντίστοιχα γουανιδυλοαλκυλαμινο παραγωγα.³⁰ Η μετατροπή των πρωτοταγών αμινο ομάδων σε ομάδες γουανιδίνης, πραγματοποιείται σε βασικές συνθήκες με την χρήση κατάλληλου αντιδραστηρίου γουανιδυλίωσης.

Οι περι-τροποποιήσεις των κυκλοδεξτρινών, τελικώς επιφέρουν δραστικές αλλαγές στη μοριακή δομή (αύξηση ύψους κοιλότητας, αύξηση ευκαμψίας της δομής), στην διαλυτότητα (αύξηση υδατοδιαλυτότητας, ή/και οργανοδιαλυτότητας όπως π.χ. οι περι-2,3,6-OMe-CDs), αλλά και στη δραστηριότητα, οπότε παρατηρούνται τελειώς νέες ιδιότητες: π.χ. οι περι-(6-αμινοαλκυλαμινο)- και -(6-γουανιδυλοαλκυλαμινο)- CDs διαπερνούν κυτταρικές μεμβράνες (cell penetrating CDs) και συμπυκνώνουν το DNA σε νανοσωματίδια. Οι περι-(6-καρβοξυαλκυλθειο)-CDs σχηματίζουν ισχυρά σύμπλοκα με θετικώς φορτισμένα φάρμακα³¹ (π.χ. με το αμινοστεροϊδές βρωμιούχο ροκουρόνιο) τα οποία βρίσκονται σε στάδιο κλινικών δοκιμών.

1.4. Οι κυκλοδεξτρίνες ως φορείς φαρμάκων

Ο πρωταρχικός σκοπός ενός συστήματος μεταφοράς φαρμάκων είναι να μεταφέρει την απαραίτητη ποσότητα του φαρμάκου στο συγκεκριμένο στόχο (είδος κυττάρων, ιστό ή όργανο) επί ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα.²⁴ Οι

κυκλοδεξτρίνες αποτελούν κατηγορία ενώσεων κατάλληλων να δράσουν ως φορείς φαρμάκων λόγω της ικανότητάς τους να μεταβάλλουν τις φυσικές, χημικές και βιολογικές ιδιότητες των ξενιζόμενων μορίων μέσω του σχηματισμού συμπλόκων. Αναλυτικότερα οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμεύουν ως μεταφορείς φαρμάκων για τους εξής λόγους:³²

- Διαθέτουν καλώς καθορισμένη δομή και αρκετές λειτουργικές ομάδες, που προσφέρονται για χημική μετατροπή ή σύζευξη με άλλα μόρια.
- Παρουσιάζουν ποικιλία στο μέγεθος της κοιλότητας και επομένως στο μέγεθος των μορίων με τα οποία μπορούν να συμπλοκοποιηθούν.
- Έχουν χαμηλή τοξικότητα και χαμηλή φαρμακευτική δραστηριότητα και επομένως είναι συμβατές με τον ανθρώπινο οργανισμό.
- Αυξάνουν την υδατοδιαλυτότητα και τη σταθερότητα των φαρμάκων έναντι της δράσης διαφόρων ενζύμων και γενικότερα έναντι της βιοαποικοδόμησης.
- Δεν επάγουν την παραγωγή αντισωμάτων, δηλαδή δεν λειτουργούν ως αντιγόνα.
- Ο ρυθμός και η χρονική στιγμή αποδέσμευσης του φαρμάκου από την κοιλότητά τους μπορούν να ελεγχθούν με χρήση του κατάλληλου παραγώγου.
- Προϊόντα σύζευξης κυκλοδεξτρινών-φαρμάκων επιδεικνύουν εξειδικευμένη στόχευση σε συγκεκριμένα όργανα.

Οι πιο κοινές εφαρμογές των κυκλοδεξτρινών στη χορήγηση φαρμάκων αφορούν στην αύξηση της υδατοδιαλυτότητας, της σταθερότητας εντός του ανθρώπινου οργανισμού και της βιοδιαθεσιμότητας ενός φαρμάκου.^{32,33} Επειδή όμως οι φυσικές κυκλοδεξτρίνες, κυρίως η βCD, παρουσιάζουν σχετικά χαμηλή διαλυτότητα στο νερό (1.8 g/100 mL, 25 °C) και σε κοινούς οργανικούς διαλύτες (π.χ. αλκοόλες), γεγονός που περιορίζει τη χρήση τους σε φαρμακευτικά σκευάσματα, τα τελευταία χρόνια έχει συντεθεί πληθώρα νέων παραγώγων, με σκοπό τη βελτίωση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων και της συμπλοκοποιητικής ικανότητας των φυσικών κυκλοδεξτρινών.^{34,35} Η αύξηση της υδατοδιαλυτότητας των βιοδραστικών ουσιών εκφράζεται με το συντελεστή διαλυτοποίησης, ο οποίος ισούται με το λόγο της διαλυτότητας της βιοδραστικής ουσίας παρουσία συγκεκριμένης συγκέντρωσης κυκλοδεξτρίνης προς τη διαλυτότητα της βιοδραστικής ουσίας απουσία κυκλοδεξτρίνης. Ανάμεσα στις εμπορικά διαθέσιμες κυκλοδεξτρίνες (Πίνακας 1.1) οι μεθυλιωμένες κυκλοδεξτρίνες με χαμηλή μοριακή υποκατάσταση φαίνεται να είναι οι καλύτεροι διαλυτοποιητές.³⁶ Επίσης, η σουλφο-βουτυλο-βCD (SBE-β-CD) φαίνεται να είναι άριστος διαλυτοποιητής για πολλές βιοδραστικές ενώσεις, είναι δε

περισσότερο αποτελεσματική από τη β-CD όχι όμως και από την διμεθυλο-βCD (DM-β-CD).

Πίνακας 1.1: Παραδείγματα βιοδραστικών ενώσεων των οποίων η διαλυτότητα αυξάνει μετά τη συμπλοκοποίηση τους με κυκλοδεξτρίνες*

CD	Βιοδραστική Ένωση
βCD	Λοραζεπάμη, Ιτρακοναζόλη, Ιβουπροφένη Πιροξικάμη
αCD	Πραζικουαντέλη
γCD	Πραζικουαντέλη, Ομεπραζόλη
HP-β-CD	Ιτρακοναζόλη Γκριζεοφουλβίνη
DM-β-CD	Ναπροξένη, Καμπτοθεκίνη
SBE-β-CD	Δαναζόλη Σπιρονολακτόνη

Οι κυκλοδεξτρίνες υφίστανται υδρόλυση των γλυκοζιτικών δεσμών μόνο εάν υποστούν παρατεταμένη έκθεση σε ισχυρώς όξινο περιβάλλον.^{37,38} Ο ρυθμός της όξινης υδρόλυσης για τις φυσικές κυκλοδεξτρίνες εξαρτάται από το μέγεθος του δακτυλίου και αυξάνεται κατά τη σειρά αCD < βCD < γCD. Ωστόσο ο ρυθμός υδρόλυσης των κυκλοδεξτρινών μειώνεται με την ύπαρξη ξενιζομένου μορίου στην κοιλότητα τους καθώς δημιουργείται στερεοχημική παρεμπόδιση στους γλυκοζιτικούς δεσμούς. Επίσης, η προσθήκη υποκαταστατών μειώνει το ρυθμό διάνοιξης του δακτυλίου, κυρίως στην περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης, καθώς μειώνεται η συγγένεια μεταξύ κυκλοδεξτρίνης και ενζύμου.

Συμπερασματικώς, οι φυσικές κυκλοδεξτρίνες και αρκετά παράγωγά τους πληρούν τις βασικές προϋποθέσεις, ώστε να μεταφέρουν και να απελευθερώνουν με ελεγχόμενο τρόπο και σε καθορισμένο στόχο φαρμακευτικές ουσίες εντός του ανθρώπινου οργανισμού. Επιπλέον, η τροποποίηση των φυσικών κυκλοδεξτρινών με υποκαταστάτες που τις καθιστούν πιο υδρόφιλες (και συνεπώς πιο υδατοδιαλυτές) τις περισσότερες φορές έχει θετική επίδραση στις σημαντικότερες ιδιότητες που πρέπει να χαρακτηρίζουν μία ένωση, η οποία προορίζεται να χρησιμοποιηθεί ως φορέας

φαρμάκων. Στον Πίνακα 1.2 παρατίθενται ορισμένα παραδείγματα συμπλόκων κυκλοδεξτρινών-φαρμάκων που έχουν βρει εμπορική εφαρμογή σε διάφορες χώρες.³⁹

*Πίνακας 1.2: Παραδείγματα σκευασμάτων που περιέχουν σύμπλοκα βιοδραστικών ενώσεων με κυκλοδεξτρίνες.**

Βιοδραστική ουσία/κυκλοδεξτρίνη	Εμπορική ονομασία	Ιδιοσκεύασμα	Εταιρεία Παραγωγής/Χώρα προέλευσης
PEG ₂ /βCD	Prostamon E	Υπογλώσσια δισκία	Ono/Ιαπωνία
PEG ₁ /αCD	Prostandin	i.v. διάλυμα	Ono/Ιαπωνία Schwatz/Γερμανία
OP-1206/γCD	Opalmon	Δισκία	Ono/Ιαπωνία
Προξικάμη/βCD	Brexin, Flogene, Cicladon	Δισκία. υπόθετα	Chiesi/Ιταλία
Μπενεξάτη/CD	Ulgut/ Lonmiel	Κάψουλες	Teikoky Shionogi/Ιαπωνία
Ιώδιο/βCD	Mena-Gargle	Διάλυμα	Kyushin/Ιαπωνία
Δεξαμεθαζόνη/βCD	Glymesason	Αλοιφή	Fujinaga/Ιαπωνία
Νιτρογλυκερίνη/βCD	Nitropen	Υπογλώσσια δισκία	Nippon Kayaku/Ιαπωνία
Κεφοτρίμη-εξετίλη/βCD	Pansporin T	Δισκία	Takeda/Ιαπωνία
Κεφαλοσπορίνη/βCD	Meiact	Δισκία	Meiji Seika/Ιαπωνία
Τιαπροφενικό οξύ/βCD	Suramyl	Δισκία	Roussel-Maestrelli/Ιταλία
Διφαινυλδραμίνη, Χλωροθεοφυλλίνη/βCD	Stada-Travel	Μασώμενα δισκία	Stada/Γερμανία
Χλωροδιαζεποξείδιο/βCD	Transillium	Δισκία	Gador/Αργεντινή
Υδροκορτιζόνη/HPβCD	Dexocort	Διάλυμα	Icelandic Pharmaceuticals/Ισλανδία
Ιτρακοναζόλη/HPβCD	Spranox	Διάλυμα	Janssen/Βέλγιο
Νιμεσουλίδη/βCD	Mesulid Fast	Δισκία	LPB/Ιταλία
Αλπροσταδίλη/αCD	Rigidur	i.v. διάλυμα	Ferring/Δανία

* Οι δομές των βιοδραστικών ουσιών παρατίθενται στο παράρτημα 3

Στην παρούσα διατριβή, θα μελετηθούν τροποποιήσεις κυκλοδεξτρινών με σάκχαρα, οι οποίες θα έχουν την δυνατότητα να αναγνωρίζουν κατάλληλες λεκτίνες, δηλαδή πρωτεΐνες υπεύθυνες για μικροβιακή μόλυνση. Οι γλυκο-κυκλοδεξτρίνες θα διερευνηθεί εάν είναι δυνατό να μεταφέρουν (εγκλωβίζουν) αντιβιοτικές ουσίες, ώστε να αποτελέσουν στοχευμένους φορείς φαρμάκων (targeted drug carriers) για μικρόβια.

1.5. Συμπεράσματα

Οι φυσικές και τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες παρουσιάζουν εξαιρετικό ενδιαφέρον ως μόρια ξενιστές με υψηλή υδατοδιαλυτότητα. Η ικανότητα των CDs να εγκλωβίζουν οργανικά μόρια θα μελετηθεί στην παρούσα εργασία, ως προς τον εγκλωβισμό αντιμικροβιακών φαρμάκων, η δε δυνατότητά τους να υφίστανται τροποποιήσεις θα χρησιμοποιηθεί για την σύνθεση νέων παραγώγων που θα έχουν ως υποκαταστάτες σάκχαρα αναγνώρισης μικροβιακών λεκτινών.

2

ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ

2.1 Εισαγωγή

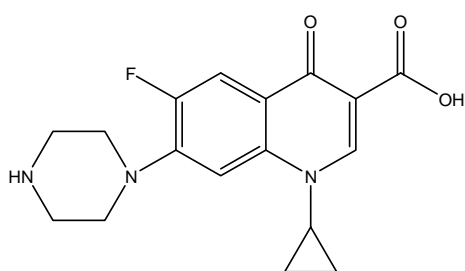
Τα αντιβιοτικά (αντιμικροβιακά) είναι χημικές ενώσεις που είτε σκοτώνουν συγκεκριμένα είδη μικροοργανισμών, όπως βακτήρια, μύκητες και πρωτόζωα είτε εμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξή τους. Διακρίνονται σε μικροβιοστατικά, μικροβιοκτόνα, ευρέος φάσματος και στενού φάσματος.¹ Οι πρώτες αντιβιοτικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στη σύγχρονη ιατρική απομονώθηκαν από ζωντανούς οργανισμούς, όπως η πενικιλίνη που παρήχθη από τους μύκητες γένους *Penicillium* και η στρεπτομυκίνη από τα βακτηρίδια του γένους *Streptomyces*. Η στρεπτομυκίνη, η οποία ανακαλύφθηκε το 1944 είναι αντιβιοτικό κατά του βακτηρίου *Mycobacterium tuberculosis*² που προκαλεί φυματίωση. Στις επόμενες δεκαετίες απομονώθηκαν η νεομυκίνη, η καναμυκίνη και η τομπραμυκίνη.³⁻⁵ Με τις προόδους στην οργανική χημεία πολλά αντιβιοτικά λαμβάνονται πλέον με χημική σύνθεση. Τη δεκαετία του '70 χρησιμοποιήθηκαν ημι-συνθετικά αντιβιοτικά όπως η αμικασίνη, η διβεκασίνη, η νετιλμισίνη και η ισεπαμισίνη.⁶⁻⁷ Το 1990 χρησιμοποιήθηκε η αρβεκασίνη, η οποία είναι παράγωγο της καναμυκίνης Β.⁶ Τα αντιβιοτικά αποτελούν κατηγορία σωτήριων φαρμάκων που έχουν προσφέρει τεράστιες υπηρεσίες στην καταπολέμηση των λοιμώξεων. Οι λοιμώξεις στον άνθρωπο προκαλούνται από ιούς και μικρόβια. Ωστόσο τα αντιβιοτικά δεν ασκούν καμία απολύτως επίδραση στους ιούς και είναι αποτελεσματικά μόνο στις μικροβιακές λοιμώξεις. Όταν πρόκειται για σοβαρές μικροβιακές λοιμώξεις, τα αντιβιοτικά εμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό των μικροβίων, επιτρέποντας έτσι στον οργανισμό να παρασκευάσει αντισώματα και κύτταρα άμυνας για να καταστρέψει όλα τα μικρόβια. Τα αντιβιοτικά μπορούν να δράσουν με τέσσερις διαφορετικούς τρόπους εναντίον των μικροβίων.

1. Προκαλούν διαταραχές στη λειτουργία της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων.
 2. Προκαλούν επιπλοκές στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων.
 3. Εμποδίζουν το μεταβολισμό των βακτηρίων.
 4. Εμποδίζουν την αντιγραφή, τη μεταγραφή και τη μετάφραση των βακτηρίων.
- Ο τελευταίος μηχανισμός δράσης των αντιβιοτικών αναλύεται ακολούθως.

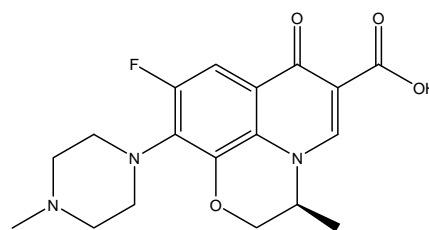
2.2 Τρόπος δράσης των αντιβιοτικών

2.2.1 Κινολόνες και β-λακταμικά αντιβιοτικά

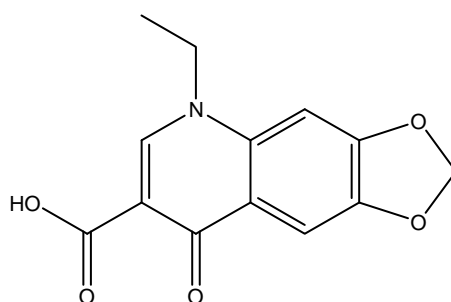
Οι κινολόνες διακρίνονται σε τρεις ομάδες, στην ομάδα I (ναλιδιξικό οξύ, οξολινικό οξύ, οξυπιρομιδικό οξύ), στην ομάδα II (φθοροκινολόνες: ενοξασίνη, νορφλοξασίνη, σιπροφλοξασίνη) και στην ομάδα III (τροβαφλοξασίνη, γκρεπαφλοξασίνη, παρφλοξασίνη, λεβοφλοξασίνη, γκατιφλοξασίνη, κλιναφλοξασίνη). Στοχεύουν στις βακτηριακές τοποϊσομεράσες, καταστρέφουν το βακτηριακό κύτταρο και αναστέλλουν τη γυράση,¹² το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την αντιγραφή και τη μεταγραφή του βακτηριακού DNA.^{13,14}



Σχήμα 2.1: σιπροφλοξασίνη (*cipro*)

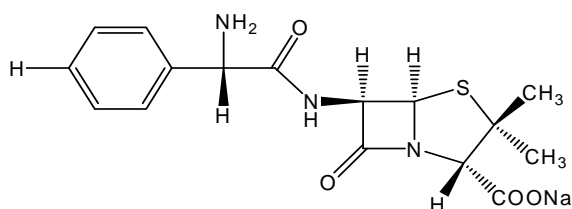


Σχήμα 2.2: λεβοφλοξασίνη (*levo*)

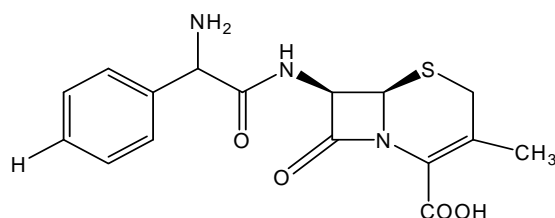


Σχήμα 2.3: οξολινικό οξύ (*oxo*)

Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά χαρακτηρίζονται από την παρουσία του β-λακταμικού δακτυλίου στο μόριό τους. Τέτοια αντιβιοτικά είναι οι πενικιλίνες (Σχήμα 2.4), οι κεφαλοσπορίνες, (Σχήμα 2.5) οι μονοβακτάμες και οι καρβαπενέμες.



Σχήμα 2.4: αμπικιλίνη



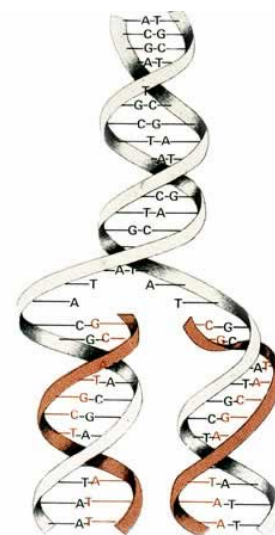
Σχήμα 2.5: κεφαλεξίνη

Ο τρόπος δράσης των β-λακταμικών αντιβιοτικών στηρίζεται στην αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος των μικροβίων. Είναι μικροβιοκτόνα και δρουν στη φάση πολλαπλασιασμού των μικροβίων. Για να δράσουν πρέπει: α) να ενωθούν με τις πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες και β) να έχουν σωστή συγκέντρωση στο σημείο δράσης. Η αντοχή των μικροβίων στα εν λόγω αντιβιοτικά οφείλεται στην παραγωγή των β-λακταμασών, δηλαδή ενζύμων τα οποία καταστρέφουν τα αντιβιοτικά υδrolύοντας τον β-λακταμικό δακτύλιό τους.¹⁵ Ο μηχανισμός της υδρόλυσης αναλύεται περαιτέρω στο κεφάλαιο 7. Οι πενικιλίνες είναι ανενεργές έναντι μικροοργανισμών που δεν διαθέτουν κυτταρικό τοίχωμα, όπως είναι τα μυκοβακτηρίδια, τα πρωτόζωα, οι μύκητες και οι ιοί. Οι κεφαλοσπορίνες διαθέτουν παρόμοιο μηχανισμό δράσης και τοξικότητα με τις πενικιλίνες αλλά είναι πιο σταθερές σε βακτηριακές β-λακταμάσες.

Ωστόσο εκτός από τα αντιμικροβιακά που ανήκουν στην κατηγορία των κινολόνων και στα β-λακταμικά αντιβιοτικά, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν και αυτά που ανήκουν στις αμινογλυκοσίδες.

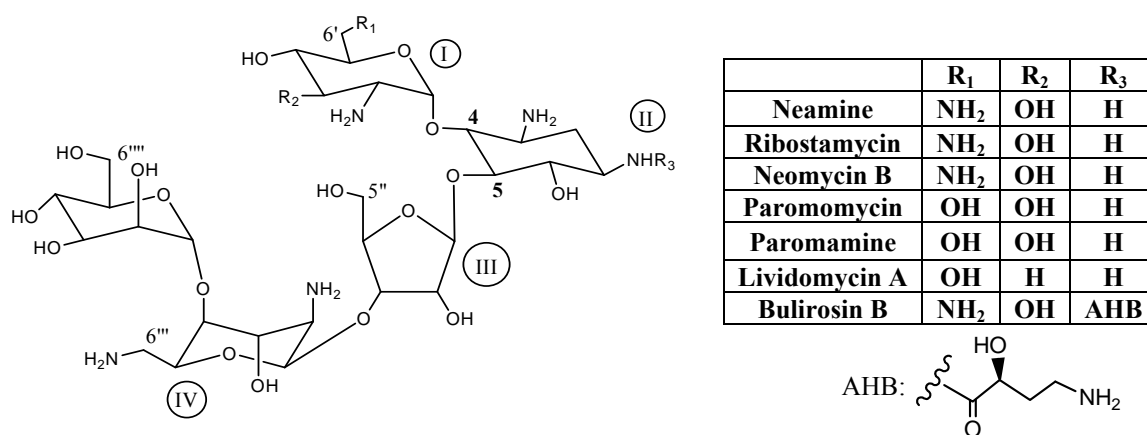
2.2.2 Αμινογλυκοσίδες

Το DNA αποτελείται από δύο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες που σχηματίζουν στο χώρο μία δεξιόστροφη διπλή έλικα. Το πρώτο βήμα για την έκφραση της πληροφορίας που υπάρχει στο DNA είναι η μεταφορά της στο RNA με τη



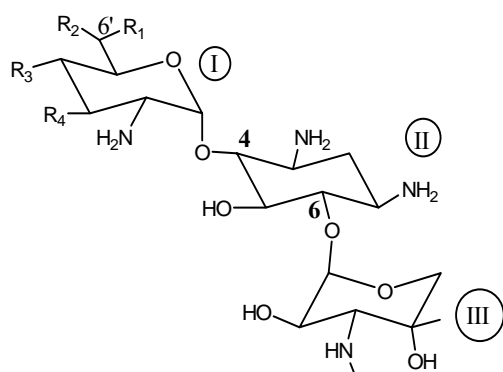
διαδικασία της μεταγραφής. Το RNA μεταφέρει με τη σειρά του, μέσω της διαδικασίας της μετάφρασης, την πληροφορία για την παραγωγή πρωτεϊνών που είναι υπεύθυνες για τη δομή και λειτουργία των κυττάρων και κατ' επέκταση και των οργανισμών.

Τα αντιβιοτικά, με την προϋπόθεση ότι η χημική τους δομή περιέχει υδατανθρακικές ενώσεις, έχουν την ικανότητα να συνδεθούν κατά τη διάρκεια της αντιγραφής με δεσμούς υδρογόνου με τις αζωτούχες βάσεις της μίας έλικας και επομένως να προκληθεί λανθασμένη κωδικοποίηση κατά τη διάρκεια της μεταγραφής. Καθώς λοιπόν, αλληλεπιδρούν με τα ριβοσώματα όπου γίνεται η μετάφραση, μειώνουν την αξιοπιστία τα μετάφρασης, δημιουργώντας εσφαλμένες πρωτεΐνες. Επομένως ο φορέας της γενετικής πληροφορίας του βακτηρίου καταστρέφεται και κατά συνέπεια ελαττώνεται και ο βαθμός πολλαπλασιασμού τους. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αντιβιοτικών, τα οποία έχουν τη δυνατότητα να δράσουν με τον προαναφερθέντα τρόπο είναι οι φυσικές αμινογλυκοσίδες.⁸ Οι αμινογλυκοσίδες είναι μόρια θετικά φορτισμένα, τα οποία διαλύονται εξαιρετικά στο νερό, ενώ η αντιμικροβιακή τους δράση αυξάνεται σε αλκαλικό περιβάλλον. Είναι μικροβιοκτόνα καθώς αναστέλλουν την πρωτεϊνσύνθεση των βακτηρίων. Η αναστολή αυτή πραγματοποιείται με τη σύνδεσή τους με πρωτεΐνη του ριβοσώματος και συγκεκριμένα με την 30S υπομονάδα του ριβοσώματος. Επομένως διακόπτεται η ανάγνωση του γενετικού κώδικα και η εσφαλμένη αναγνώριση πληροφοριών του mRNA οδηγεί στη παραγωγή μη λειτουργικών πρωτεϊνών. Οι φυσικές αμινογλυκοσίδες αποτελούνται από έναν μη υδατανθρακικό δακτύλιο, την 2-δεοξυστρεπταμίνη (2-DOS)(II), η οποία φέρει υδατανθρακικούς υποκαταστάτες στις θέσεις 4, 5 (Σχήμα 2.6) ή 4, 6 (Σχήμα 2.7, Σχήμα 2.8), ή 4 (Σχήμα 2.9).



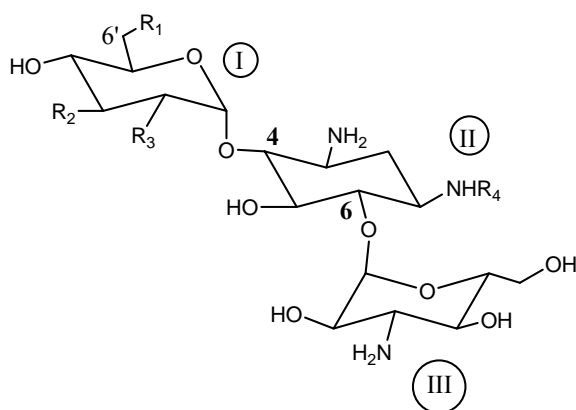
Σχήμα 2.6: Αμινογλυκοσίδες με υδατανθρακικούς υποκαταστάτες στις θέσεις 4,5

Η νεομυκίνη Β χρησιμοποιείται σε καλλυντικές κρέμες για την επούλωση καυημάτων από τον ήλιο, πληγών και δερματιτίδων. Η παρομομυκίνη χρησιμοποιείται για τη θεραπεία εντερικών παρασίτων⁹ και διαφέρει από τη νεομυκίνη στη θέση 6', όπου έχει υδρόξυλο αντί αμινο ομάδα.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Gentamicin C₁	CH ₃	NHCH ₃	H	H
Gentamicin C₂	CH ₃	NH ₂	H	H
Gentamicin C_{1A}	H	NH ₂	H	H
G-418 (Geneticin)	CH ₃	OH	OH	OH

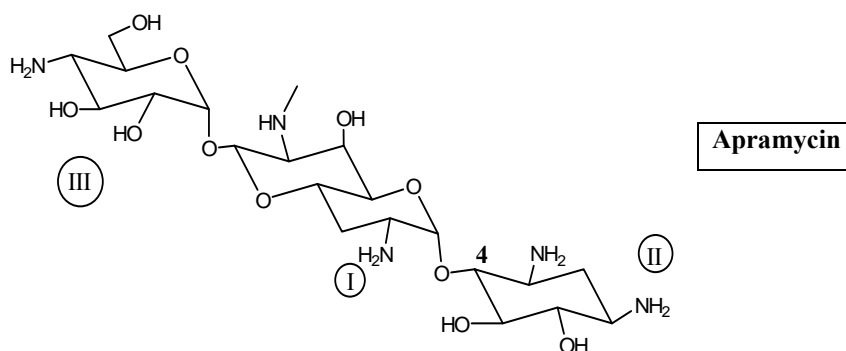
Σχήμα 2.7: Αμινογλυκοσίδες με υδατανθρακικούς υποκαταστάτες στις θέσεις 4,6



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Kanamycin A	NH ₂	OH	OH	H
Kanamycin B	NH ₂	OH	NH ₂	H
Kanamycin C	OH	OH	NH ₂	H
Tobramycin	NH ₂	H	NH ₂	H
Amicacin	NH ₂	OH	OH	AHB

Σχήμα 2.8: Αμινογλυκοσίδες με υδατανθρακικούς υποκαταστάτες στις θέσεις 4,6

Τα 4,6-διυποκατεστημένα 2-DOS χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία Gram-αρνητικών βακτηριακών λοιμώξεων, συνδεδεμένων με σοβαρές ασθένειες όπως η κυστική ίνωση, ο καρκίνος και το AIDS.⁹ Η κυστική ίνωση προκαλείται λόγω της δυσλειτουργίας του γονιδίου που παράγει την πρωτεΐνη η οποία ελέγχει τη διέλευση του χλωρίου από τις μεμβράνες των επιθηλιακών κυττάρων διαφόρων οργάνων του σώματος. Η θνησιμότητα των ασθενών στην κυστική ίνωση προκαλείται από το βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa* και οι λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος θεραπεύονται με τη χορήγηση εισπνεόμενης γενταμικίνης.¹⁰



Σχήμα 2.9: Αμινογλυκοζίδιο με υδατανθρακικούς υποκαταστάτες στη θέση 4

Η απραμυκίνη λόγω της ισχυρής τοξικότητάς της χρησιμοποιείται μόνο στην κτηνιατρική.¹¹

2.3 Μηχανισμοί βακτηριακής ανθεκτικότητας

Με την συχνή χρήση αντιβιοτικών, τα βακτήρια αναπτύσσουν μηχανισμούς, οι οποίοι μειώνουν την δραστηριότητα των φαρμάκων. Οι μηχανισμοί βακτηριακής ανθεκτικότητας μπορεί να αφορούν την ενζυμική μετατροπή των φαρμάκων, τη μετάλλαξη των φαρμάκων ή τη μείωση της συγκέντρωσης του αντιβιοτικού στα βακτηριακά κύτταρα λόγω χαμηλής διεισδυτικότητας ή υψηλής εκροής.¹⁶

Η ανθεκτικότητα στις κινολόνες αναπτύσσεται σε στάδια μέσω γενετικών μεταλλάξεων και μπορεί να είναι χρωμοσωματική¹⁸ και πλασμιδιακή.¹⁹ Η χρωμοσωματική ανθεκτικότητα στηρίζεται σε μεταλλάξεις των ενζύμων DNA-γυράση και τοποϊσομεράση IV. Η DNA-γυράση είναι το μοναδικό ένζυμο που επηρεάζει την υπερελίκωση του DNA, ενώ η τοποϊσομεράση IV φαίνεται ότι είναι υπεύθυνη για τον διαχωρισμό των μητρικών DNA αλυσίδων κατά την κυτταρική διαίρεση.²⁰ Η πλασμιδιακή ανθεκτικότητα οφείλεται στις αντλίες ενεργού εξώθησης (efflux pumps) και σε δομικές τροποποιήσεις που περιορίζουν την διέλευση του αντιβιοτικού ώστε να φθάσει στο στόχο.¹⁹ Οι κινολόνες έχουν κοινό μηχανισμό δράσης και η αντοχή τους είναι διασταυρούμενη. Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στην σιπροφλοξασίνη και σε άλλες φθοροκινολόνες έχει παρατηρηθεί με σταφυλόκοκκους, ειδικά τον ανθεκτικό στην μεθικιλίνη *S. Aureus*, *P. Aeruginosa*, *E. coli* και *E. Faecalis*. Ωστόσο η σιπροφλοξασίνη δεν δείχνει διασταυρούμενη ανθεκτικότητα με

άλλες σημαντικές και χημικά διαφορετικές ομάδες ουσιών όπως τις β-λακταμάσες, τις αμινογλυκοσίδες, τις τετρακυκλίνες, τα μακρολίδια, τα πολυπεπίδια, τις σουλφαμίδες, τις τριμεθοπρίμες και τις νιτροφουραντοΐνες.

Στην περίπτωση των αμινογλυκοσίδων, ο σημαντικότερος μηχανισμός είναι η παραγωγή αδρανοποιητικών ενζύμων, τα οποία ονομάζονται aminoglycoside-modifying enzymes (AMEs).⁸ Τα ένζυμα αυτά μετατρέπουν χαρακτηριστικές ομάδες των αντιβιοτικών μειώνοντας την αντιβακτηριακή τους δράση. Τέτοια ένζυμα μπορεί να είναι η *N*-ακετυλοτρανσφεράση (AAC), η οποία ακετυλιώνει τις άμινο ομάδες, η *O*-φωσφοροτρανσφεράση (APH), η οποία φωσφορυλιώνει τις υδροξύλο ομάδες κάνοντας το αντιβιοτικό ανενεργό εφ'όσον ως φωσφορυλιωμένο δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με τα βακτηριακά ριβοσώματα,^{17,9} και η *O*-νουκλεΐδοτρανσφεράση (ANT), η οποία μεταφέρει ένα νουκλεοτίδιο στις υδροξύλο ομάδες. Ωστόσο παρά το γεγονός ότι έχει αναπτυχθεί μεγάλη πρόοδος στην απομόνωση και στον χαρακτηρισμό των AMEs δεν έχουν ακόμα πραγματοποιηθεί προσπάθειες προκειμένου να σχεδιαστούν αναστολείς των συγκεκριμένων ενζύμων. Είναι φανερό ότι η ύπαρξη δραστικών αναστολέων θα συντελούσε στην αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας των βακτηρίων στις αμινογλυκοσίδες.

Ο πιο κοινός μηχανισμός της ανθεκτικότητας των μικροβίων στα β-λακταμικά αντιβιοτικά οφείλεται στην αδρανοποίηση του αντιβιοτικού από τις β-λακταμάσες, καθώς υπάρχουν περισσότερα από 100 τέτοια ένζυμα με διαφορετική εκλεκτικότητα για τα φάρμακα. Επιπλέον η ανθεκτικότητα ευνοείται από την αλλαγή στη δομή των πρωτεϊνών που δεσμεύουν την πενικιλίνη και επομένως δημιουργείται απώλεια της συγγένειας με τις πενικιλλοδεσμευτικές πρωτεΐνες.²¹ Η αναστολή της εισόδου του αντιβιοτικού μέσα στο κύτταρο οφείλεται επίσης στην εξωτερική μεμβράνη των gram-αρνητικών βακτηρίων και στην ελάττωση της διαπερατότητας του κυτταρικού τοιχώματος.

2.4 Συμπεράσματα

Τα αντιμικροβιακά φάρμακα κατατάσσονται σε διάφορες κατηγορίες και αποτελούν σημαντικά και αποτελεσματικά όπλα στην καταπολέμηση των μικροβίων. Όμως η τοξικότητα και η ανθεκτικότητα που αναπτύσσουν τα βακτήρια δημιουργεί την ανάγκη να συντεθούν νέοι φορείς αντιμικροβιακών φαρμάκων. Οι φορείς αυτοί

σχεδιάζονται κατά τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να διαθέτουν χαμηλή τοξικότητα και να καθιστούν δυνατή τη χρήση παλαιών αντιβιοτικών αλλά και να ικανοποιούνται οι ανάγκες στόχευσης και να μειώνονται οι μηχανισμοί αντίστασης (π.χ. μέσω εγκλωβισμού). Το αντικείμενο της παρούσας διατριβής είναι η σύνθεση υδατανθρακικών συμπλεγμάτων με κυκλοδεξτρίνες (glycoclusters), τα οποία να συνδυάζουν ικανότητα εγκλωβισμού αντιμικροβιακών φαρμάκων, δυνατότητα στόχευσης μικροβιακών λεκτινών μέσω καταλλήλων υποκαταστατών-σακχάρων αναγνώρισης και χαμηλή τοξικότητα λόγω υδατανθρακικής φύσης. Οι φορείς αυτοί, ενδεχομένως να επηρεάζουν την εμφάνιση μικροβιακής ανθεκτικότητας ή να έχουν οι ίδιοι αντιμικροβιακή δράση λόγω δομικής ομοιότητας με τις αμινογλυκοσίδες.

3

**ΡΟΛΟΣ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ - ΛΕΚΤΙΝΩΝ
ΣΤΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΜΟΛΥΝΣΗ**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΡΟΛΟΣ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ - ΛΕΚΤΙΝΩΝ ΣΤΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΜΟΛΥΝΣΗ

3.1 Λεκτίνες και Συγκολλητίνες

Οι λεκτίνες και οι σελεκτίνες είναι γλυκοπρωτεΐνες ή πρωτεΐνες οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να προσκολλώνται σε υδατάνθρακες και είναι υπεύθυνες για την προσκόλληση των λευκών αιμοσφαιρίων στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Οι λεκτίνες αρχικά απομονώθηκαν από τα φυτά και αργότερα από τα ζώα. Η αλληλεπίδραση των λεκτινών με τους υδατάνθρακες είναι συγκεκριμένη και συγκρίσιμη ως προς την ισχύ σύνδεσης ή την συμπληρωματικότητα δομής με την αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος. Οι υδατάνθρακες που υπάρχουν στις κυτταρικές επιφάνειες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές διακυτταρικές διαδικασίες αναγνώρισης. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των εξωκυτταρικών υδατανθράκων και των υδατανθράκων των συγκεκριμένων πρωτεϊνών είναι σημαντικές για πολλές βιολογικές διαδικασίες. Συγκεκριμένα ενεργοποιείται το ενδοθήλιο των τριχοειδών αγγείων κατά τη διάρκεια της φλεγμονής και έτσι επιτρέπεται η προσκόλληση λευκών αιμοσφαιρίων ως πρώτο στάδιο για τη διόδο τους μέσω του τοιχώματος των τριχοειδών.¹

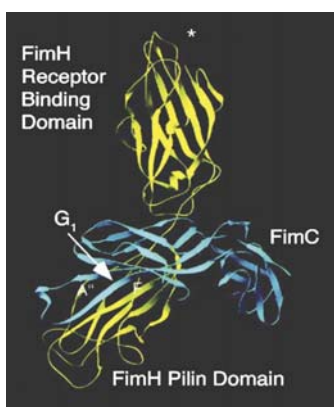
Τα βακτήρια καλύπτονται από τριχίδια (pili) ή κροσσούς (fimbriae), τα οποία περιέχουν λεκτίνες που ονομάζονται βακτηριακές προσκολλητίνες (adhesins).² Το πρώτο στάδιο για την εμφάνιση της λοίμωξης είναι η προσκόλληση του μικροβίου επάνω στην επιφάνεια του ξένου υλικού. Στο πρώτο στάδιο της προσκόλλησης παρεμβαίνουν μη ειδικοί μηχανισμοί, όπως το επιφανειακό φορτίο, η πολικότητα, δυνάμεις Van der Waals και η υδροφοβικότητα.³ Η βακτηριακή μόλυνση πραγματοποιείται μέσω των βακτηριακών λεκτινών, οι οποίες προσκολλώνται στους υδατάνθρακες των ξενιστών και μετακινούνται μεταξύ κροσσωτής και μη κροσσωτής κατάστασης (fimbriated and non-fimbriated phase variation).^{4,5,6} Επομένως ένας βακτηριακός πληθυσμός περιέχει κύτταρα και των δύο φαινοτύπων.^{7,8} Οι λεκτίνες απομονώνονται από την επιφάνεια των βακτηρίων, από τα βακτηριακά ινίδια, από

τον περιπλασμικό χώρο και από το εσωτερικό των κυττάρων. Οι πρωτεΐνες αυτές συγκολλούν σάκχαρα, δεν προέρχονται από το ανοσοποιητικό σύστημα και δεν εμφανίζουν ενζυμική δράση απέναντι στα σάκχαρα που συγκολλούν. Επιπλέον η σύνδεση τους με τα σάκχαρα δεν απαιτεί την ύπαρξη ελεύθερων υδροξυλομάδων πάνω σε αυτά.⁹ Συνεπώς γίνεται αντιληπτό ότι κάθε βακτηριακός οργανισμός περιέχει λεκτίνες που δύνανται να αναγνωρίζουν περισσότερα από ένα σάκχαρα. Ενδεικτικά στον πίνακα που ακολουθεί δίνονται μερικά βακτήρια και τα αντίστοιχα σάκχαρα αναγνώρισης.¹⁰

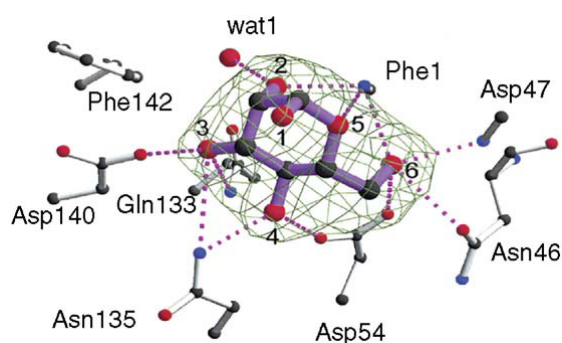
Πίνακας 3.1: Σάκχαρα αναγνώρισης από μικροβιακές λεκτίνες¹⁰

Μικρόβιο	Στοχευόμενος Ιστός	Υδατάνθρακας
<i>C. jejuni</i>	Εντερικός (Intestinal)	Fuca2GalβGlcNAc
<i>E. coli Type 1</i>	Ουροποιητικού (Urinary)	Mana3Mana6Man
P	Ουροποιητικού (Urinary)	Galα4Gal
S	Νευρικός (Neural)	NeuAc (α2-3)Galβ3GalNAc
CFA/1	Εντερικός (Intestinal)	NeuAc (α2-8)-
F1C	Ουροποιητικού (Urinary)	GalNAcβ4Galβ
F17	Ουροποιητικού (Urinary)	GlcNAc
K1	Ενδοθηλιακός (Endothelial)	GlcNAcβ4GlcNAc
K99	Εντερικός (Intestinal)	NeuAc(α2-3)Galβ4Glc
<i>Helicobacter influenzae</i>	Αναπνευστικός (Respiratory)	[NeuAc(α2-3)] _{0,1} Galβ4GlcNAcβ3Galβ4GlcNAc
<i>Helicobacter pylori</i>	Στομάχι (Stomach)	NeuAc(α2-3)Galβ4GlcNAc Fuca2Galβ3(Fuca4)Gal
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Αναπνευστικός (Respiratory)	Man
<i>N. gonorrhoea</i>	Γενετικός (Genital)	Galβ4Glc(NAc)
<i>N. meningitides</i>	Αναπνευστικός (Respiratory)	[NeuAc(α2-3)] _{0,1} Galβ4GlcNAcβ3Galβ4GlcNAc
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Αναπνευστικός (Respiratory)	L-Fuc Galβ3Glc(NAc)β3Galβ4Glc
<i>Salmonella typhimurium</i>	Εντερικός (Intestinal)	Man
<i>Staphylococcus pneumoniae</i>	Αναπνευστικός (Respiratory)	[NeuAc(α2-3)] _{0,1} Galβ4GlcNAcβ3Galβ4GlcNAc
<i>S. suis</i>	Αναπνευστικός (Respiratory)	Galα4Galβ4Glc

Οι πιο χαρακτηρισμένες λεκτίνες είναι αυτές του βακτηρίου *Escherichia coli* (*E. coli*) και συγκεκριμένα αυτές που αναγνωρίζουν τη μαννόζη (Man), αυτές που αναγνωρίζουν τη γαλαβιόζη και αυτές που αναγνωρίζουν την *N*-ακετυλο-γλυκοζαμίνη (GlcNAc).¹⁰ Ενδεικτικά θα αναλυθεί η δομή της λεκτίνης, η οποία είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση της μαννόζης. Ο συγκεκριμένος τύπος λεκτίνης απαντάται στο 95% των βακτηρίων *E. coli*, καθώς και στα βακτήρια *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* και *Salmonella enteritidis*. Οι κροσσοί της λεκτίνης του *E. coli* έχουν μήκος 1-2 μm και αποτελούνται από την πρωτεΐνη FimA μοριακού βάρους 17 kDa, η οποία σχηματίζοντας λόγχη ενώνεται μέσω συνδέσμου με την πρωτεΐνη FimH μοριακού βάρους 29-31 kDa.^{11,12} Ο σύνδεσμος έχει μήκος 3 nm και αποτελείται από δύο πρωτεΐνες την FimF και την FimG. Η θέση πρόσδεσης της μαννόζης βρίσκεται στην πρωτεΐνη FimH (Σχήμα 3.1).¹³



Σχήμα 3.1: Κρυσταλλική δομή της FimH¹⁴



Σχήμα 3.2: Σύμπλοκο των FimC-FimH με τη μαννόζη¹⁵

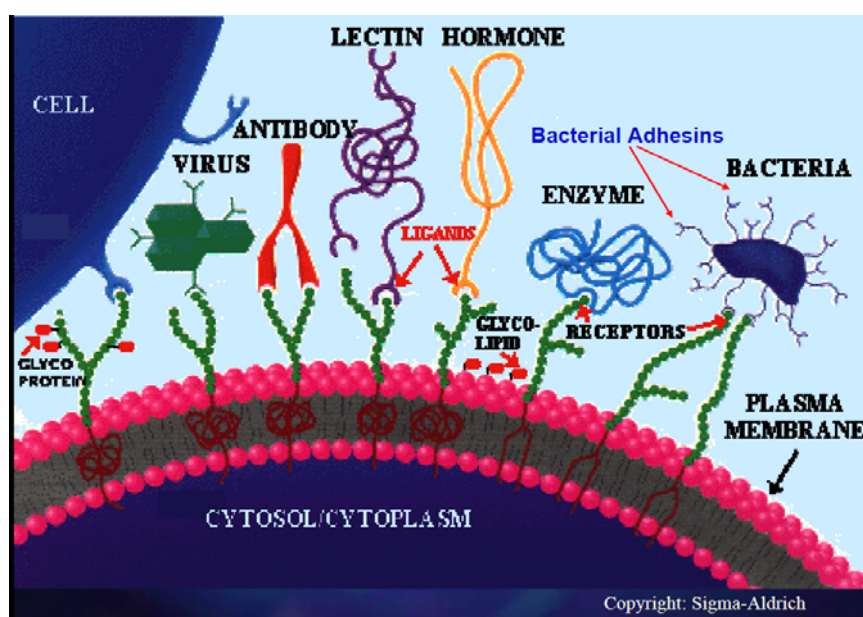
Οι πρωτεΐνες FimC-FimH έχουν κρυσταλλωθεί ως σύμπλοκο με την μαννόζη προκειμένου να εξαχθούν συμπεράσματα για τον τρόπο πρόσδεσής του σακχάρου αυτού στις εν λόγω πρωτεΐνες.^{14,16} Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι όλα τα υδροξύλια του σακχάρου, πλην του ανωμερικού, αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα τα υδροξύλια στις θέσεις 4 και 6 αλληλεπιδρούν με δεσμούς υδρογόνου με το ασπαρτικό οξύ 54, και τα υδροξύλια στις θέσεις 3 και 4 αλληλεπιδρούν με την ασπαραγίνη 135. Επίσης παρατηρούνται υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις των C2 και C3 της μαννόζης με την φαινυλαλανίνη 142.

Η πρωτεΐνη στο βακτήριο *K. pneumoniae* είναι 88% ομόλογη με αυτή στο *E. coli*. Ωστόσο παρατηρείται διαφορά στο σάκχαρο που αναγνωρίζουν. Οι πρωτεΐνες αυτές παρουσιάζουν διαφορετική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τα σάκχαρα Man α 3-

Man β 4GlcNAc και *p*-νιτροφαινυλο- α -μανοζίδιο. Στην *Salmonella typhimurium* η αντίστοιχη πρωτεΐνη είναι μικρότερη και στερείται της υδρόφοβης περιοχής.¹⁰

3.2 Υδατάνθρακες ως υποσγόμενα αντι-συγκολλητικά φάρμακα για αντιμετώπιση μολυσματικών ασθενειών

Τα κύτταρα μολύνονται από τα βακτήρια μέσω των λεκτινών των βακτηρίων, οι οποίες προσκολλώνται στους υδατάνθρακες της κυτταρικής μεμβράνης.



Τα βακτήρια μέσω των λεκτινών τους μπορούν να έχουν καλύτερη πρόσβαση σε πηγές τροφής και επίσης μπορούν να εισχωρήσουν σε διάφορους ιστούς. Επομένως εύλογος ερευνητικός στόχος είναι η παρεμπόδιση προσκολλησεως των λεκτινών των βακτηρίων, προκειμένου να μην ευνοούνται οι προαναφερθείσες λειτουργίες.^{17,18,19,20,21,22} Από ιατρική άποψη αυτός ο τρόπος αντιμετώπισης διαφόρων ασθενειών έχει αρκετά πλεονεκτήματα, καθώς θεωρείται ηπιότερος και ασφαλέστερος σε σύγκριση με αντίστοιχες χημειοθεραπευτικές προσεγγίσεις. Επιπλέον σημαντικό πλεονέκτημα της εν λόγω προσέγγισης είναι ότι οι αντιπροσκολλητικοί παράγοντες δεν σκοτώνουν ούτε αναστέλλουν την ανάπτυξη των παθογόνων με αποτέλεσμα να μην ευνοείται σε τόσο μεγάλο βαθμό η ανάπτυξη της ανθεκτικότητας των βακτηρίων, όπως συμβαίνει με τη χρήση των αντιβιοτικών.

Υπάρχουν πολλά παραδείγματα στα οποία χρησιμοποιείται η αντι-προσκολλητική θεραπεία. Ταυτόχρονη χορήγηση του μεθυλο-α-μαννοζιδίου με την κατάλληλη λεκτίνη στην ουροδόχο κύστη ποντικών²³ είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση της λοίμωξης κατά τα 2/3, ενώ στην περίπτωση που το μεθυλο-α-μαννοζίδιο είχε αντικατασταθεί από μεθυλο-α-γλυκοζίδιο δεν υπήρχε καμία βελτίωση της λοίμωξης. Διαφορετική μεταχείριση 12 πιθήκων²⁴ που ήταν θετικοί στο μικρόβιο *H. Pylori* επιβεβαίωσε την σπουδαιότητα τέτοιου είδους θεραπείας: στα μισά πειραματόζωα εφαρμόστηκε θεραπεία με τον πολυσακχαρίτη Sia3'Lac παρουσία των κατάλληλων αντιβιοτικών κατά του έλκους (ομεπραζόλη, σαπσαλικυλικό βισμούθιο) και στα άλλα μισά χορηγήθηκε μόνο ο πολυσακχαρίτης. Διαπίστωσαν ότι η χρήση μόνο του πολυσακχαρίτη έχει καλύτερα αποτελέσματα χωρίς να δημιουργεί παρενέργειες, ενώ στην περίπτωση που υπήρχε και το αντιβιοτικό δεν βελτιώθηκε ο ρυθμός της θεραπείας. Ωστόσο σε αντίστοιχα *in vivo* πειράματα σε ανθρώπους τα αποτελέσματα δεν ήταν τόσο ενθαρρυντικά.^{25,26} Βέβαια αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στο γεγονός ότι τα επίπεδα χορήγησης των υδατανθράκων ήταν ανεπαρκή ή ότι καθώς τα βακτήρια εκφράζουν περισσότερες από μία λεκτίνες με διαφορετικές εξειδικεύσεις, απαιτείται η χρήση μίγματος σακχαριτών.

3.3 Συμπεράσματα

Η ανωτέρω βιβλιογραφική ανασκόπηση έδειξε (α) την δυνατότητα συγκεκριμένων σακχάρων να αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένες βακτηριακές λεκτίνες, (β) τον γενικό μηχανισμό βακτηριακής μόλυνσης και την πιθανή αναστολή του από συγκεκριμένα σάκχαρα (γ) την πιθανότητα τα υδατανθρακικά συμπλέγματα κυκλοδεξτρινών που θα συντεθούν στην παρούσα εργασία να αναγνωρίζουν συγκεκριμένες λεκτίνες αλλά και τα ίδια να αναστέλλουν την μικροβιακή μόλυνση. Στην παρούσα εργασία, τα υδατανθρακικά συμπλέγματα κυκλοδεξτρινών με σάκχαρα αναγνώρισης λεκτινών θα μελετηθούν με αντίστοιχες λεκτίνες ώστε να διαπιστωθεί η δυνατότητα αλληλεπίδρασης. Η μελέτη αυτή περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 8.

ΜΕΡΟΣ ΙΙ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4

**6-ΠΕΡΙ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ
ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΩΝ ΜΕ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ
ΟΜΑΔΕΣ**

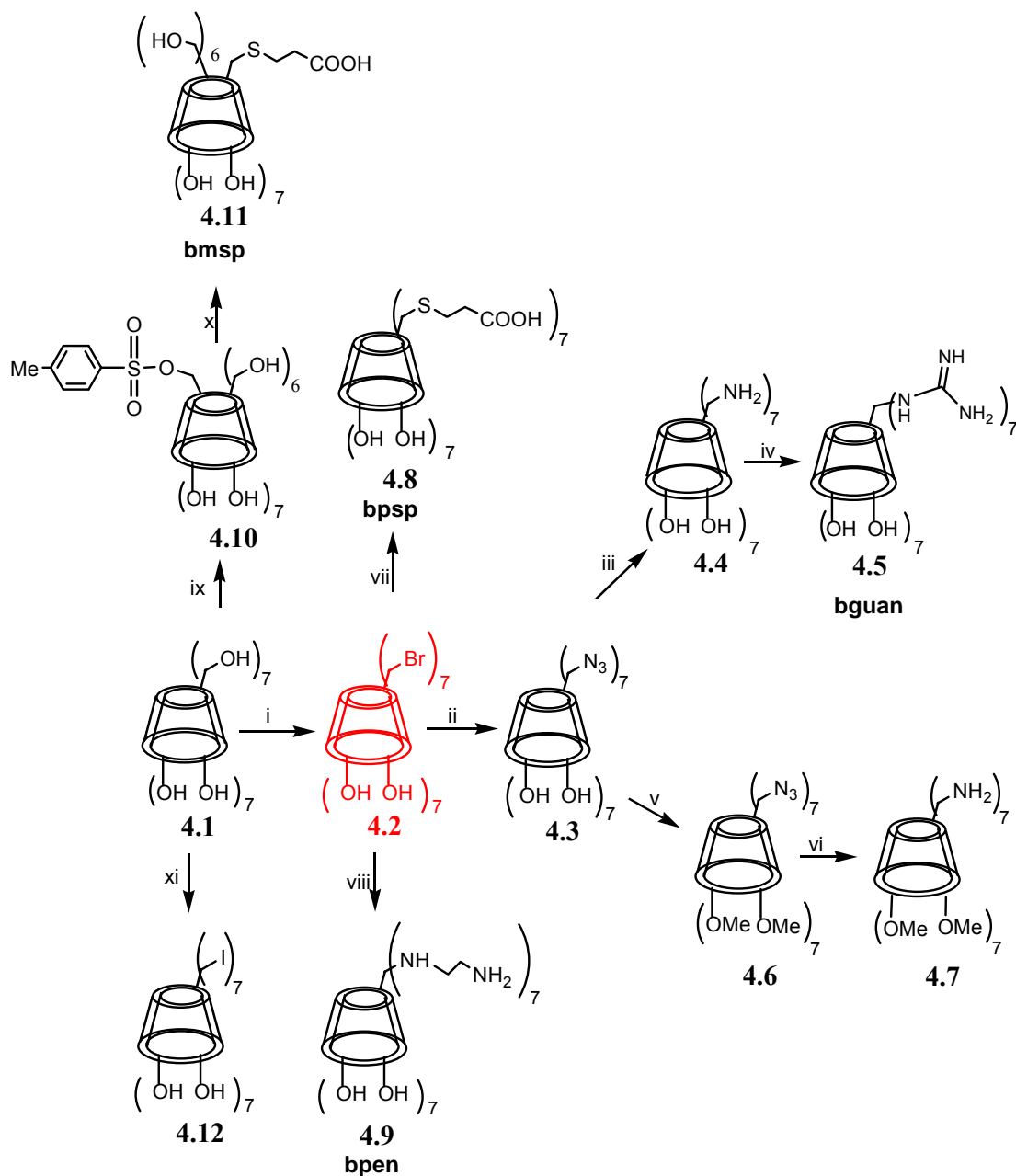
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

6-ΠΕΡΙ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΩΝ ΜΕ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ

4.1 Εισαγωγή

Ο σκοπός της διατριβής αυτής, που αφορά στην σύνδεση κυκλοδεξτρινών με σάκχαρα και μελέτη των ιδιοτήτων τους, προαπαιτεί την σύνθεση ποικιλίας τροποποιημένων CDs οι οποίες θα χρησιμοποιηθούν ως ενώσεις-κλειδιά στην σύνδεση με σάκχαρα. Στο παρόν κεφάλαιο, αναλύεται η σύνθεση αυτών των πρόδρομων CDs, οι οποίες είτε είναι αμίνο είτε καρβόξυ υποκατεστημένες, επιτρέπουν την σύνδεση με καταλλήλως τροποποιημένους μονοσακχαρίτες (κεφ. 5) και την παραγωγή γλυκοκυκλοδεξτρινών (κεφ. 6). Στα παρακάτω σχήματα φαίνονται οι πορείες και τα παράγωγα της βCD (Σχήμα 4.1) και γCD (Σχήμα 4.2) που συντέθηκαν. Οι τροποποιήσεις των CDs έγιναν προκειμένου να εξετασθεί η ικανότητα συμπλοκοποίησης (κεφ. 7) και η αντιμικροβιακή δράση (κεφ. 8) των κατωτέρω παραγώγων. Τα βιβλιογραφικώς γνωστά **bpsp**,³ **bmsp**,³ **bguan**,¹ και **bpen**² της βCD και των παραγώγων **gpsp**,³ **gpen**² και **gpren**² της γCD συντέθηκαν ως πρόδρομες ενώσεις με δυνατότητα σύνδεσης ενός, επτά και οκτώ μονοσακχαριτών. Η σύνθεση νέων καρβόξυ παραγώγων α-, β- και γ- κυκλοδεξτρινών, τα οποία φέρουν στην πρωτοταγή πλευρά ανθρακικές αλυσίδες τύπου EDTA, αναπτύχθηκε επιτυχώς ώστε να ληφθούν κυκλοδεξτρίνες με δυνατότητα σύνδεσης δώδεκα, δεκατεσσάρων και δεκαέξι μονοσακχαριτών.

4.2 Σύνθεση και φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός αμινο και καρβόξυ παραγώγων κυκλοδεξτρινών



Σχήμα 4.1: Παράγωγα της βCD: **i)** Br₂, Ph₃P, DMF, 75-80 °C, 85%^{5,6} **ii)** NaN₃, NaI, DMF, 110 °C, 95%³ **iii)** NH₃, Ph₃P, DMF, rt, 60%³ **iv)** υδροχλωρική 1*H*-πυραζολο-1-καρβοξαμίδίνη, *N,N'*-δισοπροπυλαιθυλαμίνη, DMF, 70 °C, 64%¹ **v)** NaH, MeI, THF, rt, 99%⁷ **vi)** NH₃, Ph₃P, DMF, rt, 95%⁸ **vii)** 3-μερκαπτοπροπανοϊκό οξύ, NaH, DMF, 70 °C, 75%³ **viii)** 1,2-διαμμοιοαιθάνιο, 7 atm, 80 °C, 99%² **ix)** *p*TsCl, H₂O/NaOH, 68%⁹ **x)** 3-μερκαπτοπροπανοϊκό οξύ, NaH, DMF, 100 °C, 95%³ **xi)** I₂, Ph₃P, DMF, 75-80 °C, 96%²

Η επτάκις(6-βρωμο-6-δεοξυ)-β-κυκλοδεξτρίνη **4.2** αποτελεί το πιο συχνό και το πιο χρήσιμο πλήρως υποκατεστημένο στην πρωτοταγή πλευρά κυκλοδεξτρινικό παράγωγο σε αντιδράσεις εισαγωγής πυρηνόφιλων υποκαταστατών. Για τη σύνθεσή της ακολουθήθηκε η γνωστή βιβλιογραφική πορεία⁸ που περιγράφεται αναλυτικά στο πειραματικό μέρος. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί κατά τη διάρκεια της προσθήκης του Br₂ στο DMF, όπου η θερμοκρασία δεν πρέπει να υπερβεί τους 60 °C. Η αντίδραση σχηματισμού του αντιδραστήριου Vilsmeier [Me₂N=CHBr]⁺Br⁻,⁸ το οποίο παρατηρείται ως πορτοκαλόχρουν ίζημα είναι εξώθερμη και για αυτό η προσθήκη του Br₂ πρέπει να γίνεται στάγδην. Ακολούθως είναι σημαντικό η μεν προσθήκη της βCD να γίνεται σε πολλές ισόποσες ποσότητες και η δε θερμοκρασία της αντίδρασης να διατηρείται μεταξύ 75-80 °C. Θερμοκρασία μικρότερη των 75 °C οδηγεί σε ατελή υποκατάσταση στην πρωτοταγή πλευρά ενώ μεγαλύτερη των 80 °C σε προϊόντα αποσύνθεσης της κυκλοδεξτρίνης.

Εν συνεχεία από το **4.2** παρασκευάστηκε το προϊόν **4.3** με πυρηνόφιλη υποκατάσταση του Br₂ χρησιμοποιώντας NaN₃, με καταλυτική χρήση NaI. Βιβλιογραφικά¹⁰ έχει αναφερθεί ότι η χρήση του ιωδιούχου νατρίου μπορεί να αποφευχθεί, ωστόσο η καταλυτική του χρήση αυξάνει την ταχύτητα της αντίδρασης. Στη συνέχεια το άζιδο-παράγωγο **4.3** ανάγεται στο αντίστοιχο αμινο-παράγωγο **4.4** υπό συνθήκες Staudinger (Ph₃P, NH₃). Για την απόδειξη της ολοκλήρωσης της αντίδρασης είναι χρήσιμο το φάσμα ¹³C NMR, όπου η κορυφή του άνθρακα C6 που φέρει την αμινο-ομάδα εμφανίζεται στα 41.1 ppm, ενώ η αντίστοιχη κορυφή C6 με άζιδο-ομάδα στα 52.2 ppm. Η **4.4** λαμβάνεται υπό μορφή υδροχλωρικού άλατος.

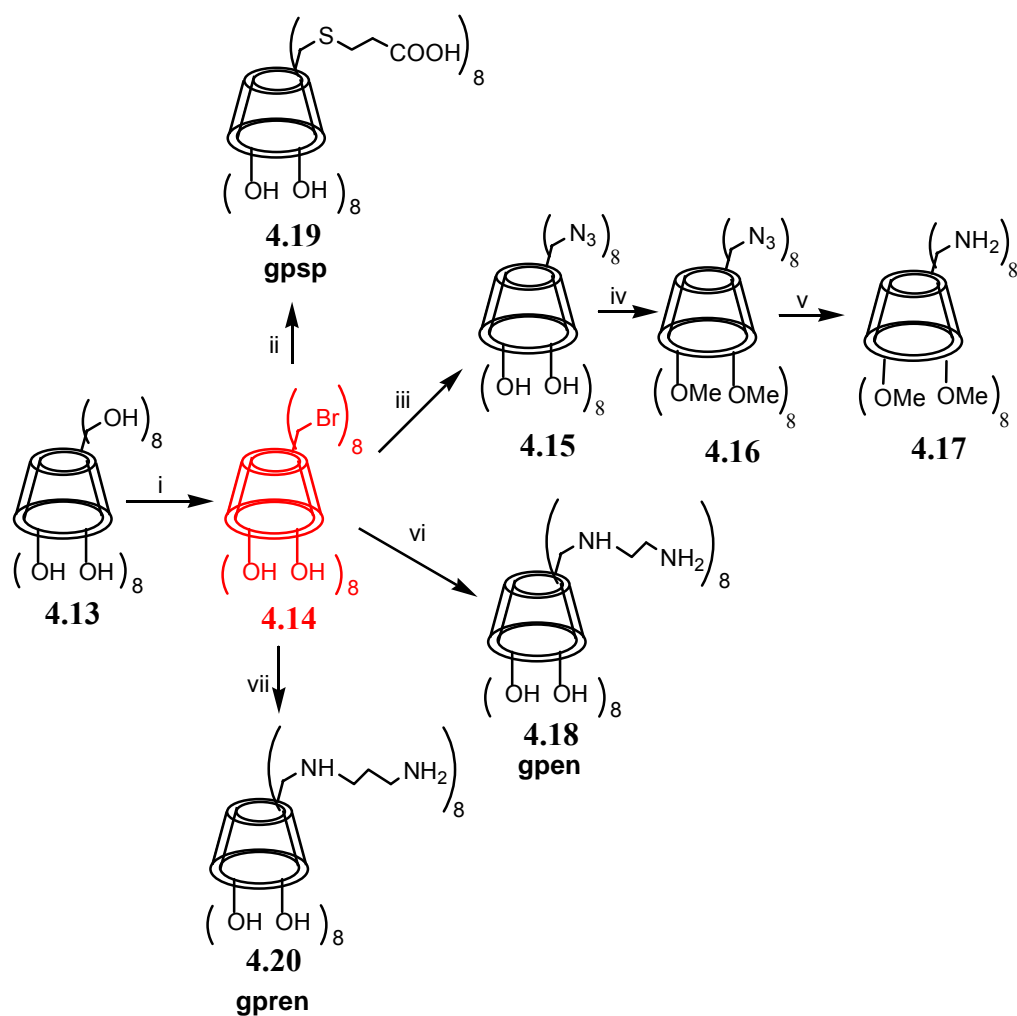
Στη συνέχεια η σύνθεση της ένωσης **4.5** πραγματοποιήθηκε με γουανυλίωση των πρωτοταγών αμινικών ομάδων της **4.4** ώστε να προκύψουν ομάδες γουανιδίνης.¹¹ Παραπροϊόν της αντίδρασης προκύπτει το 1-*H*-πυραζόλιο, το οποίο απομακρύνεται με εκχύλιση με CHCl₃ σε αλκαλικό pH.

Μεθυλίωση των δευτεροταγών υδροξυλίων της κυκλοδεξτρίνης **4.3** με μεθυλοιωδιδίο και υδρίδιο του νατρίου,¹² δίνει την **4.6**. Μετά την προσθήκη του μεθυλοιωδιδίου, η αντίδραση προστατεύθηκε από το φως προκειμένου να αποφευχθεί οποιαδήποτε πιθανή φωτοχημική αντίδραση. Αφού ολοκληρώθηκε ο σχηματισμός του προϊόντος **4.6**, έλαβε μέρος η αναγωγή Staudinger με υδατικό διάλυμα αμμωνίας προς σχηματισμό του **4.7**, δηλαδή περι-6-αμινο-6-δεοξυ-βCD, με

μεθυλιωμένη την δευτεροταγή πλευρά. Η μεθυλίωση προσδίδει αύξηση ύψους αλλά και ευκαμψία στην κοιλότητα.

Η ένωση **4.2** χρησιμοποιήθηκε για την σύνθεση των υπολοίπων κυκλοδεξτρινών που φαίνονται στο σχήμα 4.1. Το βρώμο-παράγωγο **4.2** αντέδρασε με το 3-μερκαπτοπροπιονικό οξύ και έδωσε το προϊόν **4.8 (bmsp)**.^{3,13} Με ανάλογο τρόπο συντέθηκε και το μονο-παράγωγο **4.11 (bmSP)** χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το μονο-παράγωγο **4.10**.

Το βρωμο-παράγωγο **4.2** χρησιμοποιήθηκε επίσης για το σχηματισμό του αμίνο παραγώγου² **4.9**, σε συνθήκες αυξημένης πίεσης (7 atm) και θερμοκρασίας (80 °C), σε αυτόκλειστο χρησιμοποιώντας 1,2-διαμιναιθάνιο ως διαλύτη. Για την επιτυχή ολοκλήρωση των αντιδράσεων αυτών είναι απαραίτητη η απόσταξη του 1,2-διαμιναιθανίου από KOH-CaCO₃.¹⁴ Αυτό κρίνεται αναγκαίο διότι οι αμίνες αφ' ενός κατά την παραμονή τους προσροφούν CO₂ από την ατμόσφαιρα, αφ' ετέρου έχουν έντονο υγροσκοπικό χαρακτήρα, επομένως χρειάζονται προσεκτική ξήρανση.



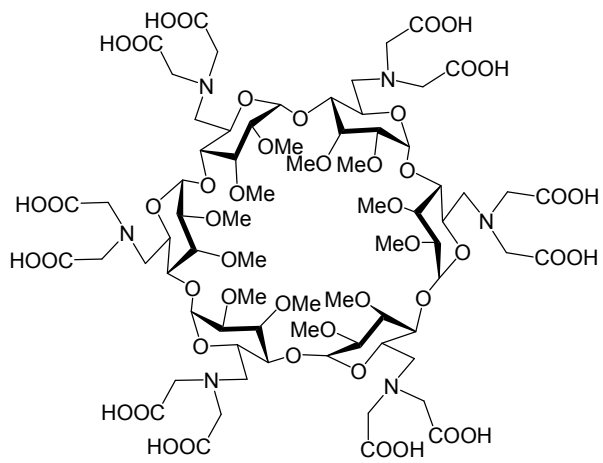
Σχήμα 4.2: Βιβλιογραφικώς γνωστά παράγωγα της γ CD: **i)** Br_2 , Ph_3P , DMF, 75-80 °C, 65%^{5,6} **ii)** 3-μερκαπτοπροπανοϊκό οξύ, NaH, DMF, 70 °C, 40%³ **iii)** NaN_3 , NaI, DMF, 110 °C, 80%³ **iv)** NaH, MeI, THF, rt, 88%¹⁵ **v)** NH_3 , Ph_3P , DMF, rt, 100%⁷ **vi)** 1,2 διαμινωαιθάνιο, 7 atm, 80 °C, 98%² **vii)** 1,3-διαμινωπροπάνιο, 7 atm, 80 °C, 79%²

Τα προϊόντα **4.14**, **4.15**, **4.16**, **4.17**, **4.18**, **4.19** και **4.20** της γ CD συντέθηκαν με τρόπο ανάλογο των αντιστοιχών προϊόντων της β CD. Αξιοσημείωτο είναι ότι η διαλυτότητα του προϊόντος **4.14** σε EtOH είναι μεγαλύτερη από ότι του αντίστοιχου προϊόντος **4.2** της β CD. Επομένως χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή στην ποσότητα αιθανόλης που χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση του παραπροϊόντος $\text{Ph}_3\text{P}=\text{O}$ κατά την διάρκεια της επεξεργασίας.

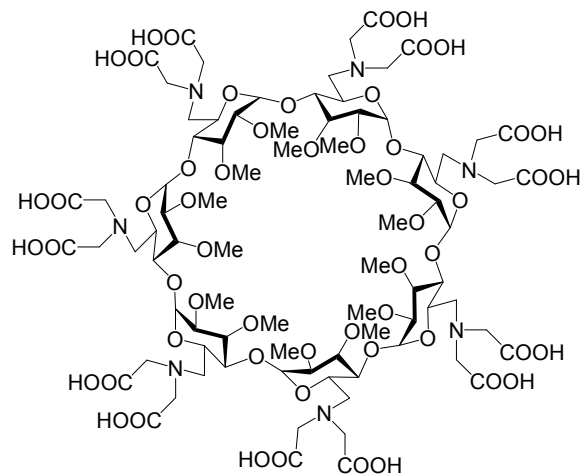
4.3 Σύνθεση νέων καρβόξυ παραγώγων α-, β- και γ- κυκλοδεξτρινών τύπου EDTA

Καρβοξυλικά παράγωγα ανάλογα του **hpsp (4.8)** και **gpsp (4.19)**, έχουν συντεθεί στην βιβλιογραφία σε μια προσπάθεια να δημιουργηθούν ξενιστές με επιμήκη κοιλότητα και δυνατότητα εγκλεισμού θετικώς φορτισμένων μορίων.³ Επίσης η σύνθεση περι-(6-καρβόξυ-6-δεοξυ)-CDs, δηλαδή κυκλοδεξτρινών όπου τα -C₆H₂OH έχουν μετατραπεί σε καρβόξυ ομάδες έχει δημοσιευθεί.¹⁶ Τα παράγωγα αυτά έχουν συντεθεί ξεκινώντας από τις περι(2,3-δι-*O*-μεθυλο)- ή από τις περι(2,3-δι-*O*-ακετυλο)-CDs χρησιμοποιώντας ως αντιδραστήριο οξείδωσης το TEMPO (ρίζα του 2,2,6,6-τετραμεθυλοπιπεριδινοξυλίου).

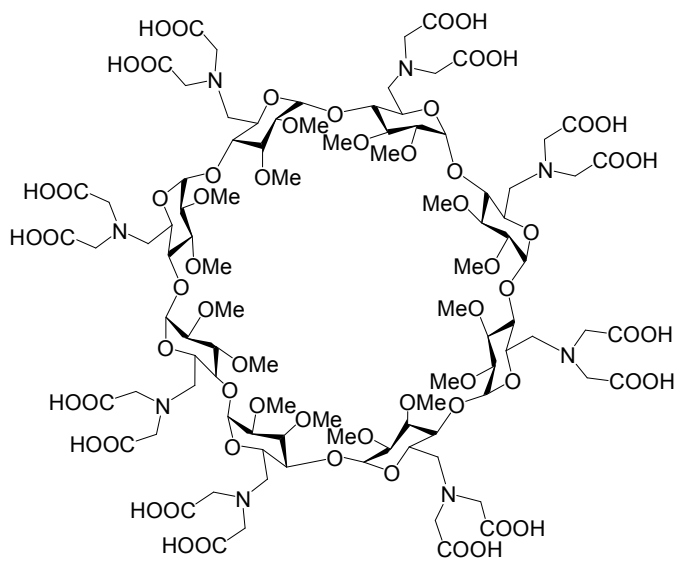
Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζεται η εισαγωγή στις κυκλοδεξτρίνες καρβοξυλομάδων σε διάταξη τύπου EDTA, δηλαδή εισαγωγή [δι(καρβοξυμεθυλο)]αμίνο-υποκαταστατών σε όλα τα άτομα C6 της πρωτοταγούς πλευράς. Έτσι θα δημιουργηθούν πολύ-EDTA-CDs¹⁷ με πλήθος ενεργών καρβοξυλίων με δυνατότητα σύζευξης αμίνο σακχάρων και την δημιουργία υδατανθρακικών συμπλεγμάτων αυξημένου μοριακού βάρους.



aedta

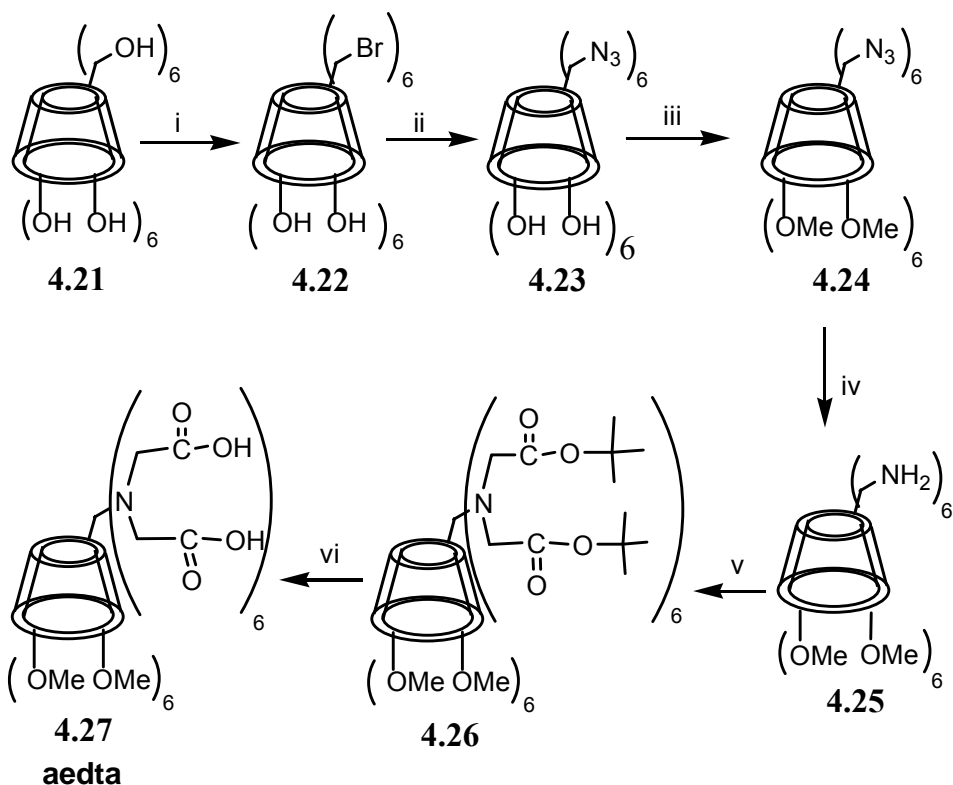


bedta



gedta

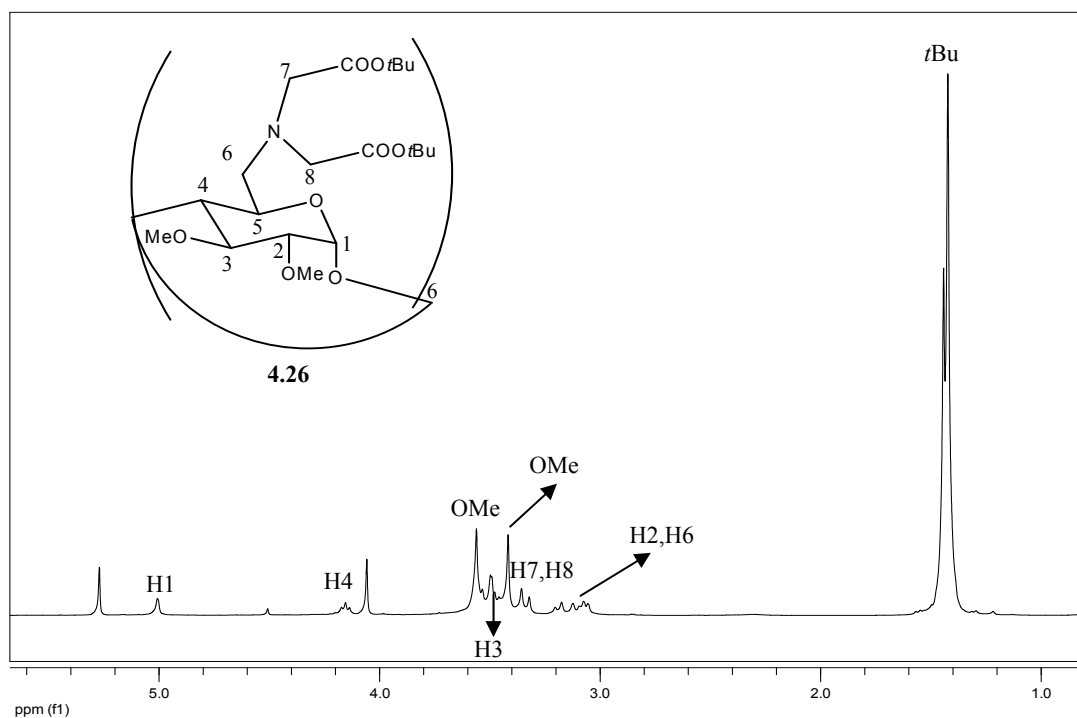
Σχήμα 4.3: Κυκλοδεξτρίνες τύπου EDTA με περι-μεθυλιωμένη την δευτεροταγή πλευρά



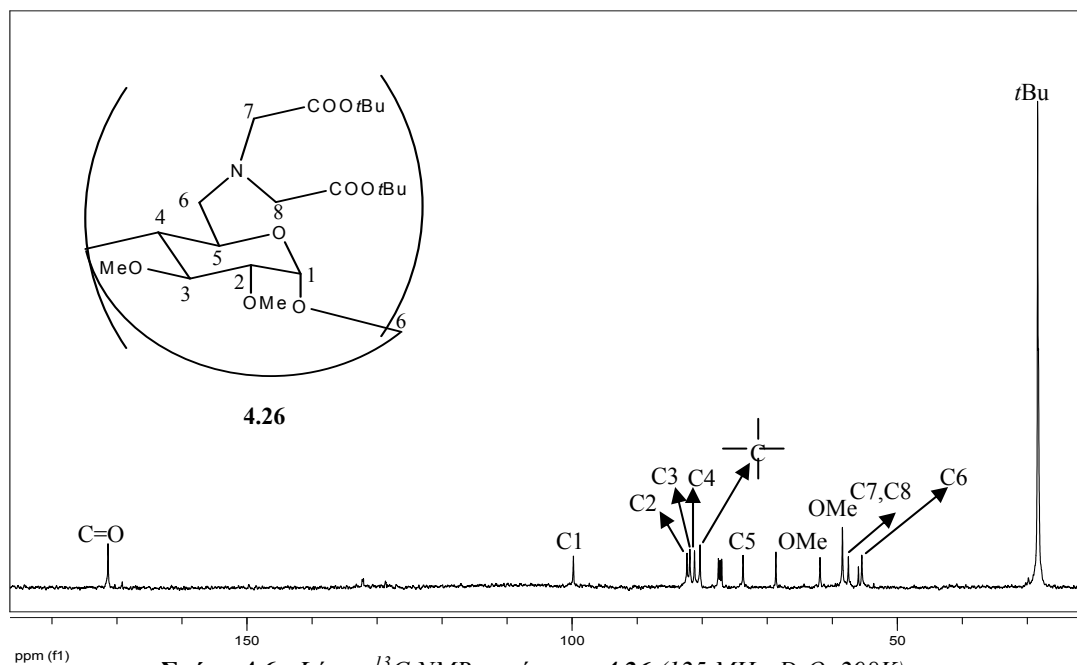
Σχήμα 4.4: Παράγωγα της α CD: **i)** Br_2 , Ph_3P , DMF, 75-80 $^\circ\text{C}$, 85%^{5,6}**ii)** NaN_3 , NaI, DMF, 110 $^\circ\text{C}$, 95%³ **iii)** NaH, MeI, THF, rt, 99%¹⁸ **iv)** NH_3 , Ph_3P , DMF, rt, 70%⁸ **v)** KI, K_2CO_3 , *t*-βουτυλεστέρας του βρωμοοξικού οξέος, ακετονιτρίλιο, 80 $^\circ\text{C}$, 88%¹⁷ **vi)** TFA, CHCl_3 , rt, 42%¹⁷

Για την σύνθεση του πολυκαρβοξυλικού παραγώγου της α CD, aedta (**4.27**), ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται στο σχήμα 4.4, ανάλογη αυτών που περιγράφηκαν ανωτέρω στα σχήματα 4.1 και 4.2. Το παράγωγο **4.25** συντέθηκε με τρόπο ανάλογο όπως για τα παράγωγα **4.7** (Σχήμα 4.1) της β CD και **4.17** (Σχήμα 4.2) της γ CD. Η κυριότερη δυσκολία αφορούσε στον καθαρισμό του προϊόντος **4.25**, το οποίο καθώς είναι αμφίφιλο μόριο ήταν αδύνατον να απαλλαγεί από τις διάφορες προσμίξεις με χρωματογραφία στήλης. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η αντίδραση του **4.25** με περίσσεια βρωμοοξικού *tert*-βουτυλεστέρα παρουσία ιωδιούχου καλίου (KI) και ανθρακικού καλίου (K_2CO_3) προς σχηματισμό του παραγώγου **4.26**, το οποίο καθαρίστηκε αποτελεσματικά με χρωματογραφία στήλης. Στα σχήματα που ακολουθούν (Σχήμα 4.5, Σχήμα 4.6) δίνονται τα φάσματα ^1H και ^{13}C NMR του προϊόντος **4.26**, στα οποία διαπιστώνεται η παρουσία δύο ομάδων *t*-βουτυλοξυκαρβονυλομεθυλενίων ανά άτομο αζώτου, η καθαρότητα και η συμμετρική δομή του. Για την ολοκλήρωση των αντιδράσεων αυτών κρίθηκε

απαραίτητη η μεθυλίωση των κυκλοδεξτρινών στη δευτεροταγή τους πλευρά, καθώς ανάλογη πορεία, χωρίς να προηγηθεί μεθυλίωση της δευτεροταγούς πλευράς, δεν ήταν επιτυχής.



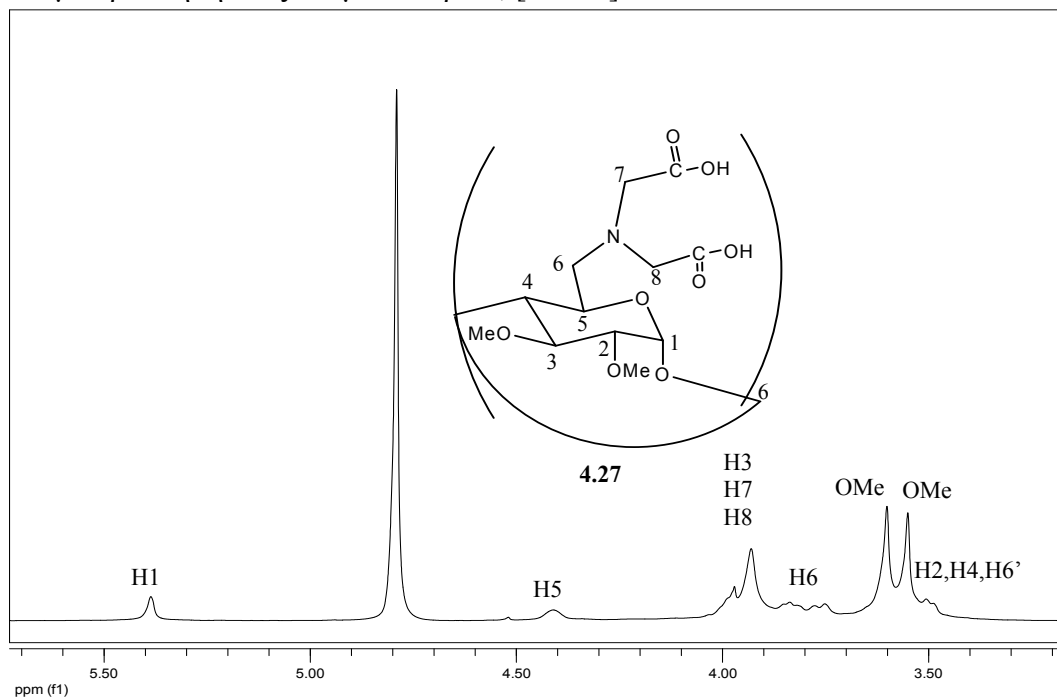
Σχήμα 4.5: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **4.26** (500 MHz, CDCl_3 , 298K)



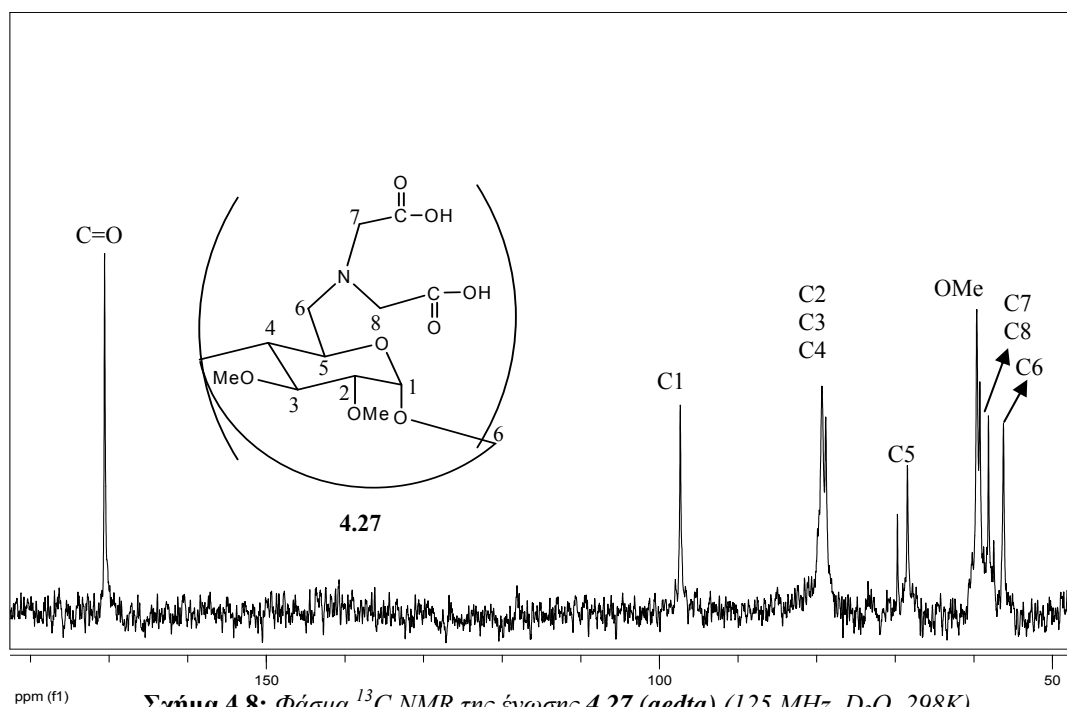
Σχήμα 4.6: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **4.26** (125 MHz, D_2O , 298K)

Εν συνεχεία, το προϊόν **4.26** υποβλήθηκε σε όξινη υδρόλυση της προστατευτικής Boc-ομάδας με τριφθοροοξικό οξύ. Τα φάσματα NMR του τελικού προϊόντος **4.27** (**aedta**) δίνονται στα παρακάτω σχήματα. Στο φάσμα ^1H NMR του **4.27** σε D_2O

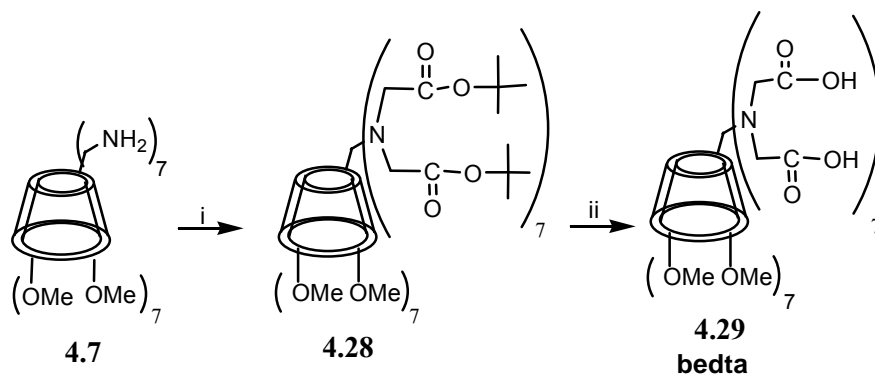
(Σχήμα 4.7) παρατηρούνται ελαφρώς διευρυμένες κορυφές, όμως στο φάσμα ^{13}C NMR (Σχήμα 4.8) εμφανίζονται οξείες κορυφές και η ύπαρξη μίας και μόνο κορυφής στα 171.3 ppm και για τα 12 καρβοξύλια της δομής, φανερώνει μοριακή συμμετρία και κατ'επέκτασιν πλήρως υποκατεστημένο προϊόν. Τέλος με το φάσμα μάζας (MALDI-TOF) πιστοποιήθηκε ότι πρόκειται για το επιθυμητό προϊόν καθώς παρατηρήθηκε ένα κύριο σήμα, σε $m/z = 1853.7$, το οποίο αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν με προσθήκη ενός ατόμου νατρίου, $[M+\text{Na}]^+$.



Σχήμα 4.7: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης 4.27 (aedta) (500 MHz, D_2O , 298K)

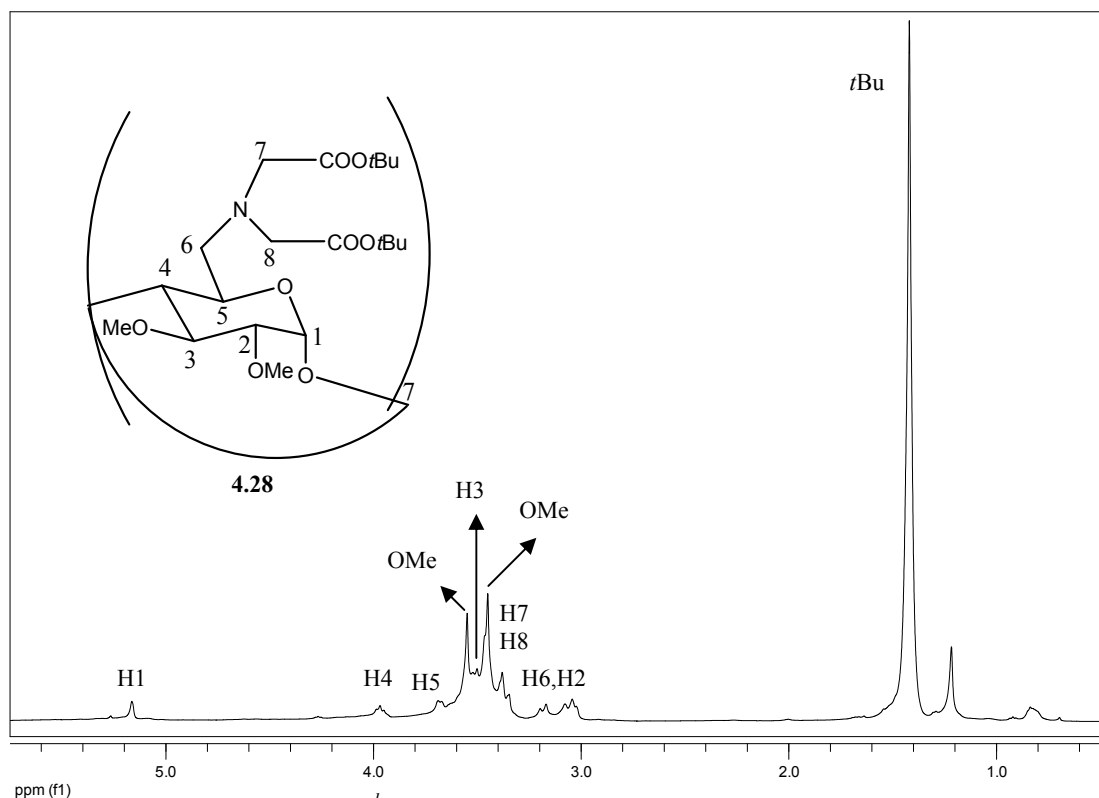


Σχήμα 4.8: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 4.27 (aedta) (125 MHz, D_2O , 298K)

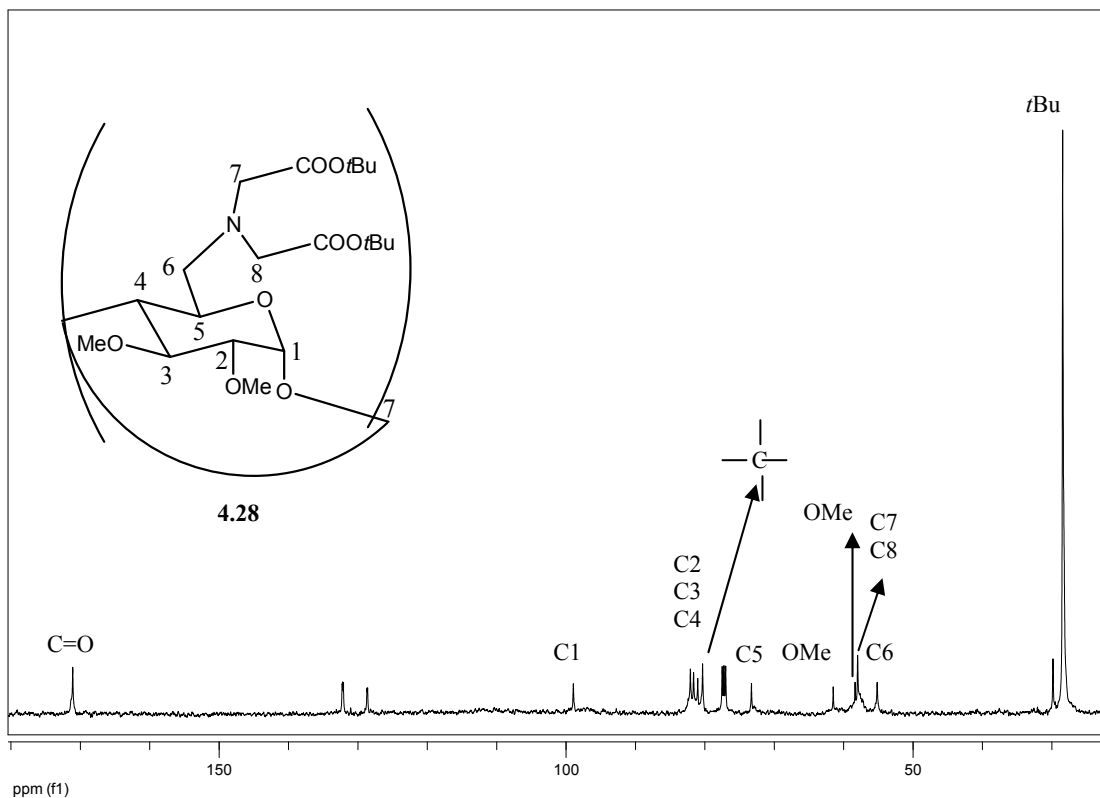


Σχήμα 4.9: Παράγωγα της βCD: **i)** KI, K₂CO₃, *t*-βουτυλεστέρας του βρωμοοξικού οξέος, ακετονιτρίλιο, 80 °C, 22%¹⁷ **ii)** TFA, CHCl₃, rt, 80%¹⁷

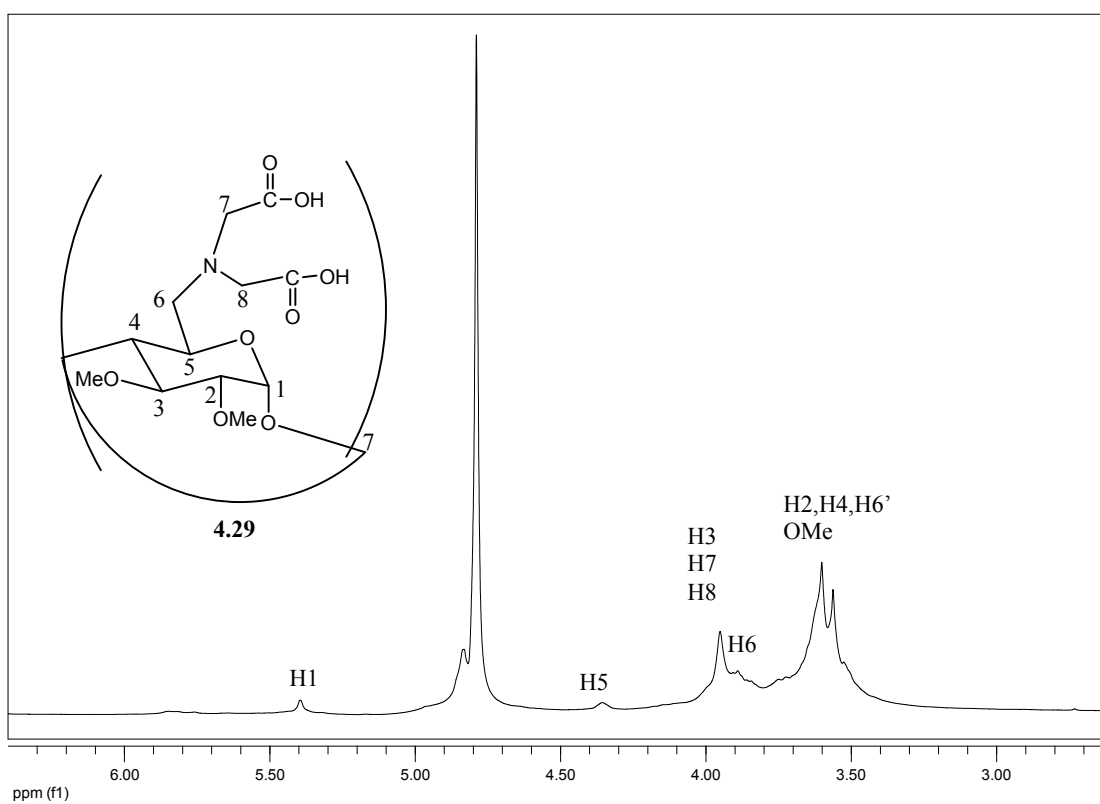
Η ίδια πειραματική πορεία που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του **aedta** ακολουθήθηκε και για τη σύνθεση του **bedta** και του **gedta**. Τα φάσματα του ενδιάμεσου προϊόντος **4.28** και του τελικού προϊόντος **4.29 (bedta)** δίνονται στα παρακάτω σχήματα (Σχήμα 4.10-4.13). Ομοίως, όπως με τα προϊόντα της αCD (**4.26**, **4.27**) παρατηρούνται και εδώ διευρυμένες κορυφές για τα φάσματα ¹H NMR και οξείες για τα φάσματα ¹³C NMR. Τέλος η φασματοσκοπία μάζας των προϊόντων **4.28** και **4.29** επιβεβαίωσε την ύπαρξη των επιθυμητών προϊόντων δίνοντας μοριακά ιόντα στα $m/z = 1484.3 [M+2Na]^{2+}$ και στα $m/z = 2158.8 [M+Na]^+$ αντιστοίχως.



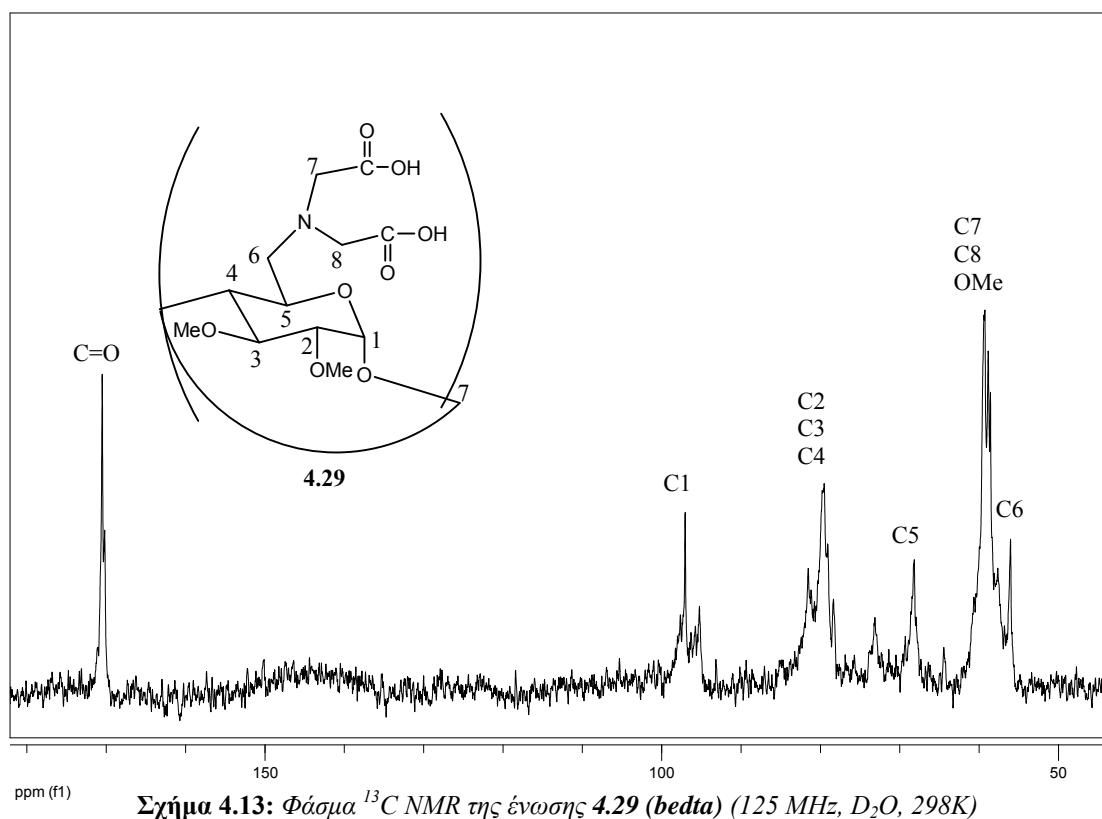
Σχήμα 4.10: Φάσμα ¹H NMR της ένωσης **4.28** (500 MHz, CDCl₃, 298K)



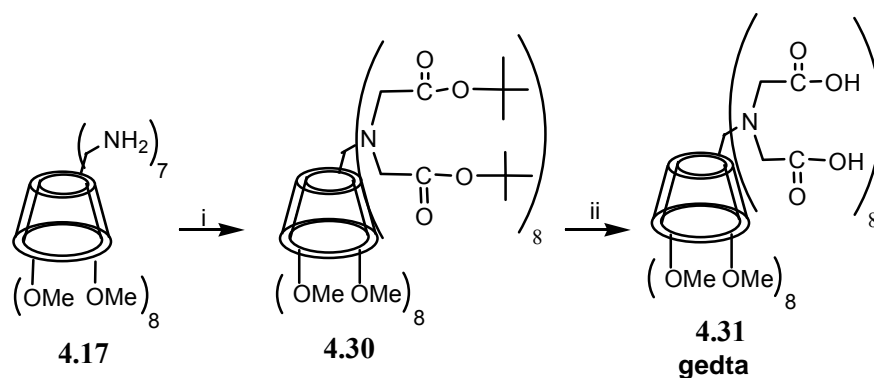
Σχήμα 4.11: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **4.28** (125MHz, CDCl_3 , 298K)



Σχήμα 4.12: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **4.29 (beta)** (500 MHz, D_2O , 298K)



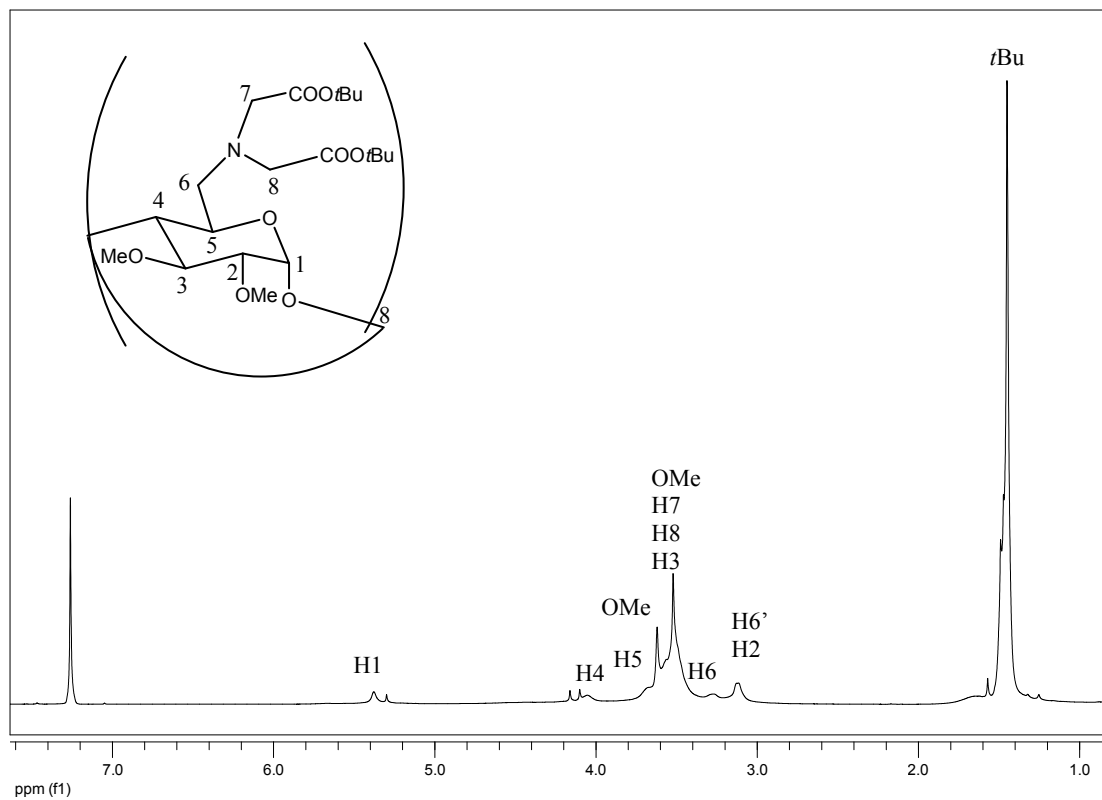
Σχήμα 4.13: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης 4.29 (bedta) (125 MHz, D₂O, 298K)



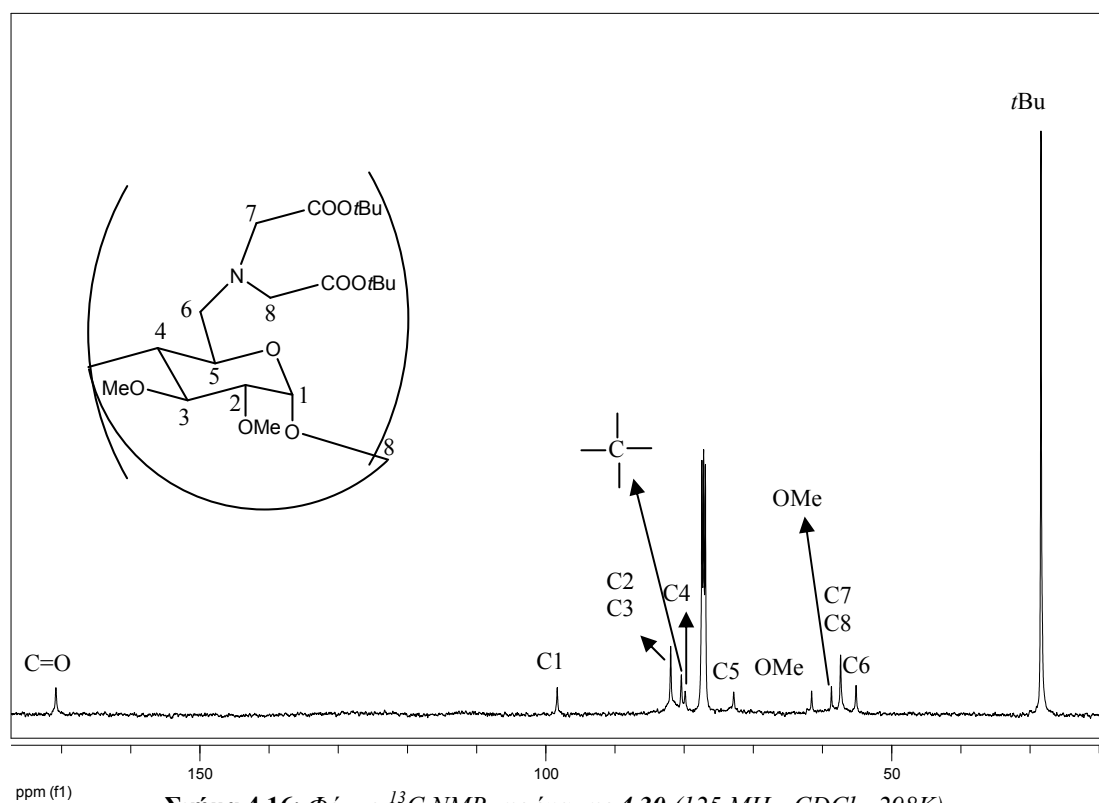
Σχήμα 4.14: Παράγωγα της γCD: **i**) KI, K₂CO₃, *t*-βουτυλεστέρας του βρωμοοξικού οξέος, ακετονιρίλιο, 80 °C, 45%¹⁷ **ii**) TFA, CHCl₃, rt, 50%¹⁷

Ο χαρακτηρισμός της δομής των ανωτέρω προϊόντων 4.26, 4.27 (aedta) και 4.28, 4.29 (bedta) έγινε με ανάλυση φασμάτων NMR με την βοήθεια πειραμάτων δύο διαστάσεων, όπως περιγράφεται κατωτέρω για τα παράγωγα της γCD 4.30 και 4.31 (gedta). Με τις πειραματικές συνθήκες που ήδη αναλύθηκαν συντέθηκαν και τα προϊόντα 4.30 και 4.31 (gedta) της γCD. Στα σχήματα 4.15 και 4.16 δίνονται τα φάσματα ¹H και ¹³C NMR του προϊόντος 4.30. Επίσης στο σχήμα 4.17 παρουσιάζεται η φασματοσκοπία μάζας, στην οποία παρατηρείται ένα κύριο σήμα σε *m/z* = 1853.7,

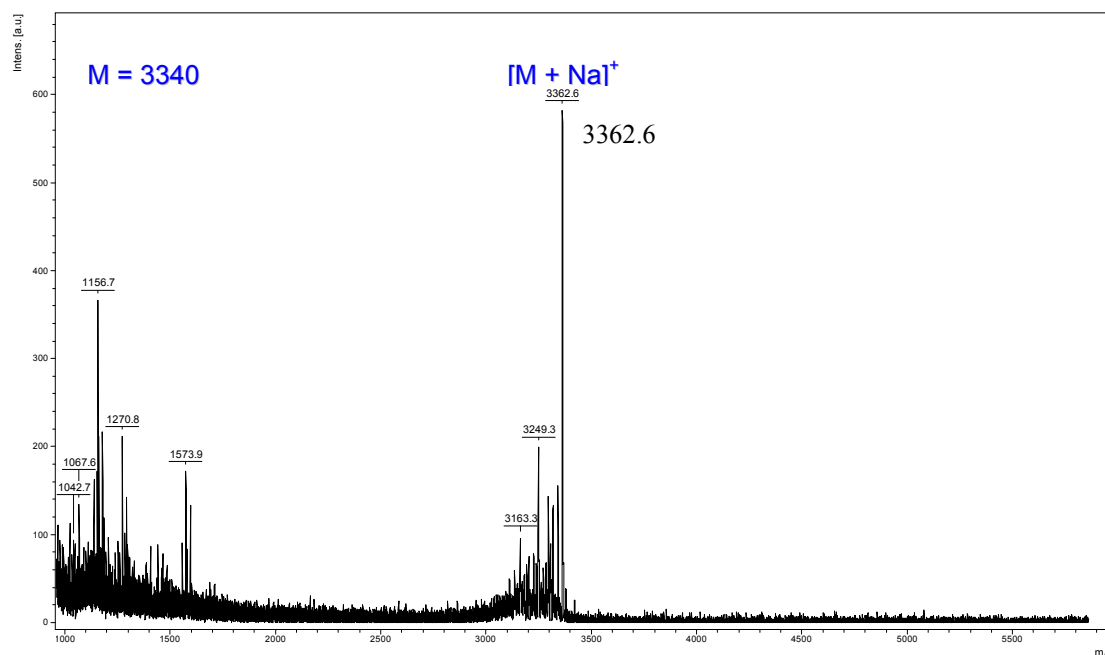
το οποίο αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν με προσθήκη ενός ατόμου νατρίου, $[M+Na]^+$, υποδεικνύοντας ότι πρόκειται για καθαρό περι-υποκατεστημένο προϊόν απαλλαγμένο από προσμίξεις μερικής υποκατάστασης.



Σχήμα 4.15: Φάσμα 1H NMR της ένωσης 4.30 (500 MHz, $CDCl_3$, 298K)

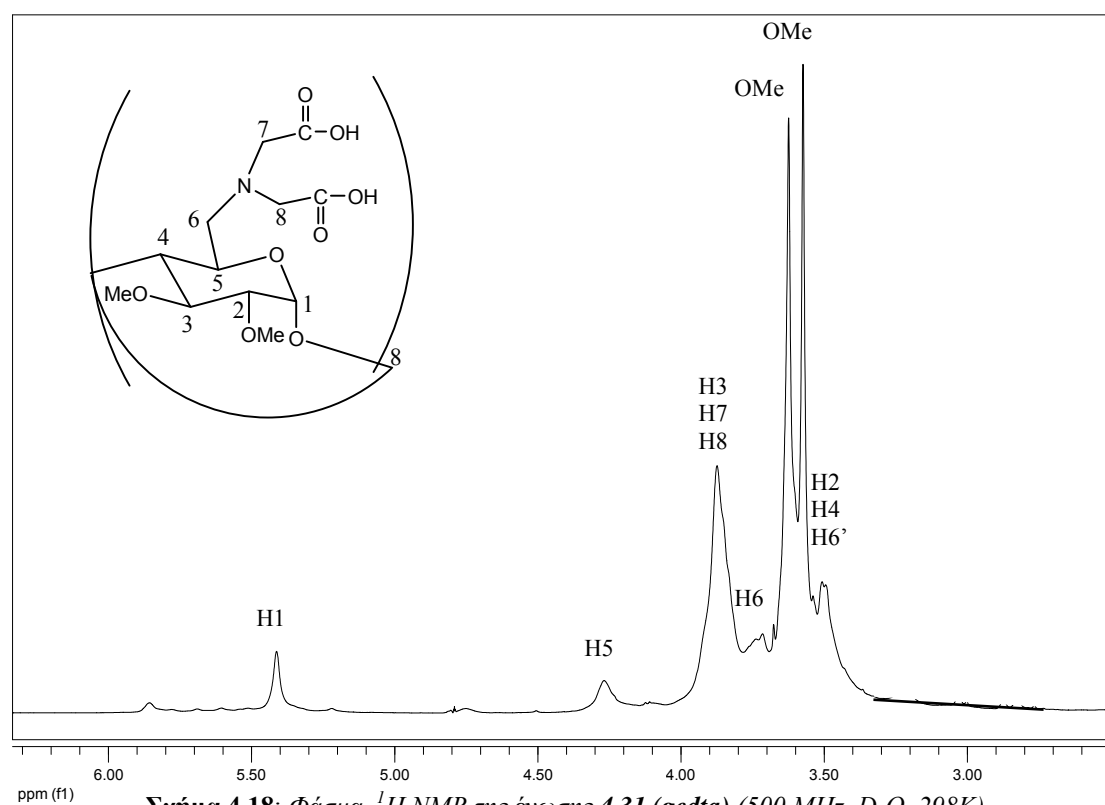


Σχήμα 4.16: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 4.30 (125 MHz, $CDCl_3$, 298K)

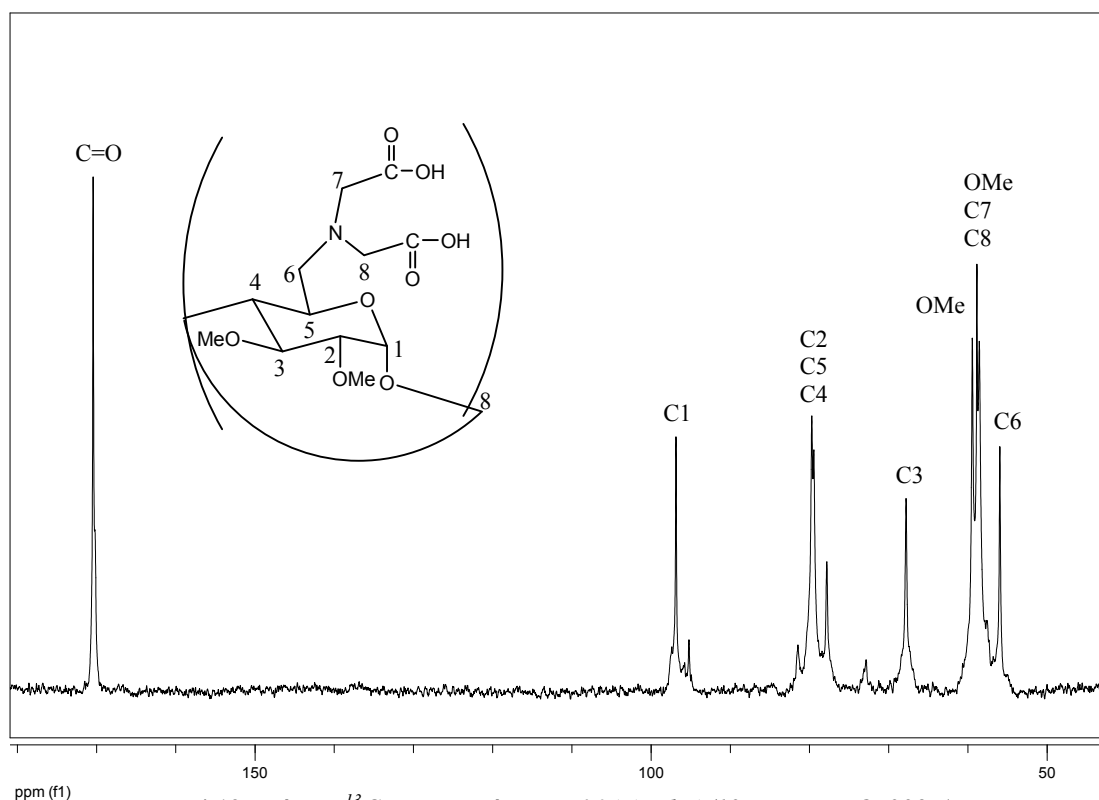


Σχήμα 4.17: Φάσμα MALDI-TOF-MS της ένωσης 4.30

Ενδεικτικά παρουσιάζεται η φασματοσκοπική ανάλυση του τελικού προϊόντος 4.31 (*gedta*). Η απόδοση των κορυφών στα φάσματα ^1H και ^{13}C NMR έγινε βάσει των φασμάτων 2D COSY, HSQC και HMBC.

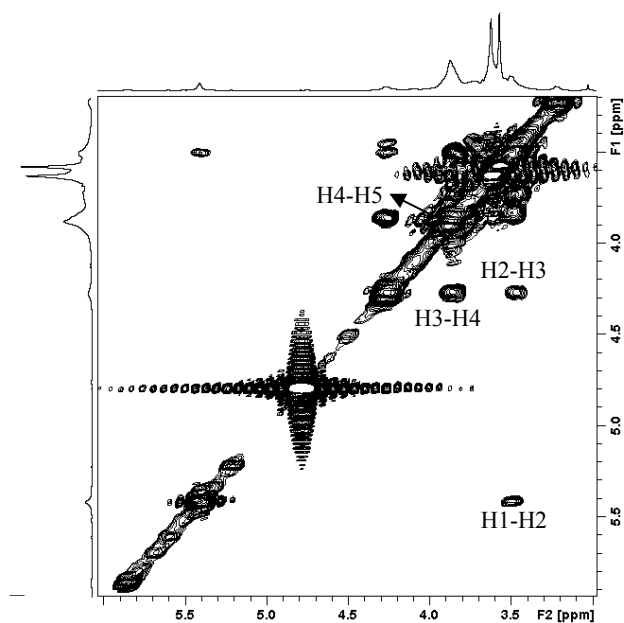


Σχήμα 4.18: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης 4.31 (*gedta*) (500 MHz, D_2O , 298K)



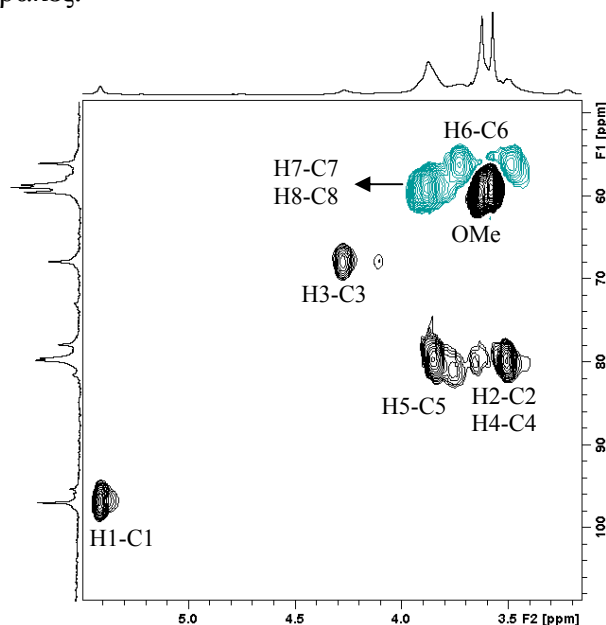
Σχήμα 4.19: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 4.31 (*gedta*) (125 MHz, D_2O , 298K)

Από το φάσμα 2D COSY (Σχήμα 4.20), το οποίο δίνει πληροφορίες για τη σύζευξη πυρήνων του ίδιου είδους μέσω χημικών δεσμών, βρίσκονται οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων H1, H2, H3, H4 και H5. Το H1 συζεύγνυται με το γειτονικό H2, το H2 με το H3, το H3 με το H4 και τέλος το H4 με το H5.



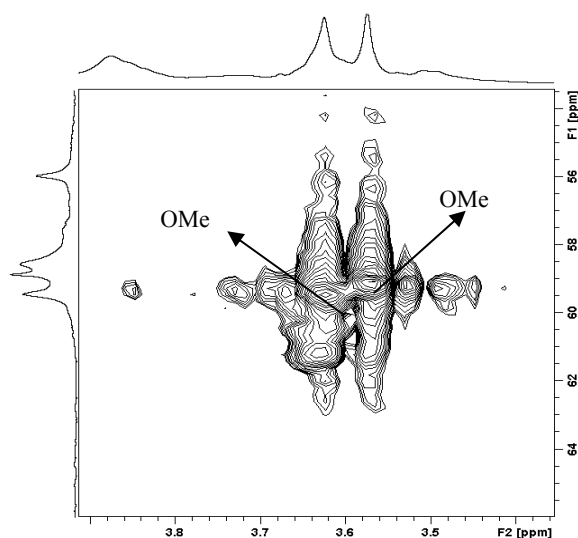
Σχήμα 4.20: Φάσμα COSY της ένωσης 4.31 (*gedta*) (500 MHz, D_2O , 298K)

Από το HSQC αποδίδονται οι άνθρακες των πρωτονίων και στη συγκεκριμένη περίπτωση οι συνθήκες του πειράματος ήταν τέτοιες έτσι ώστε οι άνθρακες που περιέχουν άρτιο αριθμό πρωτονίων να εμφανίζονται σε αντίθετη φάση από αυτούς που περιέχουν περιττό αριθμό (edited HSQC). Με αυτό τον τρόπο ταυτοποιήθηκαν ευκολότερα τα πρωτόνια H6 της πρωτοταγούς πλευράς της κυκλοδεξτρίνης και τα μεθυλικά πρωτόνια του [δι(καρβοξυμεθυλο)]αμίνιο υποκαταστάτη, καθώς και οι αντίστοιχοι άνθρακες.



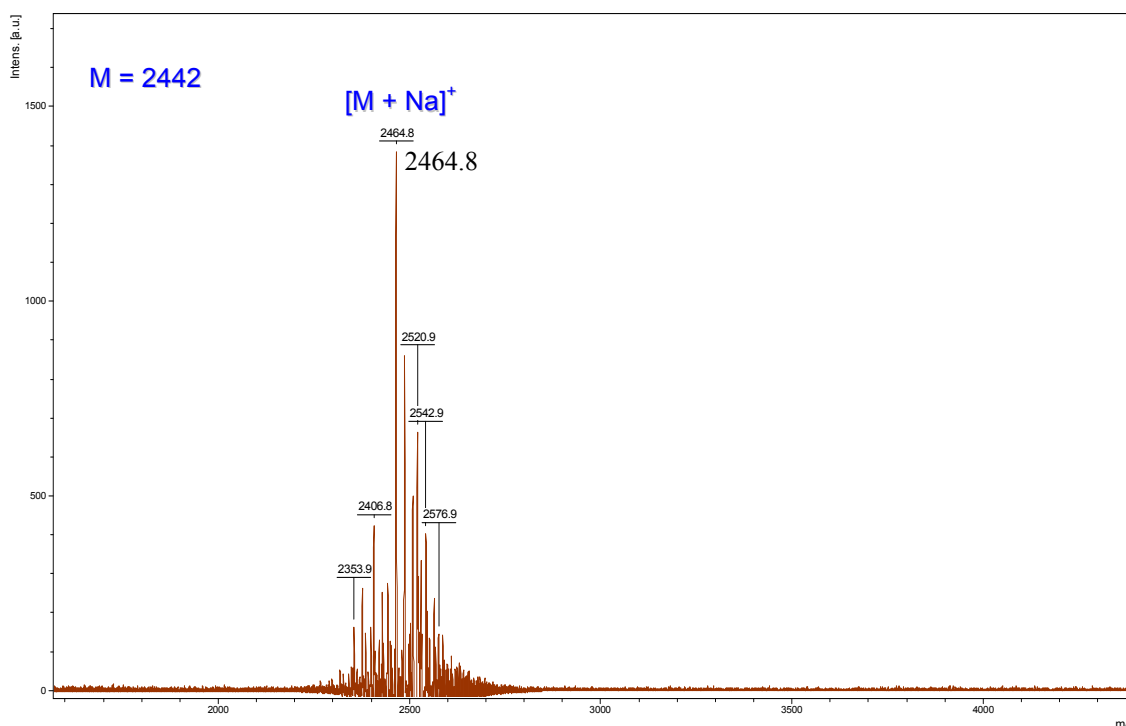
Σχήμα 4.21: Φάσμα HSQC της ένωσης 4.31 (*gedta*) (500 MHz, D_2O , 298K)

Από το φάσμα 2Δ HMBC ελήφθησαν πληροφορίες για τη συσχέτιση των πρωτονίων των μεθόξυ ομάδων της δευτεροταγούς πλευράς με τους αντίστοιχους άνθρακες της γλυκοκυρανόζης, ώστε να ολοκληρωθεί η απόδοση όλων των κορυφών.



Σχήμα 4.22: Φάσμα HMBC της ένωσης 4.31 (*gedta*) (500 MHz, D_2O , 298K)

Τελευταία απόδειξη επιτυχούς παραλαβής προϊόντος είναι η λήψη φασματοσκοπίας μάζας με την μέθοδο ήπιου ιοντισμού MALDI κατά την οποία εμφανίζεται το μοριακό ιόν παρουσία ενός ατόμου νατρίου.



Σχήμα 4.23: Φάσμα μάζας MALDI-TOF της ένωσης 4.31 (*gedta*)

4.4 Ιδιότητες των *aedta*, *bedta* και *gedta*

Στο εργαστήριο μας, μελετήθηκε και επιβεβαιώθηκε η δυνατότητα συμπλοκοποίησης των κυκλοδεξτρινών **aedta**, **bedta** και **gedta** με τις λανθανίδες Eu(III), Gd(III) και Tb(III).¹⁷ Η στοιχειομετρία των συμπλόκων μελετήθηκε με τιτλοδοτήσεις φωταύγειας, με φασματοσκοπία μάζας και με φασματοσκοπία IR. Η **aedta** και η **bedta** συμπλοκοποιούνται με αναλογία EDTA-CD/Lanthanide(III) 1:3, ενώ η **gedta** με αναλογία 1:4. Μία σημαντική ιδιότητα των EDTA-CDs είναι ότι τα σύμπλοκά τους με Gd(III) παρουσιάζουν υψηλή αποδιεγερσιμότητα (relaxivity) σε μαγνητικό πεδίο. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην δημοσίευση 17.

4.5 Συμπεράσματα

Στο παρόν κεφάλαιο περιγράφηκε η επιτυχής σύνθεση γνωστών κυκλοδεξτρινών προκειμένου εν συνεχεία να συζευχθούν με σάκχαρα στην πρωτοταγή πλευρά (κεφάλαιο 6) και να αποτελέσουν υδατανθρακικά συμπλέγματα, των οποίων οι ιδιότητες ως προς την ικανότητα εγκλεισμού μορίων (κεφάλαιο 7) και την δυνατότητα αναγνώρισής τους από κατάλληλους βιολογικούς υποδοχείς (κεφάλαιο 8) θα μελετηθούν. Επίσης περιγράφηκε η σύνθεση νέων καρβόξυ παραγώγων κυκλοδεξτρινών τύπου EDTA, τα οποία επίσης θα συζευχθούν με σάκχαρα (κεφάλαιο 6). Η δομή όλων των παραγώγων διερευνήθηκε και εξακριβώθηκε, χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία NMR δύο διαστάσεων ομοπυρηνικού (COSY) και ετεροπυρηνικού (HSQC, HMBC) συσχετισμού. Το μοριακό βάρος μετρήθηκε με MALDI-MS. Τα νέα αυτά παράγωγα παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες ιδιότητες και αποτελούν σημαντικές ενώσεις για περαιτέρω αντιδράσεις.

5

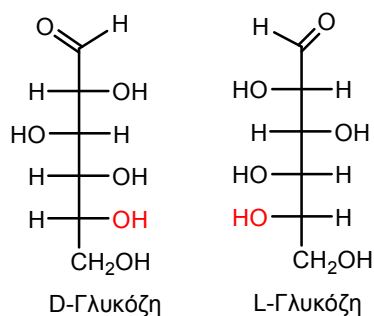
ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΜΟΝΟΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΜΟΝΟΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ

5.1 Εισαγωγή

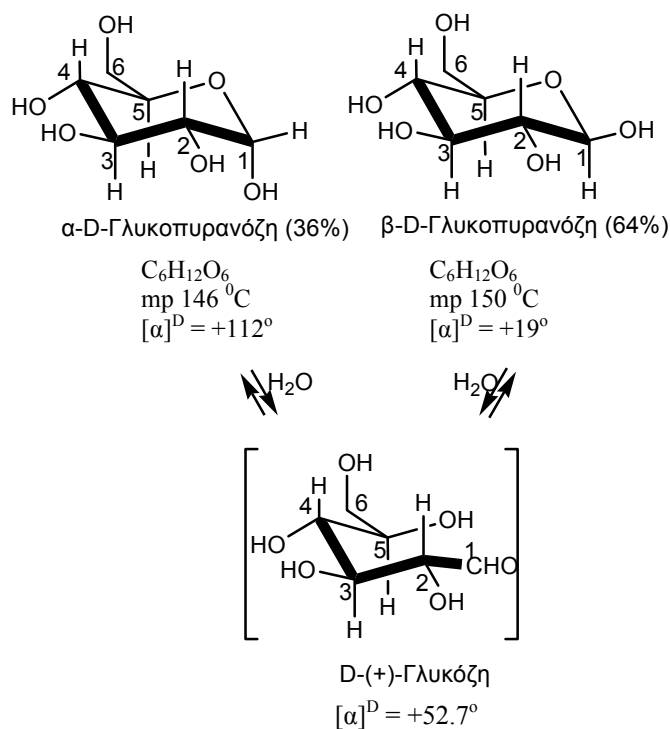
Οι υδατάνθρακες ή σάκχαρα είναι πολυδρόξυ αλδεΐδες και κετόνες, με γενικό τύπο $C_n(H_2O)_n$, ($n \geq 3$). Ταξινομούνται ανάλογα με τον αριθμό ατόμων άνθρακα και το είδος των καρβονυλικών ομάδων που περιέχουν. Υπάρχουν οι απλοί και οι σύνθετοι υδατάνθρακες. Οι απλοί υδατάνθρακες ή μονοσακχαρίτες είναι σάκχαρα που δεν μπορούν να υδρολυθούν σε άλλα μικρότερα μόρια. Οι σύνθετοι υδατάνθρακες ή πολυσακχαρίτες απαρτίζονται από δύο ή περισσότερα απλά σάκχαρα συνδεδεμένα μεταξύ τους. Οι μονοσακχαρίτες μπορούν να ταξινομηθούν περαιτέρω σε αλδόζες, εάν περιέχουν αλδεϋδομάδα και κετόζες, εάν περιέχουν κετοομάδα στο μόριό τους. Επίσης οι μονοσακχαρίτες ταξινομούνται σε D ή L σάκχαρα. Το σύστημα ονοματολογίας D και L περιγράφει την στεreoχημεία σε ένα μόνο στερεογονικό κέντρο. Η ονοματολογία αυτή προήλθε από το μόριο της γλυκεραλδεΐδης, το οποίο έχει ένα μόνο στερεογονικό κέντρο. Στη γλυκεραλδεΐδη το πρόθεμα D ή L αναφέρεται αντιστοίχως στην περιστροφή του επιπέδου του πολωμένου φωτός προς τα δεξιά (dextro) ή προς τα αριστερά (levo). Ωστόσο στην περίπτωση σακχάρων που διαθέτουν περισσότερα από ένα στερεογονικά κέντρα ο συμβολισμός D και L δεν έχει σχέση με την κατεύθυνση προς την οποία το σάκχαρο στρέφει το επίπεδο του πολωμένου φωτός. Επομένως ένα D σάκχαρο μπορεί να είναι είτε δεξιόστροφο είτε αριστερόστροφο. Στις περιπτώσεις αυτές η δεξιόστροφη περιστροφή του πολωμένου φωτός συμβολίζεται με το πρόσημο (+), ενώ η αριστερόστροφη με το πρόσημο (-). Επομένως στις προβολές κατά Fischer στα D σάκχαρα η υδροξυλομάδα που βρίσκεται στο πλέον απομακρυσμένο στερεογονικό κέντρο ως προς το καρβόνυλιο, έχει διεύθυνση προς τα δεξιά, ενώ στα L σάκχαρα έχει διεύθυνση προς τα αριστερά.¹(Σχήμα 5.1)



Σχήμα 5.1: Προβολή γλυκόζης κατά Fischer

Οι μονοσακχαρίτες απαντώνται κυρίως υπό μορφήν κυκλικών ημιακεταλών, και όχι ως αλδεύδες ή κετόνες ανοικτής αλυσίδας. Η κυκλοποίηση της ανοικτής αλυσίδας δημιουργεί νέο στερεογονικό κέντρο και επομένως προκύπτουν δύο νέα διαστερομερή ημιακεταλών, τα α και β ανωμερή (επιμερή). Στο α ανωμερές το υδροξύλιο του C1 βρίσκεται σε αξονική θέση (*trans*) ως προς τον υποκαταστάτη -CH₂OH του C5, ενώ στο β ανωμερές βρίσκεται σε ισημερινή θέση (*cis*).² Σε υδατικά διαλύματα τα ανωμερή των πυρανοζών βρίσκονται σε ισορροπία και είναι δυνατόν να κρυσταλλωθούν και να απομονωθούν.

Οι αντιδράσεις εισαγωγής αλειφατικής αλυσίδας στα σάκχαρα γίνεται στον C1 όπου προκαλείται διάνοιξη του δακτυλίου, σχηματισμός αλδεύδης, εισαγωγή της εκάστοτε επιθυμητής αλυσίδας και εν συνεχεία επανασηματισμός του δακτυλίου. Η μετατροπή του α ανωμερούς στο β ή και το αντίστροφο οφείλεται στο φαινόμενο του πολυστροφισμού. Ο πολυστροφισμός (mutarotation) είναι η αντιστρεπτή διάνοιξη του δακτυλίου ενός ανωμερούς, που οδηγεί στην αλδεϋδη ανοικτής αλυσίδας, και την επακόλουθη επανακυκλοποίηση με σχηματισμό του άλλου ανωμερούς (Σχήμα 5.2).³ Χαρακτηριστικό των αντιδράσεων εισαγωγής αλειφατικής αλυσίδας στον C1 είναι ότι σε άλλες περιπτώσεις ευνοείται το α ανωμερές και σε άλλες το β . Η θερμοδυναμική σταθερότητα του κάθε σχηματιζόμενου ανωμερούς στις συνθήκες της αντίδρασης υπαγορεύει και την τελική αναλογία α -/ β - προϊόντων που θα απομονωθούν. Αλλάζοντας τις συνθήκες της αντίδρασης ως προς το χρόνο ή τη θερμοκρασία ανά περίπτωση ευνοείται το α ανωμερές έναντι του β ή και το αντίστροφο.

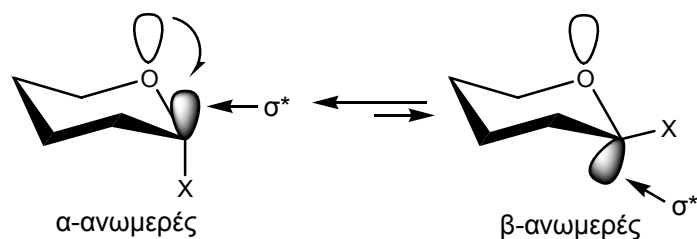


Σχήμα 5.2: Πολυστροφισμός της D-γλυκόζης στο νερό, 25 °C

Το ανωμερικό φαινόμενο είναι στερεοηλεκτρονικό φαινόμενο, το οποίο περιγράφει την τάση που έχουν τα ετεροάτομα ενός κυκλοεξανικού δακτυλίου να προτιμούν τον αξονικό προσανατολισμό έναντι του ισημερινού.

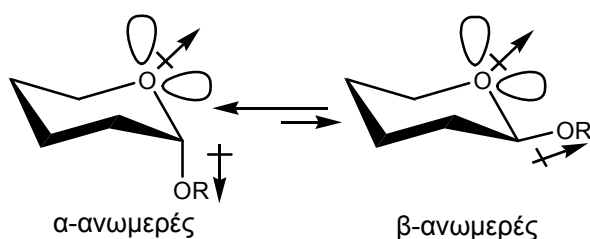
Το ανωμερικό φαινόμενο μπορεί να εξηγηθεί με διαφορετικούς τρόπους καθώς επηρεάζεται και αποδίδεται σε διάφορους παράγοντες. Ενδεικτικά θα εξηγηθούν κάποιες προσεγγίσεις.

Το ανωμερικό φαινόμενο αποδίδεται στην σταθεροποιητική αλληλεπικάλυψη μεταξύ του αδέσμευτου ζεύγους ηλεκτρονίων του ετεροατόμου του δακτυλίου (ενδοκυκλικό άτομο) και του σ^* τροχιακού του δεσμού C-X που βρίσκεται σε αξονική θέση (Σχήμα 5.3). Όταν τα εξωκυκλικά άτομα διαθέτουν μονήρη ζεύγη ηλεκτρονίων το ανωμερικό φαινόμενο είναι μέγιστο και υπάρχει παρόμοια αλληλεπίδραση μεταξύ αυτού του ζεύγους και του σ^* τροχιακού του δεσμού C-O του δακτυλίου. Η δευτερεύουσα αυτή αλληλεπίδραση, η οποία είναι χαρακτηριστική του β ανωμερούς (ισημερινή εξωκυκλική ομάδα) μετριάζει το ανωμερικό φαινόμενο.⁴



Σχήμα 5.3: Ανωμερικό φαινόμενο

Εναλλακτική ερμηνεία του ανωμερικού φαινομένου είναι η αλληλεπίδραση διπόλου-διπόλου (Σχήμα 5.4).⁵ Στην περίπτωση τόσο του α - όσο και του β -ανωμερούς, τα δύο μη δεσμικά ηλεκτρονιακά ζεύγη του οξυγόνου δημιουργούν τοπική διπολική ροπή με εξωκυκλική διεύθυνση. Επίσης τοπική διπολική ροπή δημιουργείται μεταξύ του δεσμού που συνδέει τον ανωμερικό άνθρακα και το εξωκυκλικό ετεροάτομο. Στην περίπτωση του β ανωμερούς τα δύο διανύσματα της διπολικής ροπής έχουν ίδια φορά και σχεδόν παράλληλη διεύθυνση με αποτέλεσμα η αλληλεπίδρασή τους να είναι ενεργειακά δυσμενής. Αντιθέτως το α ανωμερές ευνοείται διότι τα διανύσματα των διπολικών ροπών έχουν αντίθετη φορά μειώνοντας έτσι την αλληλεπίδραση διπόλου-διπόλου.



Σχήμα 5.4: Ανωμερικό φαινόμενο

Η επικράτηση του α ανωμερούς έναντι του β εξαρτάται και από το διαλύτη που χρησιμοποιείται. Όσο πιο πολικός είναι ένας διαλύτης τόσο λιγότερο ευνοείται το α ανωμερές. Στον παρακάτω πίνακα⁶ δίνονται ενδεικτικά κάποιοι διαλύτες και το ποσοστό στο οποίο ευνοείται η αξονική θέση του υποκαταστάτη στον C1.

Διαλύτης	Διπολική Ροπή	% Αξονική Θέση
CCl ₄	2.2	83
Benzene	2.3	82
CHCl ₃	4.7	71
Acetone	20.7	72
MeOH	32.6	69
MeCN	37.5	68
H ₂ O	78.5	52

Οι μονοσακχαρίτες περιέχουν δύο μόνο είδη λειτουργικών ομάδων, -OH και -CHO και επομένως η χημική συμπεριφορά τους ταυτίζεται με την ήδη γνωστή χημική συμπεριφορά των καρβονυλίων και των υδροξυλομάδων. Συγκεκριμένα οι μονοσακχαρίτες συμπεριφέρονται ως απλές αλκοόλες καθώς οι υδροξυλομάδες μπορούν να μετατραπούν σε εστέρες ή αιθέρες. Η εστεροποίηση πραγματοποιείται συνήθως μέσω κατεργασίας του υδατάνθρακα με κάποιο χλωρίδιο ή ανυδρίτη οξέος παρουσία βάσης. Στην περίπτωση αυτή εστεροποιούνται όλα τα υδροξύλια συμπεριλαμβανομένου και του ανωμερικού. Η μετατροπή τους σε μεθυλοαιθέρες γίνεται με την επίδραση ενός αλκυλαγονιδίου παρουσία βάσης. Η πλέον κατάλληλη βάση με την οποία σχηματίζονται αιθέρες σε υψηλές αποδόσεις είναι το οξείδιο του αργύρου παρουσία ιωδομεθανίου.^{1,3}

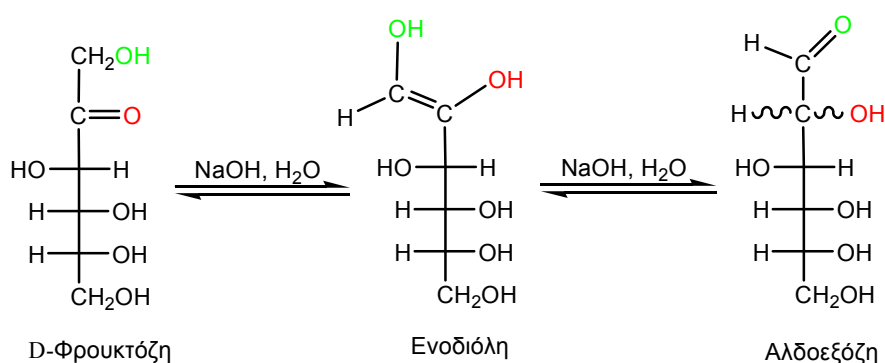
Οι γλυκοζίτες, δηλαδή οι ακετάλες των υδατανθράκων σχηματίζονται κατά την αντίδραση της ημιακετάλης ενός μονοσακχαρίτη με μια αλκοόλη παρουσία ενός όξινου καταλύτη, οπότε το ανωμερικό -OH αντικαθίσταται από μια ομάδα -OR. Ωστόσο υδρόλυση με αραιό διάλυμα οξέος μετατρέπει ξανά την ακετάλη στον ελεύθερο μονοσακχαρίτη.^{1,3}

Οι αλδιτόλες είναι πολυαλκοόλες, οι οποίες προκύπτουν από την αντίδραση μιας αλδόζης ή μιας κετόζης με NaBH₄. Η αναγωγή ενός σακχάρου πραγματοποιείται μόνο μέσω της δομής ανοικτής αλυσίδας, παρά το μικρό ποσοστό της σε ισορροπία με τις κυκλοποιημένες μορφές.^{1,3}

Τα αλδονικά οξέα είναι μονοκαρβοξυλικά οξέα, τα οποία έχουν σχηματιστεί με οξειδωση της αντίστοιχης αλδόζης. Τα αλδονικά οξέα παρασκευάζονται χρησιμοποιώντας υδατικό διάλυμα Br₂ με ρυθμισμένο pH = 6. Η αντίδραση είναι εκλεκτική στην περίπτωση των αλδοζών, καθώς οι κετόζες δεν οξειδώνονται κάτω

από τις ίδιες συνθήκες. Στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται ισχυρότερα οξειδωτικά αντιδραστήρια (πχ αραιό διάλυμα HNO_3), οι αλδόζες μετατρέπονται στα αντίστοιχα δικαρβοξυλικά οξέα, τα οποία ονομάζονται αλδαρικά οξέα. Στην αντίδραση αυτή οξειδώνονται τόσο η $-\text{CHO}$ ομάδα, όσο και η ακραία ομάδα $-\text{CH}_2\text{OH}$.^{1,2,3}

Οι αλδόζες καθώς και μερικές κετόζες εντάσσονται στα αναγωγικά σάκχαρα. Οι αλδόζες είναι αναγωγικά σάκχαρα γιατί περιέχουν την ομάδα της αλδεΐδης, ενώ κάποιες κετόζες όπως η φρουκτόζη θεωρούνται αναγωγικά σάκχαρα γιατί υπό αλκαλικές συνθήκες ισομεριώνονται ταχύτατα προς αλδόζες, μέσω μιας ακολουθίας αντιδράσεων ταυτομερείωσης κετόνης-ενόλης (Σχήμα 5.5).

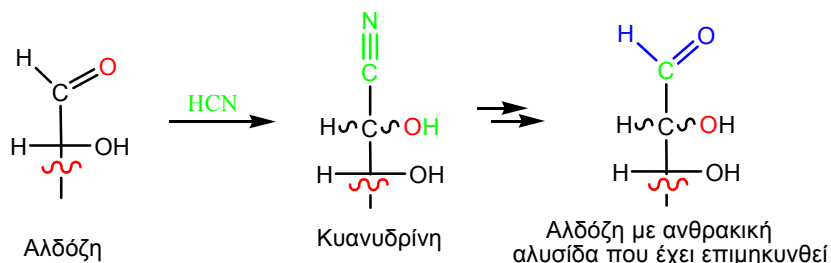


Σχήμα 5.5: Βασικώς καταλυόμενη ταυτομερείωση κετόνης-ενόλης

Οι γλυκοζίτες αντίθετα δεν αποτελούν αναγωγικά σάκχαρα, καθώς η ακεταλική ομάδα δεν μπορεί να υποστεί διάνοιξη προς σχηματισμό αλδεΐδης. Η ανίχνευση των αναγωγικών σακχάρων πραγματοποιείται με τα αντιδραστήρια Tollens, Fehling και Benedict. Τα αντιδραστήρια αυτά, όταν το σάκχαρο είναι αναγωγικό, σχηματίζουν το αντίστοιχο οξειδωμένο σάκχαρο και κάποιο μέταλλο ή οξείδιο μετάλλου ως ίζημα από την αναγωγή των μεταλλοϊόντων.

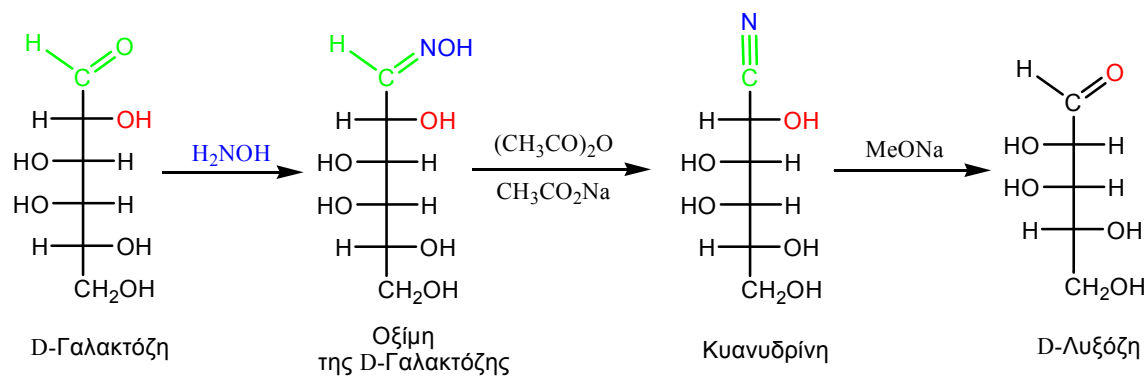
Η ανθρακική αλυσίδα των μονοσακχαριτών μπορεί είτε να επιμηκυνθεί με τη σύνθεση Kiliani-Fischer (Σχήμα 5.6) είτε να μειωθεί με την αποικοδόμηση Wohl (Σχήμα 5.7). Κατά την ανοικοδόμηση μιας αλδοζικής αλυσίδας κατά ένα άτομο άνθρακα, η αλδεϋδική ομάδα (C1) του αρχικού σακχάρου, γίνεται C2 στο νέο σάκχαρο. Επομένως μια αλδοπεντόζη μπορεί να μετατραπεί στην αντίστοιχη αλδοεξόζη. Η αύξηση της αλδοζικής αλυσίδας στηρίζεται πρώτα στο σχηματισμό της αντίστοιχης κυανυδρίνης παρουσία HCN , έπειτα στην αναγωγή του νιτριλίου προς σχηματισμό μιας ενδιάμεσης μίνης με υδρογόνωση παρουσία καταλύτη παλλαδίου

και τέλος στην υδρόλυση της μίνης προς σχηματισμό της νέας αλδόζης. Χαρακτηριστικό αυτής της μεθόδου είναι ο σχηματισμός δύο νέων αλδοζών και όχι μιας αλδόζης, καθώς η κυανυδρίνη που σχηματίζεται αποτελεί μίγμα στερεοϊσομερών λόγω του νέου στερεογονικού κέντρου.^{1,3}



Σχήμα 5.6: Ανοικοδόμηση Kiliani-Fischer

Η αποικοδόμηση Wohl ακολουθεί αντίθετη μεθοδολογία από την ανοικοδόμηση Kiliani-Fischer. Αρχικά η αλδεϋδική ομάδα της αλδόζης μετατρέπεται σε νιτρίλιο και εν συνεχεία η σχηματιζόμενη κυανυδρίνη αποβάλλει HCN υπό βασικές συνθήκες, καταλήγοντας στην αντίστοιχη αλδόζη με μειωμένο κατά ένα τον αριθμό ατόμων άνθρακα της αλδοζικής αλυσίδας.^{1,3}

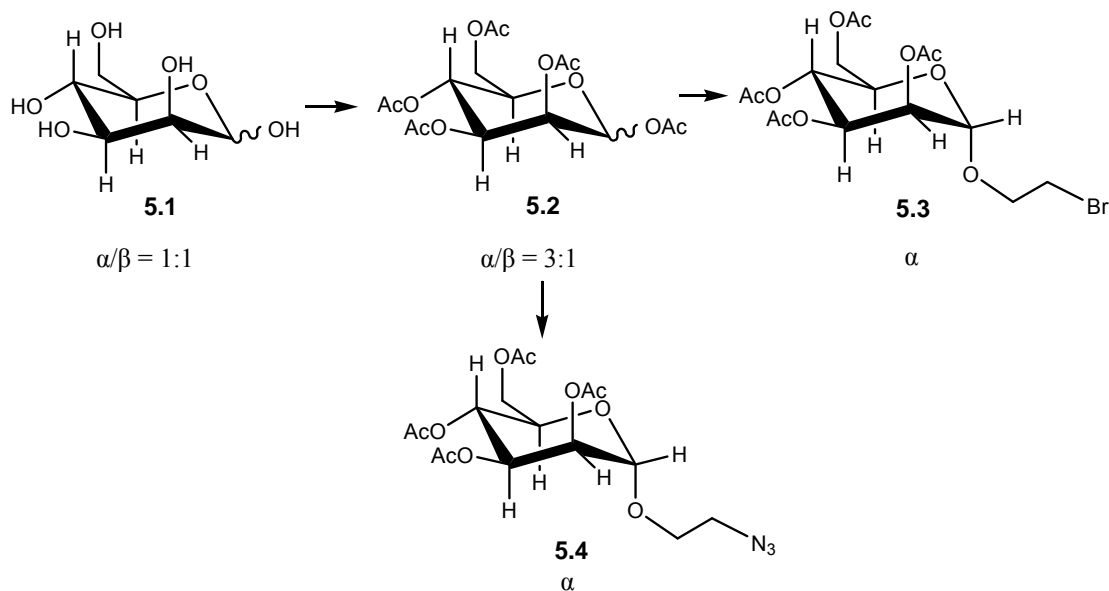


Σχήμα 5.7: Αποικοδόμηση Wohl

Σκοπός της εργασίας είναι ο σχηματισμός σακχάρων που φέρουν κατάλληλες ομάδες στη θέση 1 προκειμένου να αντιδράσουν με τις τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες που συντέθηκαν. Οι κυκλοδεξτρίνες που συντέθηκαν μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε αυτές που φέρουν καρβοξυλικές ομάδες στην πρωτοταγή τους πλευρά και σε αυτές που φέρουν αμινο ομάδες στην πρωτοταγή τους πλευρά. Επομένως στόχος ήταν να τροποποιηθούν σάκχαρα είτε με αμινο ομάδες είτε με

καρβοξυλικές ομάδες προκειμένου να αντιδράσουν με τις κυκλοδεξτρίνες που φέρουν καρβοξυλικές ομάδες ή άμινο ομάδες στην πρωτοταγή τους πλευρά.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται συνήθως για την εισαγωγή γέφυρας σύνδεσης στον C1 με καταληκτική άμινο ομάδα βασίζονται στην ακετυλίωση των σακχάρων και στην συνέχεια στο σχηματισμό 2'-βρωμοαλκυλο πυρανοζιδίων [τυπικό παράδειγμα η μαννόζη (Σχήμα 5.8)]. Τα ακετυλιωμένα σάκχαρα μετατρέπονται στους αντίστοιχους βρωμοπυρανοζίτες χρησιμοποιώντας ως αντιδραστήρια το $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ και την 2-βρωμοαιθανόλη.⁷ Άλλος τρόπος εισαγωγής αλειφατικής αλυσίδας στον C1 σακχάρων που έχουν ήδη υποστεί ακετυλίωση των υδροξυλίων τους είναι η απευθείας αντίδραση με την 2-αζιδοαιθανόλη, από την οποία λαμβάνονται τα αντίστοιχα αζιδοπυρανοζίδια.^{8,9} Ωστόσο επιλέχθηκε και μελετήθηκε η μετατροπή των ακετυλιωμένων σακχάρων στα αντίστοιχα βρωμοπυρανοζίδια (Σχήμα 5.8). Ο λόγος για τον οποίο προηγείται η ακετυλίωση του σακχάρου είναι το ανωμερικό φαινόμενο: όταν υπάρχει μίγμα ανωμερών α και β ενός σακχάρου σε αναλογία 1:1, η προστασία των υδροξυλίων με ακετυλο ομάδες ευνοεί την αξονική θέση της ακετυλο ομάδας στον C1, εμπλουτίζοντας κατά αυτόν τον τρόπο το μίγμα σε α ανωμερές.¹⁰



Σχήμα 5.8: Τροποποίηση σακχάρων-Τυπικό παράδειγμα: μαννόζη

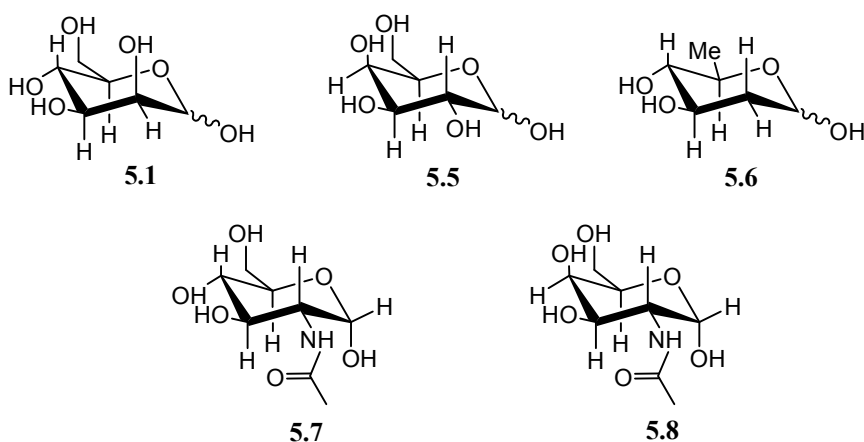
Αυτό συμβαίνει διότι η ακετυλο ομάδα στον C1 παρουσιάζει μεγαλύτερη ηλεκτραρνητικότητα από το υδροξύλιο, οπότε ευνοείται η αξονική της θέση περισσότερο από την ισημερινή.¹¹ Στη συνέχεια πραγματοποιείται η προσθήκη της βρωμοαιθυλο ομάδας, η οποία καταλήγει στο α ανωμερές. Αυτό συμβαίνει καθώς η

προσβολή του C1 από τη βρωμοαιθανόλη λόγω στεreoχημικής παρεμπόδισης πραγματοποιείται από την αξονική θέση. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται στην περίπτωση που χρησιμοποιείται η πενταακετυλιωμένη D-μαννοπυρανόζη, στην οποία η ακέτυλο ομάδα του C2 βρίσκεται σε αξονική θέση και καθιστά δυσκολότερη την προσβολή του ανωμερικού C1 από την βρωμοαιθανόλη στην ισημερινή θέση, καταλήγοντας στο α ανωμερές. Γενικότερα στις μεθυλιωμένες και ακετυλιωμένες πυρανόζες οι ογκώδεις ομάδες τείνουν να καταλάβουν ισημερινές θέσεις εκτός αν πρόκειται για ακέτυλο ή μεθόξυ ομάδες¹² στον C1 που τείνουν να έχουν αξονική θέση.

5.2 Τροποποίηση σακχάρων με αμινοάλκυλο ομάδες

Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 3, οι βακτηριακές (και άλλες) λεκτίνες αναγνωρίζουν συγκεκριμένα σάκχαρα (μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες ή πολυπλοκότερα σάκχαρα με διακλαδώσεις). Από εξέταση όμως του πίνακα 3.1 προκύπτει ότι υπάρχουν τύποι μικροοργανισμών των οποίων οι λεκτίνες παρουσιάζουν ειδικότητα ως προς μικρά σάκχαρα, δηλαδή σάκχαρα αναγνώρισης με έναν δακτύλιο. Τέτοιοι μονοσακχαρίτες είναι η D-(+)-μαννόζη (**5.1**) (Man), η D-(+)-γαλακτόζη (**5.5**) (Gal), η L-(-)-φουκόζη (**5.6**) (Fuc), η *N*-ακετυλο-D-(+)-γλυκοζαμίνη (**5.7**) (GlcNAc) και η *N*-ακετυλο-D-(+)-γαλακτοζαμίνη (**5.8**) (GalNAc) (Σχήμα 5.9).

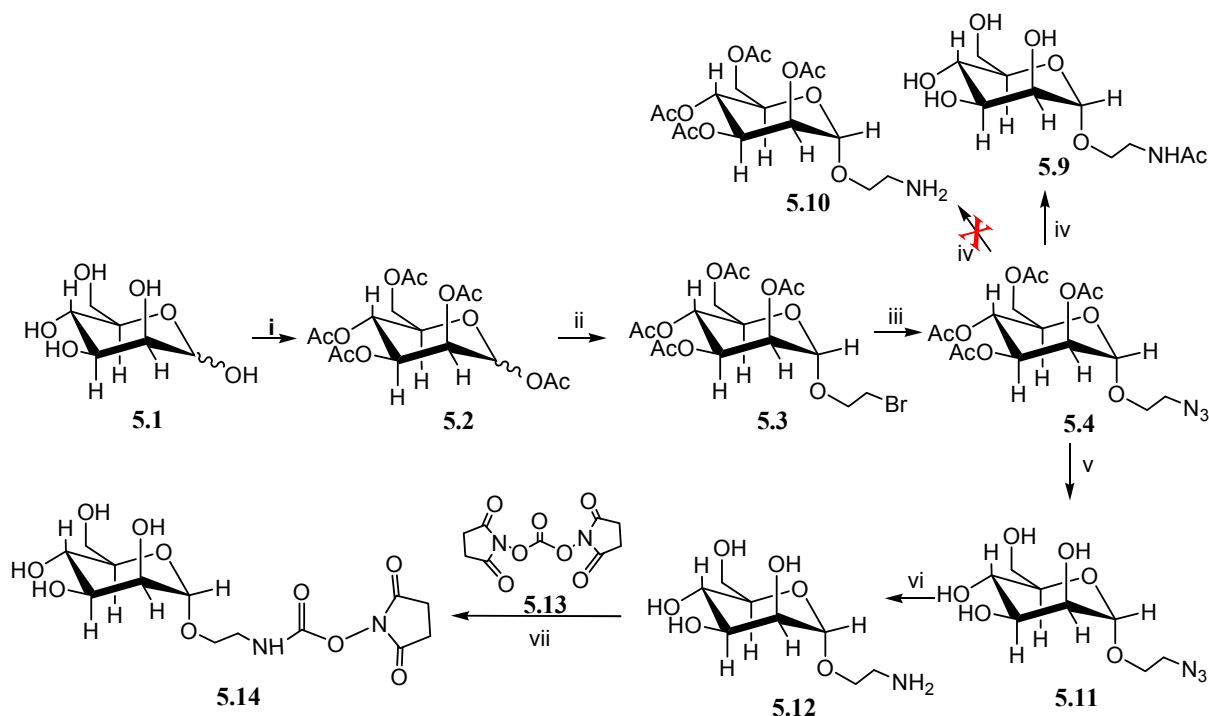
Στην παρούσα εργασία τα πέντε διαφορετικά σάκχαρα που χρησιμοποιήθηκαν τροποποιήθηκαν ώστε να φέρουν ως γέφυρα σύζευξης με τις CDs αλειφατικές αλυσίδες με καταληκτική αμινο-ομάδα.



Σχήμα 5.9: Τα σάκχαρα που χρησιμοποιήθηκαν

5.2.1 Σύνθεση αμινο παραγώγων D-(+)-μαννόζης

D-(+)-Μαννόζη

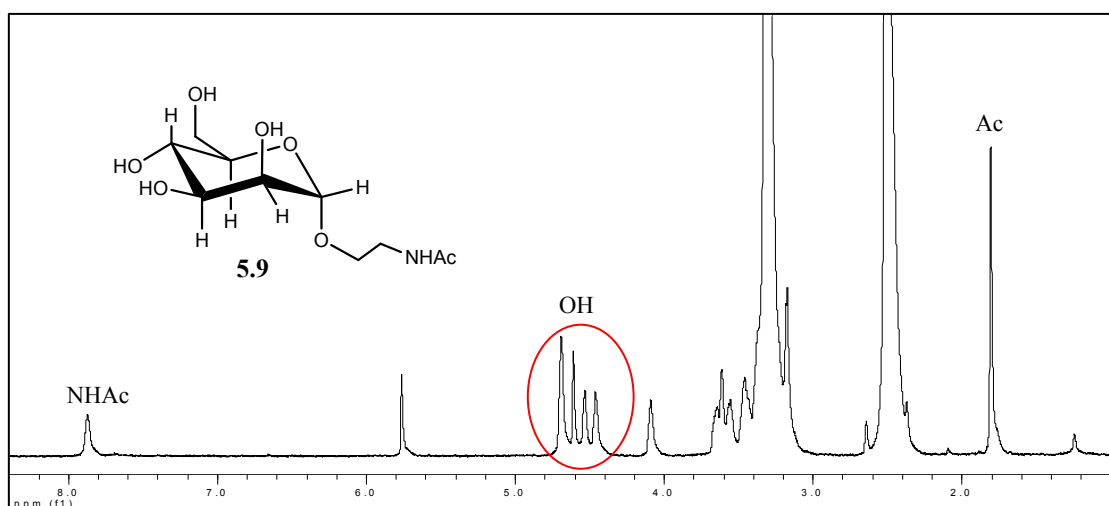


Σχήμα 5.10: Σύνθεση της 2'-αμινοαιθυλο- α -D-μαννόζης (**5.12**) και της 2'-N-ηλεκτριμιδοξυκαρβονυλαιθυλο- α -D-μαννοπυρανόζης (**5.14**): **i**) οξικός ανυδρίτης, πυριδίνη, DMAP, rt, 100% **ii**) 1-βρωμο-αιθανόλη, BF₃·OEt₂, CH₂Cl₂, rt, 67% **iii**) NaN₃, DMF, 60 °C, 91% **iv**) Pd/C 10%, H₂, MeOH, rt, 25% **v**) MeONa, MeOH, rt, 100% **vi**) Pd/C 10%, H₂, MeOH, rt, 98% **vii**) τριαιθυλαμίνη, DMF, 30%.

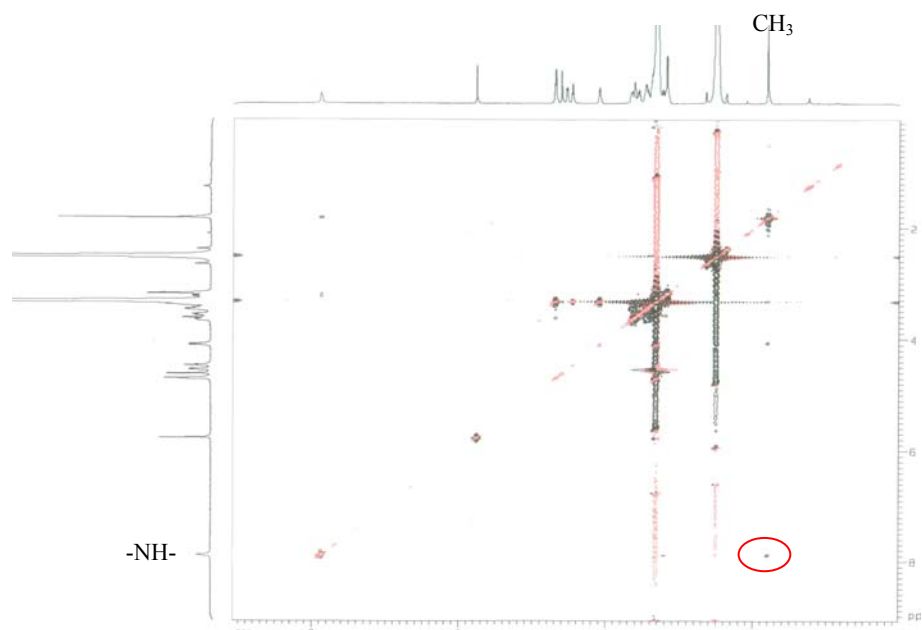
Στην πορεία του σχήματος 5.10 αναλύεται η σύνδεση της D-(+)-μαννόζης (**5.1**) στον C1 με κατάλληλες γέφυρες ώστε να καθίσταται δυνατή η σύζευξή της με τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες. Από μίγμα της D-(+)-μαννόζης (**5.1**) [α -Man]/[β -Man] = 1:1 παρελήφθη η πενταακετυλο-D-μαννόζη¹³ (**5.2**) ως μίγμα α/β = 3:1 και μετά την εισαγωγή της βρωμοαιθυλο ομάδας προέκυψε ως μοναδικό προϊόν η 2'-βρωμοαιθυλο- α -D-μαννόζη (**5.3**). Στην αντίδραση εισαγωγής της βρωμοαιθυλο ομάδας αυξήθηκε η απόδοση της αντίδρασης συγκριτικά με τη βιβλιογραφική από 41%¹⁴ σε 67%. Η **5.3** μετετράπη στην **5.4**, η οποία ελήφθη σε υψηλή απόδοση, 91% έναντι 73% της βιβλιογραφίας.¹⁴

Κατά την αντίδραση υδρογόνωσης της ένωσης **5.4** ώστε να ληφθεί η αντίστοιχη αμίνη προέκυψε προϊόν του οποίου τα φάσματα NMR υποδείκνυαν την

ύπαρξη μιας και μόνον ακέτυλο ομάδας. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία^{14,15} υδρογόνωση της **5.4** έδινε το άμινο προϊόν **5.10** που φέρει ακέτυλο ομάδες στις θέσεις 2, 3, 4 και 6. Λαμβάνοντας φάσμα ^1H NMR και HSQC σε $\text{DMSO-}d_6$ διαπιστώθηκε η παρουσία τεσσάρων ελεύθερων υδροξυλίων (Σχήμα 5.11), καθώς οι κορυφές του φάσματος πρωτονίου μεταξύ 5.00-4.00 ppm δεν αντιστοιχούν σε συχνότητες άνθρακα στο φάσμα HSQC. Μία ακόμα κορυφή δεν αντιστοιχούσε σε σήμα ^{13}C , αυτή στα 7.9 ppm, η οποία όμως έδινε κορυφή διασταύρωσης με το μεθύλιο (1.8 ppm) σε φάσμα 2D NOESY (Σχήμα 5.12). Επομένως, διαπιστώνεται παρουσία $-\text{NHAc}$ ομάδας και απουσία $-\text{OAc}$ ομάδων. Πιθανός λόγος που συνέβη αυτό είναι ότι καθώς η άζιδο ομάδα μετατρέπεται σε άμινο ομάδα καθιστά δυνατή την αποπροστασία του μορίου από τις ακέτυλο ομάδες. Εν συνεχεία η άμινο ομάδα είτε προστατεύεται ενδομοριακά από γειτονική ακέτυλο ομάδα, είτε από τον οξικό μεθυλεστέρα που παράγεται κατά τη διάρκεια της αποπροστασίας.

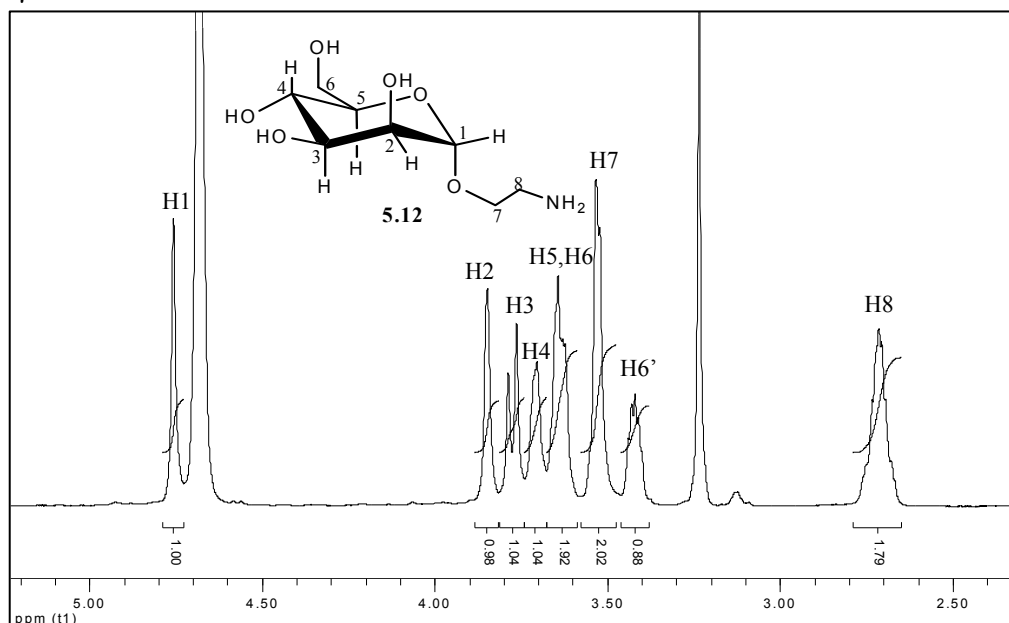


Σχήμα 5.11: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **5.9** (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 298K)

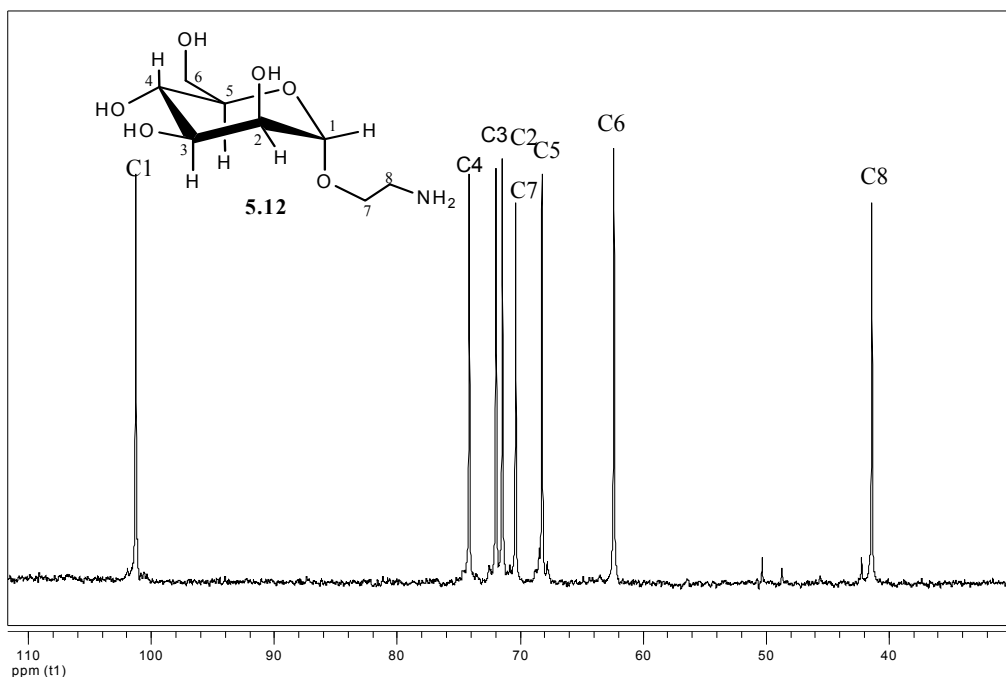


Σχήμα 5.12: Φάσμα NOESY της ένωσης 5.9 (500 MHz, DMSO- d_6 , 298K)

Λόγω των ανωτέρω επιλέχθηκε να προηγηθεί η αποπροστασία τη μαννόζης 5.4¹⁶ και να ακολουθήσει η υδρογόνωση. Το απο-ακετυλιωμένο προϊόν 5.11 μετατράπηκε στην αμίνη 5.12 σε εξαιρετική απόδοση και υψηλή καθαρότητα (Σχήμα 5.13), χρησιμοποιήθηκε δε για αντιδράσεις σύζευξης με τα κυκλοδεξτρινικά παράγωγα.

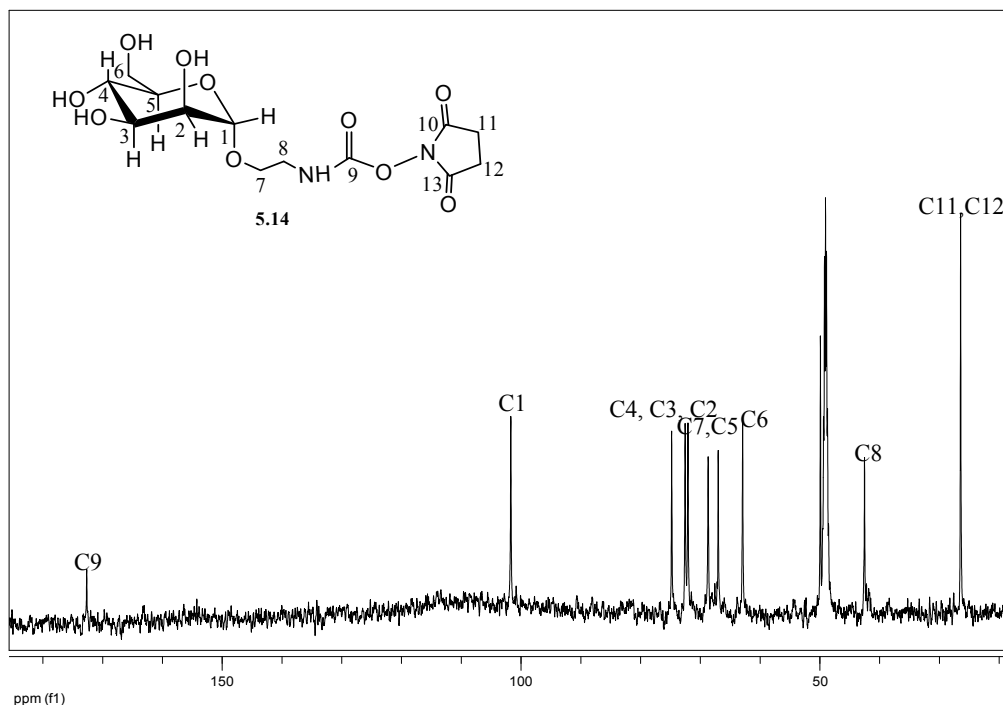


Σχήμα 5.13: Φάσμα 1H NMR της ένωσης 5.12 (500 MHz, D_2O , 298K)



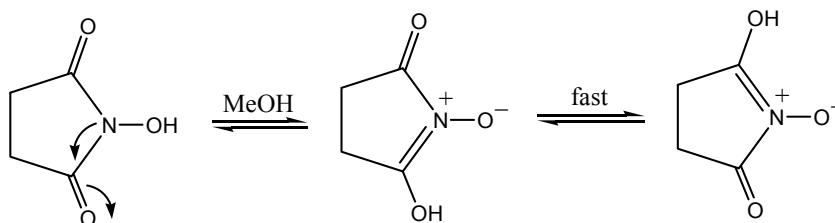
Σχήμα 5.14: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 5.12 (125 MHz, D_2O , 298K)

Εν συνεχεία από την μαννοζαμίνη 5.12 παρασκευάστηκε το προϊόν 5.14, προκειμένου να αντιδράσει με κυκλοδεξτρίνες που φέρουν αμινο ομάδες στην πρωτοταγή τους πλευρά. Η αντίδραση αυτή ήταν χαμηλής απόδοσης (30%) αν και σύμφωνα με τη βιβλιογραφία¹⁷ η απόδοση είναι 83%. Χαρακτηριστική διαφορά με τη βιβλιογραφία αποτέλεσε και το φάσμα ^{13}C NMR σε CD_3OD (Σχήμα 5.15).



Σχήμα 5.15: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 5.14 (125 MHz, CD_3OD , 298K)

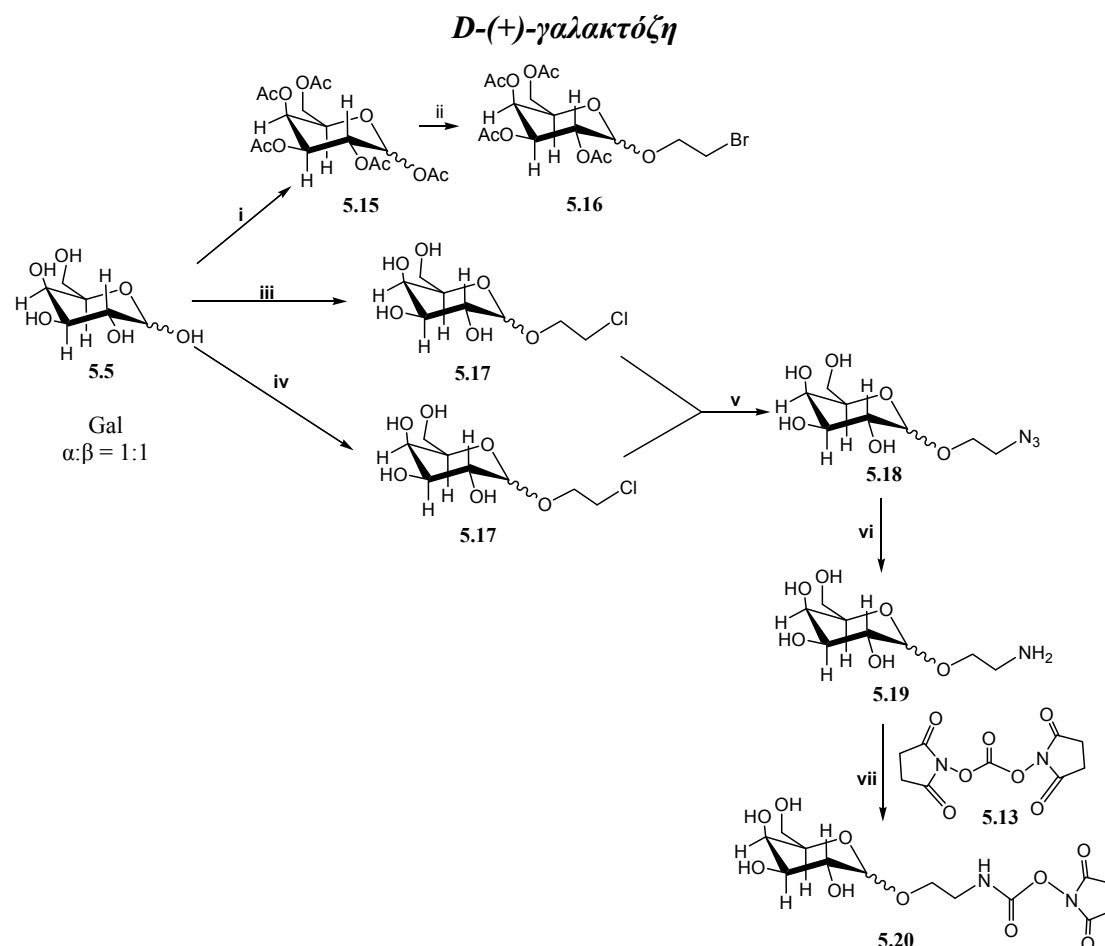
Συγκεκριμένα ήταν αδύνατος ο εντοπισμός των C-10 και C-13 του προϊόντος. Πιθανή εξήγηση για αυτό είναι ότι οι C-10 και C-13 δεν είναι αμιγώς καρβονυλικοί άνθρακες αλλά και άνθρακες διπλού δεσμού λόγω της συμμετοχής του μορίου σε διάφορες ταυτομερείς μορφές (Σχήμα 5.16).



Σχήμα 5.16: Ταυτομερείς μορφές του *N*-υδροξυλοηλεκτριμιδίου

5.2.2 Σύνθεση αμινο παραγώγων D-(+)-γαλακτόζης

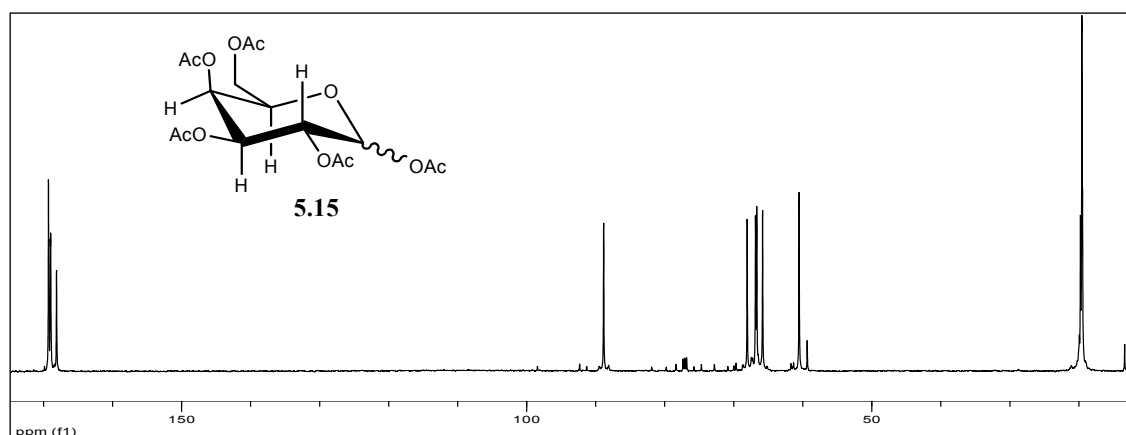
Η παρακάτω πειραματική πορεία ακολουθήθηκε για τον σχηματισμό παραγώγων της D-(+)-γαλακτόζης που διαθέτουν κατάλληλες ομάδες για την σύζευξή τους με τροποποιημένες CDs.



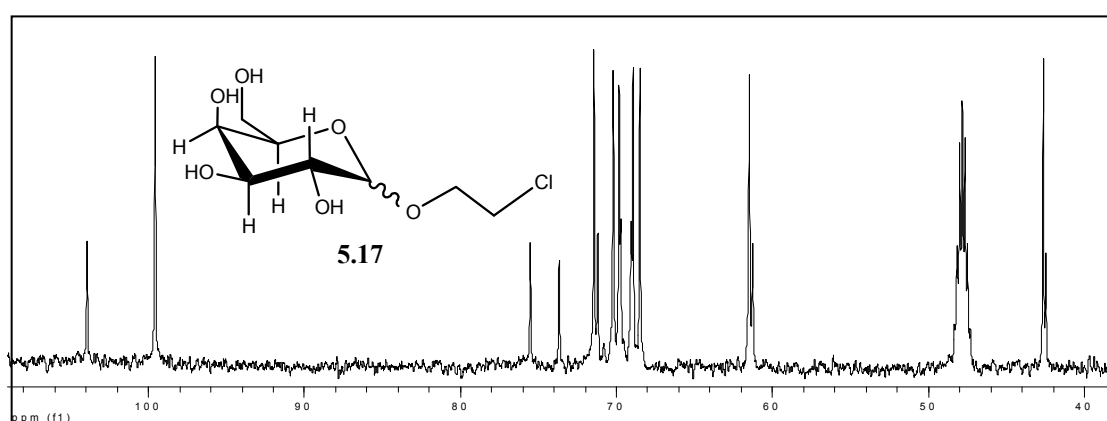
Σχήμα 5.17: Σύνθεση της 2'-αμινοαιθυλο- α,β -D-γαλακτόζης (**5.19**) και της 2'-N-ηλεκτριμιδοξυκαρβονυλοαιθυλο- α,β -D-γλυκόζης (**5.20**): **i**) ακετυλοχλωρίδιο, πυριδίνη, DMAP, r.t, 62% **ii**) 1-βρωμοαιθανόλη, $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, CH_2Cl_2 , 84% **iii**) 1-χλωροαιθανόλη, DOWEX 50WX2 (H^+), 50% **iv**) 1-χλωροαιθανόλη, ακετυλοχλωρίδιο, 49%. **v**) NaN_3 , DMF, 60°C , 100% **vi**) Pd/C 10%, H_2 , MeOH, rt, 100% , **vii**) τριαιθυλαμίνη, DMF, 27%.

Μίγμα της γαλακτόζης **5.5** ($\alpha:\beta = 1:1$) υπέστη ακετυλίωση προκειμένου να παραληφθεί η ένωση **5.15** εμπλουτισμένη στο α ανωμερές. Ωστόσο το μίγμα της αντίδρασης που προέκυψε περιείχε το επιθυμητό προϊόν ($\alpha:\beta \geq 98\%$), μη πλήρως ακετυλιωμένο προϊόν καθώς και ακετυλιωμένες φουρανόζες όπως φαίνεται και στο φάσμα ^{13}C NMR (Σχήμα 5.18). Καθώς ο καθαρισμός δεν ήταν δυνατόν να γίνει λόγω

της ίδιας πολικότητας των μορίων, η οποία διαπιστώθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) χρησιμοποιήθηκε το προϊόν μαζί με τις προσμίξεις προς σχηματισμό του προϊόντος **5.16**. Η αντίδραση¹⁸ αυτή δεν ήταν επιτυχής καθώς η απόδοση της αντίδρασης σε ότι αφορά το βαθμό υποκατάστασης ήταν πολύ μικρή. Προφανώς η γαλακτόζη δεν έχει την ίδια συμπεριφορά με τημαννόζη και έτσι χρειάστηκε να επιλεγεί διαφορετική συνθετική πορεία. Το προϊόν **5.17** συντέθηκε αποφεύγοντας το στάδιο της ακετυλίωσης. Για το σκοπό αυτό δοκιμάστηκαν δύο διαφορετικοί τρόποι^{19,20} που όμως έδωσαν το ίδιο αποτέλεσμα και ως προς την ποιότητα του προϊόντος και ως προς την απόδοση. Το προϊόν **5.17** είναι μίγμα α και β γαλακτόζης με κυριότερη την α -γαλακτόζη ($\alpha:\beta \approx 3:1$), το οποίο δεν διαχωρίζεται με χρωματογραφία στήλης. Στο φάσμα που ακολουθεί (σχήμα 5.19) φαίνεται ο C₁ του α και του β -ανωμερούς όταν χρησιμοποιήθηκε όξινη ρητίνη Dowex.

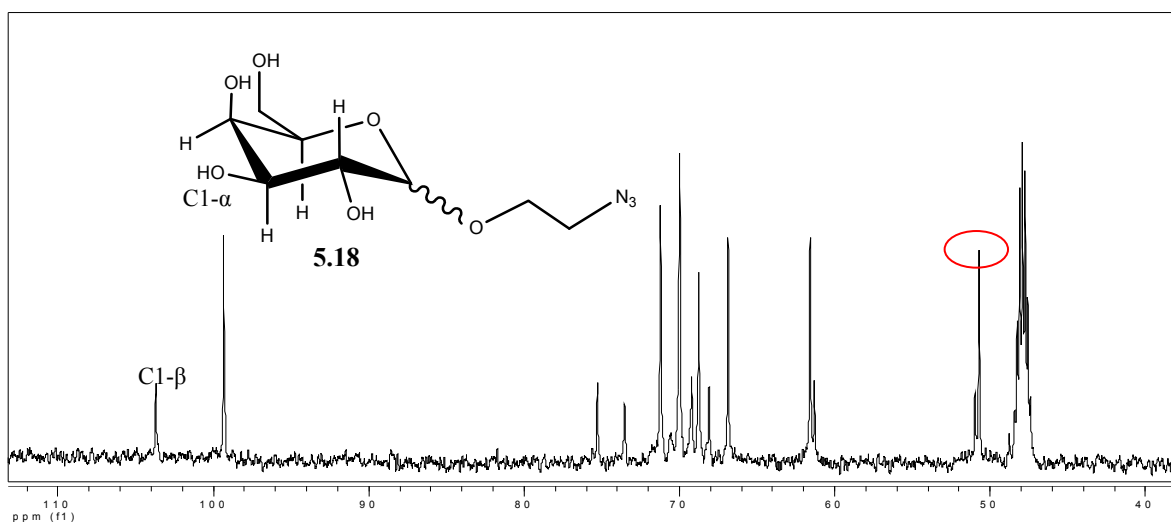


Σχήμα 5.18: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης **5.15** (125MHz, CDCl₃, 298K)

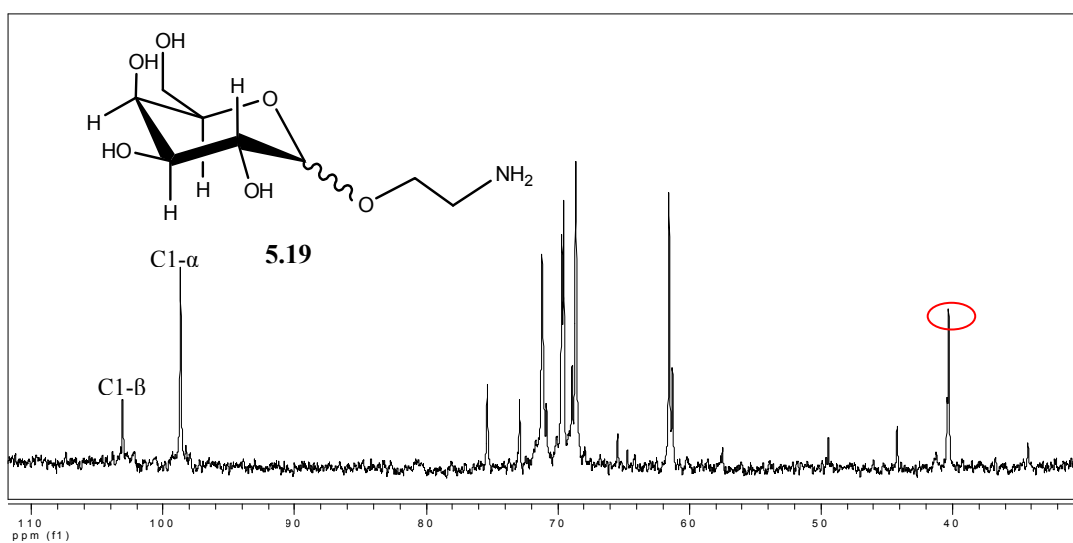


Σχήμα 5.19: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης **5.17** ($\alpha:\beta = 3:1$) (125 MHz, CD₃OD, 298K)(Dowex-iii)

Εν συνεχεία ελήφθησαν τα προϊόντα **5.18** και **5.19** (αναλογία ανωμερών $\alpha:\beta \approx 3:1$) με ικανοποιητικές αποδόσεις με τις χαρακτηριστικές κορυφές των CH_2N_3 στα 50.9 ppm (Σχήμα 5.20) και CH_2NH_2 στα 40.3 ppm (Σχήμα 5.21).



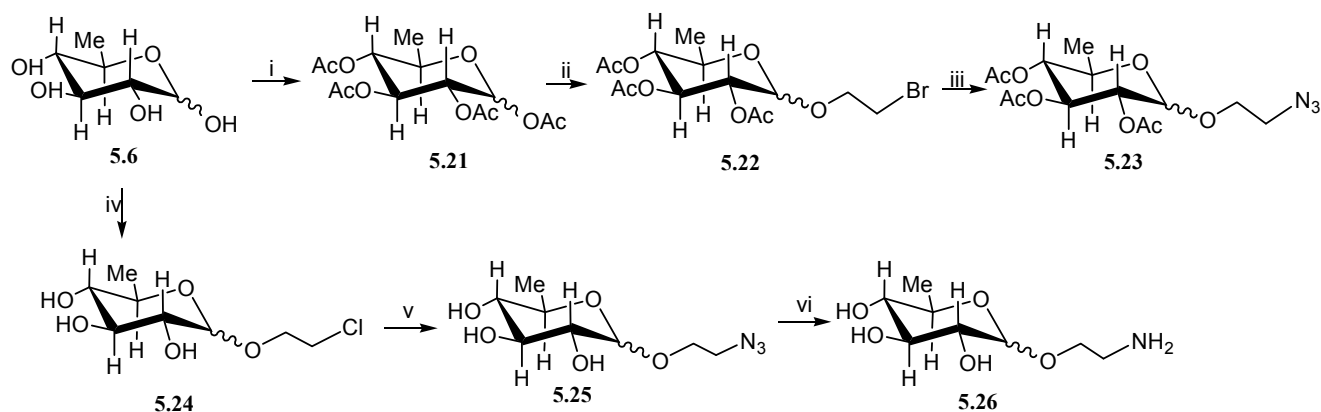
Σχήμα 5.20: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης **5.18** ($\alpha:\beta = 3:1$) (125 MHz, CD₃OD, 298K)



Σχήμα 5.21: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης **5.19** ($\alpha:\beta = 3:1$) (125 MHz, CD₃OD, 298K)

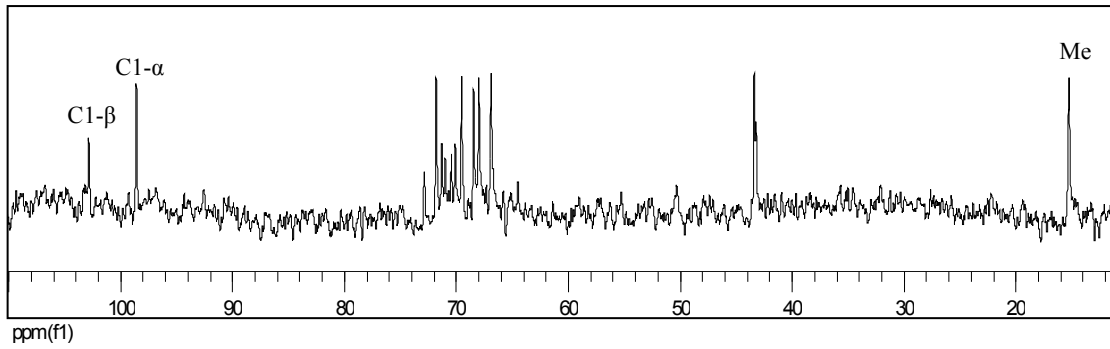
5.2.3 Σύνθεση αμινο παραγώγων L-(-)-φουκόζης

L-(-)-φουκόζη

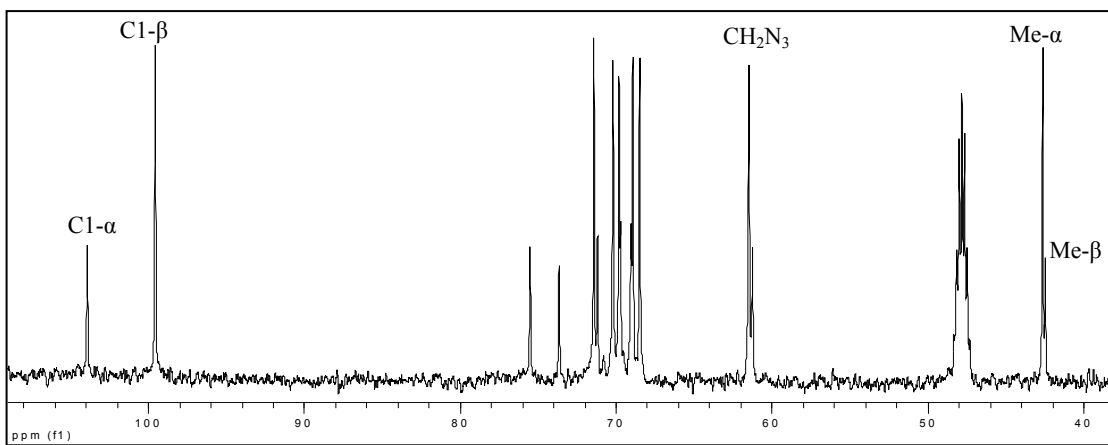


Σχήμα 5.22: Σύνθεση της 2'-αμινοαιθυλο- α,β -D-φουκόζης (5.26): **i**) ακετυλοχλωρίδιο, πυριδίνη, DMAP, r.t, 100% **ii**) 1-βρωμοαιθανόλη, $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, CH_2Cl_2 , r.t, 72% **iii**) NaN_3 , DMF, 60 °C, 86% **iv**) 1-χλωροαιθανόλη, DOWEX 50WX2 (H^+), r.t, 54% **v**) NaN_3 , NaI, DMF, 80 °C, 78% **vi**) Pd/C 10%, H_2 , MeOH, rt, 100% .

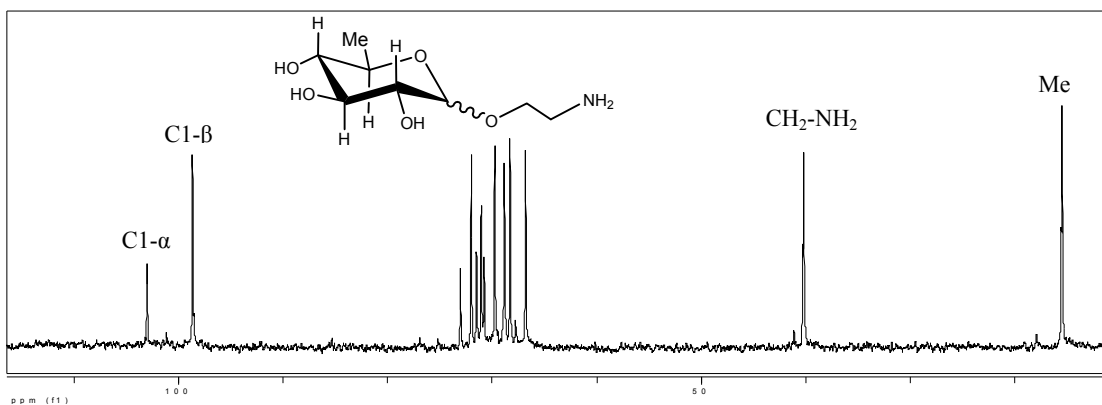
Η πρώτη συνθετική πορεία για την παραλαβή του προϊόντος 5.21, έδωσε μίγμα προϊόντων α και β τετραακετυλιωμένης φουκόζης (αναλογία ανωμερών $\alpha:\beta = 5:1$) καθώς και όχι πλήρως ακετυλιωμένο προϊόν. Τα προϊόντα 5.22 και 5.23 ήταν επίσης αδύνατον να καθαρισθούν από τα αντίστοιχα μη ακετυλιωμένα προϊόντα. Επομένως αποφασίσθηκε ότι και σε αυτήν την περίπτωση πρέπει να αποφευχθεί το στάδιο της ακετυλίωσης και να γίνει απευθείας η χλωροαιθυλίωση της φουκόζης 5.6.^{19,20} Οι ενώσεις 5.24, 5.25 και 5.26 αποτελούν μίγματα α και β με τις χαρακτηριστικές κορυφές του $\text{CH}_2\text{-Cl}$ στα 43.3 ppm (Σχήμα 5.23), του $\text{CH}_2\text{-N}_3$ στα 50.6 ppm (Σχήμα 5.24) και του CH_2NH_2 40.3 ppm (Σχήμα 5.25) όπως φαίνονται στα παρακάτω ^{13}C NMR φάσματα.



Σχήμα 5.23: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 5.24 ($\alpha:\beta = 2:1$) (125 MHz, D_2O , 298K)



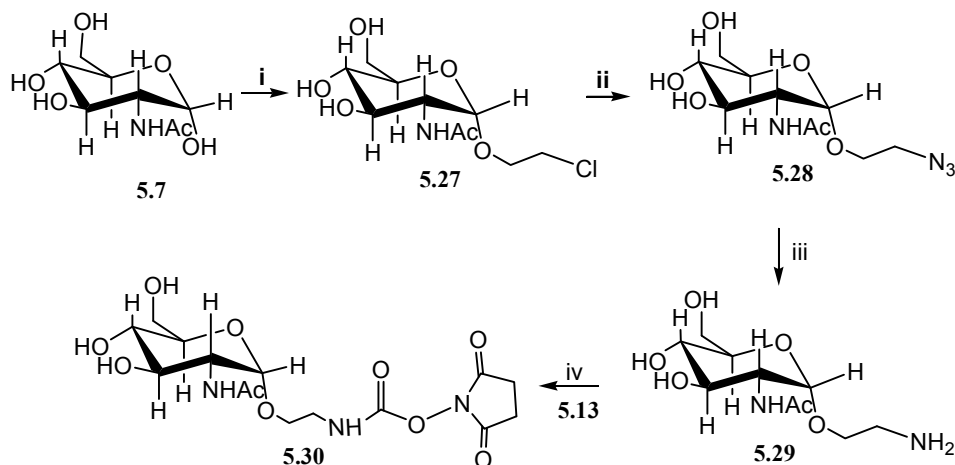
Σχήμα 5.24: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 5.25 ($\alpha:\beta = 2:1$) (125 MHz, D_2O , 298K)



Σχήμα 5.25: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 5.26 ($\alpha:\beta = 2:1$) (125 MHz, D_2O , 298K)

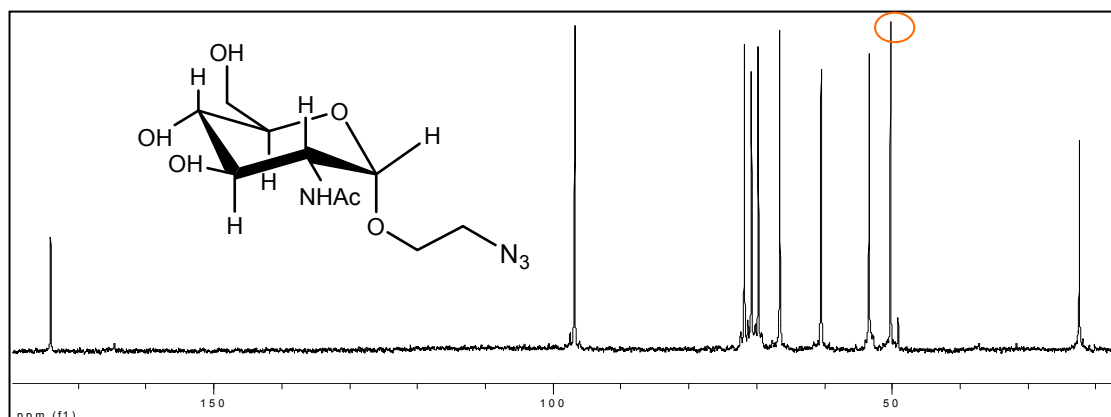
5.2.4 Σύνθεση αμινο παραγώγων *N*-ακετυλο-*D*-(+)-γλυκοζαμίνης

N-ακετυλο-*D*-(+)-γλυκοζαμίνη

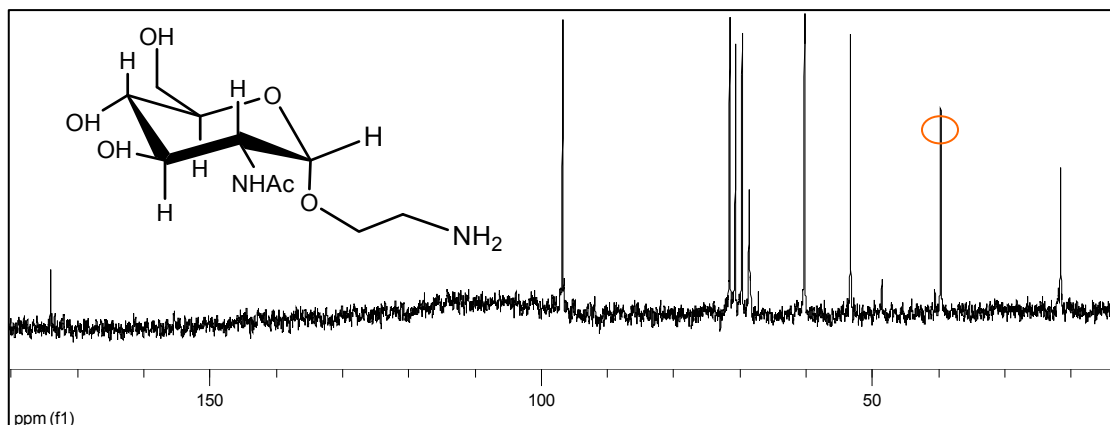


Σχήμα 5.26: Σύνθεση της 2'-αμινοαιθυλο 2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-*a*-*D*-γλυκόζης (5.29) και της 2'-*N*-ηλεκτριμιδοξυκαρβονυλοαιθυλο-2-ακεταμιδο-*a*-*D*-γλυκόζης (5.30): **i)** 2-χλωροαιθανόλη, ακετυλοχλωρίδιο, 70 °C, 61%-69% **ii)** NaN₃, DMF, 60 °C, 100% **iii)** Pd/C 10%, H₂, MeOH, rt, 100% **vii)** τριαιθυλαμίνη, DMF, 44%.

Το προϊόν **5.29** με μεθοδολογία αντίστοιχη αυτής που χρησιμοποιήθηκε για την *L*-φουκόζη ελήφθη σε πολύ καλή απόδοση. Όπως φαίνεται από τα φάσματα ¹³C NMR των ενώσεων **5.28** και **5.29**, η CH₂-N₃ κορυφή στα 50.2 ppm (Σχήμα 5.27), έχει πλέον μετατραπεί σε CH₂-NH₂ στα 39.6 ppm (Σχήμα 5.28). Για την παρασκευή των προϊόντων **5.27**, **5.28** και **5.29** ακολουθήθηκαν βιβλιογραφικές πορείες, και ελήφθησαν αποτελέσματα ίδια με της βιβλιογραφίας.^{21,22} Η πιστοποίηση του προϊόντος **5.29** έγινε και με φασματοσκοπία μάζας, στην οποία παρατηρείται το μοριακό ιόν στα $m/z = 265.3$ [M+H]⁺ και στα $m/z = 287.3$ [M+Na]⁺.

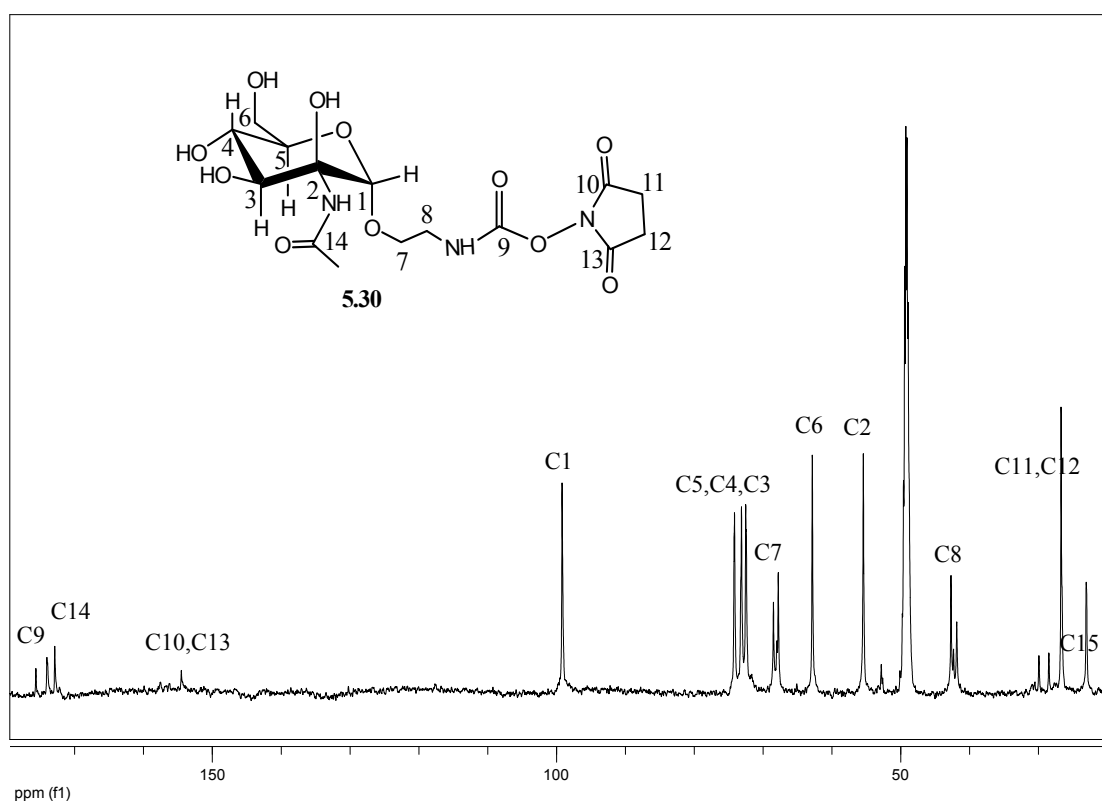


Σχήμα 5.27: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης **5.28** (α : $\beta \geq 99\%$) (125 MHz, D₂O, 298K)



Σχήμα 5.28: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **5.29** ($\alpha:\beta \geq 99\%$) (125 MHz, D_2O , 298K)

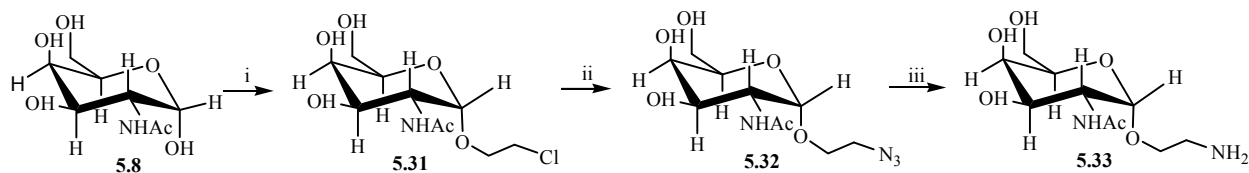
Επίσης ελήφθη το προϊόν **5.30** με απόδοση 44%, προκειμένου να αντιδράσει με κυκλοδεξτρίνες που φέρουν αμινο ομάδες στην πρωτοταγή τους πλευρά. Στην περίπτωση αυτή δεν παρουσιάστηκε το ίδιο πρόβλημα όπως τη μαννόζη **5.14** και στο φάσμα ^{13}C NMR σε CD_3OD εντοπίστηκαν οι C-10 και C-13 του προϊόντος, αλλά σε πολύ μικρή ένταση. Η πιστοποίηση του προϊόντος **5.30** έγινε και με φασματοσκοπία μάζας, στην οποία παρατηρείται το μοριακό ιόν στα $m/z = 460.4$ [$\text{M}+\text{HCl}+\text{H}_2\text{O}$].



Σχήμα 5.29: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **5.30** ($\alpha:\beta \geq 99\%$) (125 MHz, CD_3OD , 298K)

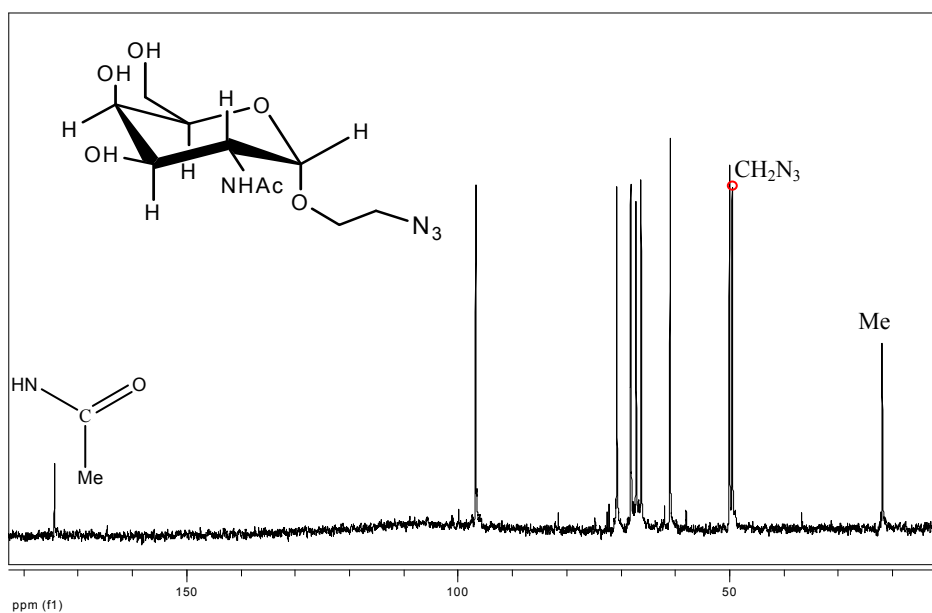
5.2.5 Σύνθεση αμινο παραγώγων *N*-ακετυλο-*D*-(+)-γαλακτοζαμίνης

N-ακετυλο-*D*-(+)-γαλακτοζαμίνη

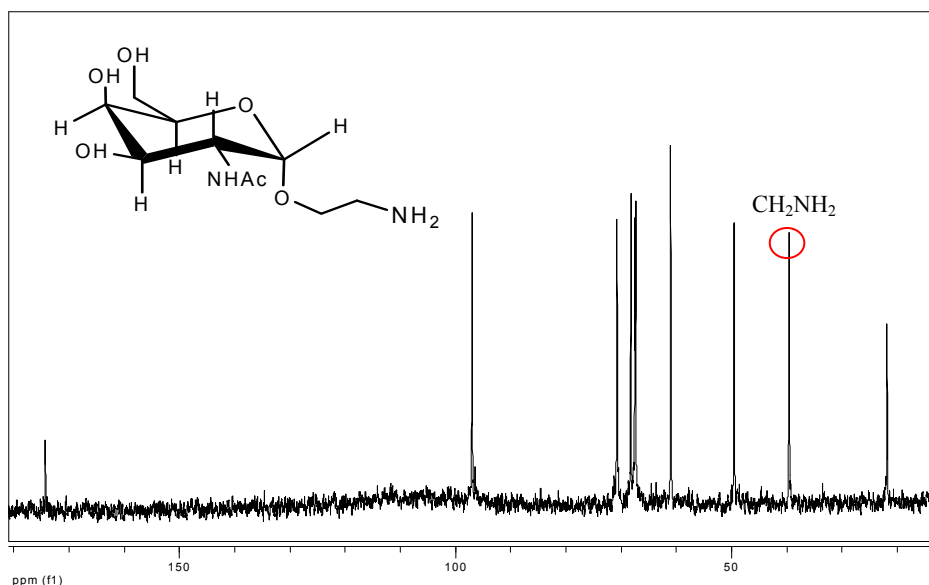


Σχήμα 5.30: Σύνθεση της 2'-αμινοαιθυλο 2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-α-*D*-γαλακτόζης (**5.33**): **i**) 2-χλωροαιθανόλη, ακετυλοχλωρίδιο, 70 °C, 69% **ii**) NaN₃, DMF, 60 °C, 100% **iii**) Pd/C 10%, H₂, MeOH, rt, 100%

Για τη σύνθεση των προϊόντων **5.31**, **5.32** και **5.33** ακολουθήθηκαν βιβλιογραφικές πορείες¹⁷ και τα προϊόντα ελήφθησαν σε άριστες αποδόσεις με τις αντίστοιχες κορυφές των CH₂N₃ (Σχήμα 5.31) και CH₂NH₂ (Σχήμα 5.32) στις αναμενόμενες περιοχές. Η πιστοποίηση του προϊόντος **5.33** έγινε και με φασματοσκοπία μάζας, στην οποία παρατηρείται το μοριακό ιόν στα $m/z = 287.3$ [M+Na]⁺.



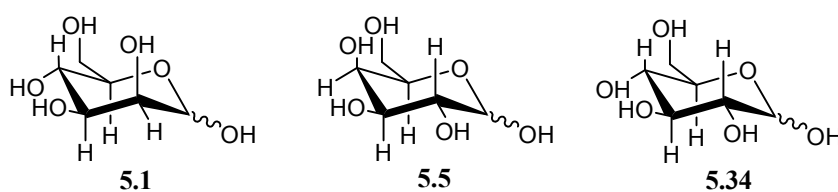
Σχήμα 5.31: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης **5.32** (α:β ≥ 98%) (125 MHz, D₂O, 298K)



Σχήμα 5.32: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 5.33 ($\alpha:\beta \geq 98\%$) (125 MHz, D_2O , 298K)

5.3 Τροποποίηση σακχάρων με καρβοξυλοάλκυλο ομάδες

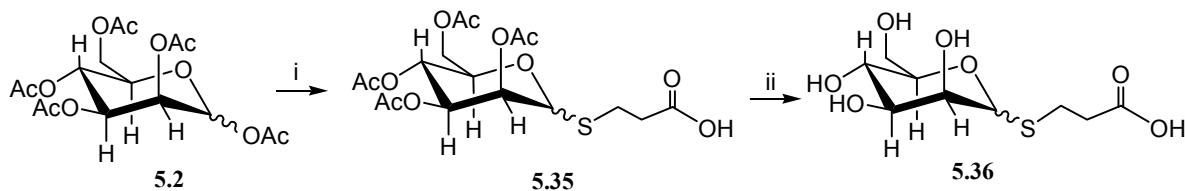
Στην παράγραφο αυτή θα συζητηθούν οι συνθέσεις σακχάρων, τα οποία φέρουν ως γέφυρα σύνδεσης αλειφατικές αλυσίδες με καταληκτικές καρβοξυλικές ομάδες, ικανά να αντιδράσουν με αμινο κυκλοδεξτρίνες. Τα σάκχαρα που χρησιμοποιήθηκαν είναι η D-(+)-μαννόζη (5.1), η D-(+)-γαλακτόζη (5.5) και η D-(+)-γλυκόζη (5.34).



Σχήμα 5.33: Τα σάκχαρα που χρησιμοποιήθηκαν

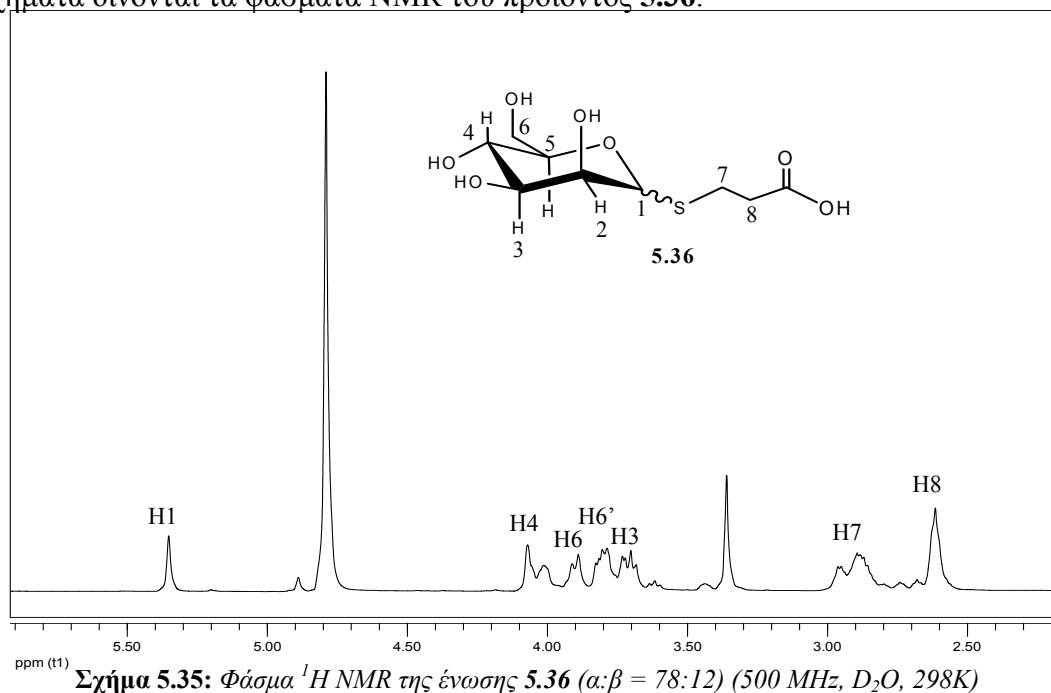
5.3.1 Σύνθεση καρβόξυ παραγώγων της D-(+)-μαννόζης

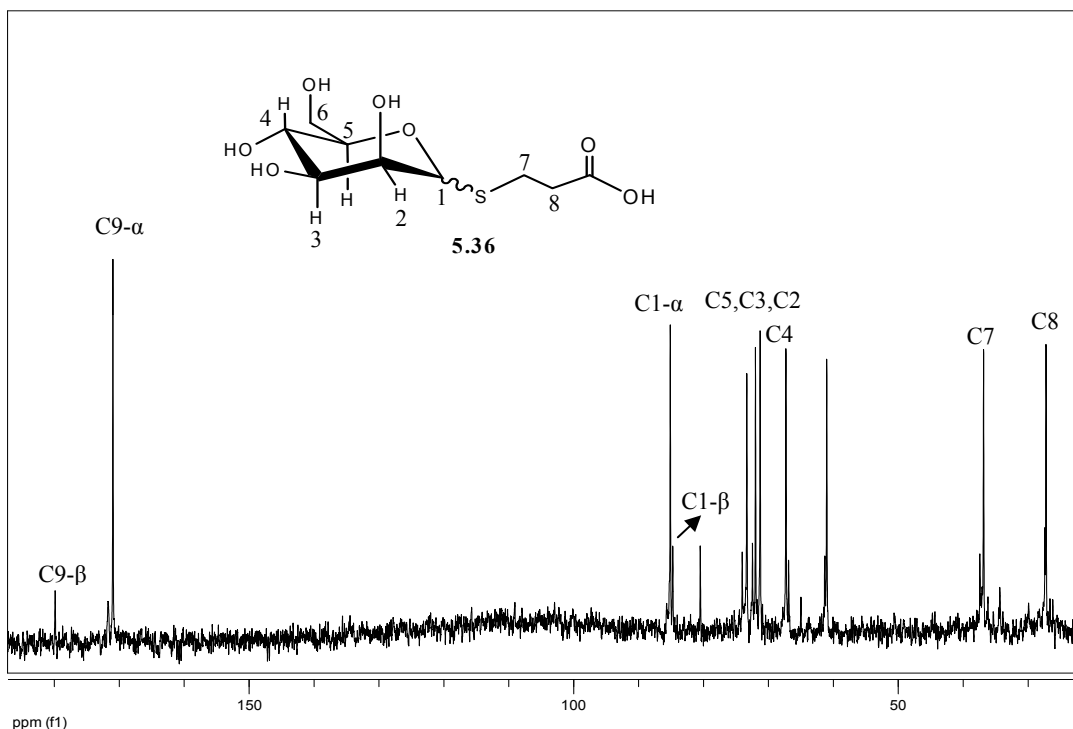
D-(+)-μαννόζη



Σχήμα 5.34: Σύνθεση της 2'-καρβοξυλοαιθυλοθειο- α,β -D-μαννοπυρανόζης (**5.36**): **i**) 3-μερκαπτοπροπανοϊκό οξύ, $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, CH_2Cl_2 , rt, 72% **ii**) MeONa , MeOH , rt, 100%

Κατά τη συνθετική αυτή πορεία από μίγμα της μαννόζης **5.2** α/β 3:1, παρελήφθη η μαννόζη **5.35** ως μίγμα $\alpha/\beta = 78:12$. Η πιστοποίηση του προϊόντος **5.35** έγινε και με φασματοσκοπία μάζας, στην οποία παρατηρείται το μοριακό ιόν στα $m/z = 459.3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Εν συνεχεία αποπροστασία των ακέτυλο ομάδων έδωσε το επιθυμητό προϊόν **5.36**, στην φασματοσκοπία μάζας του οποίου το μοριακό ιόν εμφανίζεται στα $m/z = 313.3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Προκειμένου να διαπιστωθεί κατά πόσο είναι δυνατόν να αποφευχθεί η λήψη μίγματος ανωμερών μελετήθηκε η αντίδραση σε διαφορετικούς χρόνους. Ωστόσο το προϊόν που προέκυπτε εξακολουθούσε να αποτελείται από μίγμα των ανωμερών α και β στην ίδια αναλογία. Στα παρακάτω σχήματα δίνονται τα φάσματα NMR του προϊόντος **5.36**.

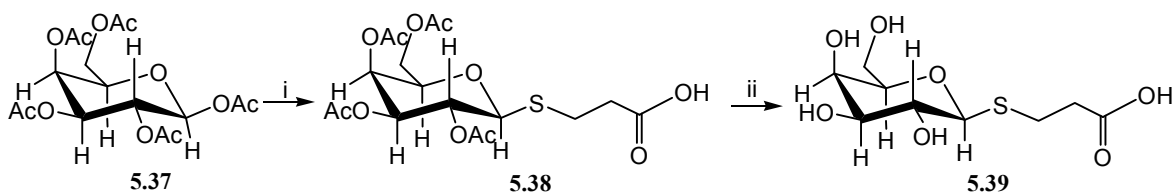




Σχήμα 5.36: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **5.36** ($\alpha:\beta = 78:12$) (125 MHz, D_2O , 298K)

5.3.2 Σύνθεση καρβόξυ παραγώγων της D-(+)-γαλακτόζης

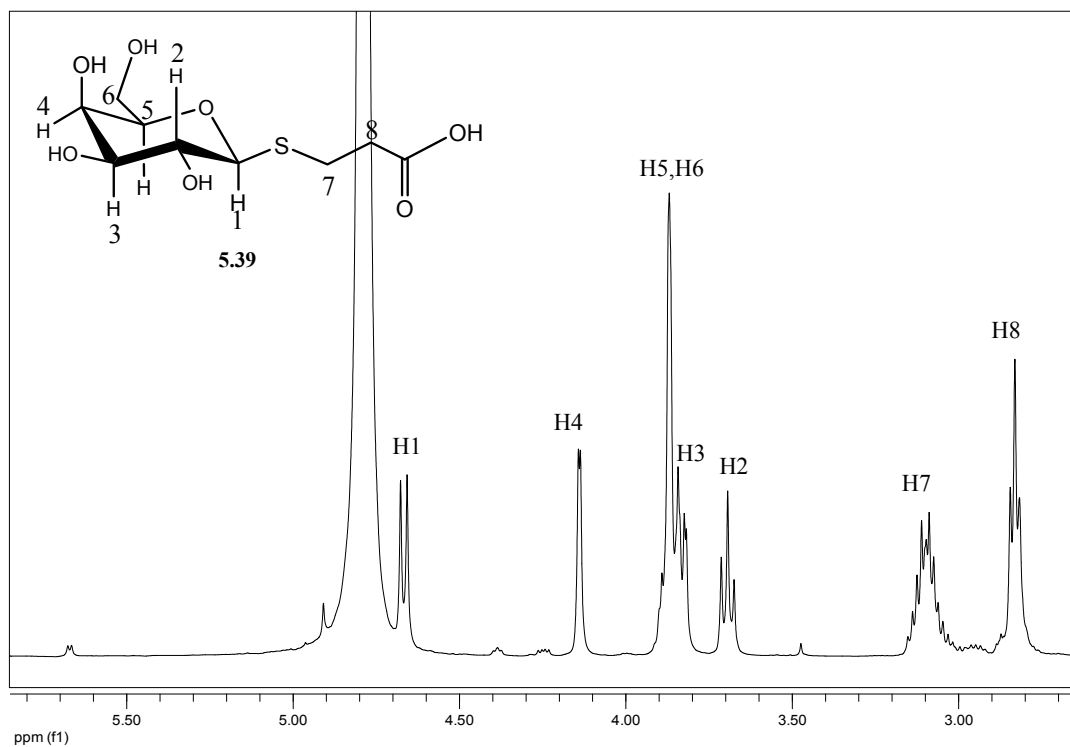
D-(+)-γαλακτόζη



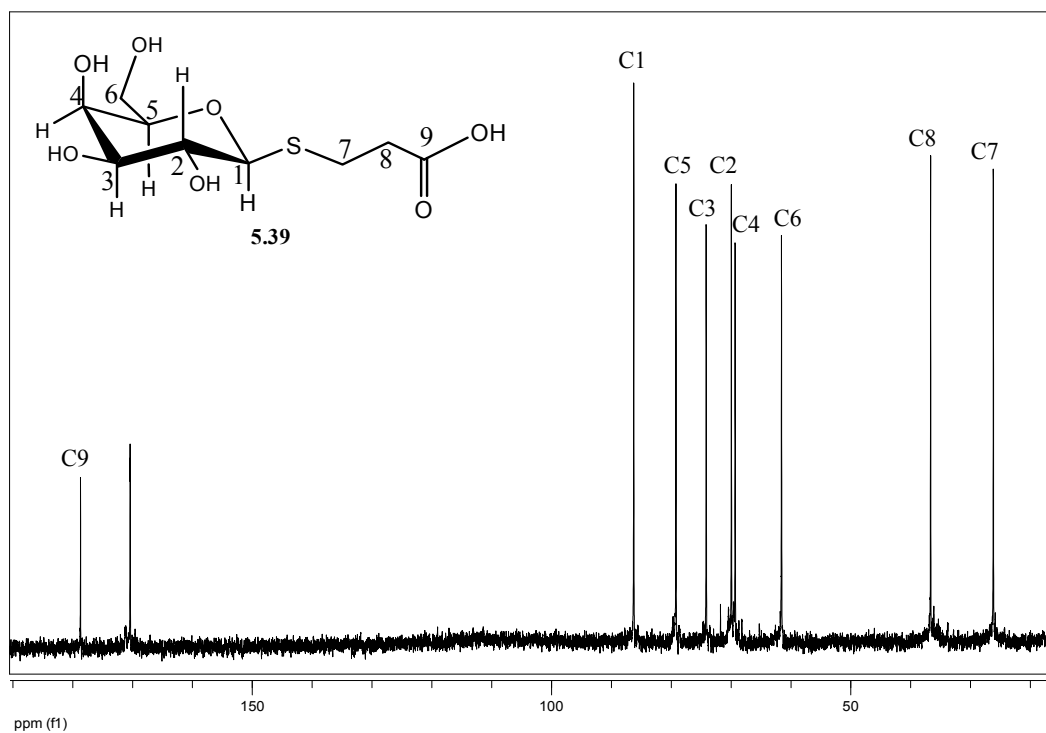
Σχήμα 5.37: Σύνθεση της 2'-καρβοξυλοαιθυλοθειο-β-D-γαλακτόζης (**5.39**): **i**) 3-μερκαπτοπροπανοϊκό οξύ, $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, CH_2Cl_2 , rt, 100% **ii**) MeONa , MeOH , rt, 100%

Η συνθετική πορεία ξεκίνησε με την εμπορική β-ακετυλωμένη γαλακτόζη **5.37**, στη συνέχεια παρελήφθη η γαλακτόζη **5.38** και εν συνεχεία αποπροστασία των αέτυλο ομάδων έδωσε το επιθυμητό προϊόν **5.39**. Κατά τις αντιδράσεις αυτές βελτιώθηκαν οι αποδόσεις σε σχέση με τις βιβλιογραφικές κατά 10%.^{23,24,25,26,27} Αξιοσημείωτο είναι ότι όταν η αντίδραση παρέμενε για 2 ώρες προέκυπτε το β-ανωμερές του προϊόντος **5.38** σε απόδοση 100%, ενώ εάν παρέμενε περισσότερο

χρόνο προέκυπτε μίγμα των α και β ανωμερών. Στα παρακάτω σχήματα δίνονται τα φάσματα του τελικού προϊόντος **5.39**, το οποίο είναι καθαρό β -ανωμερές.



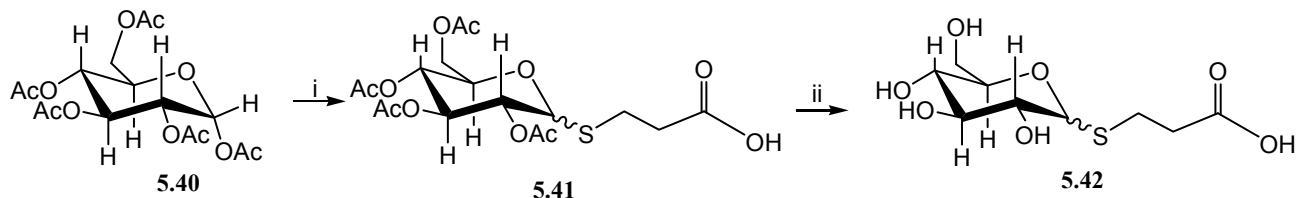
Σχήμα 5.38: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **5.39** (500 MHz, D_2O , 298K)



Σχήμα 5.39: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **5.39** (125 MHz, D_2O , 298K)

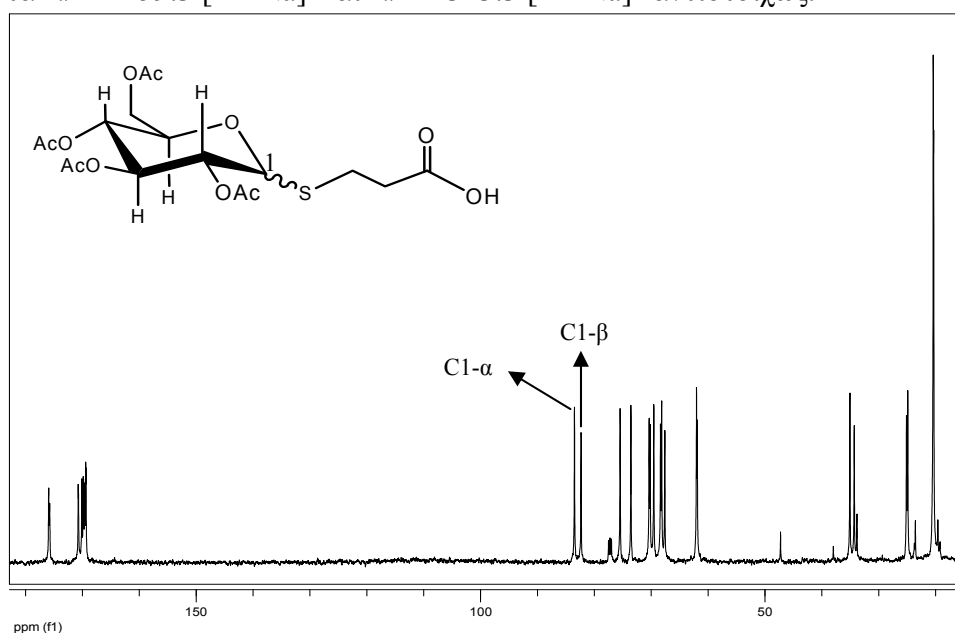
5.3.3 Σύνθεση καρβόξυ παραγώγων της D-(+)-γλυκόζης

D-(+)-γλυκόζη

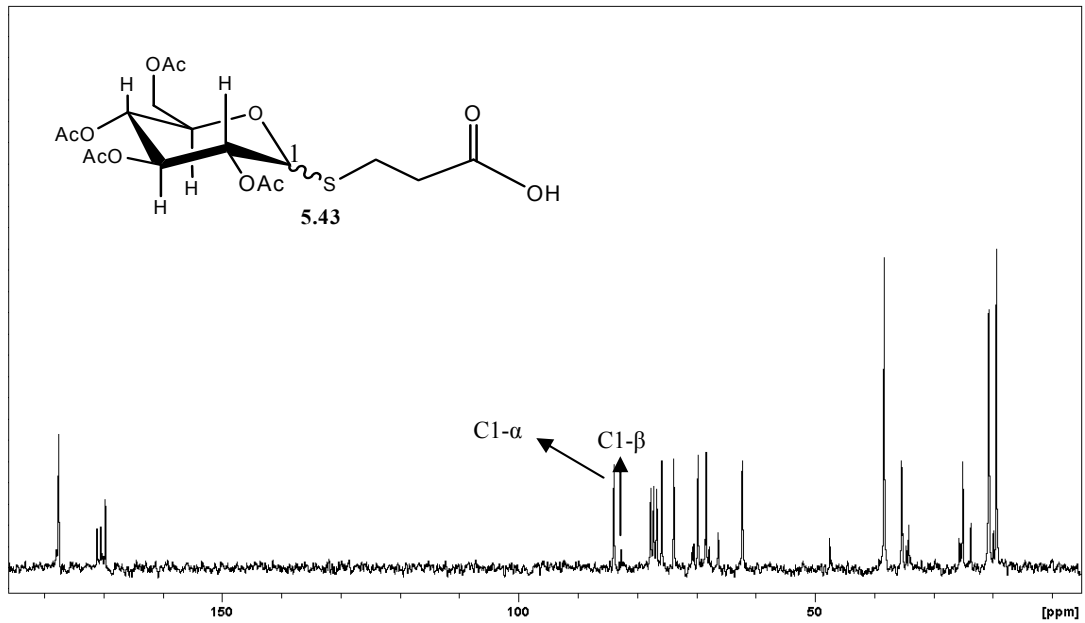


Σχήμα 5.40: Σύνθεση της 2'-καρβοξυλοαιθυλοθειο- α,β -D-γλυκόζης (5.42): **i)** 3-μερκαπτοπροπανοϊκό οξύ, $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, CH_2Cl_2 , rt, 55% **ii)** MeONa , MeOH , rt, 100%

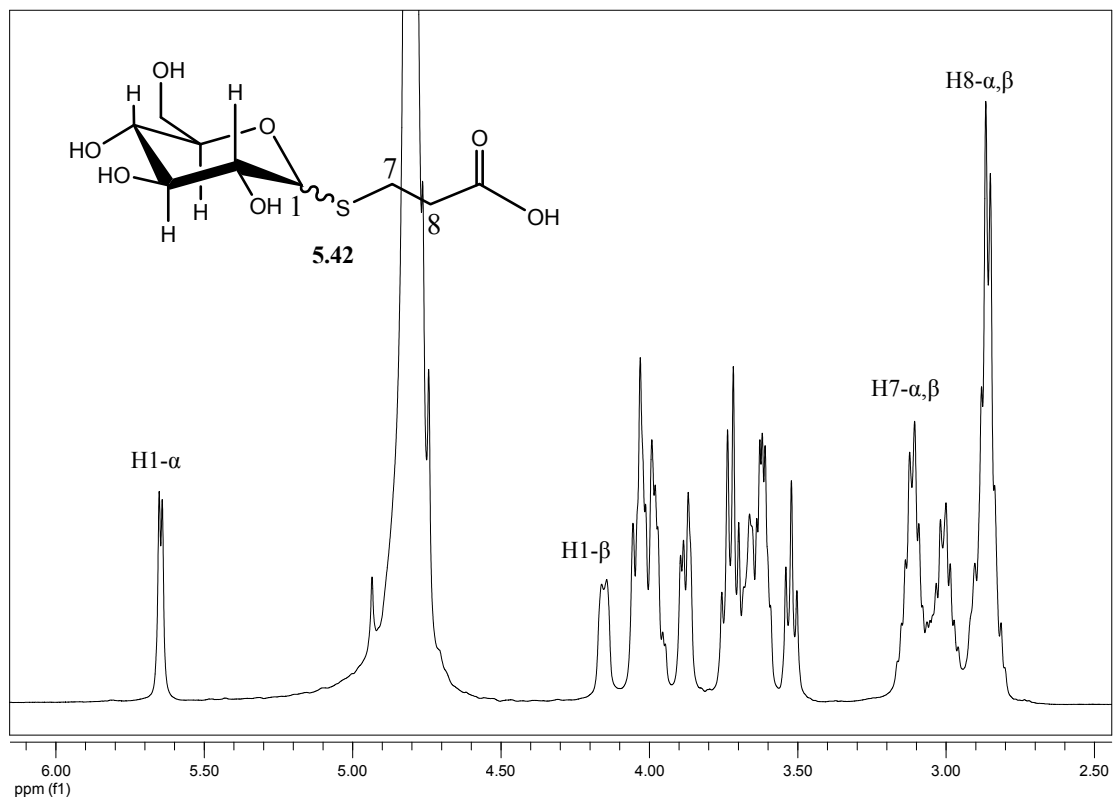
Κατά τη συνθετική αυτή πορεία η γλυκόζη **5.41** σχηματιζόταν ως μίγμα ανωμερών α και β με διαφορετική αναλογία ανάλογα με τις συνθήκες της αντίδρασης από την αρχική α -ακετυλιωμένη γλυκόζη **5.40**. Συγκεκριμένα εάν ο χρόνος της αντίδρασης ήταν 12 ώρες προέκυπτε μίγμα α και β με αναλογία 1:1 και απόδοση 55%, του οποίου το φάσμα ^{13}C NMR δίνεται στο σχήμα 5.41. Όταν όμως η αντίδραση διαρκούσε για 4 ώρες προέκυπτε μίγμα α/β με αναλογία 9:1 και απόδοση 24%, του οποίου το φάσμα ^{13}C NMR δίνεται στο σχήμα 5.42. Με αποπροστασία του προϊόντος **5.41** παρελήφθη ποσοτικά το τελικό προϊόν **5.42**. Τέλος παρατίθεται και το φάσμα του τελικού προϊόντος **5.42** (Σχήμα 5.43). Η πιστοποίηση των προϊόντων **5.41** και **5.42** έγινε και με φασματοσκοπία μάζας, στην οποία παρατηρούνται τα μοριακά ιόντα στα $m/z = 459.3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ και $m/z = 313.3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ αντιστοίχως.



Σχήμα 5.41: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **5.41** ($\alpha:\beta = 1:1$) (125 MHz, D_2O , 298K)



Σχήμα 5.42: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 5.41 ($\alpha:\beta = 9:1$) (62 MHz, D_2O , 298K)

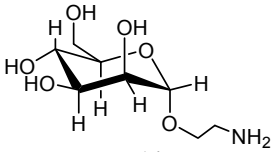
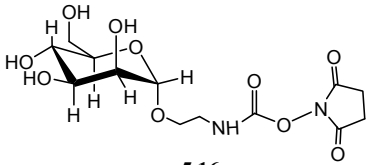
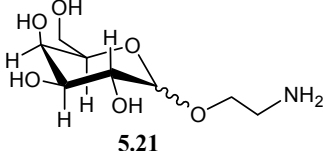
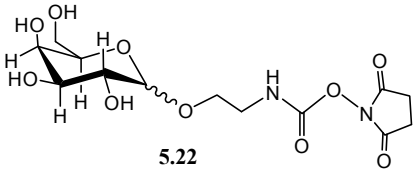


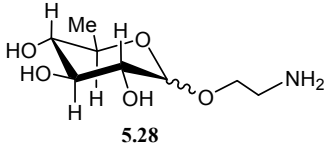
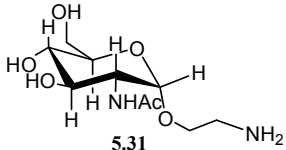
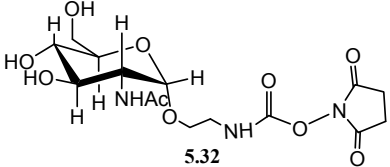
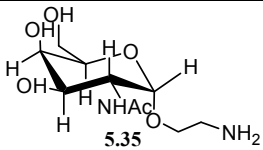
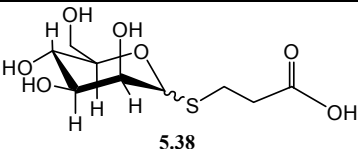
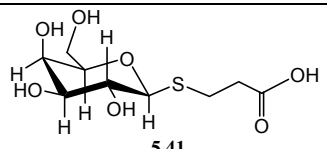
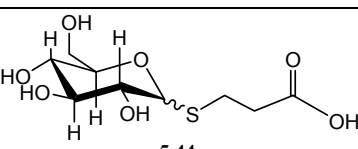
Σχήμα 5.43: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης 5.42 ($\alpha:\beta = 1:1$) (500 MHz, D_2O , 298K)

5.4 Συμπεράσματα

Στο κεφάλαιο αυτό αναλύθηκαν οι συνθετικές πορείες που ακολουθήθηκαν προκειμένου να τροποποιηθούν τα επιλεγμένα σάκχαρα **5.1** (Man), **5.5** (Gal), **5.6** (Fuc), **5.7** (GlcNAc), **5.9** (GalNAc), με καταληκτικές αμίνο ομάδες και τα **5.1** (Man), **5.5** (Gal), **5.34** (Glc) με καταληκτικές καρβοξυλο ομάδες. Η μεν πρώτη κατηγορία σακχάρων προορίζεται να συζευχθεί με κυκλοδεξτρίνες που διαθέτουν στην πρωτοταγή πλευρά καρβοξυλικές ομάδες, η δε δεύτερη κατηγορία με αυτές που έχουν αμίνο ομάδες. Τέλος στον πίνακα που ακολουθεί συγκεντρώνονται τα αποτελέσματα: είδος ουσιών, το ποσοστό του κάθε ανωμερούς στο τελικό προϊόν, η συνολική απόδοση του κάθε τελικού προϊόντος καθώς και ο αριθμός των συνθετικών σταδίων που χρειάστηκαν να πραγματοποιηθούν προκειμένου να παραληφθεί το κάθε επιθυμητό προϊόν. Ο τρόπος σύζευξης των τροποποιημένων σακχάρων του πίνακα 5.1 αναλύεται στο κεφάλαιο 6.

Πίνακας 5.1: Τροποποιημένα σάκχαρα που παρασκευάστηκαν

Συνομογραφία	Τροποποιημένα Σάκχαρα	Αναλογία Ανωμερών α:β	Συνολική Απόδοση %
Man~NH ₂ *	 <p style="text-align: center;">5.14</p>	1:0 (5 στάδια)	59%
Man~DSC*	 <p style="text-align: center;">5.16</p>	1:0 (6 στάδια)	18%
Gal~NH ₂ *	 <p style="text-align: center;">5.21</p>	3:1 (3 στάδια)	50%
Gal~DSC**	 <p style="text-align: center;">5.22</p>	3:1 (4 στάδια)	13%

Fuc~NH ₂ *		2:1 (3 στάδια)	42%
GlcNAc~NH ₂ **		1:0 (3 στάδια)	69%
GlcNAc~DSC**		1:0 (4 στάδια)	30%
GalNAc~NH ₂ **		98:2 (3 στάδια)	69%
Man~COOH**		78:12 (2 στάδια)	72%
Gal~COOH*		0:1 (2 στάδια)	100%
Glc~COOH**		1:1 9:1	55% 24%

*Βιβλιογραφικές ουσίες

**Νέες ουσίες

6

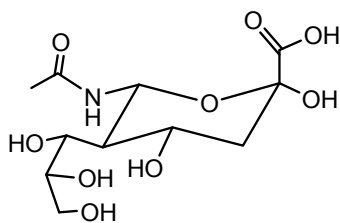
**ΟΜΟΙΟΠΟΛΙΚΗ ΣΥΝΔΕΣΗ
ΚΥΚΛΟΔΕΕΤΡΙΝΩΝ ΜΕ ΣΑΚΧΑΡΑ ΜΕΣΩ
ΑΜΙΔΙΚΩΝ ΔΕΣΜΩΝ - ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ
ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΙΚΩΝ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΩΝ
(GLYCOCLUSTERS)**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

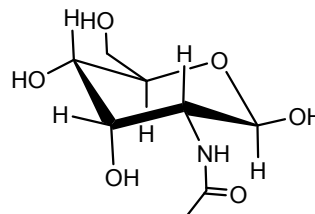
ΟΜΟΙΟΠΟΛΙΚΗ ΣΥΝΔΕΣΗ ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΩΝ ΜΕ ΣΑΚΧΑΡΑ ΜΕΣΩ ΑΜΙΔΙΚΩΝ ΔΕΣΜΩΝ– ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΙΚΩΝ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΩΝ (GLYCOCLUSTERS)

6.1 Εισαγωγή

Οι περισσότερες λεκτίνες και σελεκτίνες αναγνωρίζουν και συνδέονται με μονοσακχαρίτες, κατηγοριοποιούνται δε αναλόγως του γλυκοζιδίου που αναγνωρίζουν. Οι περισσότερες λεκτίνες αναγνωρίζουν το *N*-ακετυλονευραμινικό οξύ ή σιαλικό (Σχήμα 6.1), την *N*-ακετυλογλυκοζαμίνη (Σχήμα 6.2), την *N*-ακετυλογαλακτοζαμίνη, τη γαλακτόζη, τη μαννόζη και τη φουκόζη.^{1,2}



Σχήμα 6.1: *N*-ακετυλονευραμινικό οξύ
(*NeuNAc*, *sialic acid*)



Σχήμα 6.2: *N*-ακετυλογλυκοζαμίνη
(*GlcNAc*)

Έχει παρατηρηθεί ότι η αναγνώριση των σελεκτινών και των λεκτινών που συνυπάρχουν στα μικροβιακά τοιχώματα ενισχύεται όταν τα σάκχαρα που χρησιμοποιούνται διαθέτουν άμιδο ομάδες. Επιπλέον η αλληλεπίδραση των σακχάρων με τις βακτηριακές λεκτίνες είναι ισχυρότερη όταν αυτά προσεγγίζουν τις λεκτίνες ως υδατανθρακικά συμπλέγματα (*glycoclusters*), από τα αντίστοιχα μονομερή τους. Το γεγονός αυτό έχει αποδοθεί στο φαινόμενο της πολυδυναμικότητας (*multivalency*), το οποίο είναι πανταχού παρόν στη φύση δηλαδή σε πολλές βιολογικές λειτουργίες. Η πολυδυναμικότητα έχει αναγνωρισθεί ως υπεύθυνη ιδιότητα η οποία μεγιστοποιεί ασθενείς ή μέτριες αλληλεπιδράσεις. Το ενδιαφέρον για σύνθεση και χαρακτηρισμό υδατανθρακικών ενώσεων, οι οποίες,

εκτός από την πολυδυναμικότητά τους χαρακτηρίζονται και από την ικανότητα να εγκλωβίζουν και να μεταφέρουν φάρμακα, οδήγησε διάφορες ερευνητικές ομάδες να προβούν στη σύνθεση υδατανθρακικών συμπλεγμάτων, βασισμένων σε μοριακούς ξενιστές.³

Οι κυκλοδεξτρίνες δύνανται να συνδεθούν ομοιοπολικά με στοχεύοντα μόρια, ώστε να συνδυάζουν την ιδιότητα να λειτουργούν ως μεταφορείς φαρμάκων μέσω συμπλοκοποίησης, με αυτήν της στοχευμένης μεταφοράς σε συγκεκριμένους υποδοχείς. Πρόσδεση των CDs με συγκεκριμένα σάκχαρα ή με σιαλικά οξέα, τα οποία αναγνωρίζονται από τις λεκτίνες και τις σελεκτίνες των βακτηριακών κυττάρων, δίνει την ευκαιρία στόχευσης των κυττάρων αυτών. Επομένως οι CDs πλεονεκτούν στη δημιουργία υδατανθρακικών συμπλεγμάτων συγκριτικά με άλλα μακροκυκλικά μόρια καθώς είναι εύκολα διαθέσιμες, είναι φθηνές, είναι βιοσυμβατές και το κυριότερο, μπορούν σε υδατικά διαλύματα να εγκλείσουν στην υδρόφοβη κοιλότητά τους διάφορα ξενιζόμενα μόρια.

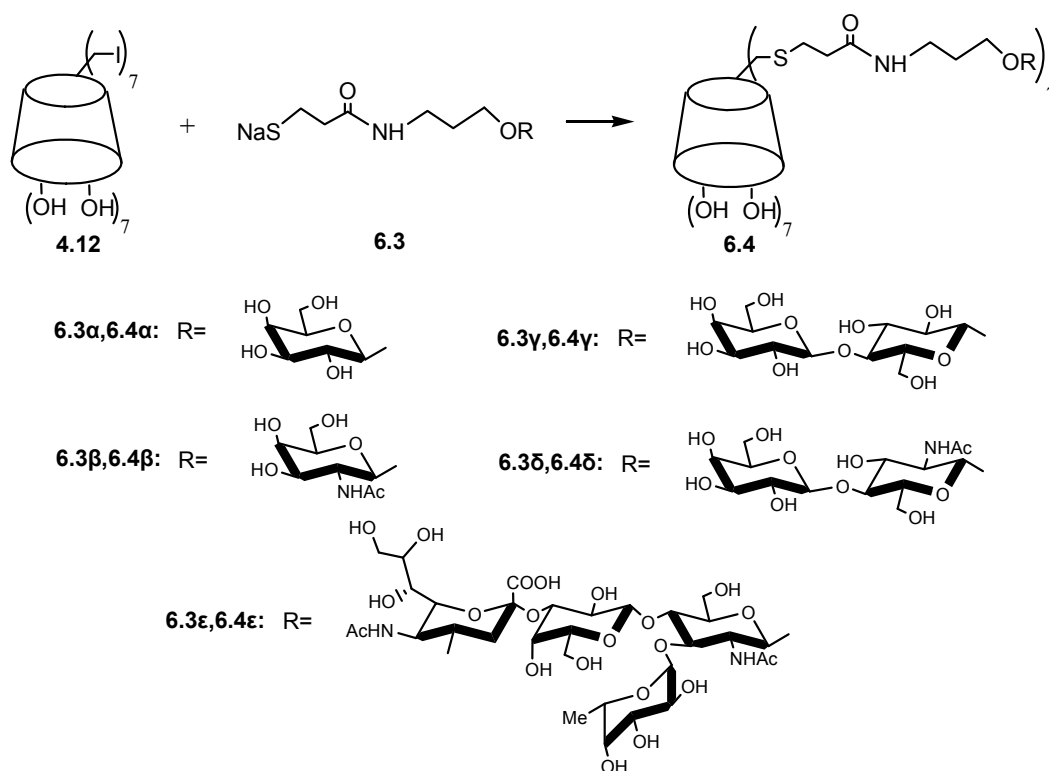
Εκτός βέβαια από την επιλογή αμινοσακχάρων σημαντικό ρόλο στην αναγνώρισή τους από τις βακτηριακές γλυκοπρωτεΐνες, παίζει και το μέγεθος των συνδέσμων μεταξύ των κυκλοδεξτρινών και των σακχάρων καθώς και ο αριθμός των γλυκοζιδίων που αλληλεπιδρούν στις γλυκοπρωτεΐνες. Στις περισσότερες βιβλιογραφικές αναφορές υποστηρίζεται ότι όταν χρησιμοποιούνται ως σύνδεσμοι μετρίου μεγέθους αλυσίδες (2-5 άτομα άνθρακα), η αναγνώριση συγκεκριμένων γλυκοπρωτεϊνών¹ λειτουργεί αποτελεσματικότερα από ότι με μακρύτερους συνδέσμους. Επίσης στις περιπτώσεις που χρησιμοποιούνται μεγαλύτερου μήκους αλυσίδες προκύπτουν προβλήματα στο συνθετικό μέρος των πειραμάτων και συγκεκριμένα προκύπτει μίγμα προϊόντων (κυκλοδεξτρίνης-σακχάρου) με διαφορετική υποκατάσταση.⁴

Από τις πρώτες βιβλιογραφικές αναφορές στη σύνθεση πλήρως υποκατεστημένων β-κυκλοδεξτρινών με θείο-γαλακτόζες^{5,6} και θείο-γλυκόζες⁷ ως ομάδες υποκατάστασης στην πρωτοταγή πλευρά, έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες πρόσδεσης σακχάρων στις κυκλοδεξτρίνες, ακολουθώντας διαφορετικές μεθοδολογίες, οι οποίες αναφέρονται περιληπτικά παρακάτω.

Ένας τρόπος προσέγγισης είναι η σύνθεση των τελικών μορίων χρησιμοποιώντας β-κυκλοδεξτρίνες, που φέρουν αμίνο ομάδα στην πρωτοταγή τους πλευρά και σάκχαρα (λακτόζες-γλυκόζες), που φέρουν θείο-καρβοξυλικά οξέα.⁸ Η

λακτόζη αναγνωρίζεται από τις ασιαλο-γλυκοπρωτεΐνες των ηπατικών κυττάρων, οπότε το σύμπλεγμα βCD-λακτόζη μπορεί να συμπλοκοποιηθεί με αντιφλεγμονώδη φάρμακα, όπως η ναπροξένη και να μεταφερθεί στα ηπατικά κύτταρα. Επίσης έχει αποδειχθεί ότι η αλβουμίνη ανθρώπινου ορού που φέρει γαλακτόζη μπορεί να συνδεθεί ομοιοπολικά με τη ναπροξένη και να μεταφερθεί επιλεκτικά στο συκώτι αντί των νεφρών, καθώς τα ηπατικά κύτταρα φέρουν τις αντίστοιχες πρωτεΐνες που είναι ικανές να αναγνωρίσουν τη γαλακτόζη.⁹

Προηγούμενες μελέτες έχουν αποδείξει ότι οι πλήρως υποκατεστημένες β-κυκλοδεξτρίνες με μόρια γλυκόζης ενισχύουν την παρεμπόδιση της συγκόλλησης των ερυθροκυττάρων που προκαλείται από την αγλουτινίνη **WGA** και τη λεκτίνη **EcorL**. Αναλυτικότερα η συγκεκριμένη ερευνητική ομάδα¹⁰ συνέθεσε τις παρακάτω βCDs ξεκινώντας από την επτακίς(6-ιωδο-6-δεοξυ)-β-κυκλοδεξτρίνη **4.12** και τα τροποποιημένα σάκχαρα **6.3** και εξέτασε το βαθμό συγκόλλησης των ερυθροκυττάρων που προκαλείται από την **WGA** και την **EcorL**, παρουσία των ενώσεων **6.4**. Σημειωτέον ότι στις ενώσεις **6.4** τα σάκχαρα συνδέονται με τον μακροκυκλικό πυρήνα της βCD μέσω γέφυρας οκτώ δεσμών.



Σχήμα 6.3: Τροποποιημένες βCDs¹⁰

Τα αποτελέσματα της μελέτης τους ήταν ιδιαίτερα εντυπωσιακά καθώς εξετάζοντας την κυκλοδεξτρίνη **6.4β** με την **WGA** και τις κυκλοδεξτρίνες **6.4α**, **6.4γ**,

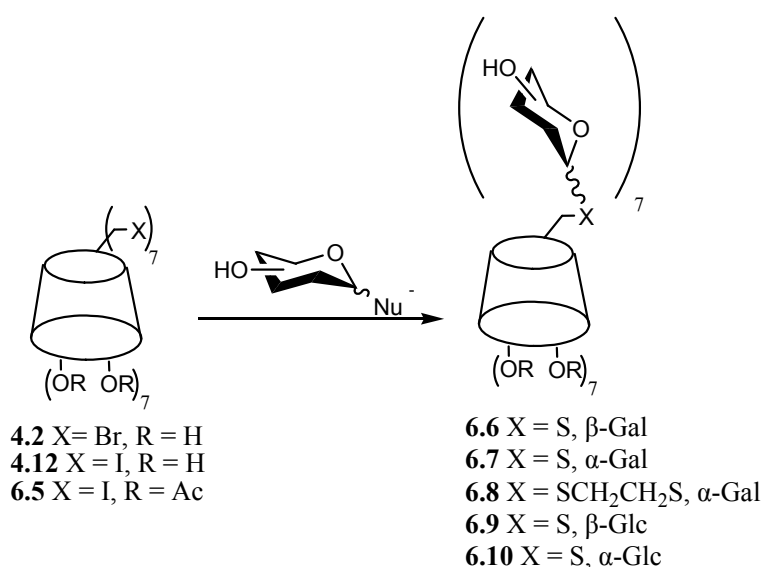
6.4δ με την **ECorL** κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η ελάχιστη συγκέντρωση παρεμπόδισης, της συγκόλλησης ερυθροκυττάρων (MIC) μειώνεται δραματικά σε σχέση με τη φυσική β-κυκλοδεξτρίνη.

Η ίδια ερευνητική ομάδα έχει επίσης μελετήσει την πρόσδεση των κυκλοδεξτρινών **6.4α**, **6.4β**, **6.4γ**, **6.4δ** και **6.4ε** στην E-σελεκτίνη. Η μελέτη αυτή έγινε προσδιορίζοντας τον υποδιπλασιασμό της συγκέντρωσης (IC_{50}) της ελεύθερης κυκλοδεξτρίνης. Τα αποτελέσματα ήταν θετικά όταν χρησιμοποιήθηκε ως υποκαταστάτης η **6.4ε**. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη αναγνωρίζει τα σάκχαρα που φέρει η κυκλοδεξτρίνη **6.4ε**. Τα σάκχαρα προσδένονται σε αυτή και έτσι η συγκέντρωση της ελεύθερης κυκλοδεξτρίνης **6.4ε** μειώνεται.¹¹

Ένας άλλος τρόπος προσέγγισης της σύνθεσης τέτοιων μορίων είναι η φωτοπροσθήκη θειοσακχάρων σε β-κυκλοδεξτρίνες που φέρουν αλλυλικούς αιθέρους στις θέσεις 6 και 2. Προτέρημα της μεθόδου αυτής είναι ο απλός διαχωρισμός του τελικού προϊόντος από τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται.¹² Επίσης έχουν συντεθεί μόνο-, δι-, και τρι-υποκατεστημένες με φουκόζη β-κυκλοδεξτρίνες,¹³ χρησιμοποιώντας μερικώς ακετυλιωμένες κυκλοδεξτρίνες¹⁴ στη πρωτοταγή πλευρά και 2,3,4-τρι-*O*-ακετυλο-L-φουκοπυρανόζυλο τριχλωροακεταμίδιο.¹⁵ Έχει μελετηθεί η αιμολυτική δραστηριότητα αυτών των κυκλοδεξτρινών και έχει αποδειχθεί ότι εξασθενεί περισσότερο όταν χρησιμοποιείται η δι-υποκατεστημένη β-κυκλοδεξτρίνη από ότι η φυσική β-κυκλοδεξτρίνη και ακόμα περισσότερο όταν χρησιμοποιείται η μόνο-υποκατεστημένη. Στην περίπτωση των υποκατεστημένων με φουκόζη κυκλοδεξτρινών, ενώ η διαλυτότητα τους στο νερό είναι σχεδόν η ίδια, παρατηρείται διαφοροποίηση στην αιμολυτική δράση τους.¹³ Επίσης η ίδια ερευνητική ομάδα μελέτησε την ικανότητα αναγνώρισης της φουκόζης από την λεκτίνη *Aleuria aurantia* **AAL**, χρησιμοποιώντας οπτικό βιοαισθητήρα. Τα αποτελέσματα τους αποδεικνύουν ότι η πρόσδεση είναι ισχυρότερη στις δι-υποκατεστημένες β-κυκλοδεξτρίνες και ιδιαίτερα σε αυτές που φέρουν δύο μόρια φουκόζης, τα οποία δεν είναι σε γειτονικές γλυκοπυρανόζες.

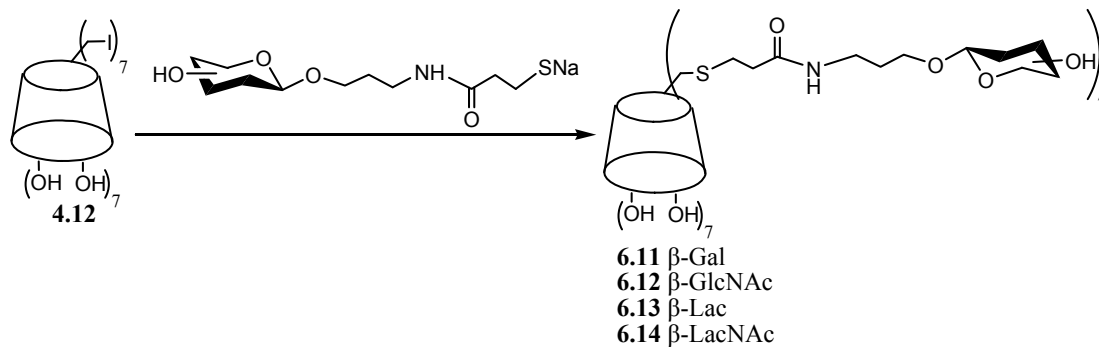
Η ομάδα των Robertis *et al.*¹⁶ συνέθεσε υδατανθρακικά συμπλέγματα με πυρηνόφιλη υποκατάσταση των τροποποιημένων CDs **4.2** (βpBr), **4.12** (βpI) και **6.5** με θειο-α- και θειο-β-γαλακτοπυρανοζίδια και η ομάδα των Lainé *et al.*¹⁷ συνέθεσε τα ίδια υδατανθρακικά συμπλέγματα με θειο-α και θειο-β-γλυκοπυρανοζίδια. Η μελέτη της βιοαναγνωρισιμότητας με πειράματα κροκκίδωσης των περι-6-γαλακτοζυλο-θειο-

CDs από την λεκτίνη *Kluyveromyces fragilis* έδειξε ότι η πλήρης υποκατάσταση στην πρωτοταγή πλευρά οδηγεί σε καλύτερες ιδιότητες παρεμπόδισης της κροκκίδωσης από ότι η μονοϋποκατάσταση. Επίσης η **6.7** είχε διπλάσια απόδοση παρεμπόδισης από την **6.6**. Επιπλέον όταν χρησιμοποιήθηκε το παράγωγο **6.8**, το οποίο διαθέτει και αλειφατική αλυσίδα ως γέφυρα σύνδεσης τα αποτελέσματα ως προς το βαθμό παρεμπόδισης ήταν ακόμα πιο ικανοποιητικά. Στις περι-6-γλυκοζυλοθειο-CDs **6.9**, **6.10** μελετήθηκε η ικανότητα συμπλοκοποίησής τους και διαπιστώθηκε ότι λόγω απουσίας υδροξυλίων στην πρωτοταγή πλευρά η σταθερότητα του συμπλόκου μειώνεται καθώς αδυνατούν να κάνουν δεσμούς υδρογόνου από τη θέση 6.



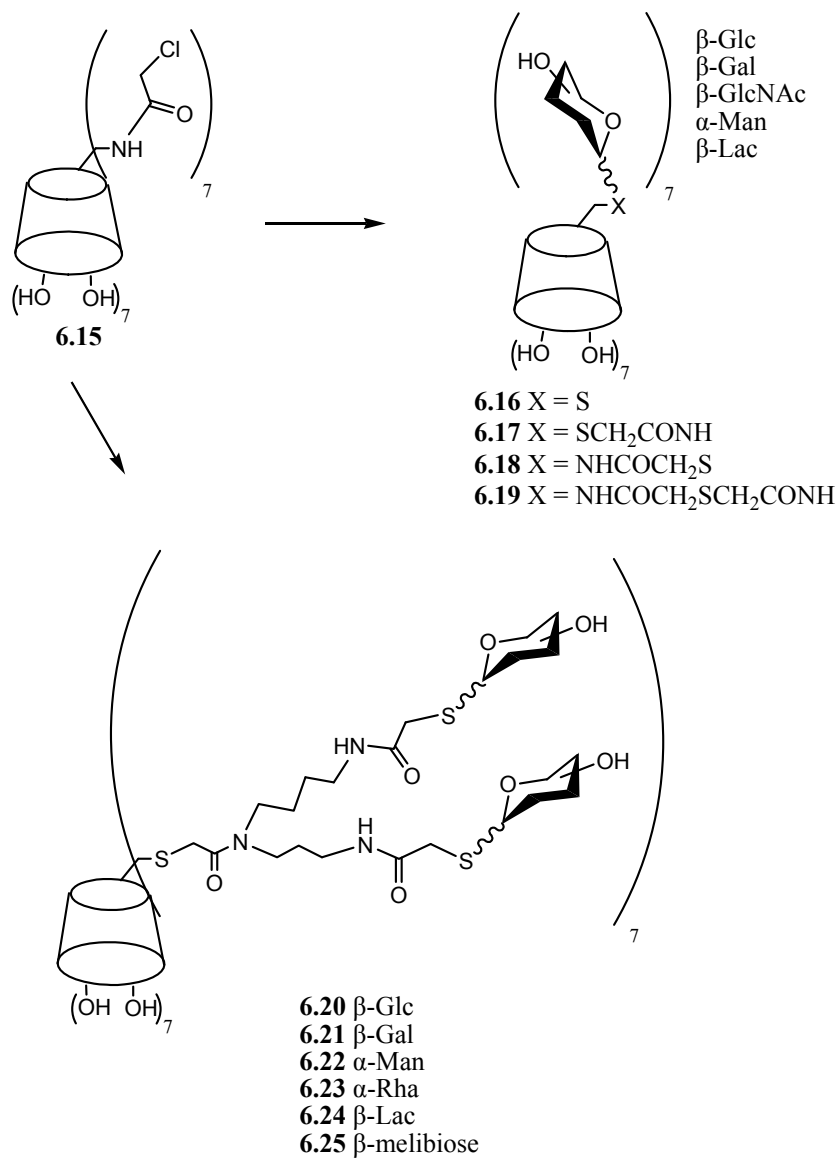
Σχήμα 6.4: Υδατανθρακικά συμπλέγματα^{16,17}

Καθώς λοιπόν είχε διαπιστωθεί ότι η χρήση αλειφατικής γέφυρας σύνδεσης αυξάνει την ικανότητα παρεμπόδισης η ομάδα του Furuike *et al.*^{10,18} συνέθεσε τα προϊόντα **6.11**, **6.12**, **6.13**, **6.14** και μελέτησε την ικανότητα τους να αλληλεπιδρούν με τις βακτηριακές λεκτίνες wheat germ (*Triticum vulgare*) agglutinin (WGA) και *Erythrina coralloidendron* (eCorL) που αναγνωρίζουν τα αντίστοιχα σάκχαρα. Διαπίστωσε ότι τα υδατανθρακικά συμπλέγματα που φέρουν επτά υδατανθρακικούς υποκαταστάτες έχουν ισχυρότερη αλληλεπίδραση από ότι τα αντίστοιχα μονομερή. Συγκεκριμένα η MIC (minimum inhibition concentration) ήταν 40 φορές υψηλότερη στην περίπτωση των υδατανθρακικών συμπλεγμάτων.



Σχήμα 6.5: Υδατανθρακικά συμπλέγματα^{10,18}

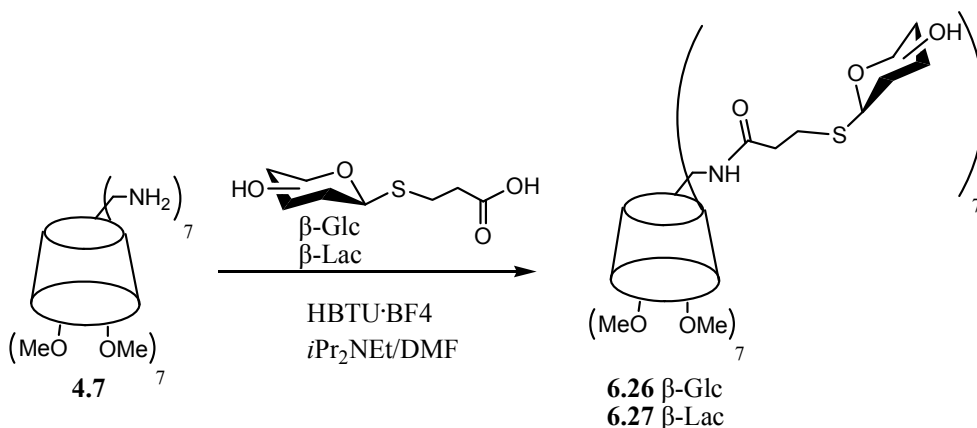
Η ίδια ερευνητική ομάδα συνέθεσε και τα παρακάτω υδατανθρακικά συμπλέγματα.^{39,20,21,22,23}



Σχήμα 6.6: Υδατανθρακικά συμπλέγματα¹⁹⁻²³

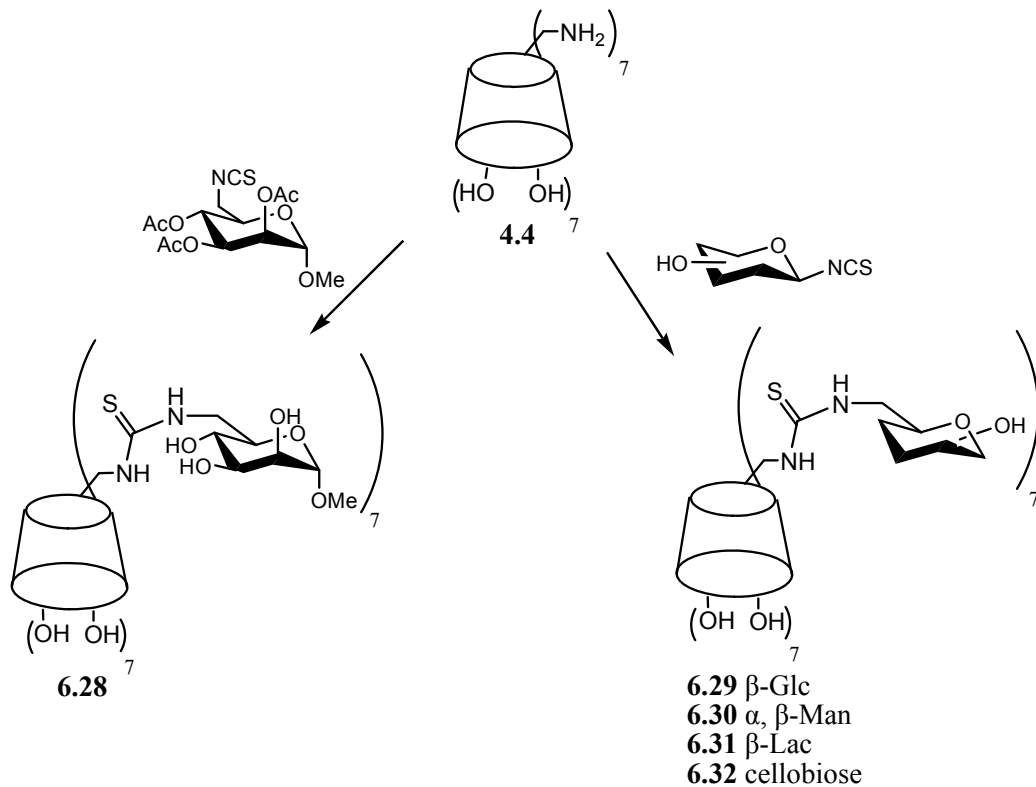
Διαπιστώθηκε ότι οι γέφυρες σύνδεσης επηρεάζουν την ικανότητα αλληλεπίδρασης με πρωτεϊνικά υποστρώματα ανάλογα με τη χημική τους φύση. Ωστόσο αύξηση των υποκαταστατών από 7 σε 14, αυξάνει την ικανότητα αλληλεπίδρασης αλλά μειώνει τη ικανότητα συμπλοκοποίησης.

Η ομάδα του Stoddart *et al.*²⁴ συνέθεσε κυκλοδεξτρινικά συμπλέγματα που φέρουν μεθόξυ ομάδες στη δευτεροταγή πλευρά.



Σχήμα 6.7: Υδατανθρακικά συμπλέγματα²⁴

Άλλος τρόπος προσέγγισης σύζευξης κυκλοδεξτρινών με σάκχαρα είναι μέσω γεφυρών θειουρίας.^{25,26} Ενδεικτικά αναφέρονται κάποια υδατανθρακικά συμπλέγματα που προέκυψαν κατά αυτόν τον τρόπο.



Σχήμα 6.8: Υδατανθρακικά συμπλέγματα^{25,26}

Σκοπός της εργασίας μας, είναι η σύνθεση νέων κυκλοδεξτρινών πλήρως και μονο-υποκατεστημένων στην πρωτοταγή πλευρά με νέους συνδέσμους και πέντε διαφορετικά σάκχαρα αναγνώρισης βακτηριακών λεκτινών, ακολουθώντας διαφορετική μεθοδολογία από τις ήδη υπάρχουσες.

Ωστόσο το ενδιαφέρον μας κυρίως εστιάζεται στις πλήρως υποκατεστημένες κυκλοδεξτρίνες καθώς υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές, οι οποίες υποστηρίζουν ότι είναι αποτελεσματικότερες στην αναγνώριση των λεκτινών των βακτηριακών κυττάρων.

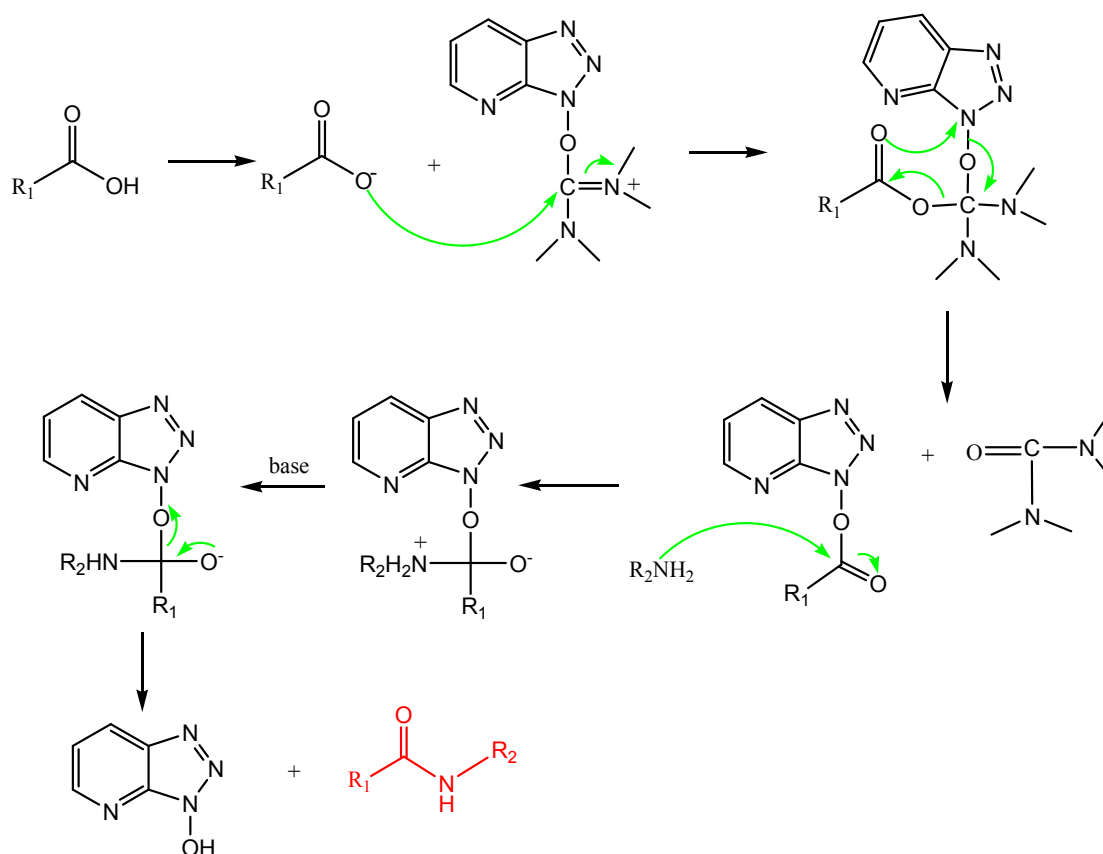
Επιλέχθηκαν κυκλοδεξτρίνες που φέρουν καρβοξυλικές ομάδες στην πρωτοταγή τους πλευρά για να συζευχθούν με σάκχαρα που φέρουν αμινο ομάδες, καθώς και κυκλοδεξτρίνες που φέρουν αμινο ομάδες στην πρωτοταγή τους πλευρά για να συζευχθούν με σάκχαρα που φέρουν καρβοξυλικές ομάδες.

Έπειτα από διαφορετικές προσεγγίσεις σύζευξης σακχάρων με κυκλοδεξτρίνες, επελέγη το τετρα-μεθυλοουρονικό άλας του εξαθοροφωσφορικού αζαβενζοτριάζολίου (HATU²⁵), έναντι του πλέον κλασσικού

δικυκλοεξυλοκαρβοδιμιδίου (DCC). Η χρήση του HATU πλεονεκτεί σε σχέση με παλαιότερες μεθόδους^{27,28} καθώς τα προϊόντα λαμβάνονται σε ιδιαίτερα καθαρή μορφή χωρίς μη υδατοδιαλυτές προσμίξεις.

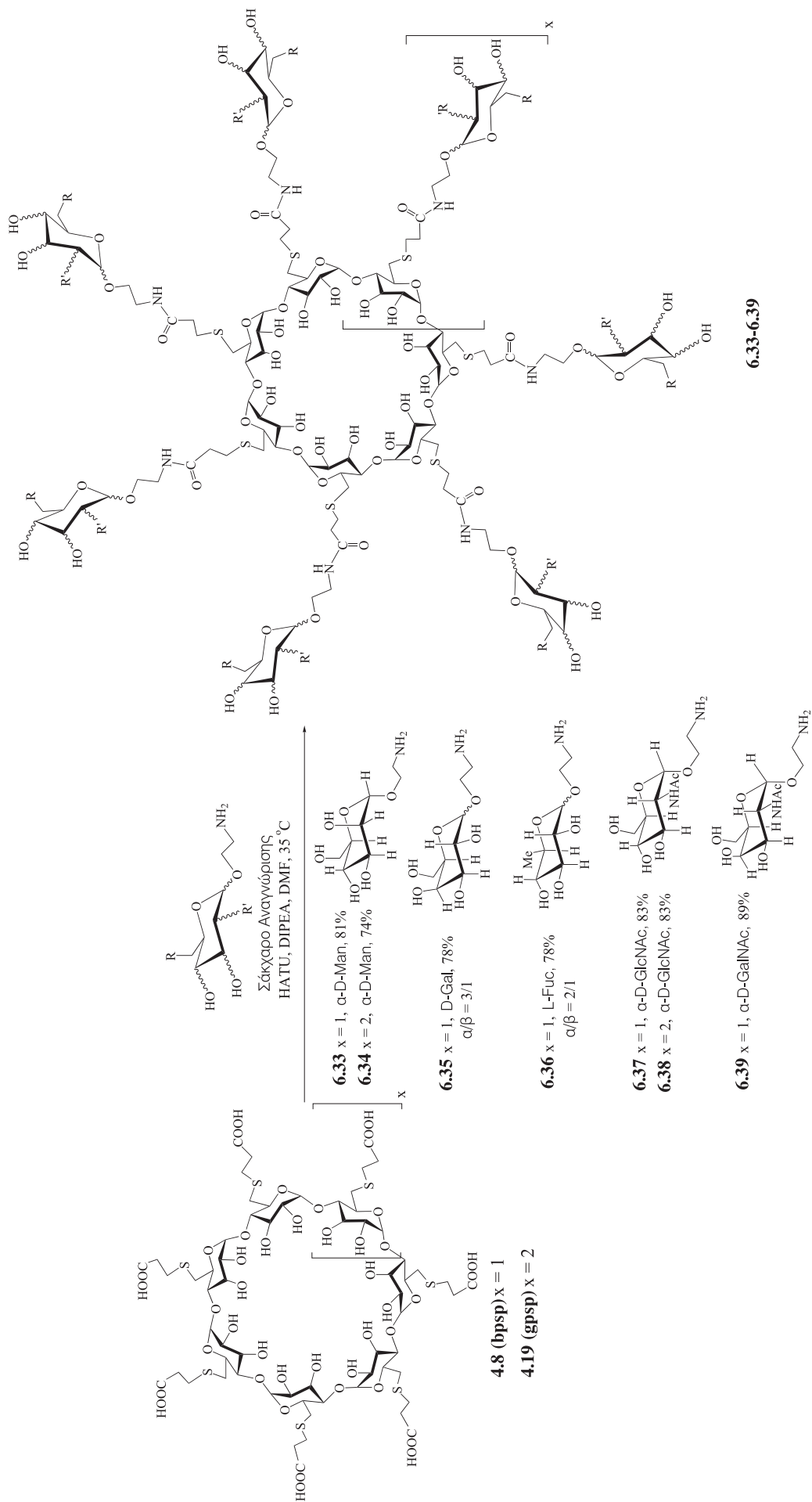
6.2 Σύνδεση αμινο σακχάρων με καρβόξυ κυκλοδεξτρίνες

Για τις συνθέσεις χρησιμοποιήθηκαν οι γνωστές βιβλιογραφικά καρβοξυλιωμένες κυκλοδεξτρίνες **bpsp**,²⁹ **gpsp**,²⁹ οι οποίες συζεύχθηκαν με πέντε διαφορετικά σάκχαρα αναγνώρισης (μονοσακχαρίτες) ενωμένα με μικρή αλειφατική γέφυρα με τελική αμινο ομάδα, η σύνθεση των οποίων αναλύθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο (κεφ. 5). Η σύζευξη αφορούσε δημιουργία πεπτιδικού δεσμού άρα συνθήκες με *N*-υδροξυβενζοτρίαζόλιο (HOBT) και DCC. Όμως τα προκύπτοντα προϊόντα ήταν ανεπαρκώς υποκατεστημένα και παρουσίασαν δυσκολίες στην απομάκρυνση των παραπροϊόντων, κυρίως της δι(κυκλοεξυλο)ουρίας. Τελικώς η χρήση του αντιδραστήριου HATU έδωσε πολύ πιο καθαρά και διαχωρίσιμα προϊόντα. Παρουσία βάσης το HATU μετατρέπει τα καρβοξυλικά οξέα στους αντίστοιχους ενεργούς εστέρες του αζαβενζοτρίαζολίου (RCOOAt). Οι εστέρες αυτοί είναι πιο δραστικοί από τους εστέρες OBt καθώς η OAt είναι καλύτερη αποχωρούσα ομάδα.³⁰ Επιπλέον αντιδράσεις σύζευξης που πραγματοποιούνται με αντιδραστήρια, τα οποία βασίζονται στο HOAt όπως το HATU, έχουν σαν αποτέλεσμα να πραγματοποιούνται με τρόπο γρηγορότερο και αποδοτικότερο χωρίς ιδιαίτερο επιμερισμό, εφ'όσον υπάρχει ασύμμετρο υπόστρωμα. Στο σχήμα που ακολουθεί (Σχήμα 6.9) δίνεται ο μηχανισμός της αντίδρασης σύζευξης ενός καρβοξυλικού οξέος με μίας πρωτοταγούς αμίνης χρησιμοποιώντας ως αντιδραστήριο σύζευξης το HATU.



Σχήμα 6.9: Μηχανισμός δημιουργίας πεπτιδικού δεσμού μέσω HATU³⁰

Στο Σχήμα 6.10 συνοψίζονται τα αντιδραστήρια, οι συνθήκες, οι αποδόσεις και τα ποικίλα προϊόντα που ελήφθησαν με βάση τις **bpsp** και **gpsp** (4.8 και 4.19, αντιστοίχως). Τα σάκχαρα που εισήχθησαν στην πρωτοταγή πλευρά, α -D-Man (5.14), D-Gal (5.21), L-Fuc (5.28), α -D-GlcNAc (5.31), α -D-GalNAc (5.35) μετά από σύζευξη της τελικής τους αμινομάδας με τα καρβοξύλια των 4.8 και 4.19, τελικώς ενώνονται με γέφυρες έξι δεσμών. Κατά τα προηγούμενα, το μήκος της γέφυρας σύνδεσης μπορεί να θεωρηθεί επαρκές ώστε να μην μειωθεί η δραστηκότητα των συμπλεγμάτων στην αναγνώριση ή την συμπλοκοποίηση.

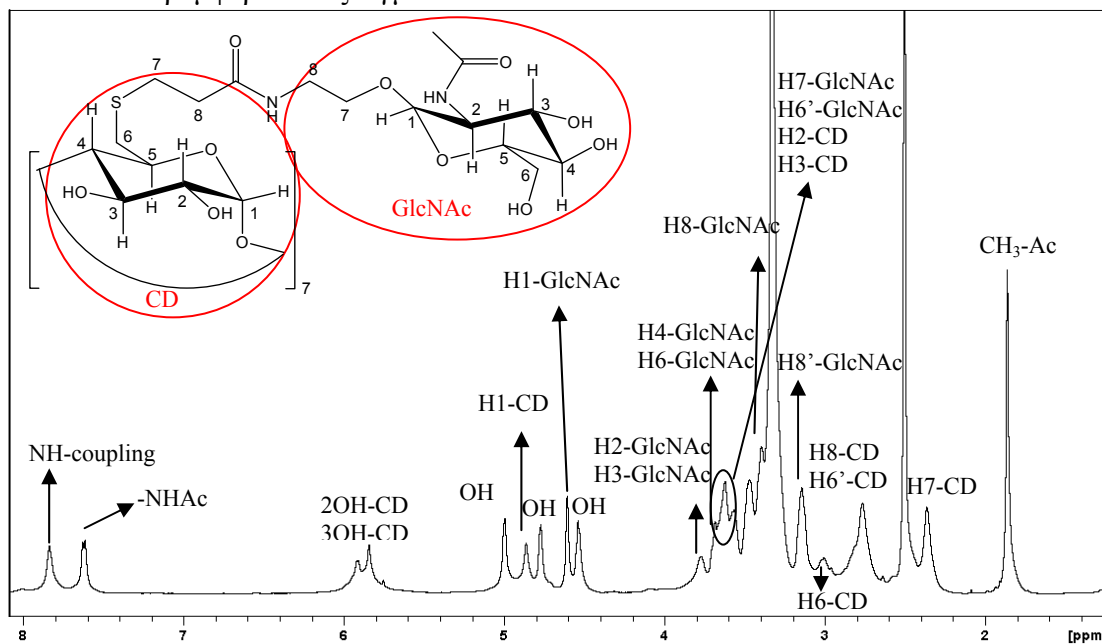


Σχήμα 6.10: Σύνθεση σακχαρών με κυκλοδεξτρίνες μέσω αμιδικών δεσμών

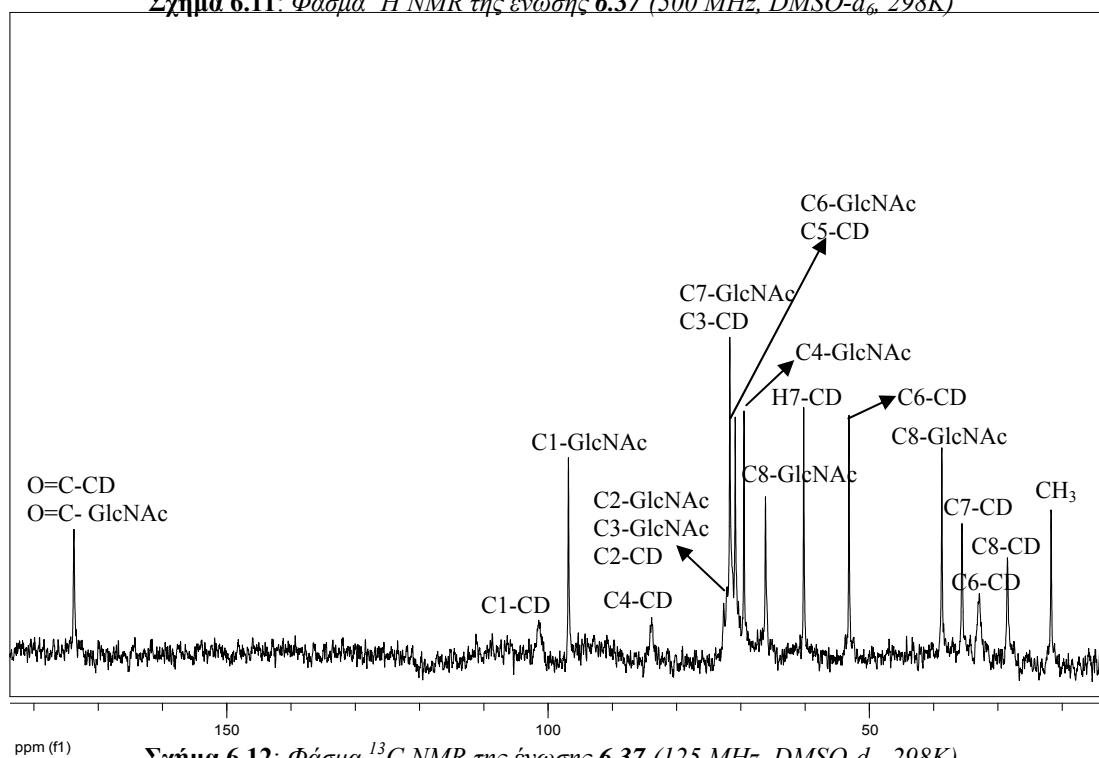
Κατά τις αντιδράσεις αυτές, προέκυψαν 7 διαφορετικά προϊόντα, τα οποία φέρουν σάκχαρα αναγνώρισης βακτηριακών λεκτινών στην πρωτοταγή τους πλευρά και προσομοιάζουν αρκετά σε ήδη γνωστά βιβλιογραφικά υδατανθρακικά συμπλέγματα. Τα προϊόντα ελήφθησαν σε καθαρή μορφή και σε πολύ καλές αποδόσεις. Προκειμένου να ταυτοποιηθούν τα προϊόντα ελήφθησαν φάσματα NMR δύο διαστάσεων ομοπυρηνικού και ετεροπυρηνικού συσχετισμού. Η δημιουργία του αμιδικού δεσμού και επομένως η απόδειξη ότι πραγματοποιήθηκε επιτυχώς αντίδραση σύζευξης σε όλα τα καρβοξύλια της πρωτοταγούς πλευράς πιστοποιήθηκε με φάσμα HMBC. Το φάσμα HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation), προσδιορίζει τη σύνδεση ετεροπυρηνικών spin μέσω πολλών δεσμών ($^2J_{H-C}$, $^3J_{H-C}$ κυρίως) και η χρησιμότητά του έγκειται στη συσχέτιση διαφορετικών πυρήνων, εν προκειμένω 1H και ^{13}C , ανάμεσα στους οποίους μεσολαβούν περισσότεροι του ενός δεσμοί.

Ενδεικτικά παρουσιάζονται στα σχήματα που ακολουθούν τα φάσματα NMR του προϊόντος **6.37** (b₁sp-GlcNAc) και αναλύεται η διαδικασία με την οποία από τα φάσματα 2Δ ταυτοποιήθηκε το τελικό προϊόν. Στο φάσμα 1H NMR του **6.37** σε DMSO-*d*₆ (Σχήμα 6.11) εμφανίζονται σχετικώς διευρυμένες κορυφές, οι οποίες αποδίδονται στο κυκλοδεξτρινικό μέρος του μορίου. Επιπλέον πιστοποιείται η ύπαρξη δύο κορυφών στην περιοχή 8.5-7.0 ppm, τυπική περιοχή εμφάνισης των αμιδίων. Το ένα αμίδιο εμφανίζεται στα 7.62 ppm και αποδίδεται στο αμίδιο της ακέτυλο ομάδας του σακχάρου, ενώ το άλλο αμίδιο εμφανίζεται στα 7.83 ppm και αποδίδεται στο αμίδιο που προκύπτει λόγω της σύζευξης των δύο συστατικών. Η ύπαρξη σακχάρου (GlcNAc) πιστοποιείται από την ύπαρξη της ακέτυλο κορυφής (~1.9 ppm), ενώ η περιοχή 4.0-2.2 ppm καλύπτεται από ποικιλία κορυφών (βCD και GlcNAc). Επιπροσθέτως, παρατηρούνται οι κορυφές που οφείλονται στα υδροξύλια στις θέσεις 2 και 3 (OH₂ και OH₃) της βCD (~6.0 ppm), ενώ στην περιοχή 4.5-5.0 ppm, υπάρχουν πέντε απλές κορυφές, οι οποίες αποδίδονται σε υδροξύλια αλλά και ανωμερικά πρωτόνια H1. Η διευκρίνιση της φύσης των πέντε αυτών κορυφών αλλά και η απόδοση αρκετών κορυφών στην περιοχή 4.0-2.2 ppm προέκυψε από το φάσμα HSQC (Σχήμα 6.13). Ωστόσο στο φάσμα ^{13}C (Σχήμα 6.12) οι κορυφές του μικρού σακχάρου είναι οξείες και αντικατοπτρίζουν συμμετρικώς υποκατεστημένα μόρια, γεγονός που αποδεικνύει την πλήρη υποκατάσταση στην πρωτοταγή πλευρά. Οι κορυφές του κυκλοδεξτρινικού μακροκυκλίου, είναι σχετικώς ασθενείς και διευρυμένες. Αυτό το γεγονός, αν και κατ'αρχήν προκαλεί ερωτηματικά, εν τούτοις

μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι υπάρχει μειωμένη ευκαμψία στο μακροκύκλιο σε σχέση με τους υδατανθρακικούς υποκαστάτες, επομένως είτε συνυπάρχουν πολλές ελαφρώς διαφορετικές (με πολύ μικρο ΔG^0) διαμορφώσεις του μακροκυκλίου, είτε μειωμένη ικανότητα αποδιέγερσης των ατόμων μέσω κινήσεων των δεσμών. Το φαινόμενο αυτό έχει αναφερθεί επανειλημμένως στην βιβλιογραφία^{10,31} για φάσματα ^{13}C NMR παρεμφερών συζευγμάτων.

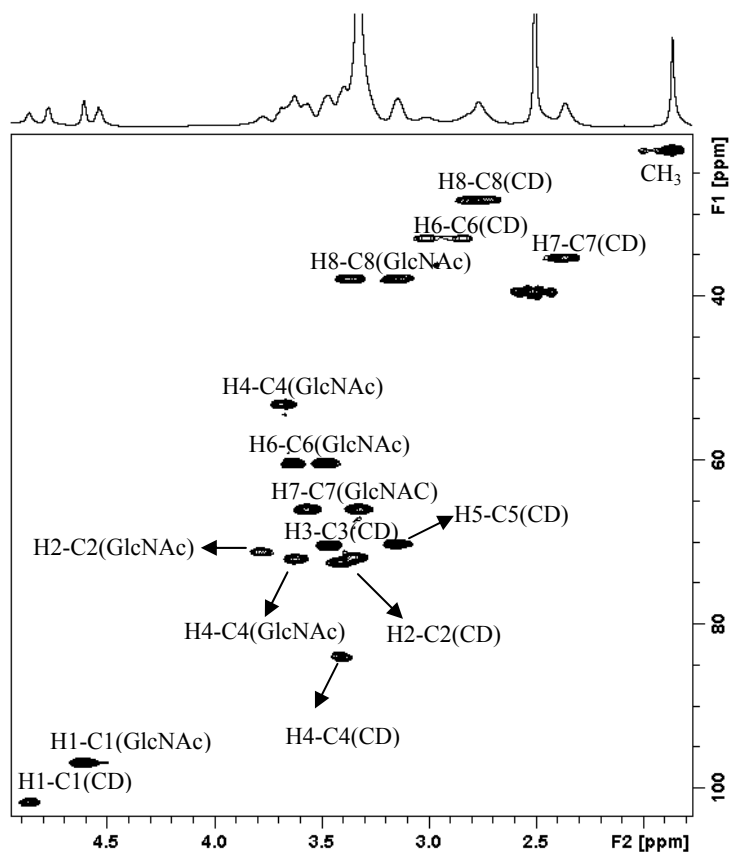


Σχήμα 6.11: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης 6.37 (500 MHz, DMSO-d_6 , 298K)



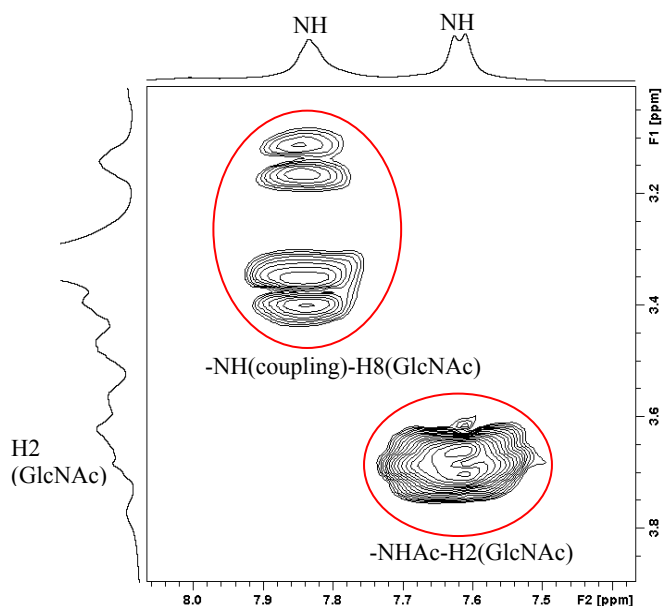
Σχήμα 6.12: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 6.37 (125 MHz, DMSO-d_6 , 298K)

Καθώς το HSQC προσδιορίζει τη σύνδεση ετεροπυρηνικών spin μέσω ενός χημικού δεσμού ($J^{1\text{H}-^{13}\text{C}}$) τα πρωτόνια των υδροξυλίων δεν θα εμφανίσουν κορυφές διαστάυρωσης (contours) με ^{13}C . Επομένως αποδίδονται τα υδροξύλια στο φάσμα ^1H NMR, και εν συνεχεία τα μεθυλενικά πρωτόνια (CD-C6, C7, C8 και GlcNAC-C6, C7, C8). Κυρίως όμως φαίνεται ότι οι κορυφές στα 7.62 και 7.83 ppm (περιοχή αμιδίων) δεν αντιστοιχούν σε σήματα ^{13}C άρα πρόκειται για κορυφές αμιδίων.



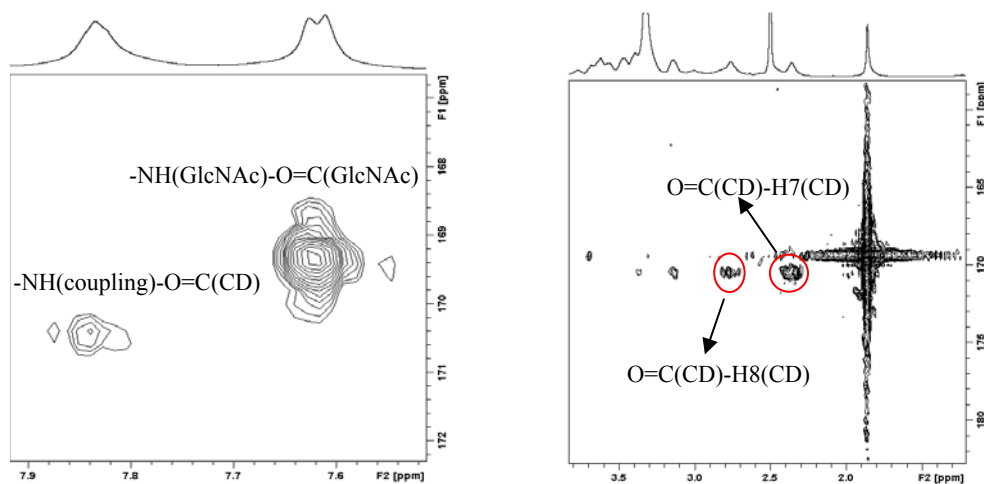
Σχήμα 6.13: Φάσμα HSQC της ένωσης 6.37 (500 MHz, DMSO- d_6 , 298K)

Από το φάσμα 2D COSY (Σχήμα 6.14), το οποίο δίνει πληροφορίες για τη σύζευξη πυρήνων του ίδιου είδους μέσω χημικών δεσμών, διαπιστώνεται ότι το αμίδιο στα 7.62 ppm, το οποίο εμφανίζεται ως διπλή κορυφή ($J = 7.8$ Hz) ανήκει στο σάκχαρο, καθώς φαίνεται η σύζευξή του με το H2 του σακχάρου. Επίσης το αμίδιο στα 7.83 ppm συζεύγνυται με δύο γειτονικά πρωτόνια. Τα πρωτόνια αυτά ανήκουν στον C8 του σακχάρου. Η μορφή λοιπόν του αμιδίου στα 7.83 ppm αναμένεται να είναι μια διπλή διπλών κορυφή.



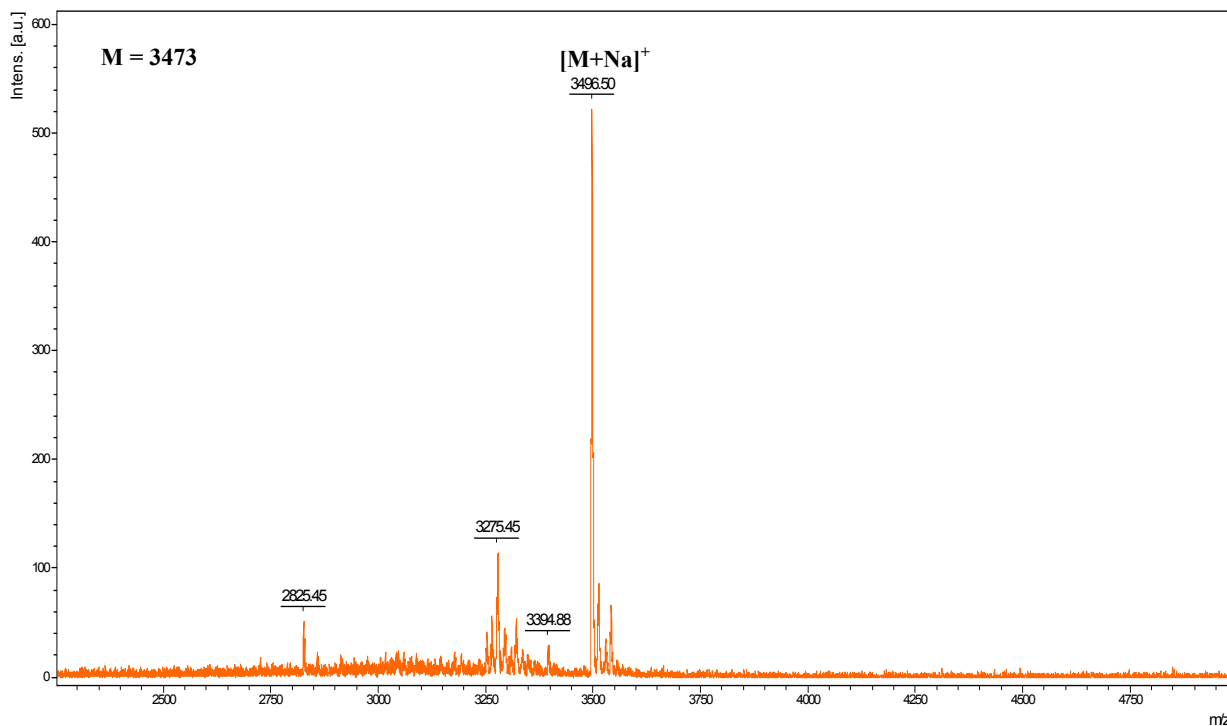
Σχήμα 6.14: Φάσμα COSY της ένωσης 6.37 (500 MHz, DMSO- d_6 , 298K)

Τέλος από την κορυφή διασταύρωσης που αντιστοιχεί σε συσχέτιση του O=C της υποκατεστημένης γλυκόζης με το NH του υποκαταστάτη στο φάσμα 2D HMBC (Σχήμα 6.15) επιβεβαιώνεται η προσάρτηση των τροποποιημένων σακχάρων στην πρωτοταγή πλευρά της κυκλοδεξτρίνης.



Σχήμα 6.15: Φάσμα HMBC της ένωσης 6.37 (500 MHz, DMSO- d_6 , 298K)

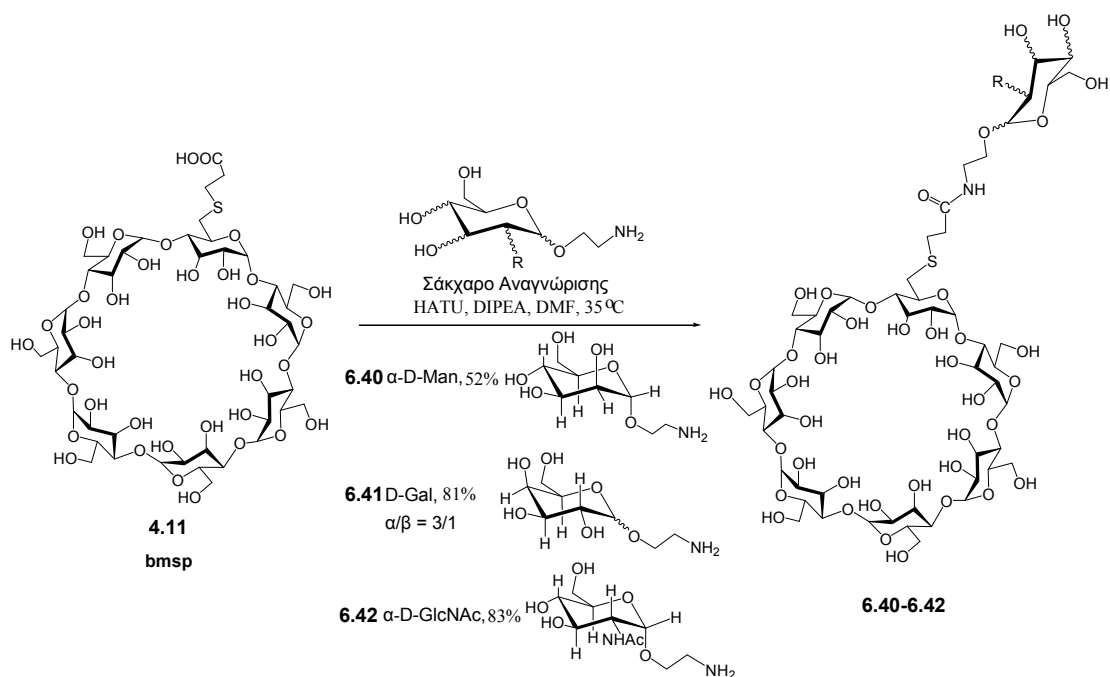
Επιπλέον πιστοποίηση ότι πρόκειται για πλήρως υποκατεστημένα προϊόντα προέκυψε με τη λήψη φασματοσκοπίας μάζας, με την μέθοδο Matrix Assisted Laser Desorption-Time of Flight (MALDI-TOF). Στο φάσμα του σχήματος 6.16, παρατηρείται ένα κύριο σήμα, το οποίο αντιστοιχεί σε m/z του μοριακού ιόντος με προσθήκη ενός ατόμου νατρίου. Η έλλειψη άλλων μεγάλων κορυφών και η απουσία θορύβου δείχνει ότι η ένωση **6.37** είναι απαλλαγμένη από προσμίξεις με μικρό βαθμό υποκατάστασης.



Σχήμα 6.16: Φάσμα MALDI-MS της ένωσης **6.37**

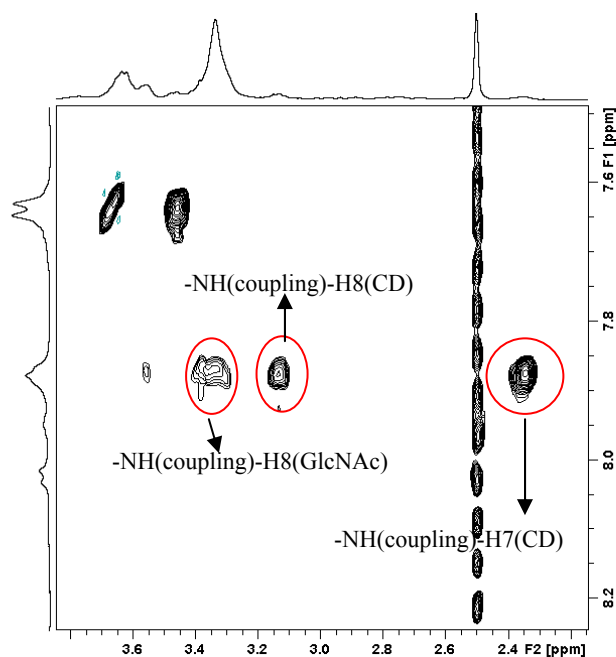
Η ανωτέρω φασματοσκοπική ανάλυση (Σχήμα 6.11-Σχήμα 6.16), η οποία έδωσε πλήρη ταυτοποίηση της δομής και της καθαρότητας του συμπλέγματος **6.37** ακολουθήθηκε και για τα υδατανθρακικά συμπλέγματα **6.33-6.36**, **6.38** και **6.39**.

Εκτός βέβαια από πλήρως υποκατεστημένες κυκλοδεξτρίνες, συντέθηκαν και μονοϋποκατεστημένες κυκλοδεξτρίνες, δηλαδή παράγωγα που φέρουν στην πρωτοταγή τους πλευρά ένα σάκχαρο αναγνώρισης βακτηριακών λεκτινών. Συγκεκριμένα, συντέθηκαν οι 2'-αμινοαιθυλο-*O*- α -D-μαννοπυρανόζη **5.12**, 2'-αμινοαιθυλο-*O*- α,β -D-γαλακτόζη **5.19** και 2'-αμινοαιθυλο-2-ακεταμιδο-2-δεοξυ- α -D-γλυκόζη **5.29**. Σκοπός αυτών των συνθέσεων ήταν να παραχθούν μονο-6-παράγωγα, αντίστοιχα των περι-6-παραγώγων, ώστε να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα ελέγχου δραστηριότητας των τελευταίων.



Σχήμα 6.17: Μονοϋποκατεστημένες κυκλοδεξτρίνες με σάκχαρα

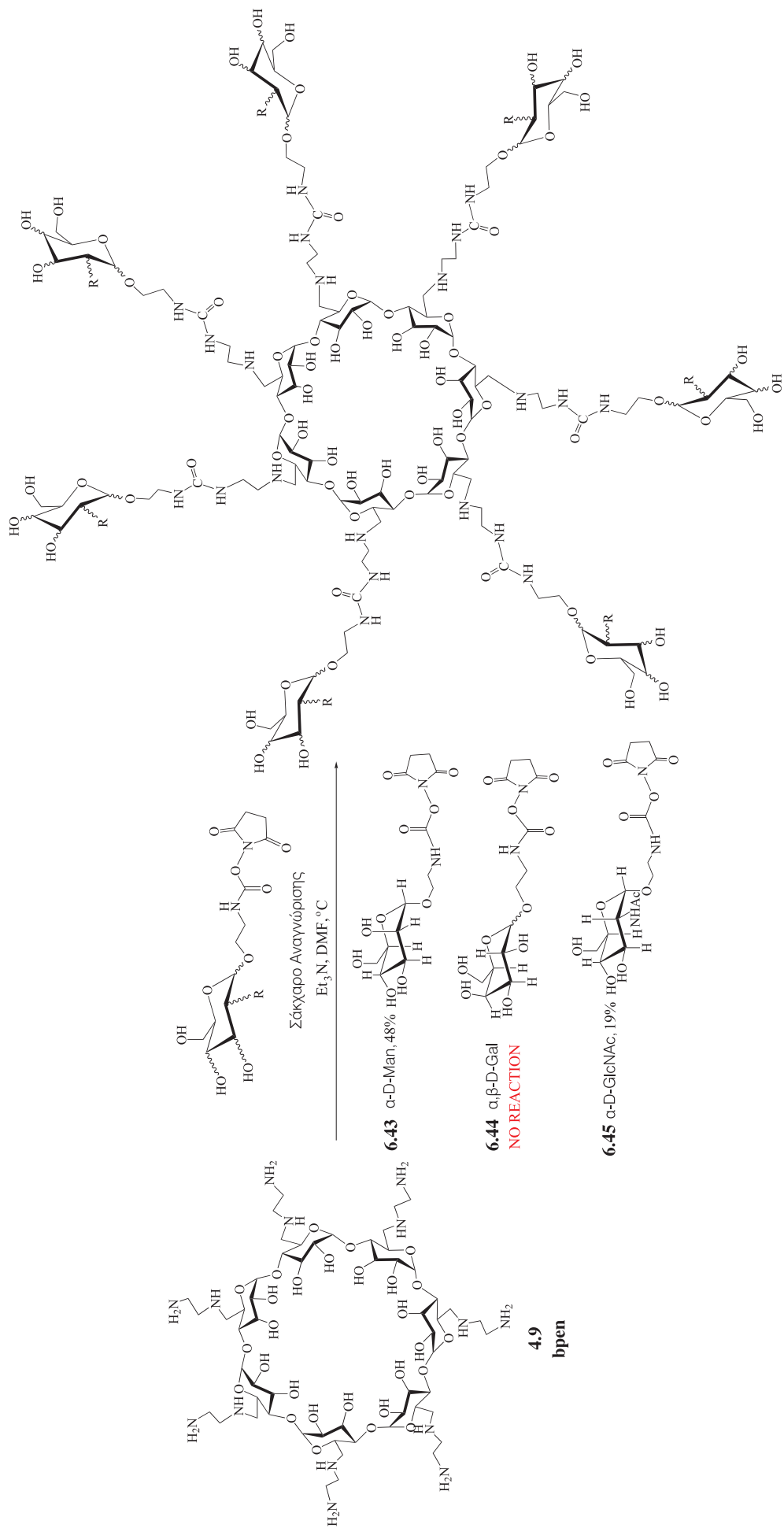
Η ταυτοποίηση των προϊόντων έγινε με φασματοσκοπική ανάλυση ανάλογη με αυτήν των πλήρως υποκατεστημένων προϊόντων με μοναδική διαφορά ότι η επιβεβαίωση της επιτυχούς αντίδρασης σύζευξης πιστοποιήθηκε με φάσμα ομοπυρηνικού συντονισμού 2D ROESY αντί του φάσματος ετεροπυρηνικού συντονισμού HMBC. Ο λόγος για τον οποίο έγινε αυτή η επιλογή είναι ότι το φάσμα ROESY (Rotating frame Overhause Effect SpectroscopY) προσδιορίζει τις αλληλεπιδράσεις μέσω χώρου και είναι πείραμα υψηλότερης ευαισθησίας από το HMBC, καθώς δίνει πληροφορίες για την συσχέτιση πυρήνων ^1H - ^1H , δηλαδή πυρήνων με υψηλή ισοτοπική αφθονία και ευαισθησία. Στην προκειμένη δε περίπτωση υπήρξε επαρκής ανάλυση (resolution) των κορυφών ενδιαφέροντος των προϊόντων, ώστε τα φάσματα να είναι αναγνώσιμα. Ενδεικτικά παρουσιάζεται το ROESY του υδατανθρακικού συμπλέγματος **6.42** (bmsp-GlcNAc) σε $\text{DMSO-}d_6$, από το οποίο διαπιστώνεται η επιτυχής σύζευξη της αμινο ομάδας του σακχάρου με την καρβόξυλο ομάδα της κυκλοδεξτρίνης. Αναλυτικότερα είναι εμφανής η αλληλεπίδραση του NH με τις μεθυλενομάδες H8 και H7 της κυκλοδεξτρίνης.²² Η πιστοποίηση του προϊόντος **6.42** έγινε και με φασματοσκοπία μάζας, στην οποία παρατηρείται το μοριακό ιόν στα $m/z = 1491.7$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$.



Σχήμα 6.18: Φάσμα ROESY της ένωσης 6.42 (500 MHz, DMSO- d_6 , 298K)

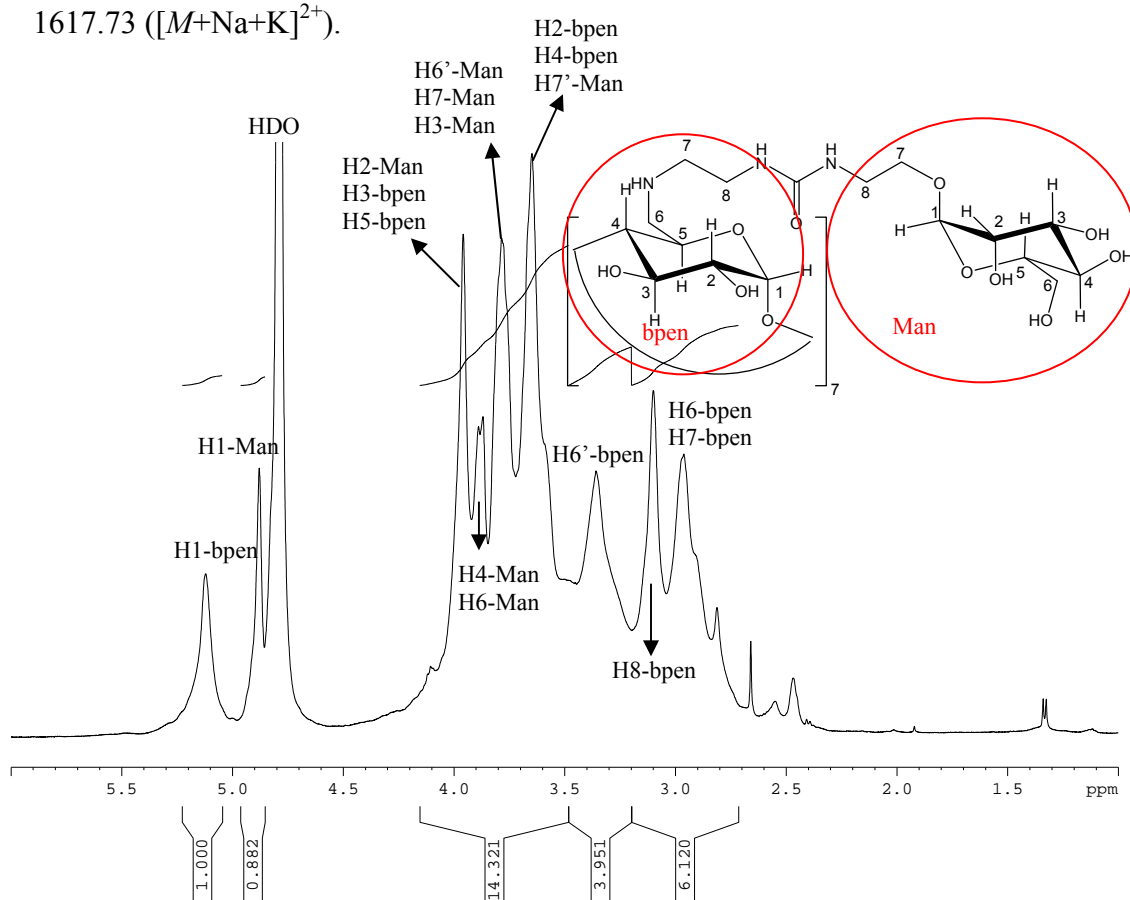
6.3 Σύνδεση καρβόξυ σακχάρων με αμινο κυκλοδεξτρίνες

Ένας διαφορετικός τρόπος προσέγγισης εισαγωγής υδατανθράκων στην πρωτοταγή πλευρά κυκλοδεξτρινών είναι να χρησιμοποιηθούν κυκλοδεξτρίνες που φέρουν αμινο ομάδες στην πρωτοταγή τους πλευρά για να συζευχθούν με σάκχαρα που φέρουν καρβοξυλικές ομάδες. Η ιδέα αυτή προσεγγίστηκε με δύο διαφορετικούς συνθετικούς τρόπους. Ο πρώτος τρόπος στηρίζεται στην εισαγωγή κατάλληλης ομάδας στα σάκχαρα που φέρουν αμινο ομάδα έτσι ώστε να μπορούν να αντιδράσουν με την τροποποιημένη CD 4.9 (bren).³² Η κατάλληλη ομάδα είναι το αντιδραστήριο ανθρακικός εστέρας του *N,N'*-διηλεκτρολυοϊμιδίου (*N,N'*-Disuccinimidyl carbonate) DSC,^{33,34} το οποίο αντιδρά αμφιπλεύρως με αμινο-υποκατεστημένα μόρια, τα οποία συνδέονται τελικώς με ομάδα ουρίας. Για το λόγο αυτό συντέθηκαν τα σάκχαρα 5.14, 5.20, 5.30 και δοκιμάστηκε σε βασικές συνθήκες η ένωσή τους με την CD 4.9 (Σχήμα 6.19).

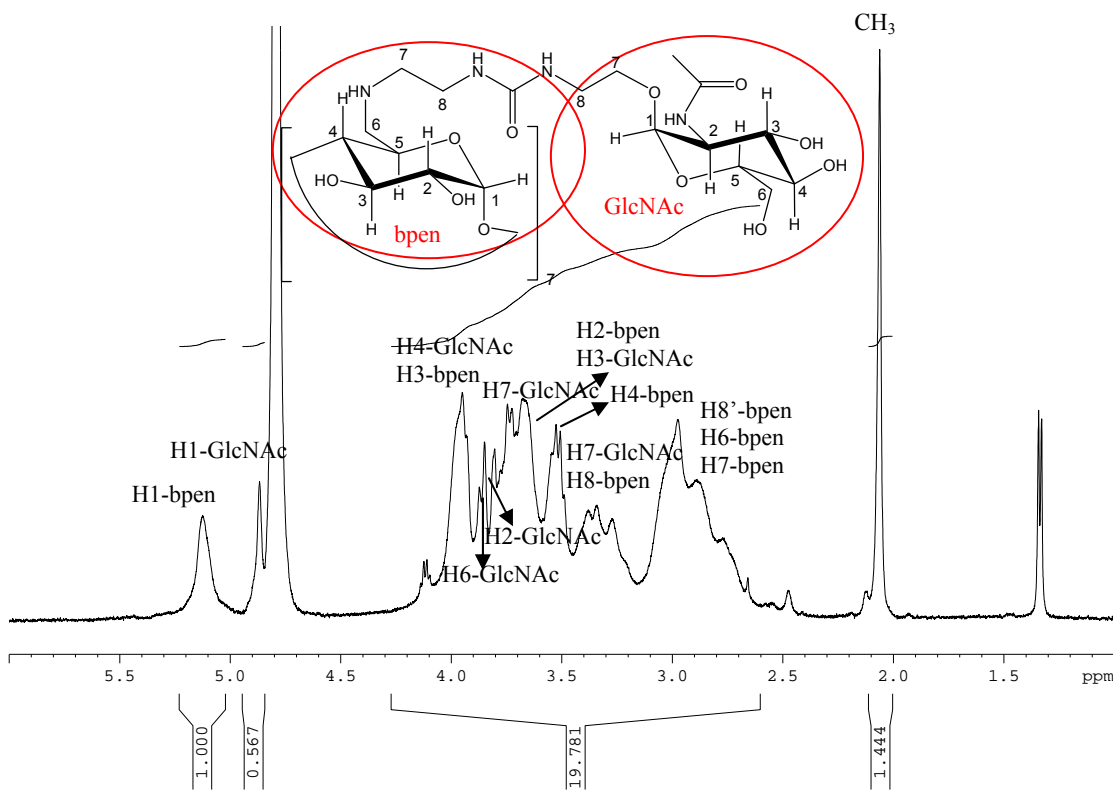
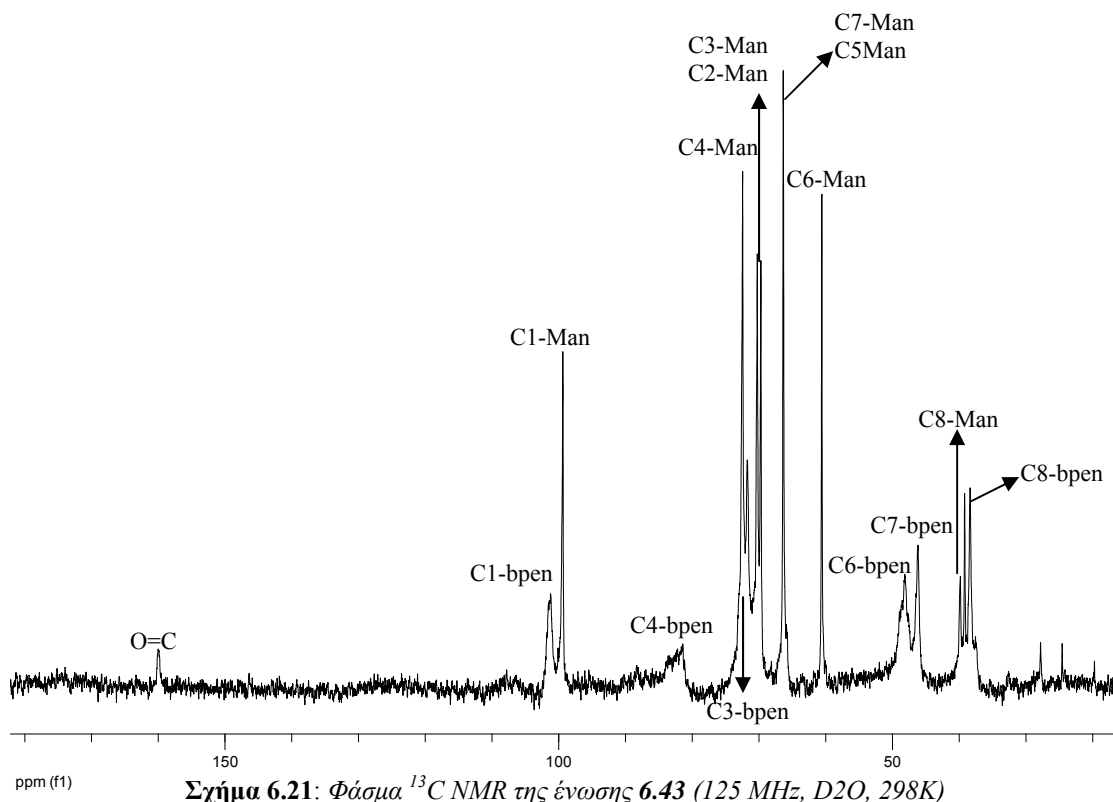


Σχήμα 6.19: Σύνδεση σακχάρων με κυκλιδεξτρίνες μέσω γέφυρας τύπου ουρίας

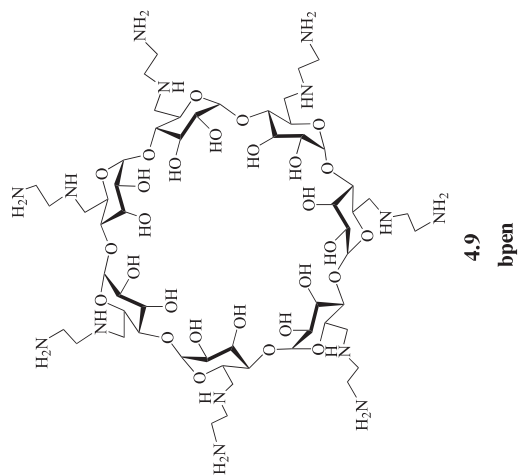
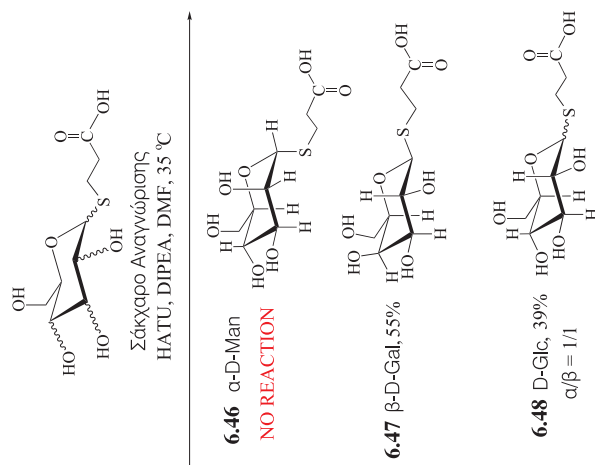
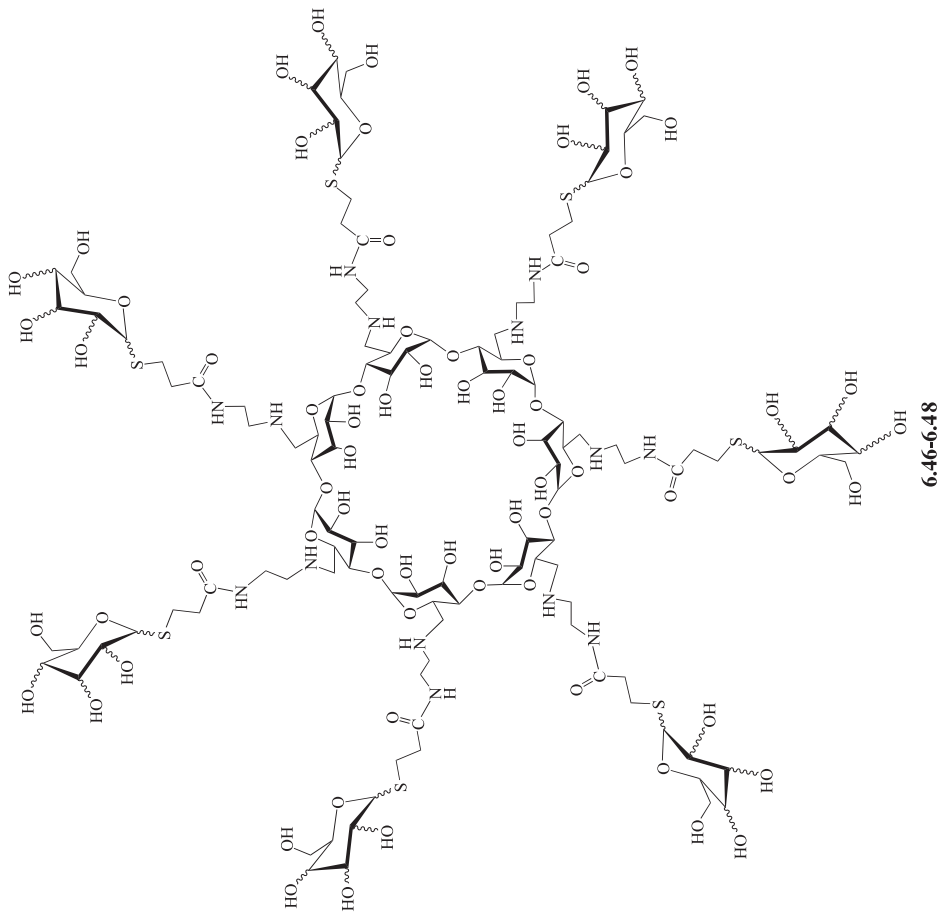
Από τα τρία διαφορετικά σάκχαρα με DSC στο τελικό τους άκρο (**6.43**, **6.44** και **6.45**) που δοκιμάστηκαν, επιτυχή αντίδραση έδωσαν τα δύο (**6.43** και **6.45**) αλλά και αυτά όχι σε ιδιαίτερα υψηλή απόδοση (48% και 19%). Χαρακτηριστικό των προϊόντων αυτών ήταν ότι το φάσμα ^1H NMR σε $\text{DMSO-}d_6$ εμφάνιζε διευρυμένες κορυφές, γεγονός που δεν επέτρεπε την λήψη φασμάτων 2Δ και επομένως τον απόλυτα ακριβή χαρακτηρισμό των προϊόντων. Ωστόσο έχοντας ταυτοποιήσει τα αρχικά προϊόντα έγινε προσπάθεια απόδοσης της κάθε κορυφής στα φάσματα ^1H και ^{13}C NMR. Τα τελευταία, εμφάνιζαν διευρυμένες κορυφές για τα σήματα της bpen, αλλά οξείες για τα σήματα του συνεζευγμένου σακχάρου, όπως και οι προηγούμενες ενώσεις. Στα σχήματα που ακολουθούν παρουσιάζονται τα φάσματα ^1H και ^{13}C NMR του προϊόντος **6.43** (bpen- α -Man) και το φάσμα ^1H NMR του προϊόντος **6.45** (bpen- α -GlcNAc). Επίσης από το φάσμα ^1H NMR του προϊόντος **6.43** διαπιστώνεται, σύμφωνα με την ολοκλήρωση των κορυφών, ότι πρόκειται για πλήρως υποκατεστημένο προϊόν, ενώ το φάσμα ^1H NMR του προϊόντος **6.45** δείχνει μικρότερο βαθμό υποκατάστασης (50%). Η πιστοποίηση του προϊόντος **6.43** έγινε και με φασματοσκοπία μάζας, στην οποία παρατηρείται το μοριακό ιόν στα $m/z = 1617.73$ ($[M+\text{Na}+\text{K}]^{2+}$).



Σχήμα 6.20: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **6.43** (500 MHz, D_2O , 298K)

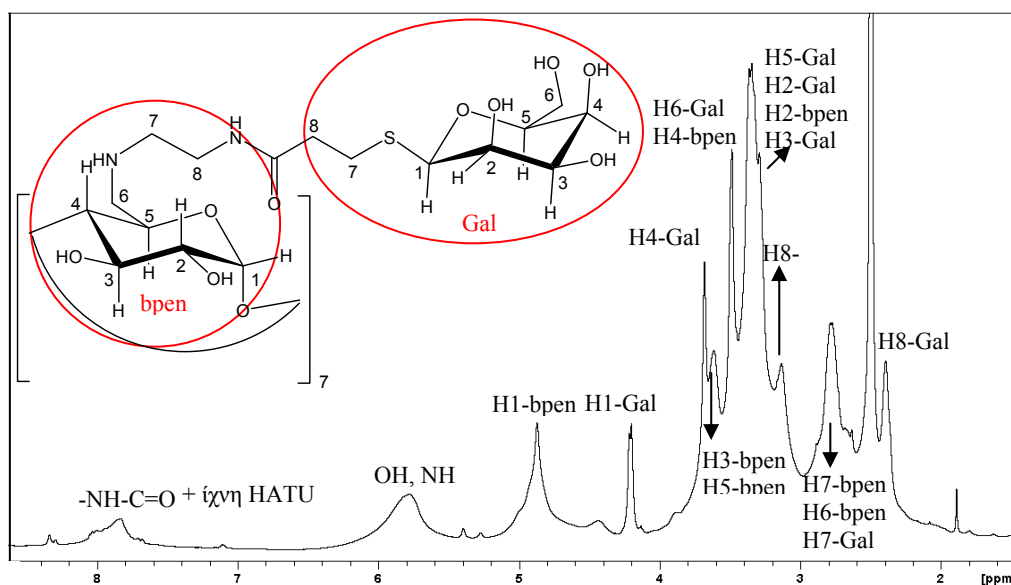


Προκειμένου να αντιμετωπισθούν τα προβλήματα που παρουσίασε η ανωτέρω πορεία, παρασκευάστηκαν παράγωγα σακχάρων που φέρουν καρβοξυλικές ομάδες ώστε να συνδεθούν με την κυκλοδεξτρίνη **4.9** (bpen). Για αυτήν τη συνθετική πορεία δοκιμάστηκε η αντίδραση σύζευξης τριών διαφορετικών σακχάρων (α -D-Man, β -D-Gal, α,β -D-Glc), χρησιμοποιώντας το γνωστό αντιδραστήριο σύζευξης HATU. Σε αυτήν την μεθοδολογία (Σχήμα 6.23), όταν χρησιμοποιήθηκε η 2'-καρβοξυλοαιθυλοθειο-*O*- α,β -D-μαννοπυρανόζη **5.36** δεν προέκυψε επιτυχής αντίδραση. Ωστόσο στα υπόλοιπα δύο σάκχαρα που χρησιμοποιήθηκαν οι αποδόσεις ήταν ικανοποιητικές (55% και 39%) και ο δε βαθμός υποκατάστασης που προέκυπτε από την ολοκλήρωση των φασμάτων ^1H NMR υποδείκνυε πλήρως υποκατεστημένα προϊόντα. Η ταυτοποίηση των προϊόντων δεν δημιούργησε προβλήματα καθώς τα φάσματα ^1H NMR σε DMSO- d_6 έδιναν σχετικά οξείες κορυφές και καθιστούσαν δυνατή τη λήψη 2Δ φασμάτων. Ενδεικτικά παρουσιάζονται στα σχήματα που ακολουθούν τα φάσματα NMR του προϊόντος **6.47** (bpen-Gal) και αναλύεται η διαδικασία με την οποία χάρις στην λήψη φασμάτων 2Δ ταυτοποιήθηκε το τελικό προϊόν.

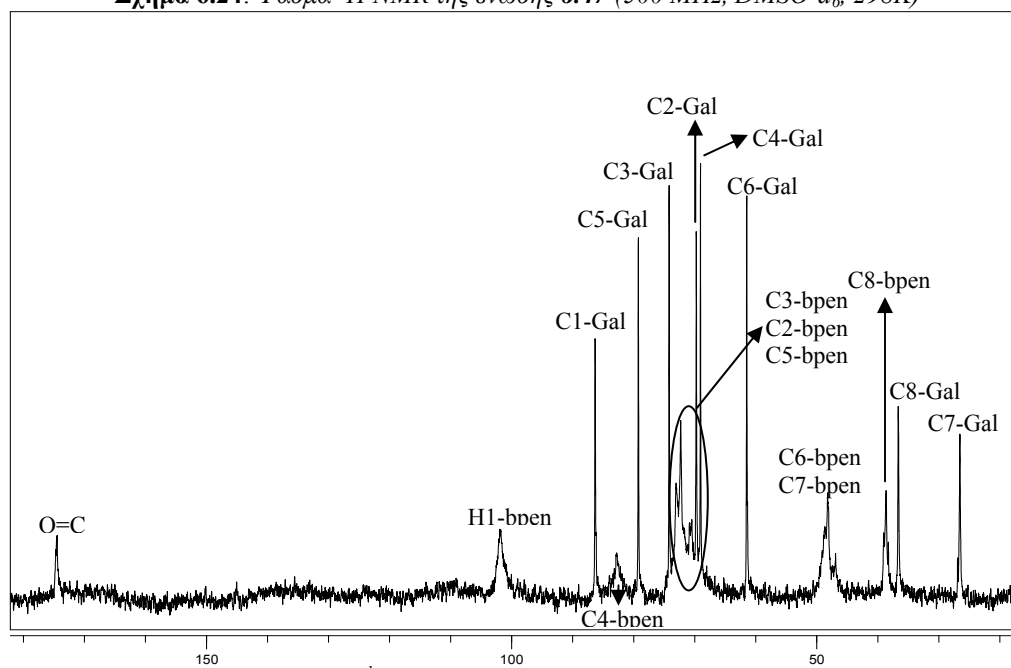


Σχήμα 6.23: Σύνδεση σακχάρων με κυκλοδεξτρίνες μέσω αμιδικών δεσμών

Η μορφή των φασμάτων NMR έχει πολλές ομοιότητες σε σύγκριση με τα φάσματα NMR που αφορούσαν τα πλήρως υποκατεστήμενα προϊόντα που προέρχονται από αντίδραση σύζευξης κυκλοδεξτρινών, οι οποίες φέρουν καρβοξυλικές ομάδες με σάκχαρα, τα οποία διαθέτουν αμινο ομάδες. Στο φάσμα ^1H NMR (Σχήμα 6.24) εμφανίζονται σχετικώς διευρυμένες κορυφές, οι οποίες αποδίδονται στο κυκλοδεξτρινικό μέρος του μορίου. Επιπλέον στο φάσμα ^1H NMR σε $\text{DMSO-}d_6$ πιστοποιείται η ύπαρξη αμιδίου στα 7.85 ppm. Ωστόσο στο φάσμα ^{13}C (Σχήμα 6.25) οι κορυφές είναι σχετικώς οξείες οπότε αντιστοιχούν σε συμμετρικώς υποκατεστημένα μόρια, γεγονός που αποδεικνύει την πλήρη υποκατάσταση στην πρωτοταγή πλευρά της bpen.

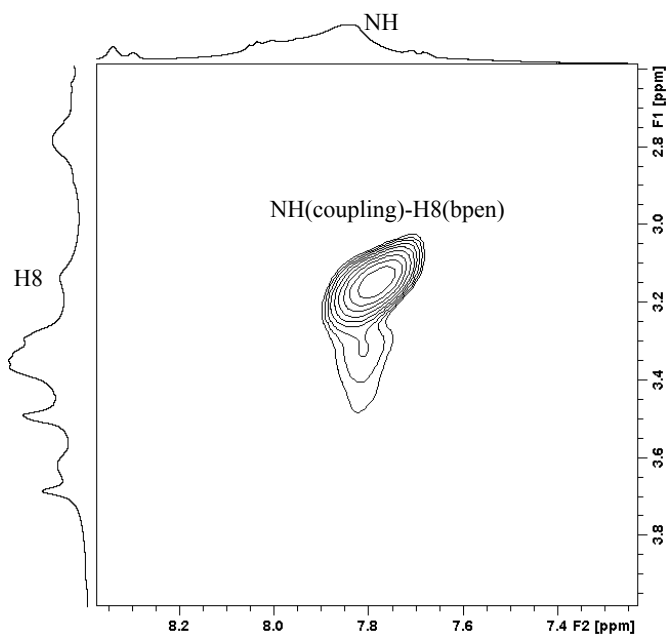


Σχήμα 6.24: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης 6.47 (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 298K)



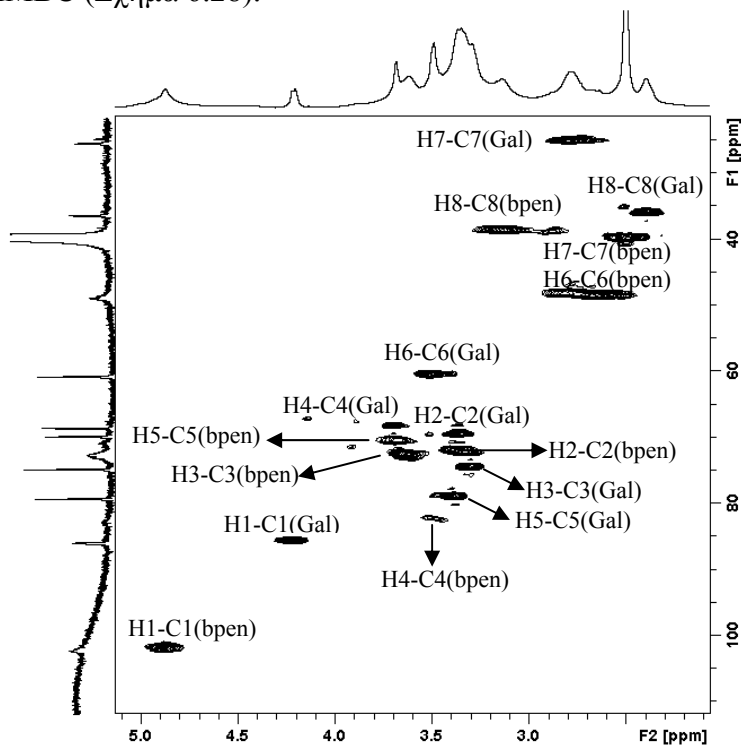
Σχήμα 6.25: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 6.47 (125 MHz, D_2O , 298K)

Από το φάσμα 2Δ COSY (Σχήμα 6.26), διαπιστώνεται ότι το αμίδιο στα 7.85 ppm, συζεύγνυται με τα H8 της κυκλοδεξτρίνης στα 3.15 ppm (3J).

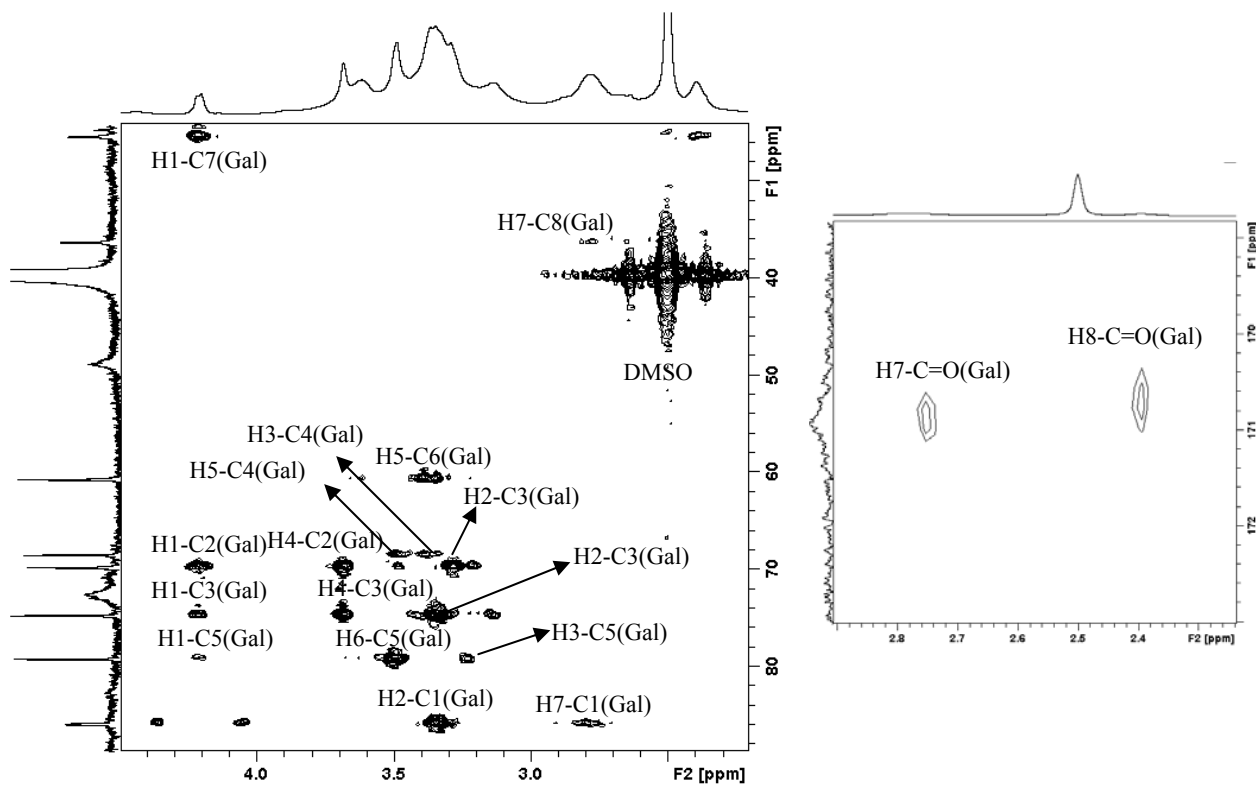


Σχήμα 6.26: Φάσμα COSY της ένωσης 6.47 (500 MHz, DMSO- d_6 , 298K)

Στη συνέχεια η απόδοση των υπολοίπων σημάτων πρωτονίου και άνθρακα γίνεται βάσει των συσχετίσεων μεταξύ πυρήνων στα φάσματα 2Δ, HSQC (Σχήμα 6.27) και HMBC (Σχήμα 6.28).

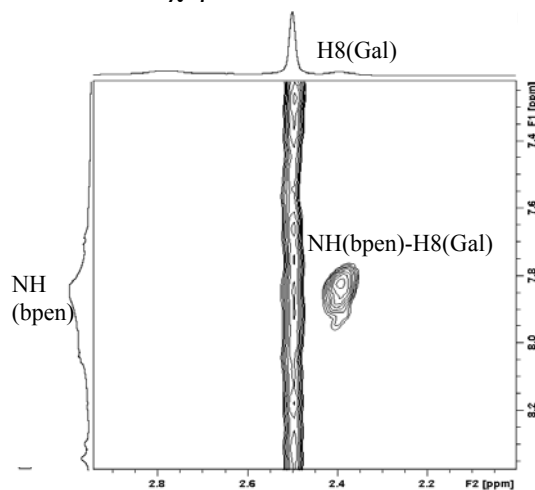


Σχήμα 6.27: Φάσμα HSQC της ένωσης 6.47 (500 MHz, DMSO- d_6 , 298K)



Σχήμα 6.28: Φάσμα HMBC της ένωσης 6.47 (500 MHz, DMSO- d_6 , 298K)

Στην περίπτωση αυτή το φάσμα HMBC έδωσε μόνο τις συζεύξεις μεταξύ των πρωτονίων και των ανθράκων του σακχάρου και όχι της κυκλοδεξτρίνης. Συνεπώς χρειαζόταν η λήψη ενός φάσματος με μεγαλύτερη ευαισθησία. Επελέγη η λήψη του φάσματος ομοπυρηνικού συντονισμού ROESY (Σχήμα 6.29), στο οποίο φαίνεται με μεγάλη ευκρίνεια η χημική σύζευξη της καρβοξυλικής ομάδας του σακχάρου με την αμινο ομάδα της κυκλοδεξτρίνης. Αναλυτικότερα είναι εμφανής η διπολική σύζευξη (dipolar coupling) του NH που προέρχεται από την κυκλοδεξτρίνη (bpen) με τα μεθυλικά πρωτόνια H8 του σακχάρου.



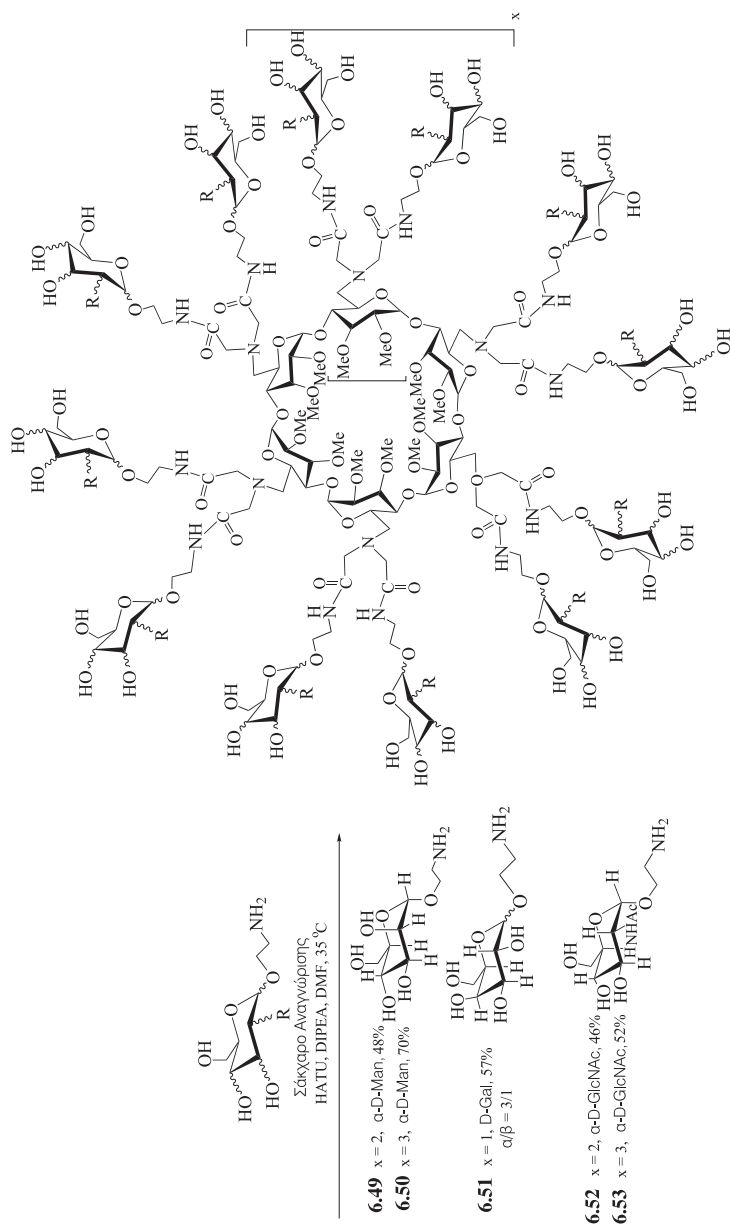
Σχήμα 6.29: Φάσμα ROESY της ένωσης 6.47 (500 MHz, DMSO- d_6 , 298K)

Κατά αυτόν τον τρόπο επιβεβαιώνεται ότι η αντίδραση σύζευξης ήταν επιτυχής και ο συνδυασμός των ανωτέρω φασμάτων οδήγησε στην πλήρη ταυτοποίηση των τελικών προϊόντων.²² Η πιστοποίηση του προϊόντος **6.47** έγινε και με φασματοσκοπία μάζας, στην οποία παρατηρείται το μοριακό ιόν στα $m/z = 1591.62$ ($[M+2H]^{2+}$). Η ίδια φασματοσκοπική ανάλυση (Σχήμα 6.24 - Σχήμα 6.29), ακολουθήθηκε και για την πλήρη ταυτοποίηση του υδατανθρακικού συμπλέγματος **6.48**.

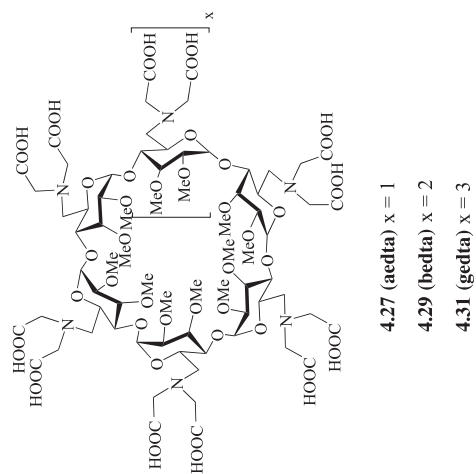
Η μεθοδολογία σύζευξης αμινικών με καρβοξυλικά προϊόντα ακολουθήθηκε και για τη σύνθεση υδατανθρακικών συμπλεγμάτων, τα οποία φέρουν 14 ομάδες σακχάρων στην πρωτοταγή τους πλευρά όπως αναλύεται κατωτέρω.

6.4 Σύνθεση υδατανθρακικών συμπλεγμάτων, χρησιμοποιώντας τα νέα καρβόξυ παράγωγα α-, β- και γ- κυκλοδεξτρίνης τύπου EDTA

Κατά τη συνθετική αυτή πορεία χρησιμοποιήθηκαν τα νέα καρβόξυ παράγωγα α-, β- και γ- κυκλοδεξτρίνης τύπου EDTA **4.27** (aedta), **4.29** (bedta) και **4.33** (gedta), αντιστοίχως προκειμένου να συζευχθούν με σάκχαρα που διαθέτουν καταληκτική αμίνο ομάδα. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά σάκχαρα αναγνώρισης βακτηριακών λεκτινών, τροποποιημένα με κατάλληλη αλυσίδα στη θέση 1, δηλαδή οι 2'-αμινοαιθυλο-*O*-α-D-μαννοπυρανοζίδιο **5.12**, 2'-αμινοαιθυλο-*O*-α,β-D-γαλακτοζίδιο **5.19** και 2-αμινοαιθυλο-2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-α-D-γλυκοζίδιο **5.29**. Τα τελικά προϊόντα (Σχήμα 6.30) προέκυψαν σε ικανοποιητικές αποδόσεις χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο HATU.



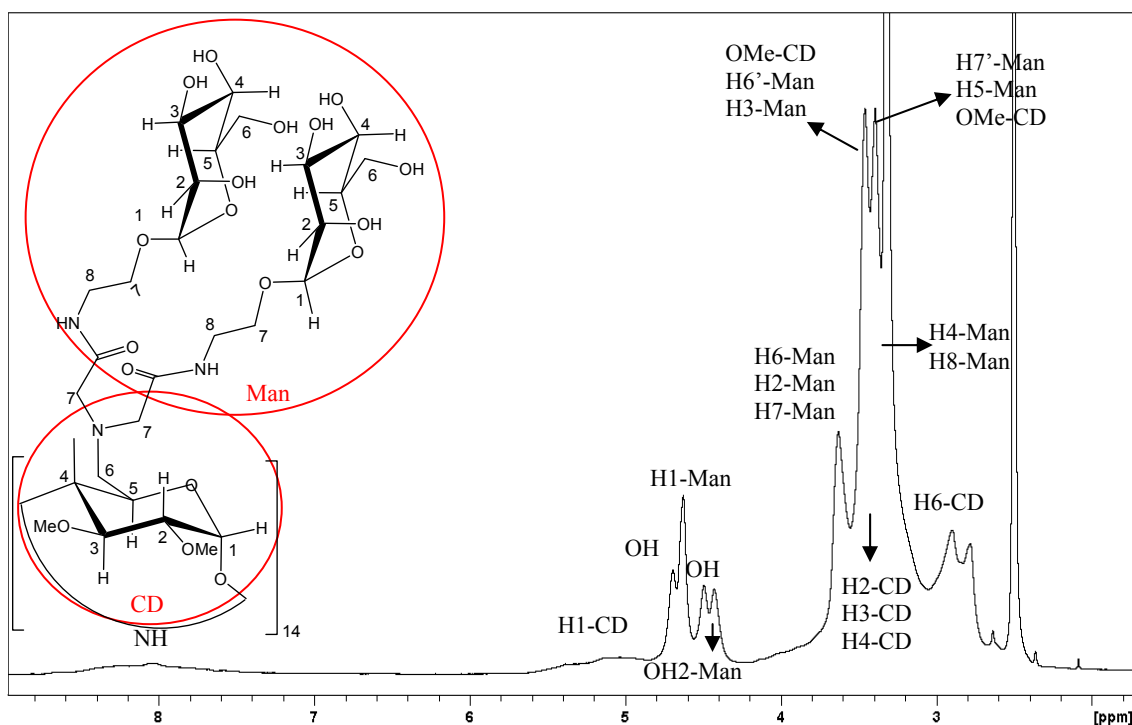
6.49-6.53



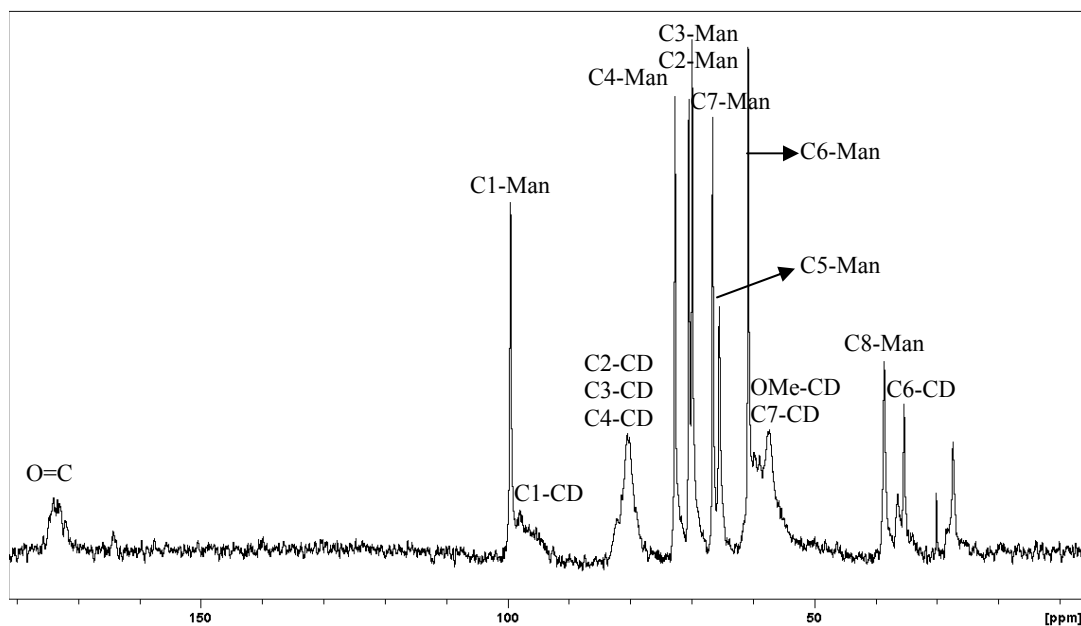
Σχήμα 6.30: Σύνθεση υδατανθρακικών συμπλεγμάτων, χρησιμοποιώντας τα νέα καρβόξυ-γλυκοδεξτρίνης τύπου EDTA, aedta, bedta και gedta

Είναι χαρακτηριστική η μορφή των φασμάτων NMR τόσο σε DMSO- d_6 όσο και σε D₂O για τα τελικά αυτά προϊόντα. Στα φάσματα ¹H NMR το κυκλοδεξτρινικό μέρος του μορίου δίνει ευρείες κορυφές γεγονός που καθιστά τη λήψη φασμάτων 2Δ ιδιαίτερα δύσκολη και κατά συνέπεια υπάρχει δυσκολία στην ακριβή ταυτοποίηση του κυκλοδεξτρινικού πυρήνα. Αντιθέτως οι κορυφές που αντιστοιχούν στους υποκαταστάτες, δηλαδή στα σάκχαρα, της πρωτοταγούς πλευράς είναι οξείες και καλοσχηματισμένες. Η διαφορετική αυτή συμπεριφορά έχει ως αποτέλεσμα να ταυτοποιηθεί πλήρως η περιοχή του μορίου που φέρει τα σάκχαρα στην πρωτοταγή πλευρά, ενώ για την κυκλοδεξτρίνη δεν είναι δυνατόν να αποδοθούν με απόλυτη ακρίβεια όλα τα πρωτόνια.

Στα σχήματα που ακολουθούν παρουσιάζεται ο τρόπος με τον οποίο ταυτοποιήθηκε το υδατανθρακικό σύμπλεγμα **6.49 (bedta- α -Man)**. Η ίδια ακριβώς μεθοδολογία ακολουθήθηκε και για τα υπόλοιπα τέσσερα υδατανθρακικά συμπλέγματα, **6.50-6.53**. Παρατίθενται τα φάσματα ¹H NMR (Σχήμα 6.31) και ¹³C NMR (Σχήμα 6.32) στα οποία έχουν αποδοθεί οι κορυφές βάσει των συσχετίσεων μεταξύ πυρήνων στα φάσματα 2Δ COSY, HSQC και NOESY. Στο φάσμα ¹H NMR η χαρακτηριστική κορυφή του αμιδίου στα 8.67-7.65 ppm αποτελεί ένδειξη επιτυχούς σύζευξης. Στο φάσμα ¹³C NMR, παρατηρούμε αφ' ενός οξείες κορυφές **α -Man** που προέρχονται από ένα μόνον σάκχαρο, άρα έχουμε συμμετρικό, δηλαδή πλήρως υποκατεστημένο μόριο, αφ' ετέρου ισχυρή διεύρυνση των κορυφών της κυκλοδεξτρίνης, όπως είχε παρατηρηθεί ανωτέρω (κεφ. 4). Η ύπαρξη τέλος ευρείας κορυφής για τον άνθρακα του καρβονυλίου μπορεί να αποδοθεί σε ύπαρξη πολλών διαμορφώσεων των υποκαταστατών, άρα εμφάνιση διευρυμένων κορυφών. Η πιστοποίηση του προϊόντος **6.49** έγινε και με φασματοσκοπία μάζας, στην οποία παρατηρείται το μοριακό ιόν στα $m/z = 2540.0$ ($[M+2H]^{2+}+2H_2O$).

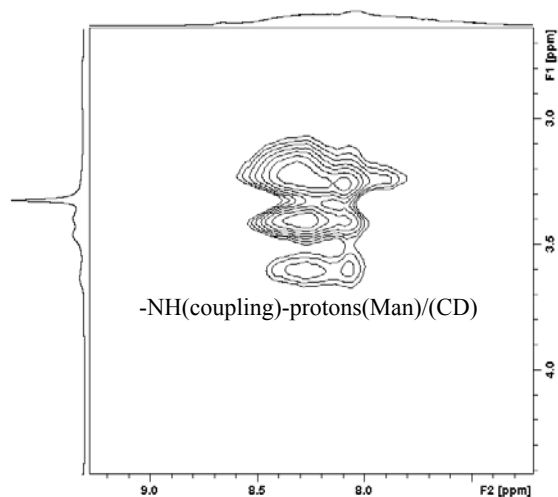


Σχήμα 6.31: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης 6.49 (500 MHz, DMSO-d_6 , 298K)



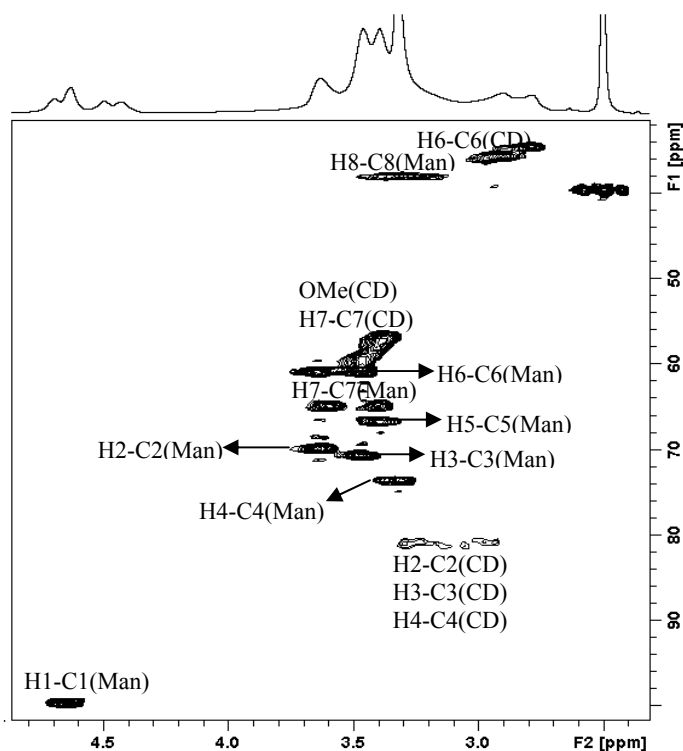
Σχήμα 6.32: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 6.49 (62MHz, D_2O , 298K)

Μία ακόμα ένδειξη ότι πρόκειται για το επιθυμητό προϊόν συμπεραίνεται από το φάσμα NOESY (Σχήμα 6.33). Φαίνεται ότι η ομάδα NH-C=O , η οποία προκύπτει από την σύζευξη έχει συσχετισμό NOE τόσο με τα πρωτόνια του σακχάρου όσο και με τα πρωτόνια της κυκλοδεξτρινικής περιοχής του μορίου.



6.33: Φάσμα NOESY της ένωσης 6.49 (500 MHz, DMSO- d_6 , 298K)

Με το φάσμα HSQC (Σχήμα 6.34) ολοκληρώθηκε η ταυτοποίηση του υδατανθρακικού συμπλέγματος 6.49, το οποίο φέρει 14 σάκχαρα στην πρωτοταγή του πλευρά.



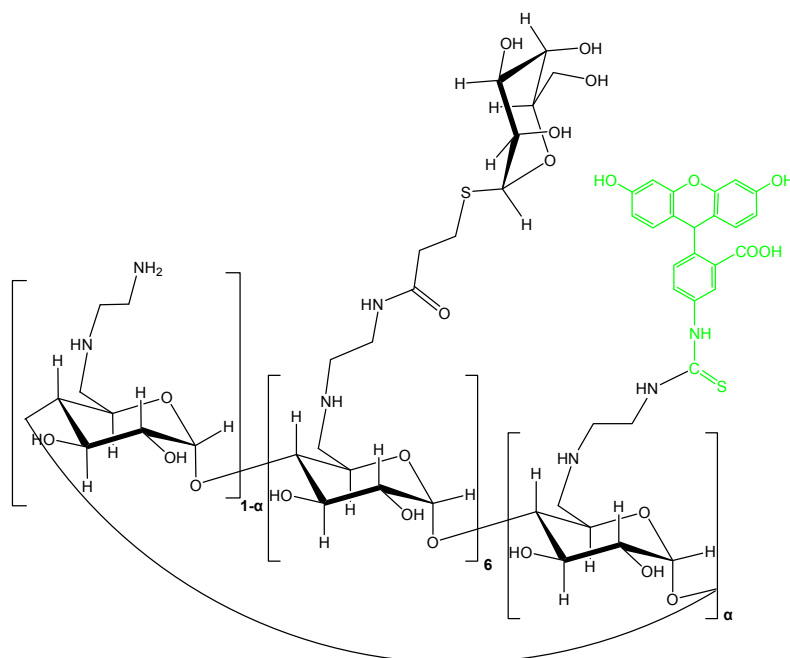
Σχήμα 6.34: Φάσμα HSQC της ένωσης 6.49 (500 MHz, DMSO- d_6 , 298K)

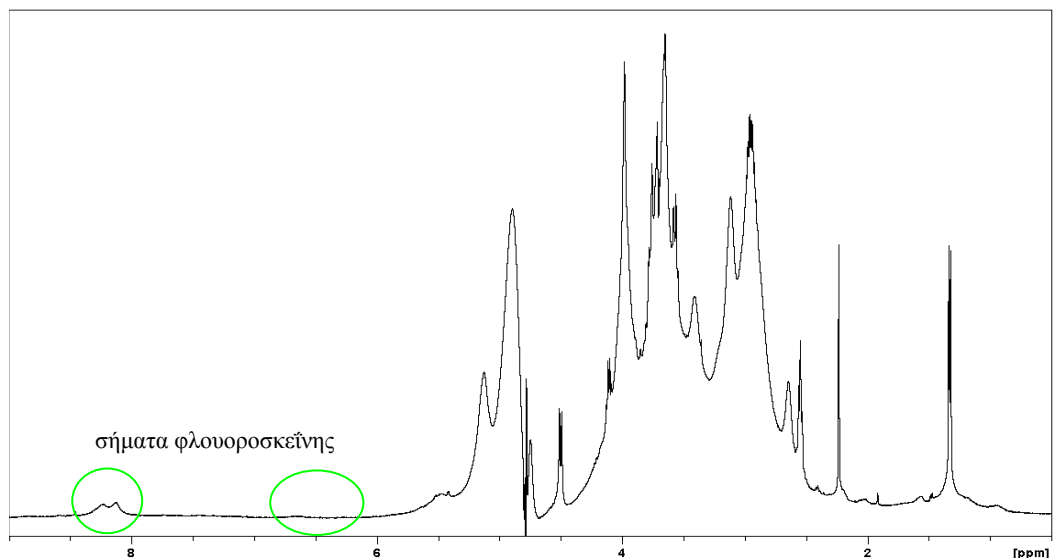
Έπειτα από την ολοκλήρωση της σύνθεσης των παραπάνω υδατανθρακικών συμπλεγμάτων, ακολούθησε η επισήμανσή τους με φθορίζουσα χρωστική, με σκοπό να καταστεί δυνατή η ανίχνευσή τους με μικροσκοπία φθορισμού.

6.5 Επισήμανση των υδατανθρακικών συμπλεγμάτων με φλουορεσκεΐνη

Η επισήμανση των υδατανθρακικών συμπλεγμάτων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ως φθορίζουσα χρωστική την ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC), η οποία είναι ένα από τα πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια για την επισήμανση αμινοξέων, πεπτιδίων και πρωτεϊνών. Η χρωστική FITC χρησιμοποιείται σε αναλογία τέτοια έτσι ώστε αφ' ενός να μην επηρεάζει τα δομικά χαρακτηριστικά του μορίου, αφ' ετέρου να είναι ανιχνεύσιμη. Ακολουθήθηκαν δύο μέθοδοι επισήμανσης.

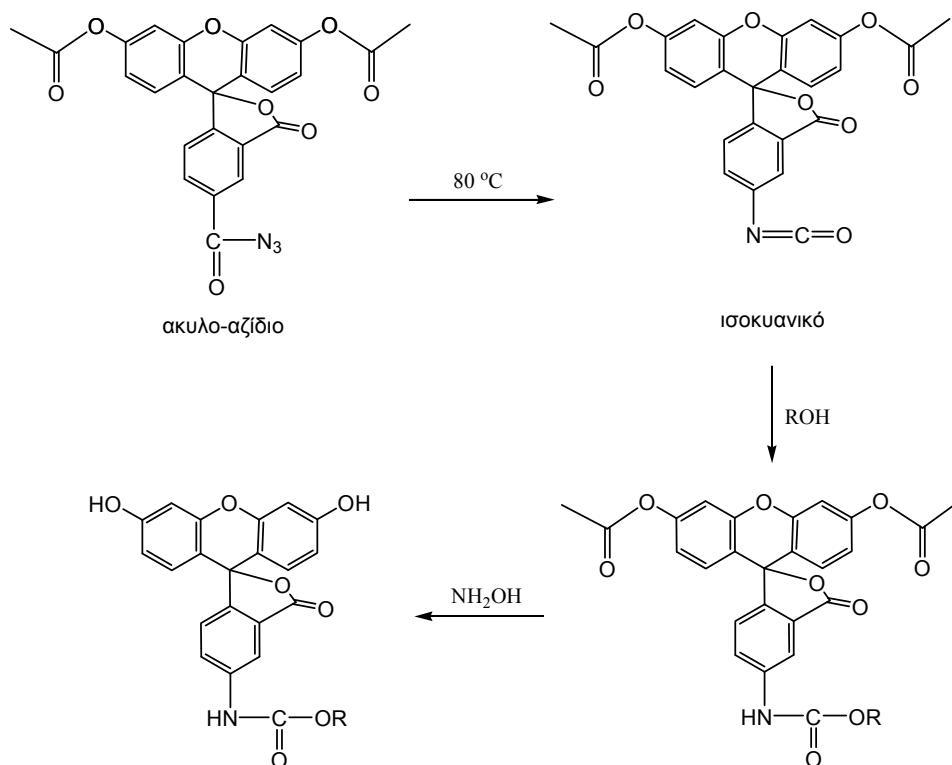
Με την πρώτη μέθοδο επισημάνθηκε το υδατανθρακικό σύμπλεγμα **6.47 (bpen-Gal)**. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην πυρηνόφιλη προσβολή των λίγων ελεύθερων πρωτοταγών αμινομάδων επί του ατόμου άνθρακα της ομάδας $-N=C=S$ του FITC και ευνοείται σε βασικό περιβάλλον καθώς οι αμινομάδες βρίσκονται σε αποπρωτονιωμένη μορφή, ώστε να εμφανίζουν αυξημένο πυρηνόφιλο χαρακτήρα. Από το φάσμα ^1H NMR (Σχήμα 6.35) του προϊόντος **6.47 (bpen-Gal)**, διαπιστώνεται η ύπαρξη των αρωματικών σημάτων της φλουορεσκεΐνης στην περιοχή 8.0-6.8 ppm.





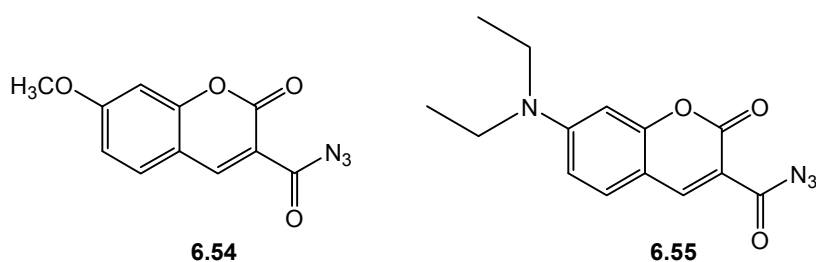
Σχήμα 6.35: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης 6.47-FITC (500MHz, D_2O , 298K)

Τα υδατανθρακικά συμπλέγματα **6.33**, **6.35**, **6.36**, **6.37**, **6.49**, **6.52**, **6.50**, **6.40**, **6.41** και **6.42** με βάση την **hpsp** και την **gpsp** επισημάνθηκαν χρησιμοποιώντας διαφορετική μεθοδολογία καθώς στα μόρια αυτά δεν υπάρχουν ελεύθερες πρωτοταγείς αμινομάδες ώστε να αντιδράσουν με την ομάδα $-\text{N}=\text{C}=\text{S}$ του FITC. Τα μόρια αυτά διαθέτουν μόνο υδροξυλομάδες στην CD και στους υποκαταστάτες (μονοσακχαρίτες) και επομένως ήταν απαραίτητο να βρεθεί μεθοδολογία επισημάνσης των ομάδων αυτών. Οι πλέον κατάλληλες χρωστικές αλκοολών είναι οι ισοκυανικές,³⁵ με τυπικό παράδειγμα την 5-καρβονυλο-αζιδο-φλουορεσκεΐνη. Η επισημάνση χρησιμοποιώντας την εν λόγω χρωστική περιλαμβάνει τρία βήματα. Αρχικά γίνεται Curtius μετάθεση του ακυλο-αζιδίου σε ισοκυανικό, ακολουθεί η αντίδραση με την επιθυμητή αλκοόλη και κατόπιν γίνεται αποπροστασία του μορίου από τις ακέτυλο ομάδες χρησιμοποιώντας υδροξυλαμίνη (Σχήμα 6.36).



Σχήμα 6.36: Τυπικό παράδειγμα επισήμανσης αλκοολών.

Η ανωτέρω μέθοδος επισήμανσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί και με άλλες χρωστικές, όπως η 7-μεθοξικουμαρινο-3-καρβονυλο-αζίδιο (**6.54**) και η 7-διαιλυλο-αμινο-3-καρβονυλο-αζίδιο (**6.55**).



Οι χρωστικές όμως που διαθέτουν ισοκυανικές ομάδες είναι λιγότερο σταθερές από αυτές που έχουν ισοθειοκυανικές ομάδες, όπως η FITC, πολύ ακριβότερες και ιδιαίτερα δυσεύρετες. Οπότε για να επιτευχθεί η επισήμανση αλκοολών με τη χρωστική FITC, είναι αναγκαίο να χρησιμοποιηθούν ιδιαίτερα δραστικές συνθήκες. Συνεπώς η επισήμανση των προϊόντων με FITC πραγματοποιήθηκε σε DMSO

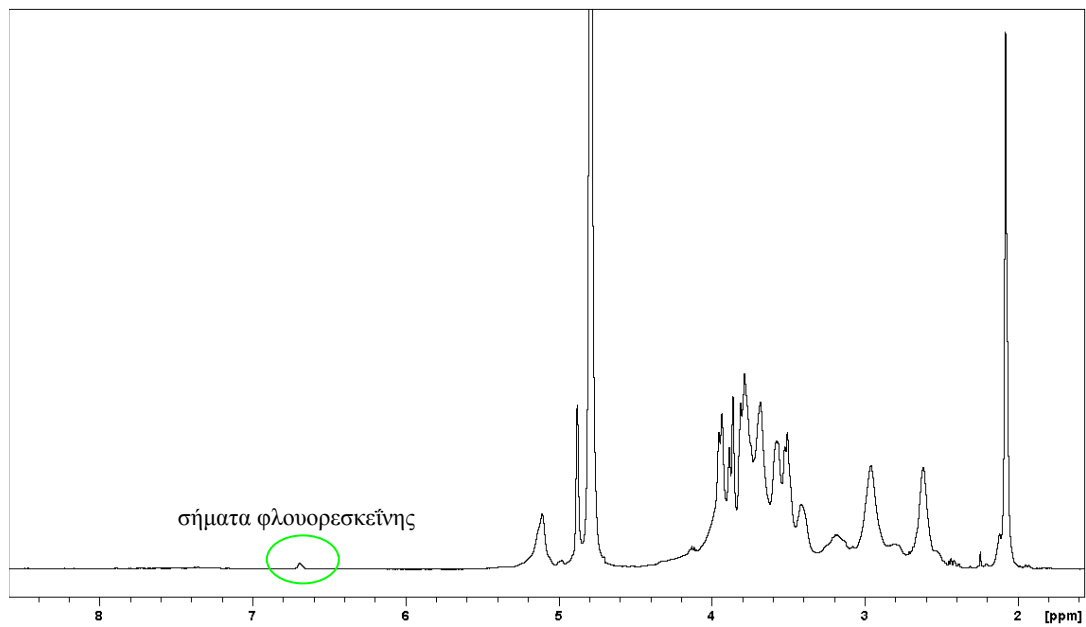
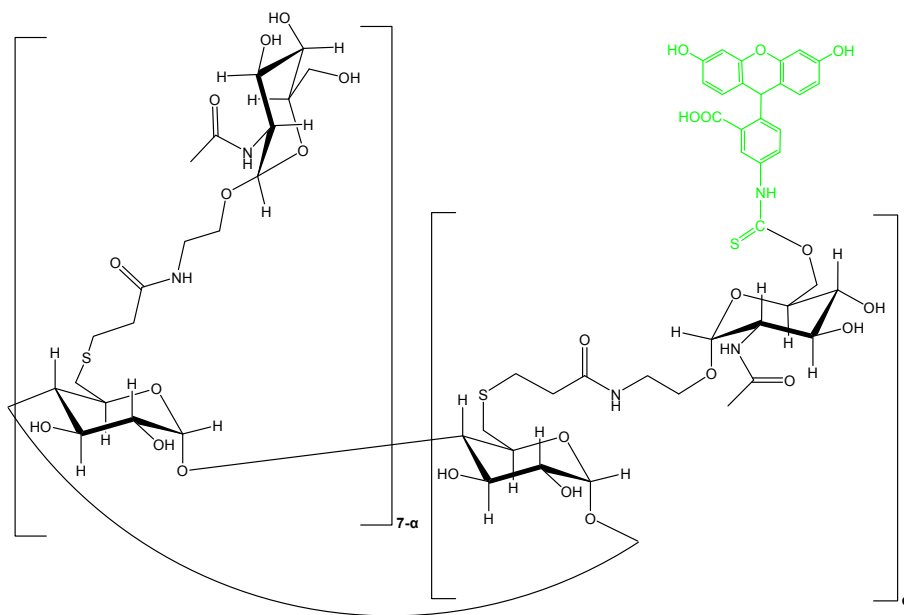
παρουσία NaOH, επομένως η φλουορεσκεΐνη θα συνδεθεί τυχαία με ένα από τα (πολλά) διαθέσιμα υδροξύλια.

Με τον προαναφερθέντα τρόπο επισημάνθηκαν η φυσική β-κυκλοδεξτρίνη καθώς και πλήρως και μόνο υποκατεστημένα υδατανθρακικά συμπλέγματα, τα οποία παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί. Το ποσοστό επισήμανσης των προϊόντων κυμαίνεται από 5% έως 10%.

Πίνακας 6.1: Προϊόντα που επιμάνθηκαν με FITC

Υδατανθρακικά Συμπλέγματα με 7 σάκχαρα	Υδατανθρακικά Συμπλέγματα με 14 σάκχαρα	Υδατανθρακικά Συμπλέγματα με 1 σάκχαρο
<i>B</i> rsp-Man (6.33)- <i>Fluo</i>	Bedta-Man (6.49)- <i>Fluo</i>	<i>B</i> msp-Man (6.40)- <i>Fluo</i>
<i>B</i> rsp-Gal (6.35)- <i>Fluo</i>	Bedta-GlcNAc (6.52)- <i>Fluo</i>	<i>B</i> msp-Gal (6.41)- <i>Fluo</i>
<i>B</i> rsp-Fuc (6.36)- <i>Fluo</i>	Gedta-Man (6.50)- <i>Fluo</i>	<i>B</i> msp-GlcNAc (6.42)- <i>Fluo</i>
<i>B</i> rsp-GlcNAc (6.37)- <i>Fluo</i>		

Ενδεικτικά παρουσιάζεται το φάσμα ^1H NMR (Σχήμα 6.37) του προϊόντος *b*rsp-GlcNAc (6.37)-*Fluo*, στο οποίο διαπιστώνεται η ύπαρξη των αρωματικών σημάτων της φλουορεσκεΐνης στην περιοχή 6.72-6.65 ppm.



Σχήμα 6.37: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης 6.37-Fluo (500MHz, D_2O , 298K)

6.6 Συμπεράσματα

Στο παρόν κεφάλαιο αναλύθηκε η μεθοδολογική προσέγγιση και η επιτυχής σύνθεση νέων υδατανθρακικών συμπλεγμάτων, τα οποία φέρουν στην πρωτοταγή τους πλευρά 1, 7, 8, 12, 14 ή 16 σάκχαρα αναγνώρισης βακτηριακών λεκτινών. Η δομή όλων των παραγώγων διερευνήθηκε και εξακριβώθηκε, χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία NMR δύο διαστάσεων ομοπυρηνικού (COSY, ROESY, NOESY) και ετεροπυρηνικού (HSQC, HMBC) συσχετισμού. Το μοριακό βάρος μετρήθηκε με MALDI-MS. Τέλος, πραγματοποιήθηκε η επισήμανση κάποιων από τις παραπάνω ενώσεις με τη φθορίζουσα χρωστική φλουορεσκεΐνη, με σκοπό να καταστεί δυνατή η ανίχνευσή τους με μικροσκοπία φθορισμού σε πειράματα προσκόλλησης τους σε βακτηριακά κύτταρα, όπως θα αναλυθεί στο κεφάλαιο 8.

7

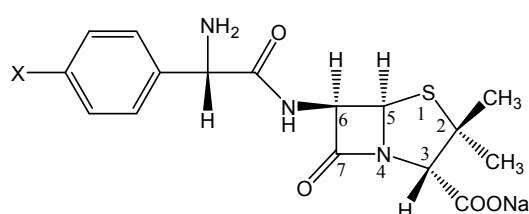
**ΜΕΛΕΤΕΣ ΕΓΚΛΩΒΙΣΜΟΥ ΚΑΙ
ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΤΗΣ ΑΜΠΙΚΙΛΛΙΝΗΣ
ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΙΚΩΝ
ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΩΝ**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΜΕΛΕΤΕΣ ΕΓΚΛΩΒΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΤΗΣ ΑΜΠΙΚΙΛΛΙΝΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΙΚΩΝ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΩΝ

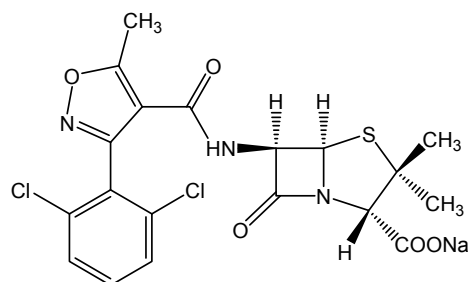
7.1 Εισαγωγή

Οι πενικιλίνες (7.1α-7.1γ) και οι κεφαλοσπορίνες (7.2α, 7.2β) ανήκουν στην κατηγορία των β-λακταμικών αντιβιοτικών (Σχήμα 7.1), τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως, καθώς παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα τοξικότητας.¹ Το κοινό δομικό χαρακτηριστικό τους είναι ότι διαθέτουν β-λακταμικό σκελετό, ο οποίος ενώνεται στις πενικιλίνες με πενταμελή δακτύλιο και στις κεφαλοσπορίνες με εξαμελή δακτύλιο. Η αντιμικροβιακή δράση και η ανάπτυξη ανθεκτικότητας των μικροβίων αναφέρθησαν στο κεφάλαιο 2.

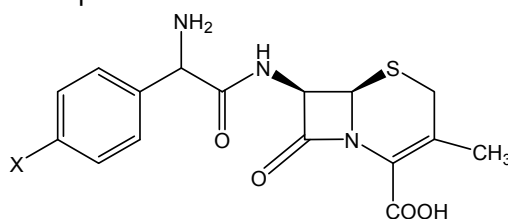


7.1α: X = H, Αμπικιλίνη

7.1β: X = OH, Αμοξικιλίνη



7.1γ: Δικλοξακιλλίνη

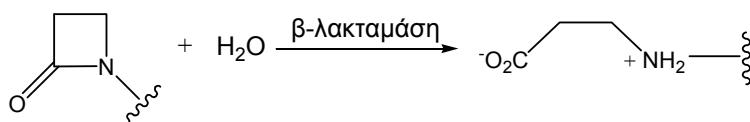


7.2α: X = H, Κεφαλεξίνη

7.2β: X = OH, Κεφαδροξίλη

Σχήμα 7.1: Παραδείγματα β-λακταμικών αντιβιοτικών

Λόγω του τετραμελούς δακτυλίου τα αντιβιοτικά έχουν περιορισμένη σταθερότητα έναντι της υδρόλυσης.² Η υδρόλυση των αντιβιοτικών προκαλείται από πυρηνόφιλη προσβολή του β-λακταμικού δακτυλίου και καταλύεται από οξέα ή βάσεις.³ Η αυτό-υδρόλυση των αντιβιοτικών παρουσία νερού καταστρέφει τη δομή τους και κατά συνέπεια την αντιβιοτική τους δράση. *In vivo*, η υδρόλυση προκαλείται από συγκεκριμένα ένζυμα, τα οποία υδρολύουν τον β-λακταμικό σκελετό προς το σχηματισμό του β-αμινοξέος^{1,4} (Σχήμα 7.2). Τα ένζυμα αυτά ονομάζονται β-λακταμάσες. Το ένζυμο β-λακταμάση το οποίο παράγεται από βακτήρια,^{5,6} καταστρέφει τον β-λακταμικό δακτύλιο αναστέλλοντας έτσι την αντιβιοτική δράση του φαρμάκου, οπότε τα βακτήρια επιζούν. Με τη διαδικασία αυτή, που θεωρείται σημαντικός μηχανισμός ανάπτυξης ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών, διασπώνται κυρίως οι πενικιλίνες και σε μικρότερο βαθμό οι κεφαλοσπορίνες.²

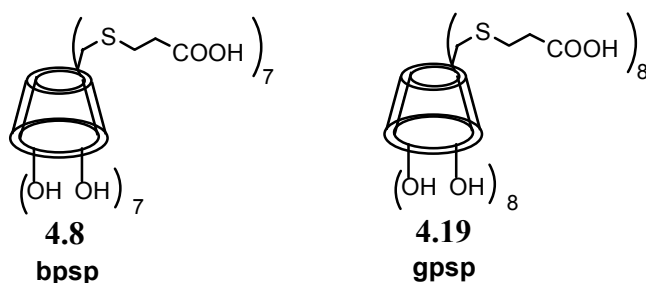


Σχήμα 7.2: Υδρόλυση παρουσία του ενζύμου β-λακταμάση

Επομένως είναι πολύ σημαντικό να παρεμποδιστεί η καταλυτική δράση του ενζύμου. Αυτό είναι πιθανό να πραγματοποιηθεί με δύο τρόπους. Ο πρώτος τρόπος περιλαμβάνει το σχεδιασμό νέων αντιβιοτικών, τα οποία να μην είναι ευάλωτα στην ενζυμική υδρόλυση. Ο δεύτερος τρόπος βασίζεται στη ταυτόχρονη χρήση του αντιβιοτικού με διάφορους αναστολείς. Ωστόσο σε ό,τι αφορά τη πρώτη μέθοδο, τα βακτήρια έχουν τη δυνατότητα να παράγουν διαφορετικές β-λακταμάσες ικανές να υδρολύουν τα νέα αντιβιοτικά. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η κατηγορία φαρμάκων των καρβαπενεμών που τη δεκαετία του '70 θεωρείτο καινοτόμος σειρά αντιβιοτικών ικανή να αντιστέκεται στην υδρόλυση.¹ Ωστόσο σε σύντομο χρονικό διάστημα διαπιστώθηκε η ύπαρξη νέων λακταμασών, των καρβαπενεμασών, οι οποίες υδρολύουν τα συγκεκριμένα αντιβακτηριακά φάρμακα.⁷ Έχουν ταυτοποιηθεί περίπου 200 διαφορετικά ένζυμα που ανήκουν στην κατηγορία των β-λακταμασών.⁸ Συνεπώς ο δεύτερος τρόπος προσέγγισης έχει απασχολήσει ιδιαίτερα την επιστημονική κοινότητα.

Οι αναστολείς δράσης των β-λακταμασών μπορούν να παρατείνουν την δράση των β-λακταμικών αντιβιοτικών, περιορίζοντας την υδρόλυση τους και

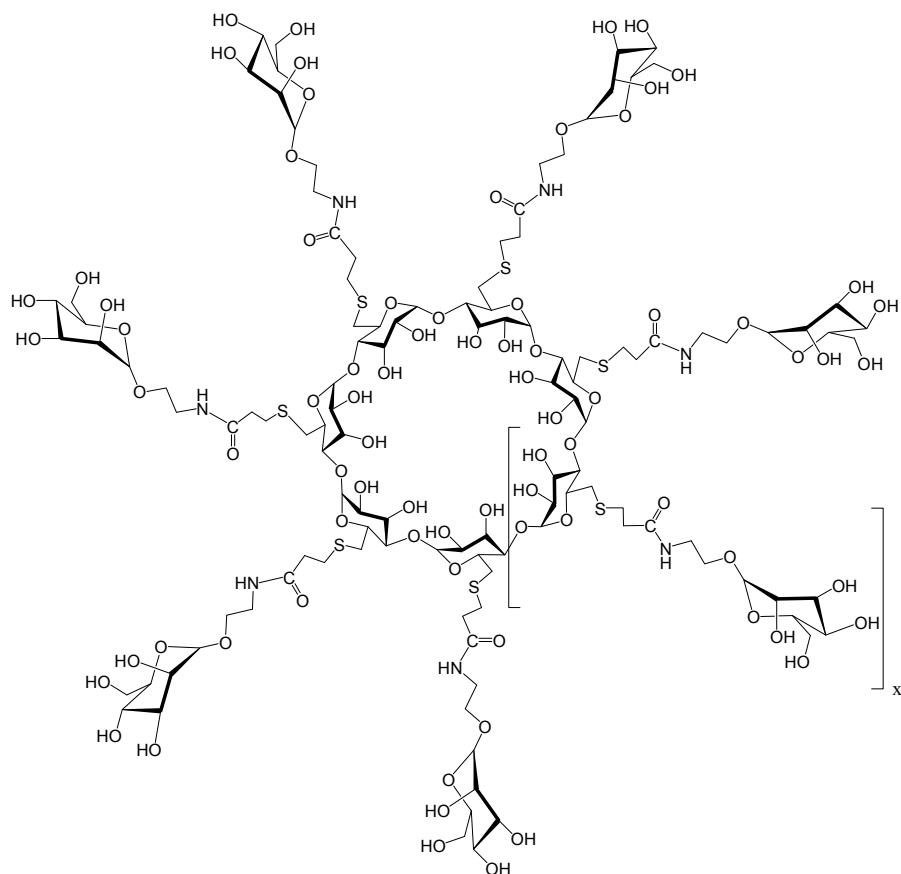
ταυτόχρονα διατηρώντας την ευαισθησία των βακτηρίων. Οι κυκλοδεξτρίνες, εφόσον μπορούν να εγκλωβίσουν τα συγκεκριμένα αντιβιοτικά ενδέχεται να μειώσουν την ταχύτητα υδρόλυσης και άρα να δράσουν ως αναστολείς. Πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι παρουσία των βCD, 2-υδροξυπροπυλο-β-CD και μεθυλο-β-CD, η αντιμικροβιακή δράση διαφόρων β-λακταμικών αντιβιοτικών είχε αυξηθεί, γεγονός που αποδόθηκε στη δημιουργία συμπλόκων. Αναλυτικότερα η ομάδα του Aki *et al.*^{9,10} κατέληξε ότι η βCD και η 2-υδροξυπροπυλο-β-CD σε ιδιαίτερα όξινο pH δημιουργούν είτε 1:1 ή 1:2 σύμπλοκα με την αμπικιλίνη με ταυτόχρονη σταθεροποίησή της. Ωστόσο σε λιγότερο όξινο ή ουδέτερο pH παρατήρησαν μόνο τη δημιουργία συμπλόκου 1:1, ενώ δεν υπήρχε σταθεροποίηση της αμπικιλίνης από την υδρόλυση. Επιπλέον πρόσφατες μελέτες στο οικείο εργαστήριο² έδειξαν ότι η ενζυμική υδρόλυση της αμπικιλίνης καθυστερεί όταν η τελευταία συμπλοκοποιείται με κυκλοδεξτρίνες που έχουν τροποποιηθεί στην πρωτοταγή πλευρά. Συγκεκριμένα διαπιστώθηκε ότι η αμπικιλίνη σχηματίζει σύμπλοκο εγκλεισμού με την καρβοξυλιωμένη γ-κυκλοδεξτρίνη **4.19** (**gpsp**) και παρουσία β-λακταμάσης η ταχύτητα αποικοδόμησής της μειώνεται σχεδόν κατά το ήμισυ. Δεν παρατηρήθηκε η δημιουργία συμπλόκου με την αντίστοιχη β-κυκλοδεξτρίνη **4.8** (**bpsp**) (Σχήμα 7.3).



Σχήμα 7.3: Οι CDs που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο δημιουργίας συμπλόκου με την αμπικιλίνη²

7.2 Επίδραση τροποποιημένων κυκλοδεξτρινών και υδατανθρακικών συμπλεγμάτων στην ταχύτητα της υδρόλυσης της αμικικιλίνης παρουσία του ενζύμου β-λακταμάση

Στην εργασία αυτή μελετήθηκε η ταχύτητα της υδρόλυσης της αμικικιλίνης παρουσία του ενζύμου β-λακταμάση από *Enterobacter cloacae* σε υδατικά διαλύματα υδατανθρακικών συμπλεγμάτων (6.30, 6.34) του κεφαλαίου 6, σε διαλύματα κυκλοδεξτρινών (4.19) και σε διαλύματα απλών σακχάρων (5.7, 5.1). Αρχικά έγιναν μελέτες ελέγχου δημιουργίας συμπλόκου των υδατανθρακικών συμπλεγμάτων hpsp-Man (6.33) και grsp-Man (6.34) (Σχήμα 7.4) με την αμικικιλίνη. Από το 2Δ φάσμα ROESY των 6.33 ή 6.34 με την αμικικιλίνη δεν ανιχνεύθηκαν διπολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των σημάτων της αρωματικής περιοχής (8.00-6.50 ppm) της αμικικιλίνης και των σημάτων των υδατανθράκων (5.00-3.00 ppm), οπότε δεν μπορούμε να βεβαιώσουμε ότι δημιουργείται σύμπλοκο με το συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Το αποτέλεσμα αυτό είναι εξηγήσιμο, εάν ληφθεί υπ' όψιν ότι η σταθερά εγκλεισμού της αμικικιλίνης με την απλή grsp (4.19)² είχε υπολογισθεί μόλις $17 \pm 0.9 \text{ M}^{-1}$. Δεδομένη της βιβλιογραφικής εμπειρίας, περί μειωμένης ικανότητας εγκλωβισμού των υδατανθρακικών συμπλεγμάτων με βάση τη βCD έναντι της απλής βCD αναμένεται και η αντίστοιχη ικανότητα των 6.33 ή 6.34 να εγκλωβίσουν την αμικικιλίνη να είναι πολύ χαμηλή.



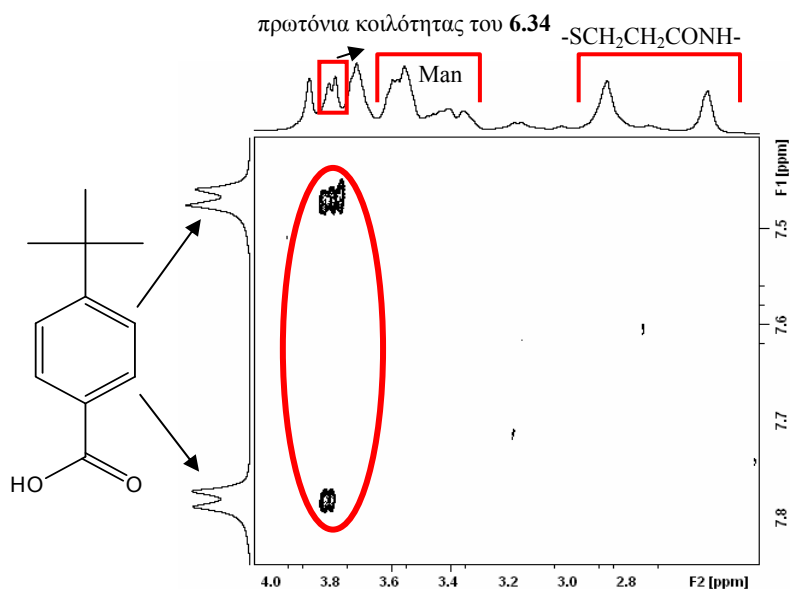
6.33 $x = 7$, bpsp-Man

6.34 $x = 8$, gpsp-Man

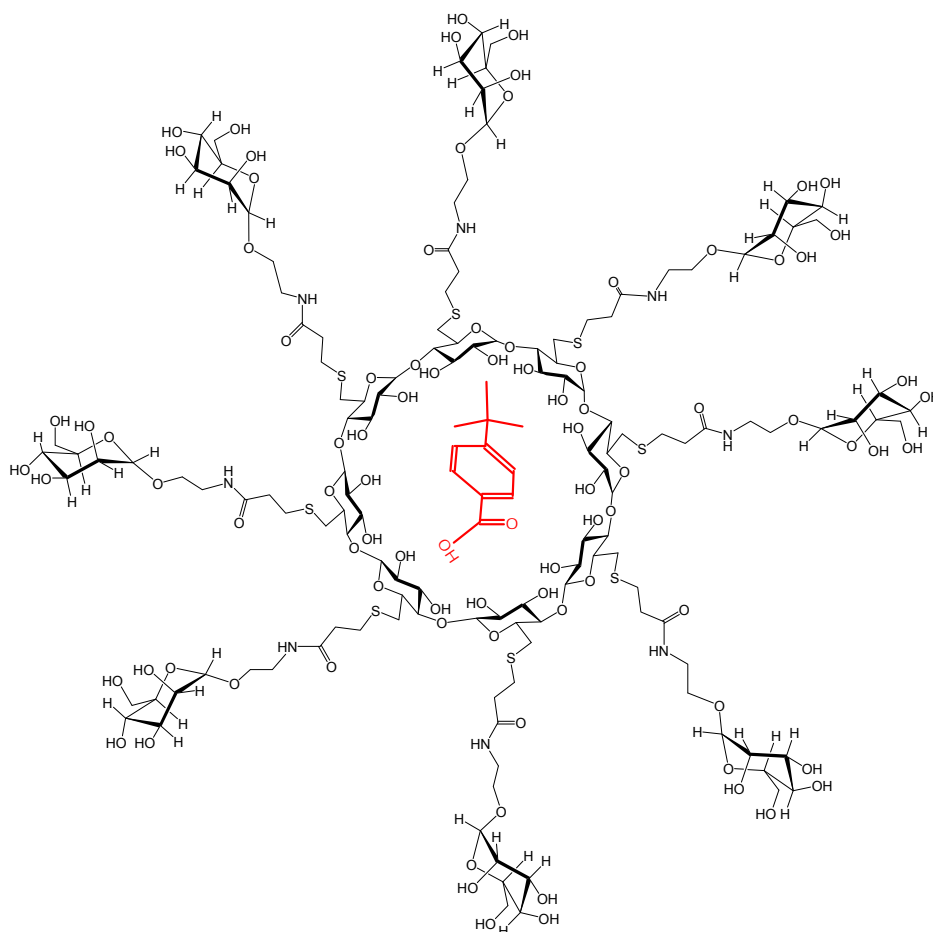
Σχήμα 7.4: Υδατανθρακικά συμπλέγματα προς δημιουργία συμπλόκου με την αμικιλίνη

Εν συνεχεία μελετήθηκε κατά πόσο τα εν λόγω υδατανθρακικά συμπλέγματα διατηρούν τη ικανότητα να λειτουργούν ως μόρια ξενιστές, δηλαδή διερευνήθηκε η λειτουργικότητα της κοιλότητας, ώστε να αποκλεισθεί πιθανή παρεμπόδιση της εισόδου της δευτεροταγούς πλευράς της κοιλότητας εξ' αιτίας των υποκαστατών της πρωτοταγούς (π.χ. λόγω στρέβλωσης του σχήματος ή δημιουργία διμερών (head to tail)). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ένα τυπικό ξενιζόμενο μόριο, το *tert*-βουτυλοβενζοϊκό οξύ.¹¹ Το μόριο αυτό έχει αμφίφιλο χαρακτήρα, ιοντιζόμενη καρβοξυλική ομάδα-κεφαλή και λιπόφιλο σώμα. Η σταθερά συμπλοκοποίησης με τη βCD είναι υψηλή, η δε κρυσταλλική του δομή¹² έχει δείξει εγλωβισμό με το καρβοξύλιο στην πρωτοταγή και το *t*-βουτύλιο στην δευτεροταγή πλευρά. Λαμβάνοντας 2Δ φάσμα ROESY (Σχήμα 7.5) του προϊόντος **6.34** με το *tert*-βουτυλοβενζοϊκό οξύ σε αναλογία 1:5 διαπιστώθηκε η δημιουργία συμπλόκου καθώς είναι εμφανής η ενδομοριακή αλληλεπίδραση του φαινυλίου του *tert*-

βουτυλοβενζοϊκού οξέος με τα πρωτόνια που ανήκουν στην κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης. Τα πρωτόνια της κυκλοδεξτρινικής κοιλότητας εντοπίστηκαν και χαρακτηρίστηκαν με τη βοήθεια φασμάτων NMR 2Δ (κεφάλαιο 6), αλλά δεν ήταν εφικτός περαιτέρω χαρακτηρισμός, δηλαδή διαχωρισμός των H3, H5, H6 (βλ. σχ. 2, κεφ. 1). Επιπροσθέτως, απουσιάζουν κορυφές διασταύρωσης λόγω διπολικών αλληλεπιδράσεων του ξενιζομένου μορίου με τους υδατανθρακικούς υποκαταστάτες (τα μόρια μαννόζης) ή τη γέφυρα σύνδεσης (-SCH₂CH₂CONH-). Συνεπώς επιβεβαιώνεται η δυνατότητα του υδατανθρακικού συμπλέγματος **6.34** (grsp-Man) να δημιουργεί σύμπλοκα εγκλεισμού, δηλαδή επιβεβαιώνεται ότι η κοιλότητα δεν εμποδίζεται από τους ογκώδεις υποκαταστάτες, οπότε παρουσία ξενιζομένου μορίου με κατάλληλο σχήμα και υψηλή K_{assoc} με τη βCD σχηματίζεται σταθερό σύμπλοκο εγκλεισμού σε υδατικό διάλυμα και με το **6.34**.



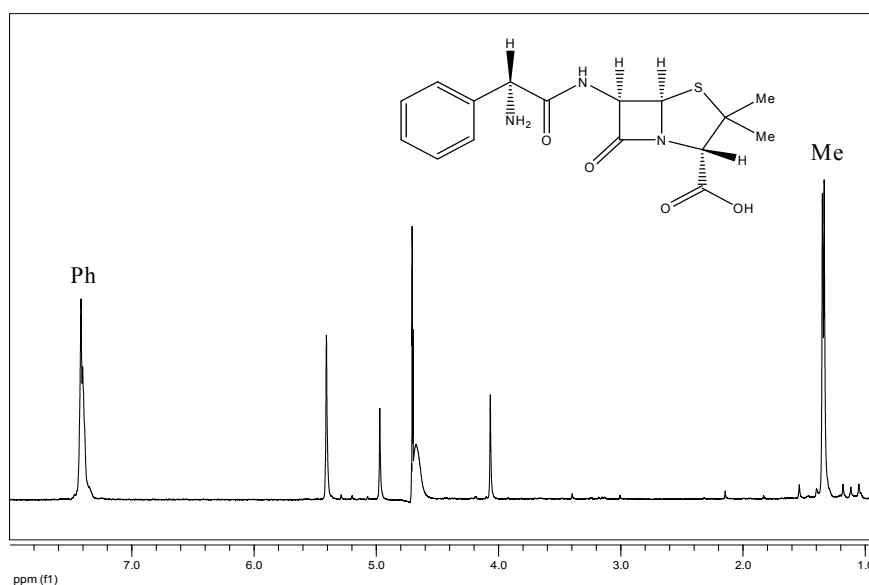
Σχήμα 7.5: Μέρος Φάσματος 2Δ ROESY του υδατικού διαλύματος grsp-Man (**6.34**) με *t*-βουτυλοβενζοϊκό οξύ σε περίσσεια, D₂O, 500 MHz, 298K, pH 8-8.5



Σχήμα 7.6: Προτεινόμενη δομή του συμπλόκου *gprsp-Man* (**6.34**) με *t*-βουτυλοβενζοϊκό οξύ

Προηγούμενη εμπειρία² έδειξε ότι η **gprsp**/αμπικιλίνη σχηματίζει μεν 1:1 σύμπλοκο μέσω εγκλεισμού αλλά τελικώς 2:1 σύμπλοκο μέσω εξωτερικών αλληλεπιδράσεων (aggregation). Επομένως η **gprsp** μειώνει την ταχύτητα υδρόλυσης της αμπικιλίνης παρουσία β-λακταμάσης κατά περίπου το ήμισυ, δηλαδή παρεμποδίζει τη δράση του ενζύμου, όχι αναγκαστικά μέσω προστασίας του αντιβιοτικού στην κοιλότητα, αλλά και μέσω εξωτερικών αλληλεπιδράσεων. Βάσει των ανωτέρω, παρ'ότι η δημιουργία συμπλόκων των πλήρως υποκατεστημένων κυκλοδεξτρινών με σάκχαρα με την αμπικιλίνη δεν απεδείχθη με φασματοσκοπία ¹H NMR, μελετήθηκε κατά πόσον επηρεάζεται η ταχύτητα της υδρόλυσης της αμπικιλίνης σε διαλύματα με τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες *gprsp*-GlcNAc (**6.30**), *gprsp*-Man (**6.34**), σε διαλύματα με σάκχαρα που δεν δημιουργούν κοιλότητα (μαλτοεπταόζη, ευθύγραμμο ολιγομερές) καθώς και σε διαλύματα με σάκχαρα μικρού μεγέθους, GlcNAc (**5.7**) και Man (**5.1**). Το φαινόμενο εξετάσθηκε με φασματοσκοπία NMR παρακολουθώντας την αποικοδόμηση της αμπικιλίνης

συναρτήσει του χρόνου, σε σταθερή θερμοκρασία και συνθήκες ψευδο-πρώτης τάξεως (μεγάλη περίσσεια ξενιστών). Αρχικά μελετήθηκε η αποικοδόμηση της αμπικιλίνης χρησιμοποιώντας εξωτερικό ή εσωτερικό πρότυπο, προκειμένου να είναι εφικτή η σύγκριση των κορυφών της αμπικιλίνης με κορυφή χρονικώς σταθερή (εσωτερικό πρότυπο). Η ιδέα όμως αυτή εγκαταλείφθηκε προκειμένου να αποφευχθεί η εισαγωγή νέων ουσιών που πιθανότατα να επηρέαζαν τις ισορροπίες των μορίων διαλύματος συγκρίνοντας κάποιες κορυφές μεταξύ τους. Επειδή το σύνολο των κορυφών του φαινυλίου της αμπικιλίνης πριν και μετά την υδρόλυσή της, παραμένει σταθερό, ενώ οι δύο κορυφές των μεθυλίων στη θέση 2 μειώνονται κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης, αποφασίστηκε η παρακολούθηση αυτών των κορυφών συναρτήσει του χρόνου. Επομένως το ποσοστό της αμπικιλίνης που αποικοδομείται ορίζεται ως ο λόγος των κορυφών των μεθυλίων ως προς τις κορυφές του φαινυλίου με το πέρας του χρόνου (Σχήμα 7.7). Καθώς λοιπόν η αμπικιλίνη υδρολύεται, ο λόγος αυτός μειώνεται. Καταγράφηκαν οι μειώσεις αυτές σε συγκεκριμένους χρόνους (από 0 έως 150 ώρες) και έγιναν τα γραφήματά τους συναρτήσει του χρόνου.



Σχήμα 7.7: ^1H NMR της αμπικιλίνης σε D_2O .

Πραγματοποιήθηκαν τρία πειράματα ενζυμικής υδρόλυσης προκειμένου να επιβεβαιωθεί η επαναληψιμότητα του πειράματος και συγκεκριμένα της υδρόλυσης της ελεύθερης αμπικιλίνης. Χρησιμοποιήθηκε η β -λακταμάση από *Enterobacter cloacae*. Σε κάθε υδρόλυση διατηρήθηκαν οι ίδιες συνθήκες (συγκέντρωση συστατικών, αναλογία ενζύμου, ρυθμιστικό διάλυμα, θερμοκρασία). Οι αναλογίες της Αμπικιλίνης/Κυκλοδεξτρινών/Μαλτοεπταόζης ήταν 1/5/5, ενώ η αναλογία της Αμπικιλίνης/μονοσακχαριτών είναι 1/40, προκειμένου η συγκέντρωση των

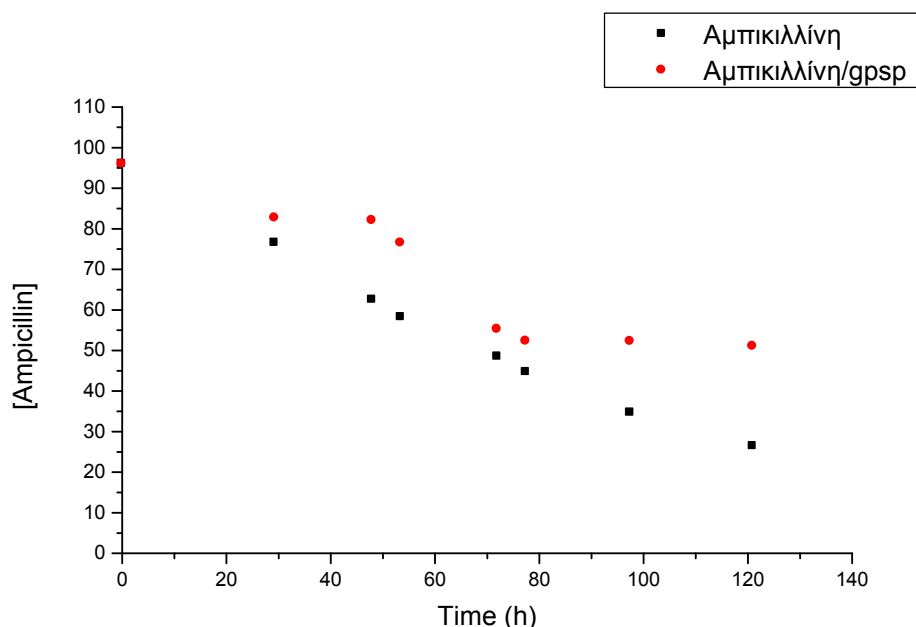
σακχάρων να είναι αντίστοιχη με αυτή των παραγώγων της γCD, η οποία αποτελείται από 8 μονάδες γλυκόζης.

Στη συνέχεια περιγράφονται τα αποτελέσματα της κάθε υδρόλυσης και δίνονται οι αντίστοιχες γραφικές παραστάσεις του ποσοστού της αμπικιλίνης που υδρολύεται συναρτήσει του χρόνου.

Υδρόλυση Α

Ετοιμάστηκαν δύο ρυθμιστικά διαλύματα με pH 7: α) διάλυμα αμπικιλίνης (**7.1α**) και β-λακταμάσης, β) διάλυμα αμπικιλίνης (**7.1α**), grsp (**4.19**) και β-λακταμάσης.

Τα διαλύματα αφέθηκαν για 17 ώρες στους 25 °C σε λουτρό σταθερής θερμοκρασίας και ελήφθησαν ¹H NMR φάσματα, στις 0, 6, 26, 46.5, 54 και 126 ώρες. Ενδιαμέσως τα διαλύματα φυλάσσονταν σε λουτρό σταθερής θερμοκρασίας στους 25 °C. Τα αποτελέσματα του λόγου των ολοκληρώσεων των κορυφών των μεθυλίων ως προς τις κορυφές του φαινυλίου της αμπικιλίνης στα ανωτέρω δείγματα δίνουν την γραφική παράσταση του παρακάτω σχήματος (Σχήμα 7.8).

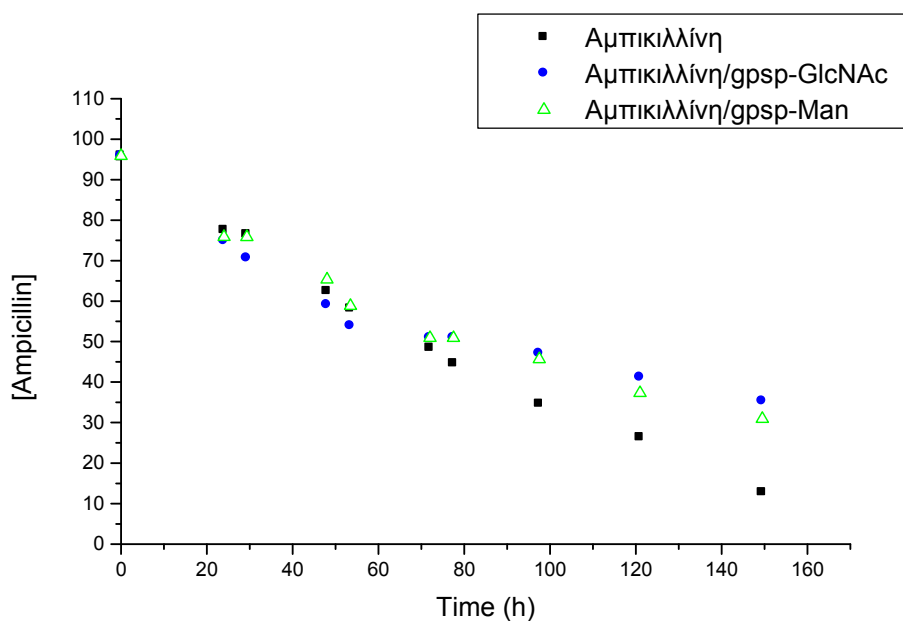


Σχήμα 7.8: Υδρόλυση Α. Αποικοδόμηση της αμπικιλίνης παρουσία grsp σε πενταπλάσια αναλογία

Η γραφική αυτή παράσταση δείχνει ότι η ενζυμική υδρόλυση της αμπικιλίνης επιβραδύνεται παρουσία grsp **4.19** κατά ~30% επιβεβαιώνοντας τα προηγούμενα πειράματα.²

Υδρόλυση Β

Ετοιμάσθηκαν τρία ρυθμιστικά διαλύματα με pH 7: α) διάλυμα αμπικιλίνης (**7.1α**) και β-λακταμάσης σε συγκέντρωση ίση με β) διάλυμα αμπικιλίνης (**7.1α**), grsp-GlcNAc (**6.38**) και β-λακταμάσης καθώς και γ) διάλυμα αμπικιλίνης (**7.1α**), grsp-Man (**6.34**) και β-λακταμάσης. Τα διαλύματα αφέθηκαν για 17 ώρες στους 25 °C σε λουτρό σταθερής θερμοκρασίας και ελήφθησαν ¹H NMR φάσματα, στις 0, 6, 24, 30, 48.5, 53.5, 72, 78, 96, 101, 168 ώρες. Ενδιαμέσως τα διαλύματα φυλάσσονταν σε λουτρό σταθερής θερμοκρασίας στους 25 °C. Τα αποτελέσματα του λόγου των ολοκληρώσεων των κορυφών των μεθυλίων ως προς τις κορυφές του φαινυλίου της αμπικιλίνης στα ανωτέρω δείγματα δίνουν την γραφική παράσταση του παρακάτω σχήματος (Σχήμα 7.9).



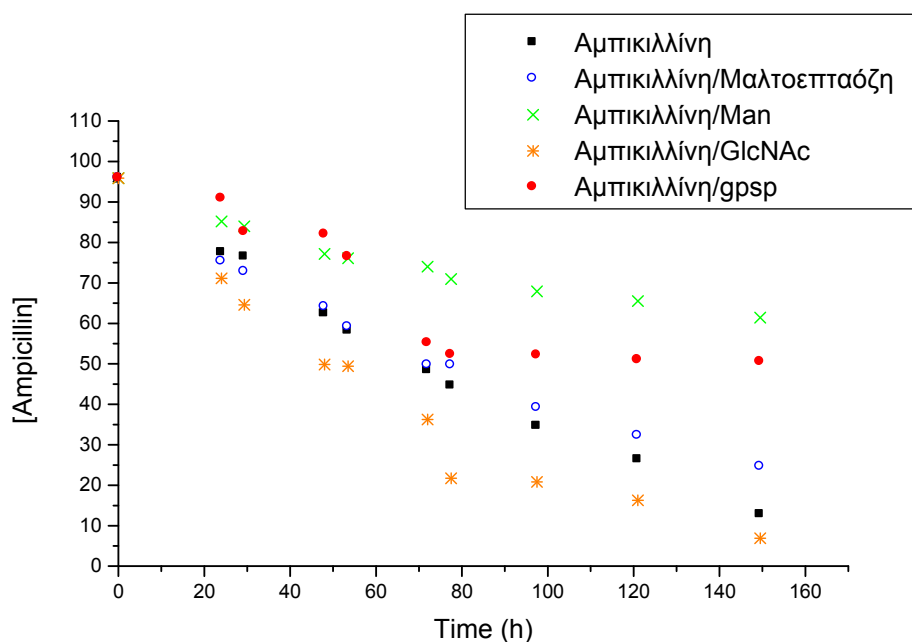
Σχήμα 7.9: Υδρόλυση Β. Αποικοδόμηση της αμπικιλίνης παρουσία grsp-GlcNAc και grsp-Man σε πενταπλάσια αναλογία

Το γράφημα δείχνει οι grsp-Man (**6.34**) και grsp-GlcNAc (**6.38**) έχουν παράλληλη συμπεριφορά, ήτοι παρουσία τους η αμπικιλίνη υδρολύεται με παρόμοιο μηχανισμό εφ'όσον οι δύο καμπύλες υδρόλυσης φαίνεται ότι διέπονται από την ίδια σταθερά χρόνου, και τελικώς αναστέλλουν την υδρόλυση της αμπικιλίνης από το ένζυμο β-λακταμάση σε ποσοστό ~30%. Στου ίδιους χρόνους, η αποικοδόμηση της

αμπικιλίνης είναι σχεδόν ολική, καθώς η αντίστοιχη καμπύλη πλησιάζει το 10% στις 170 h με διαφορετική χρονική εξάρτηση (άρα μηχανισμό) από τις δύο προηγούμενες.

Υδρόλυση Γ

Ετοιμάσθηκαν πέντε ρυθμιστικά διαλύματα με pH 7: α) διάλυμα αμπικιλίνης (**7.1α**) και β-λακταμάσης, β) διάλυμα αμπικιλίνης (**7.1α**), μαλτοεπταόζης, επταμερές της γλυκόζης (γραμμικό ανάλογο της βCD) και β-λακταμάσης, γ) διάλυμα αμπικιλίνης (**7.1α**), μαννόζης (**5.1**) και β-λακταμάσης, δ) διάλυμα αμπικιλίνης (**7.1α**), GlcNAc (**5.7**) και β-λακταμάσης και ε) διάλυμα αμπικιλίνης (**7.1α**), grsp (**4.19**) και β-λακταμάσης. Τα διαλύματα αφέθηκαν για 17 ώρες στους 25 °C σε λουτρό σταθερής θερμοκρασίας και ελήφθησαν ¹H NMR φάσματα, στις 0, 24, 29.3, 48, 53.5, 72, 77.5, 97.5, 121, 149.5 ώρες. Ενδιαμέσως τα διαλύματα φυλάσσονταν σε λουτρό σταθερής θερμοκρασίας στους 25 °C. Τα αποτελέσματα του λόγου των ολοκληρώσεων των κορυφών των μεθυλίων ως προς τις κορυφές του φαινυλίου της αμπικιλίνης στα ανωτέρω δείγματα δίνουν την γραφική παράσταση του παρακάτω σχήματος (Σχήμα 7.10).



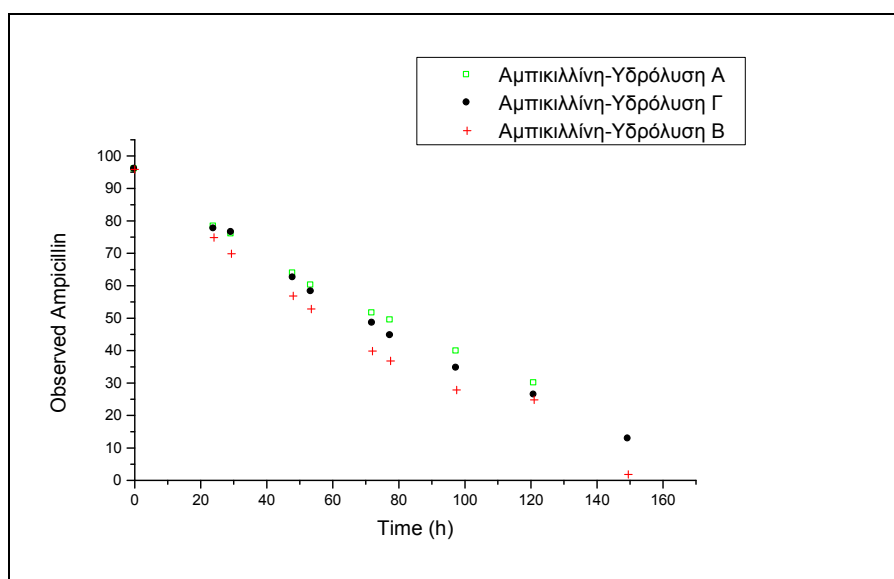
Σχήμα 7.10: Υδρόλυση Γ. Αποικοδόμηση της αμπικιλίνης παρουσία μαλτοεπταόζης και grsp σε πενταπλάσια αναλογία και παρουσία Man και GlcNAc σε σαρανταπλάσια αναλογία

Από την γραφική παράσταση αυτή εξάγεται το συμπέρασμα ότι η μαννόζη, η μαλτοεπταόζη και η **gpsp** αναστέλλουν την υδρόλυση της αμπικιλίνης από το ένζυμο β-λακταμάση, ενώ η GlcNAc επιταχύνει την υδρόλυσή του.

7.2.1 Επεξεργασία των γραφικών παραστάσεων

Στο σχήμα 7.11 φαίνεται η ενζυμική υδρόλυση μόνης της αμπικιλίνης και για τις τρεις επαναλήψεις που πραγματοποιήθηκαν, οπότε φαίνεται ότι έχει εξασφαλισθεί η επαναληψιμότητα μεταξύ των τριών πειραμάτων.

Η υδρόλυση της αμπικιλίνης ακολουθεί την ίδια πορεία και στις τρεις περιπτώσεις. Προσαρμόζοντάς τα δεδομένα σε εξίσωση εκθετικής μορφής ($y = Ae^x$) επιβεβαιώνεται η εκθετική της πορεία. Επίσης από την γραφική παράσταση του σχήματος 7.11 το πειραματικό σφάλμα υπολογισμού της μη-υδρολυμένης αμπικιλίνης μπορεί να εκτιμηθεί ως $\pm 10\%$. Βάσει των παραπάνω διαπιστώσεων συγκρίθηκαν και όλα τα υπόλοιπα δείγματα.



Σχήμα 7.11: Υδρόλυση Α, Β και Γ της αμπικιλίνης

Η ταχύτητα αντίδρασης πρώτης τάξεως δίνεται από την εξίσωση:

$$r = -d[A]/dt = k[A] \quad (1)$$

Χρησιμοποιώντας λογαρίθμους, η εξίσωση παίρνει την μορφή:

$$\ln[A] = -kt + \ln [A]_0 \quad (2)$$

$$\ln[A]_0 - \ln[A] = kt \quad (3)$$

$$\ln[A]_0/\ln[A] = kt \quad (4),$$

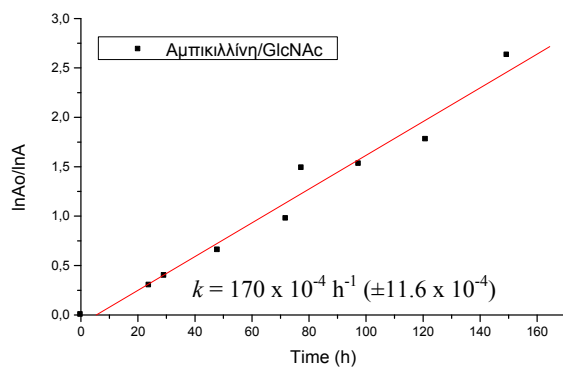
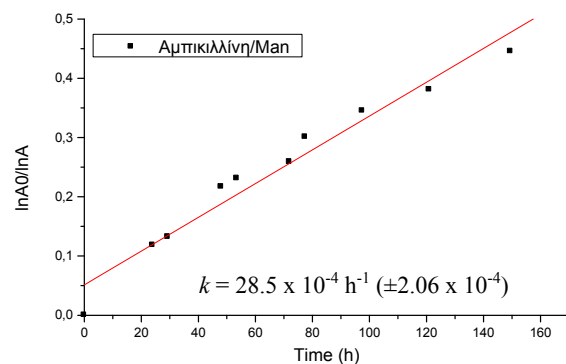
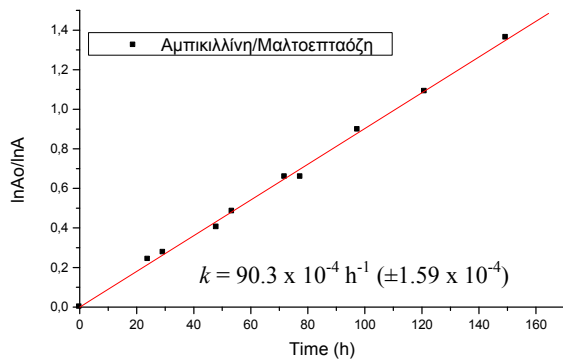
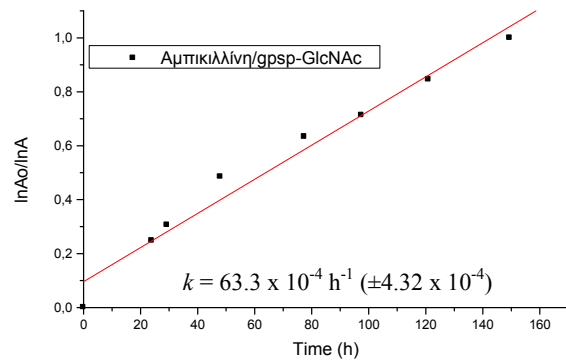
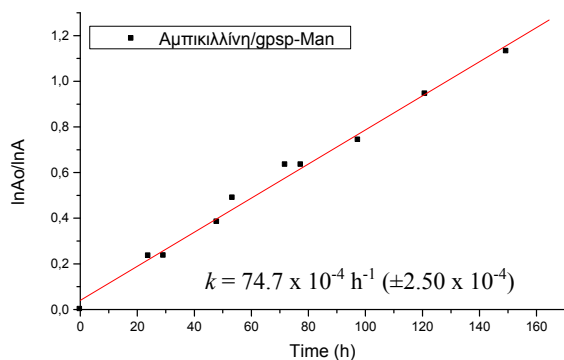
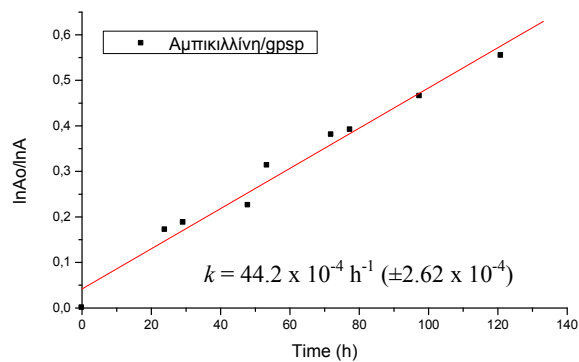
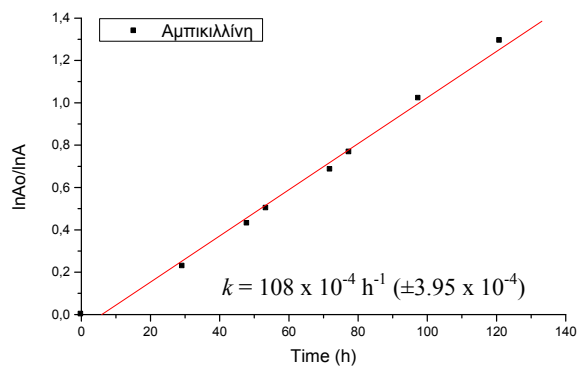
δηλαδή το γράφημα $\ln[A]_0/\ln[A]$ έναντι t είναι ευθεία γραμμή, η κλίση της οποίας δίνει την ταχύτητα της αντίδρασης.

Οι πειραματικές συνθήκες επελέγησαν ώστε η ταχύτητα αντίδρασης να είναι ψευδο-πρώτης τάξης, εφ'όσον το ένα από τα δύο αντιδρώντα (η CD) βρίσκεται σε περίσσεια και επομένως η συγκέντρωσή του είναι σταθερή. Υποθέτουμε επομένως ότι η υδρόλυση είναι συνάρτηση μόνον της συγκέντρωσης της αμπικιλίνης, $[A]$, εφ'όσον και η ποσότητα (και η δράση) του ενζύμου είναι καταλυτική. Στην εξίσωση (4) ο λόγος $\ln[A]_0/\ln[A]$ είναι η τεταγμένη, ο χρόνος t είναι η τετμημένη και η κλίση που αντιστοιχεί στην σταθερά ταχύτητας δίνεται από το k .

Τα πειραματικά δεδομένα εφαρμόστηκαν στην εξίσωση (4), προκειμένου να διαπιστωθεί εάν υφίσταται γραμμικότητα, εάν δηλαδή η υδρόλυση ακολουθεί νόμο 1^{ης} τάξεως. Στη συγκεκριμένη περίπτωση το $[A]_0$ είναι η αρχική συγκέντρωση της αμπικιλίνης, εκφρασμένη ως ο λόγος των ολοκληρώσεων των κορυφών των μεθυλίων ως προς τις κορυφές του φαινυλίου της αμπικιλίνης, που μετρήθηκε από τα ¹H NMR φάσματα. Το $[A]$ είναι συγκέντρωση της αμπικιλίνης στα δείγματά μας, εκφρασμένη ως ο λόγος των ολοκληρώσεων των κορυφών των μεθυλίων ως προς τις κορυφές του φαινυλίου της αμπικιλίνης, που μετρήθηκε από τα φάσματα ¹H NMR σε διαφορετικές χρονικές στιγμές κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

Κριτήριο καλής προσαρμογής των πειραματικών σημείων στην ανωτέρω γραμμική εξίσωση είναι το μέγεθος R^2 (goodness of fit): όσο περισσότερο το R^2 πλησιάζει τη μονάδα τόσο πιο κοντά στη γραμμικότητα είναι τα δεδομένα.

Στον σχήμα 7.12 που ακολουθεί δίνεται η προσαρμογή των σημείων για τα πειράματα υδρόλυσης. Επίσης δίνονται οι ταχύτητες υδρόλυσης σε κάθε περίπτωση και το σφάλμα που προκύπτει καθώς και το R^2 , του οποίου η τιμή είναι πλησίον της μονάδας. Η γραμμική προσαρμογή των πειραματικών σημείων, έστω και με υπολογισθέν πειραματικό σφάλμα $\sim \pm 10\%$ δείχνει ότι η ταχύτητα αντίδρασης είναι ψευδο-πρώτης τάξεως και επιβεβαιώνει την αρχική μας υπόθεση να χειριστούμε τα εν λόγω πειραματικά δεδομένα χρησιμοποιώντας την εξίσωση (1) (ταχύτητα αντίδρασης πρώτης τάξεως). Το σχετικά μεγάλο πειραματικό σφάλμα είναι ενδεχομένως υπεύθυνο για τις προηγούμενες αποκλίσεις του R^2 από τη μονάδα. Επιπλέον, η υδρόλυση των πενικιλινών παράγει σειρά συστατικών, η επίδραση/συνεισφορά των οποίων δεν είναι δυνατόν να αξιολογηθεί παρουσία ενζύμου αλλά και των λοιπών υδατανθράκων.



Σχήμα 7.12: Γραμμική προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων σύμφωνα με την εξίσωση (4)

k	Ενζυμική Υδρόλυση (παρουσία β-λακταμάσης)	Γραμμική Προσαρμογή R^2
$k = 108 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$ ($\pm 3.95 \times 10^{-4}$)	Αμπικιλλίνη	0.99606
$k = 44.2 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$ ($\pm 2.62 \times 10^{-4}$)	Αμπικιλλίνη/Grsp	0.98786
$k = 74.7 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$ ($\pm 2.50 \times 10^{-4}$)	Αμπικιλλίνη/Grsp-Man	0.99552
$k = 63.3 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$ ($\pm 4.32 \times 10^{-4}$)	Αμπικιλλίνη/Grsp-GlcNAc	0.98628
$k = 90.3 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$ ($\pm 1.59 \times 10^{-4}$)	Αμπικιλλίνη/Μαλτοεπταόζη	0.99876
$k = 28.5 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$ ($\pm 2.06 \times 10^{-4}$)	Αμπικιλλίνη/Man	0.97956
$k = 170 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$ ($\pm 11.6 \times 10^{-4}$)	Αμπικιλλίνη/GlcNAc	0.98435

7.3 Συμπεράσματα

Τα ανωτέρω πειράματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η παρουσία των κυκλοδεξτρινών σε διάλυμα αμπικιλλίνης επιβραδύνει την ενζυμική υδρόλυσή της παρόλο που δεν διαπιστώθηκε δημιουργία συμπλόκου μέσω εγκλωβισμού. Αναλυτικότερα, η τροποποιημένη κυκλοδεξτρίνη grsp (**4.19**) και τα υδατανθρακικά συμπλέγματα grsp-GlcNAc (**6.38**) και grsp-Man (**6.34**), αναστέλλουν την αποικοδόμηση της αμπικιλλίνης σε ποσοστό ~30%. Τα μικρά σάκχαρα Man (**5.1**) και

GlcNAc (**5.7**) παρουσιάζουν διαφορετική συμπεριφορά. Συγκεκριμένα, το σάκχαρο **5.1** επιβραδύνει την υδρόλυση της αμπικιλλίνης παρουσία της β-λακταμάσης σε ποσοστό ~50%, ενώ το σάκχαρο **5.7** επιταχύνει την αποικοδόμηση της σε ποσοστό ~7%. Βιβλιογραφική αναζήτηση για ύπαρξη προτιμώμενης σύνδεσης της β-λακταμάσης με μαννόζη δεν έδωσε στοιχεία, οπότε η προστατευτική δράση της μαννόζης δεν μπορεί να στηριχθεί σε προηγούμενα δεδομένα. Τέλος η μαλτοεπταόζη δεν επηρεάζει καθόλου την ταχύτητα της υδρόλυσης του αντιβιοτικού, γεγονός που υποδεικνύει ότι η ύπαρξη της κοιλότητας των κυκλοδεξτρινών διαδραματίζει κάποιο ρόλο, παρά την φαινομενική αδυναμία συμπλοκοποίησης.

Τα παρόντα πειραματικά αποτελέσματα δείχνουν ότι τα νέα υδατανθρακικά συμπλέγματα παρέχουν προστασία στην αμπικιλλίνη έναντι ενζυμικής υδρόλυσης *in vitro*, και παρ'όλο που δεν δείχθηκε μοριακός εγκλεισμός, προστατεύουν καλύτερα από την γραμμική μαλτοεπταόζη. Η σειρά αποτελεσματικότητας είναι:

man>gpcsp>gpcsp-GlcNAc>Gpcsp-Man>μαλτοεπταόζη>αμπικιλλίνη>GlcNAc

8

**ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ /
ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΙΚΩΝ
ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΩΝ ΜΕ ΛΕΚΤΙΝΕΣ ΚΑΙ
ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ / ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΙΚΩΝ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΩΝ ΜΕ ΛΕΚΤΙΝΕΣ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

8.1 Εισαγωγή

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφονται οι τρόποι με τους οποίους μελετήθηκε η δυνατότητα αναγνώρισης των σακχάρων των υδατανθρακικών συμπλεγμάτων του κεφαλαίου 6 από συγκεκριμένα υποστρώματα, δηλαδή λεκτίνες, οι οποίες, σύμφωνα με την βιβλιογραφία, αναγνωρίζουν κατά μεγάλη προτίμηση τα συγκεκριμένα σάκχαρα. Η συμβολομετρία λευκού φωτός (White light reflectance spectroscopy, WLRS), ήταν η μέθοδος με την οποία μελετήθηκε η αλληλεπίδραση των ουσιών μας με επιλεγμένες λεκτίνες, ακινητοποιημένες σε επιφάνειες. Επιπλέον, μελέτες αλληλεπίδρασης φθορίζοντων υδατανθρακικών συμπλεγμάτων με ζώντα χαρακτηρισμένα μικροβιακά στελέχη μέσω μικροσκοπίας φθορισμού και φθορισμομετρίας κατέδειξαν την ικανότητα των συμπλεγμάτων να προσκολλώνται στα συγκεκριμένα μικρόβια. Τέλος, μερικές από τις τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες του κεφαλαίου 4, χρησιμοποιήθηκαν ως φορείς σε διαλύματα με σιπροφλοξασίνη, λεβοφλοξασίνη και οξολινικό οξύ, των οποίων η αποτελεσματικότητα εκπεφρασμένη σε MIC (minimum inhibition concentration) ελέγχθηκε σε πλήθος νοσοκομειακών μικροβιακών στελεχών.

8.2 Μελέτες αλληλεπιδράσεων υδατανθρακικών συμπλεγμάτων/λεκτινών με συμβολόμετρο λευκού φωτός (WLRS)

Οι μελέτες αλληλεπιδράσεων βιομορίων με άλλα μόρια, κυρίως μικρά μόρια αναγνώρισης, είναι σημαντικές για την μελέτη βιολογικών συστημάτων. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές περιλαμβάνουν αντιστρεπτή σύνδεση με σταθερές ταχύτητας k_{on} και k_{off} , ισχυρή σύνδεση με υψηλή σταθερά σύνδεσης $K = k_{on}/k_{off}$ ή ασθενή

αλληλεπίδραση με μικρού μεγέθους k και K . Οι αλληλεπιδράσεις αυτές ανιχνεύονται, αλλά και μετρώνται ποσοτικά, εύκολα και με μεγάλη ευαισθησία, όταν ένα από τα δύο συνδεόμενα μέρη είναι επισημασμένο με φθορίζουσα ουσία, οπότε η σύνδεση ανιχνεύεται με φασματοσκοπία ή/και με μικροσκοπία φθορισμού, όπως θα περιγραφεί κατωτέρω. Η χρήση όμως φθορισμομετρικών μεθόδων προαπαιτεί ένα επιπλέον βήμα, αυτό της επισήμανσης, ενός τουλάχιστον εκ των αλληλεπιδρώντων ουσιών.

Η παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο της αλληλεπίδρασης δύο συστατικών, το ένα εκ των οποίων ακινητοποιείται σε σταθερή επιφάνεια, ενώ το άλλο διοχετεύεται στην επιφάνεια αυτή υπό μορφήν διαλύματος, ενώ ταυτόχρονα καταγράφεται η αλλαγή σε κάποια οπτική ή άλλη ιδιότητα, έχει πολλά πλεονεκτήματα. Κατ'αρχήν, δεν απαιτείται επισήμανση. Επιπλέον, λαμβάνονται πληροφορίες για την ταχύτητα της αντίδρασης, για την ισχύ της σύνδεσης και για την ταχύτητα αποσύνδεσης.

Από τις μεθόδους παρακολούθησης αλληλεπιδράσεων χωρίς επισήμανση (label-free) η πλέον χρησιμοποιούμενη και εμπορικός διαθέσιμη είναι ο Συντονισμός Επιφανειακών Πλασμονίων (Surface Plasmon Resonance, SPR). Η SPR είναι μια ευαίσθητη οπτική τεχνική που χρησιμοποιείται για τη μελέτη επιφανειακών φαινομένων πάνω σε λεπτό στρώμα ενός μετάλλου, συνηθέστερα χρυσού (Au). Η τεχνική βασίζεται στην ύπαρξη ενός παροδικού ηλεκτρομαγνητικού πεδίου πάνω στην επιφάνεια του μετάλλου και στη μέτρηση της μεταβολής του δείκτη διάθλασης του διαλύτη εγγύς της μεταλλικής επιφάνειας, λόγω π.χ. της σύνδεσης ενός αντιγόνου με το ειδικό προς αυτό αντίσωμα το οποίο βρίσκεται ακινητοποιημένο στη μεταλλική επιφάνεια. Η λειτουργία της SPR βασίζεται στην αλληλεπίδραση των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων του προσπίπτοντος μονοχρωματικού, γραμμικά πολωμένου φωτός και των ελεύθερων ηλεκτρονίων (νέφος ευκίνητων ηλεκτρονίων) που βρίσκονται στην επιφάνεια του μεταλλικού αγωγού.¹ Η μέθοδος αυτή είναι ευρέως διαδεδομένη για τη μελέτη αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών με άλλα βιομόρια ή αντισώματα, όμως λίγα παραδείγματα υπάρχουν για την μελέτη αλληλεπιδράσεων με υδατάνθρακες. Ενδεικτικά, η ομάδα του Wang *et al.*² μελέτησε με SPR τις αλληλεπιδράσεις συνθετικών ολιγοσακχαριτών συνδεδεμένων με γλυκοπρωτεΐνες με την λεκτίνη ConA (Concanavalin A), η οποία αναγνωρίζει το σάκχαρο μαννόζη, καθώς και αντίστοιχους ολιγοσακχαρίτες που διαθέτουν γαλακτόζη με την πρωτεΐνη PNA (από το φυτό *Arachis hypogaea*) ακινητοποιημένη σε επιφάνεια χρυσού (Au).

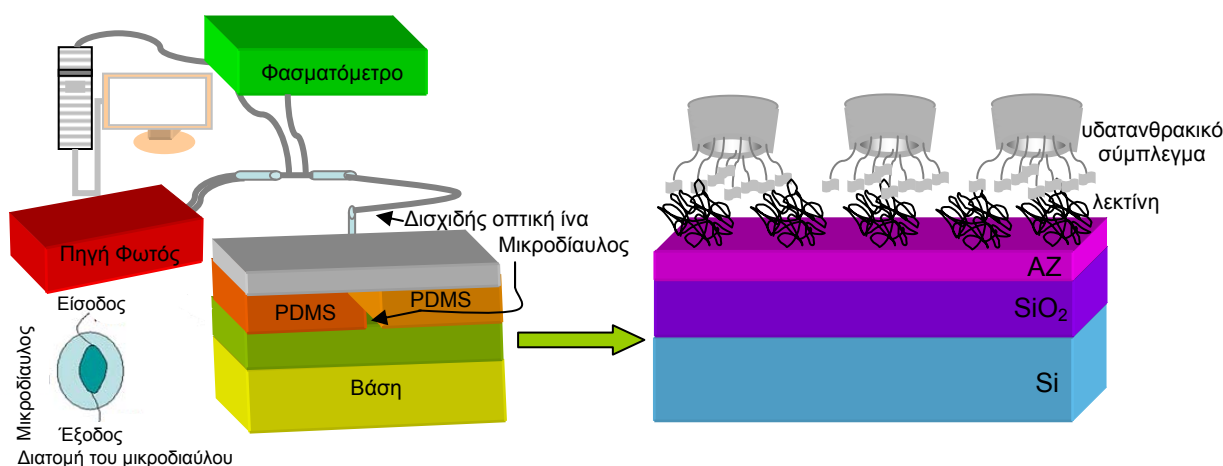
Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι καθώς αυξάνεται ο αριθμός των σακχάρων στους ολιγοσακχαρίτες, ισχυροποιείται η αλληλεπίδραση με τις λεκτίνες.

Τα εμπορικά διαθέσιμα όργανα SPR (π.χ. από την Biocore) είναι διατάξεις υψηλού κόστους και δεν είναι εύκολα διαθέσιμες. Άλλες διατάξεις που βασίζονται σε αλλαγή του δείκτη διάθλασης λόγω δημιουργίας στοιβάδας μορίων, όταν συνδέονται με άλλα μόρια, περιλαμβάνουν και την διάταξη του οπτικού συμβολομέτρου που βασίζεται στην ανάκλαση λευκού φωτός και έχει το σαφές πλεονέκτημα ότι δεν χρειάζεται μονοχρωματικό φως. Η μεθοδολογία που έχει αναπτυχθεί στο Ινστιτούτο Μικροηλεκτρονικής, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», όπου έγιναν οι μετρήσεις, συνδυάζει μικρορευστομηχανική διάταξη με υπόστρωμα υψηλής ανακλαστικότητας (δισκίδιο πυριτίου, Si και στρώμα οξειδίου, SiO₂) και κατάλληλο λογισμικό για την παρακολούθηση της αλλαγής συγκεκριμένου λ_{\max} , όπως εξηγείται κατωτέρω (Σχήμα 8.1).

Το συμβολόμετρο λευκού φωτός επιτρέπει την καταγραφή των αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα σε μία επιφάνεια μέσω ανάκλασης του φωτός σε διεπιφάνειες, οπότε και αναφέρεται ως Φασματοσκοπία Ανάκλασης Λευκού Φωτός (White Light Reflectance Spectroscopy, **WLRS**). Για την ακρίβεια, η επιφάνεια αυτή είναι δισκίδιο πυριτίου (Si) με ενδιάμεσο στρώμα οξειδίου (SiO₂) πάχους συνήθως 3000 nm και τέλος λεπτό υμένιο νεολάκκας AZ-5214 πάχους 50-100 Å. Το στρώμα οξειδίου ορίζει την οπτική διαδρομή συμβολής παρέχοντας δυνατότητα ακριβούς μέτρησης του πάχους των στοιβάδων που επικάθονται, ενώ η AZ-5214 σχηματίζει επιφάνεια με άριστη δυνατότητα προσρόφησης και ακινητοποίησης πρωτεϊνών.³ Το φως μεταφέρεται από την πηγή ορατού φωτός προς το δείγμα και προς τον ανιχνευτή μέσω οπτικών ινών (Σχήμα 8.1). Καθώς το φως μεταδίδεται διαμέσου του δείγματος καταγράφεται η μεταβολή του τοπικού λ_{\max} ακτίνας λευκού φωτός που προκύπτει καθώς ανακλάται στην διεπιφάνεια πρωτεϊνών και υδατικού ρυθμιστικού διαλύματος και συμβάλλει ενισχυτικά (constructive interference) ή αποσβεστικά (destructive interference) με την δέσμη που ανακλάται στην διεπιφάνεια Si/SiO₂. Καθώς η πρωτεΐνη εναποτίθεται στην AZ-5214 και σχηματίζεται υμένιο, επέρχεται μετατόπιση του λ_{\max} προς μεγαλύτερα μήκη κύματος (red shift) ως αποτέλεσμα της αύξησης του μήκους διαδρομής συμβολής. Τα πειραματικά δεδομένα ($\Delta\lambda_{\max}$ vs time) προσαρμόζονται στην εξίσωση της ανάκλασης³ και το ισοδύναμο πάχος του στρώματος, π.χ. της πρωτεΐνης μπορεί να υπολογισθεί καθώς και η ταχύτητα σύνδεσης και αποσύνδεσης, η σταθερά σύνδεσης

και άλλα χαρακτηριστικά. Συνθήκες αποφυγής πειραματικού λάθους πρέπει απαραίτητως να τηρούνται κατά την διαδικασία του πειράματος: σταθερή θερμοκρασία, σταθερή χαμηλή ροή διαλύματος, ώστε οι μοριακές αλληλεπιδράσεις να γίνονται σε συνθήκες ισορροπίας και αποφυγή φυσαλίδων.

Κατόπιν των ανωτέρω οι επιλεγμένες πρωτεΐνες ακινητοποιήθηκαν επί της AZ-5214 μετά από έκθεση της τελευταίας σε ροή διαλύματος πρωτεΐνης σε PBS (phosphate buffer saline). Ο σχηματισμός στρώματος πρωτεΐνης πιστοποιήθηκε από συνήθως ταχεία και μεγάλη μετατόπιση του λ_{max} εντός των πρώτων λεπτών. Η στοιβάδα κάθε πρωτεΐνης αφέθηκε να σταθεροποιηθεί για ~12 ώρες, και ακολούθως έγιναν εκπλύσεις με PBS. Εν συνεχεία με την μικρορευστομηχανική διάταξη εισήχθησαν τα διαλύματα σε PBS των ουσιών (υδατανθρακικών συμπλεγμάτων) ενώ ταυτοχρόνως καταγραφόταν η αλλαγή του σήματος, δηλαδή η μετατόπιση λ_{max} με προσαρμογή των δεδομένων στα 590-680 nm.

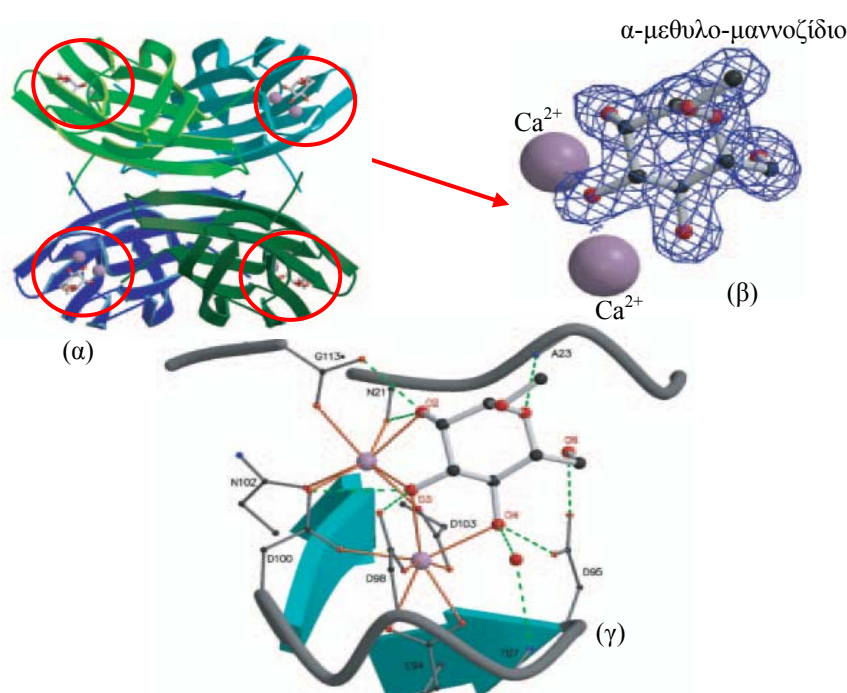


Σχήμα 8.1: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης WLRs³

Για να μελετηθούν οι αλληλεπιδράσεις των ουσιών του κεφαλαίου 6, επελέγησαν λεκτίνες με βιβλιογραφικώς διαπιστωμένη συγγένεια για σάκχαρα αναγνώρισης, όπως η D-(+)-μαννόζη (5.1) (Man), η D-(+)-γαλακτόζη (5.5) και η N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνη (5.7) (GlcNAc). Το ενδιαφέρον εστιάσθηκε στη λεκτίνη RS-III που προέρχεται από το βακτήριο *Ralstonia solanacearum*, στην GNL⁴ από το φυτό *Galanthus nivalis*, στην WGA (Wheat germ agglutinin)⁵ από το φυτό *Triticum vulgare* και στην PHA-P (Phytohemagglutinin) από το φυτό *Phaseolus vulgaris*.

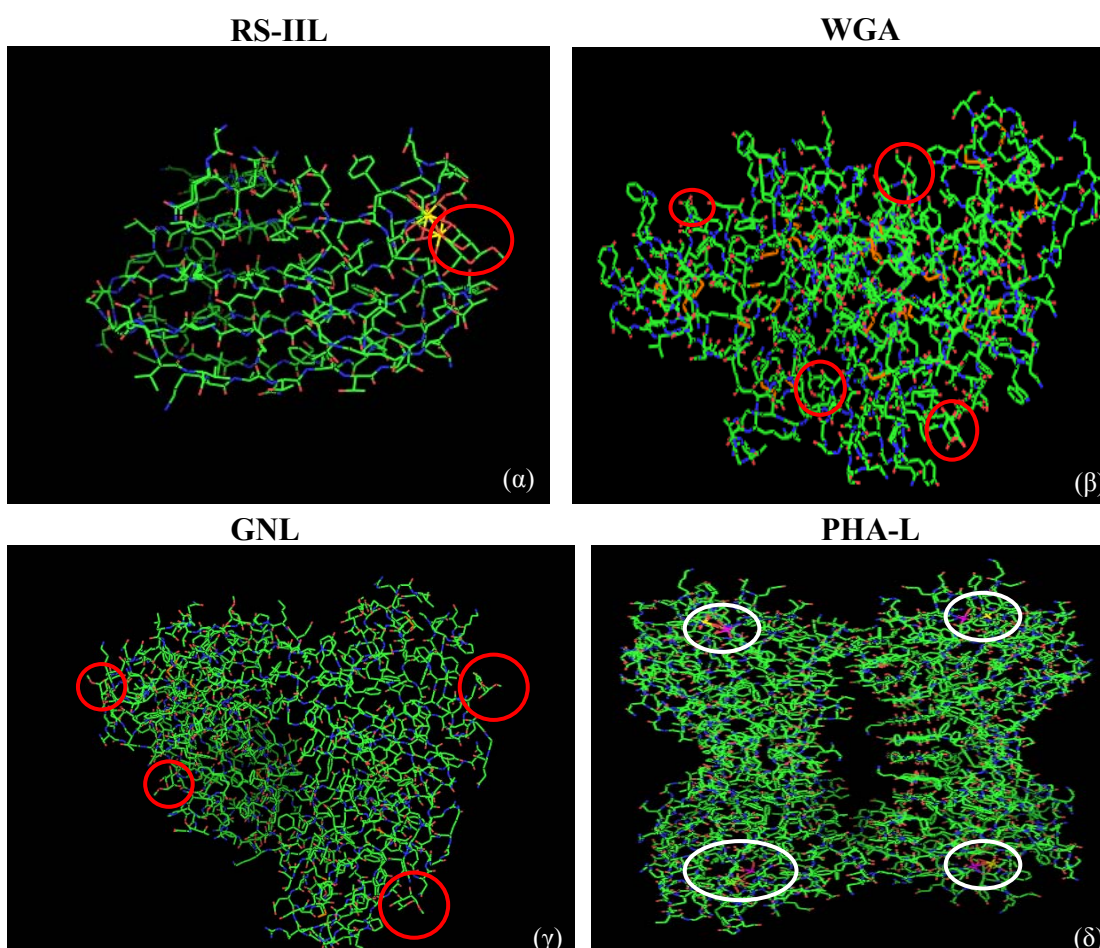
Το παθογόνο για τα φυτά βακτήριο *Ralstonia solanacearum* παράγει δύο λεκτίνες, την RSL και την RS-III, οι οποίες παρουσιάζουν διαφορετική συνάφεια ως

προς τη φουκόζη. Η RSL αναγνωρίζει με φθίνουσα δυνατότητα την L-φουκόζη, την L-γαλακτόζη, την D-αραβινόζη, την D-φρουκτόζη και την D-μαννόζη,⁶ ενώ η RS-III εξειδικεύεται, με κατά σειρά φθίνουσας συγγένειας, στην D-φρουκτόζη, την D-μαννόζη, την L-φουκόζη, την L-γαλακτόζη και την D-αραβινόζη. Η δομή στην κρυσταλλική κατάσταση της RS-III υπό μορφή συμπλόκου με το α-μεθυλομαννοζίδιο (Σχήμα 8.2) δείχνει ότι το σύμπλοκο στην μοναδιαία κυψελίδα είναι τετραμερές.⁷ Η ασύμμετρη μονάδα έχει ένα μονομερές που αποτελείται από 113 αμινοξέα, ένα μόριο α-μεθυλομαννοζιδίου και δύο άτομα ασβεστίου, τα οποία θεωρούνται απαραίτητα για την επιτυχή πρόσδεση με το ανάλογο σάκχαρο.⁸ Τα δύο αυτά κατιόντα βρίσκονται σε απόσταση 3.75 Å μεταξύ τους και αλληλεπιδρούν με τα υδροξύλια 2, 3 και 4 του σακχάρου. Τα υδροξύλια 3, 4 και 6 του σακχάρου αλληλεπιδρούν με δεσμούς υδρογόνου με το γλουταμικό οξύ (Glu-94) και το ασπαρτικό οξύ (Asp-103) της λεκτίνης. Το υδροξύλιο 2 δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με την ασπαραγίνη (Asn-21) και το υδροξύλιο 5 με την αλανίνη (Ala-21). Στην περίπτωση αυτή οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις είναι περιορισμένες και μόνο η O-μεθυλο ομάδα αλληλεπιδρά με την αλανίνη (Ala-23) (Σχήμα 8.2).



Σχήμα 8.2: Κρυσταλλική δομή της RS-III ως συμπλόκου με το α-μεθυλο μαννοζίδιο⁷: (α) το τετραμερές στην μοναδιαία κυψελίδα (β) η μοριακή δομή του συμπλοκοποιημένου μεθυλο-α-μαννοζιδίου με τα κατιόντα ασβεστίου (γ) οι ακριβείς αλληλεπιδράσεις σακχάρου-πρωτεΐνης αναπαρίστανται με διακεκομμένη γραμμή

Η λεκτίνη GNL παρουσιάζει εξειδίκευση στην αναγνώριση της α-μαννόζης (α-Man). Είναι τετραμερής και το κάθε μονομερές έχει μοριακό βάρος ~13 kDa (Σχήμα 8.3γ σύμπλοκο με α-μεθυλομαννοζίδιο). Η WGA αποτελείται από δύο διμερή (70 kDa το τετραμερές) και αναγνωρίζει την *N*-ακετυλο-γλυκοζαμίνη (GlcNAc) (Σχήμα 8.3β). Τέλος η PHA-P, η οποία αποτελείται από την PHA-E και την PHA-L⁹ (Σχήμα 8.3δ) αναγνωρίζει την γαλακτόζη (Gal) και είναι τετραμερής με μοριακό βάρος 127 kDa. Στην περίπτωση της PHA-L δεν ευρέθηκε δομή συμπλεγμένη με σάκχαρο στην βάση κρυσταλλογραφικών δεδομένων PDB (RCSB Protein data Bank),⁵ αλλά η πρωτεΐνη είναι συγκρυσταλλωμένη με ένα κατιόν Mn^{2+} και ένα κατιόν Ca^{2+} σε κάθε ένα μονομερές. Στα σχήματα που ακολουθούν παρουσιάζονται οι δομές των ανωτέρω πρωτεϊνών.



Σχήμα 8.3: Δομές⁵ των λεκτινών: (α) *RS-III* - μονομερές τμήμα της τετραμερούς δομής ως σύμπλοκο με το α-μεθυλομαννοζίδιο, (β) *WGA* - τετραμερής, χωρίς μέταλλα, ως σύμπλοκο με την *N*-ακετυλογλυκοζαμίνη (GlcNAc), (γ) *GNL* - τετραμερής, χωρίς μέταλλα, ως σύμπλοκο με το α-μεθυλομαννοζίδιο, (δ) *PHA-L* - τετραμερής, χωρίς σάκχαρο, ως σύμπλοκο με ιόντα Ca^{2+} και Mn^{2+} (Σε κόκκινο κύκλο εγκλείεται η περιοχή πρόσδεσης του κατάλληλου σακχάρου, σε λευκό κύκλο τα σημεία σύνδεσης των ιόντων Ca^{2+} και Mn^{2+}).

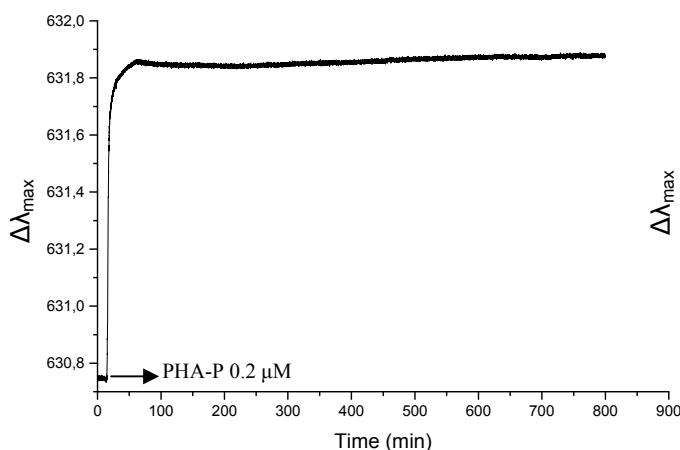
Με την μέθοδο του οπτικού συμβολομέτρου μελετήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις των λεκτινών PHA-P, WGA και GNL με τα υδατανθρακικά συμπλέγματα που φέρουν τα αντίστοιχα σάκχαρα αναγνώρισης για κάθε λεκτίνη.

PHA-P / Gal

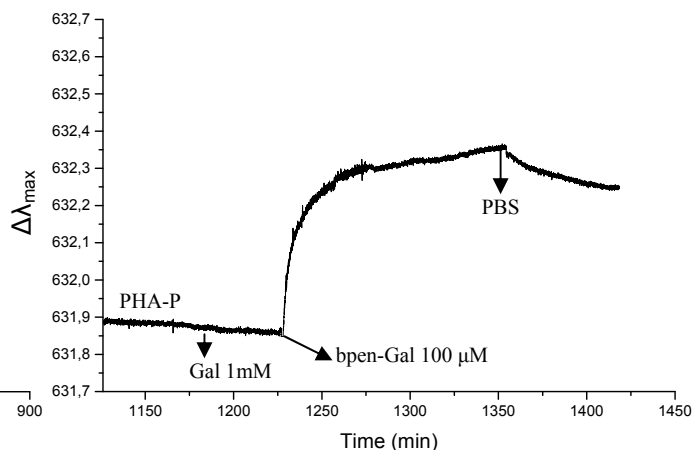
Η λεκτίνη PHA-P αναγνωρίζει την γαλακτόζη (Gal) όπως αναφέρθηκε στην σελ. 141. Η PHA-P είναι τετραμερής στην κρυσταλλική κατάσταση και αποτελείται από δύο πρωτεΐνες, την PHA-E (126 kD) και την PHA-L (128 kD). Δεδομένου του μεγάλου μοριακού της βάρους η πρωτεΐνη χρειάζεται να διαλυθεί σε PBS τουλάχιστον 12 ώρες πριν την επίστρωσή της στην διάταξη WLRS, όπως διαπιστώθηκε πειραματικώς. Προφανώς η διάλυση της στερεάς πρωτεΐνης σε PBS απαιτεί χρόνο όχι μόνο για την ενυδάτωση αλλά κυρίως για την αναδίπλωσή της σε λειτουργικό τρισδιάστατο σχήμα. Η επίστρωση της PHA-P από διάλυμα PBS 0.2 μM (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) έγινε επιτυχώς δεδομένου ότι παρατηρήθηκε ταχεία και κατακόρυφη άνοδος της γραμμής βάσης στην διάταξη WLRS (Σχήμα 8.4), ενώ σχετικά σύντομα (εντός 70 min) παρατηρήθηκε πλατώ που αντιστοιχεί σε συνολική μετατόπιση $\Delta\lambda_{\text{max}} = 11 \text{ \AA}$, στο οποίο δεν παρουσιάστηκε μείωση μετά από έκπλυση με PBS. Η πρωτεϊνική στοιβάδα, όπως διαπιστώθηκε σε επανειλημμένα πειράματα, πρέπει να παραμείνει επί ώρες στην επιφάνεια της ρητίνης AZ-5214 ώστε να επέλθει θερμοδυναμική ισορροπία μεταξύ των αλληλεπιδρώντων μορίων με την ρητίνη, και τελικώς η εν διαλύματι τριτοταγής/τεταρτοταγής δομή να τροποποιηθεί προς τελική, σταθερή δομή επί του στερεού υποστρώματος. Βάσει αυτών, το πρωτεϊνικό διάλυμα σε PBS αφήνεται στην επιφάνεια του δισκιδίου Si/SiO₂/AZ-5214 επί δωδεκάωρο τουλάχιστον. Στην συνέχεια η πρωτεϊνική στοιβάδα είναι έτοιμη να δεχθεί υδατανθρακικά συμπλέγματα γαλακτόζης ώστε να ελεγχθεί εάν και κατά πόσο είναι εφικτή η σύνδεσή τους με την PHA-P.

Τα υδατανθρακικά συμπλέγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το **bpsp-Gal (6.35)** και το **bpen-Gal (6.47)** με 7 σάκχαρα αναγνώρισης το κάθε ένα και το **bmsp-Gal (6.41)** με 1 σάκχαρο αναγνώρισης, σε συγκέντρωση 100 μM έκαστο. Τέλος το σάκχαρο Gal (5.5) χρησιμοποιήθηκε σε υψηλή συγκέντρωση 1 mM. Παρατηρήθηκε ιδιαίτερη μεταβολή του $\Delta\lambda_{\text{max}}$ στα υδατανθρακικά συμπλέγματα με 7 σάκχαρα αναγνώρισης (Σχήμα 8.5, Σχήμα 8.6), ενώ δεν υπήρξε αύξηση ούτε στο αντίστοιχο υδατανθρακικό σύμπλεγμα που έφερε 1 σάκχαρο αναγνώρισης (**bmsp-Gal**) στην

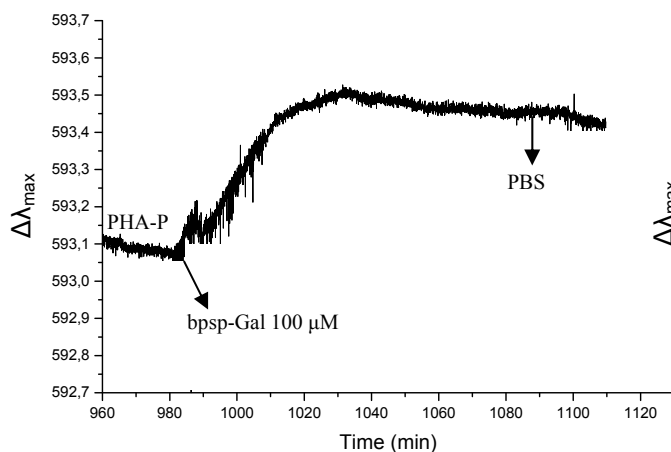
πρωτοταγή πλευρά αλλά ούτε και στο αντίστοιχο μονομερές του (**Gal**) σε δεκαπλάσια συγκέντρωση. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η περίπτωση της τροποποιημένης κυκλοδεξτρίνης **bpen-Gal (6.47)**, η οποία έδειξε μεγάλη αύξηση $\Delta\lambda_{\max}$ καθώς οι ελεύθερες αμινομάδες που διαθέτει αλληλεπιδρούν με τις αρνητικά φορτισμένες ομάδες της λεκτίνης. Συγκεκριμένα η μεταβολή της μετατόπισης του λ_{\max} κατά την απόθεση της πρωτεΐνης PHA-P ήταν 11 Å (Σχήμα 8.4), της **bpen-Gal (6.47)** 5 Å και κατόπιν εκπλύσεως 3.9 Å (Σχήμα 8.5) και της **bpsp-Gal (6.35)** 3.7 Å (Σχήμα 8.6). Από την κλίση της καμπύλης ανόδου διαφαίνεται ότι η ταχύτητα σύνδεσης της **bpen-Gal (6.47)** είναι μεγαλύτερη από αυτή της **bpsp-Gal (6.35)** και μπορεί να εξηγηθεί από την ικανότητα των αμινομάδων της **bpen-Gal (6.47)** να συνδέεται πολλαπλώς με αρνητικώς φορτισμένες πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων της πρωτεΐνης.



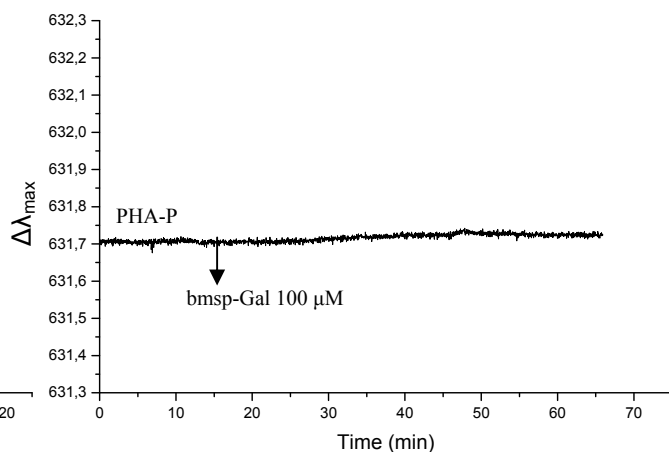
Σχήμα 8.4: Σχηματισμός στοιβάδας PHA-P σε πραγματικό χρόνο, μετά από ροή διαλύματος PHA-P σε PBS πάνω από επιφάνεια AZ-5214



Σχήμα 8.5: Gal και bpen-Gal επί στοιβάδας PHA-P



Σχήμα 8.6: bpsp-Gal επί στοιβάδας PHA-P



Σχήμα 8.7: bmsp-Gal επί στοιβάδας PHA-P

Στον πίνακα που ακολουθεί συνοψίζονται τα ακριβή αποτελέσματα που ελήφθησαν για κάθε ουσία. Συγκεκριμένα δίνονται οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν, τα μοριακά βάρη (MW) των ουσιών, ο λόγος των MW μεταξύ της πρωτεΐνης και των ουσιών καθώς και ο αντίστοιχος λόγος της μεταβολής $\Delta\lambda_{\max}$. Αν δεχθούμε ότι το πάχος του υμενίου που σχηματίζεται από τις **6.35**, **6.47**, **6.41** και **5.5** είναι ανάλογο του μοριακού βάρους του μονομερούς τμήματος της πρωτεΐνης (δεδομένου ότι υπάρχει 1 θέση δέσμευσης ανά μονομερές, οπότε ο λόγος MW θα αναμενόταν αντίστοιχος του λόγου $\Delta\lambda_{\max}$), τότε διαπιστώνουμε ότι οι προς μελέτη ουσίες συνδέονται σε περισσότερες από μία θέσεις (unspecific), οι οποίες παραμένουν και μετά από τις εκπλύσεις με PBS, γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη ισχυρής σύνδεσης μεταξύ των υδατανθρακικών συμπλεγμάτων και της λεκτίνης PHA-P.

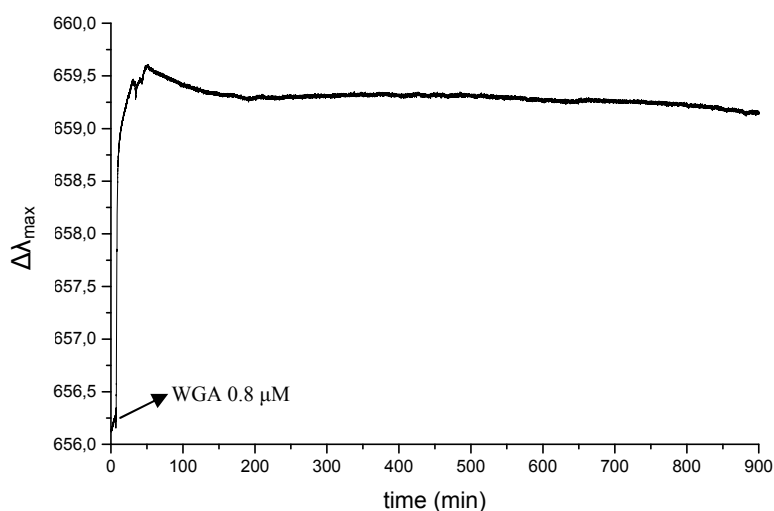
Πίνακας 8.1: Αποτελέσματα οπτικού συμβολόμετρου με τη λεκτίνη PHA-P

Ουσία	Συγκέντρωση	$\Delta\lambda_{\max}$	M.W	Λόγος MW πρωτεΐνης/ ουσίας	Λόγος $\Delta\lambda_{\max}$ πρωτεΐνης/ ουσίας
PHA-P	0.2 μ M	11 Å	32 kDa (μονομερές)		
bpsp-Gal (6.35)	100 μ M	3.7 Å	3188	10	2.9
bpen-Gal (6.47)	100 μ M	3.9 Å	3181	10	2.8
bmsp-Gal (6.41)	100 μ M	0	1428	22	-
Gal (5.5)	1 mM	0	180	177	-

WGA / GlcNAc

Η λεκτίνη WGA, η οποία εξειδικεύεται στην αναγνώριση του σακχάρου *N*-ακετυλογλυκοζαμίνη (GlcNAc), μελετήθηκε με υδατανθρακικά συμπλέγματα που διαθέτουν 1, 7, 14 και 16 υποκαταστάτες GlcNAc την **bmsp-GlcNAc** (6.42), την **bpsp-GlcNAc** (6.37), την **bedta-GlcNAc** (6.52) και την **gedta-GlcNAc** (6.53) αντιστοίχως, καθώς και με το μονομερές σάκχαρο **GlcNAc** (5.7). Αρχικά

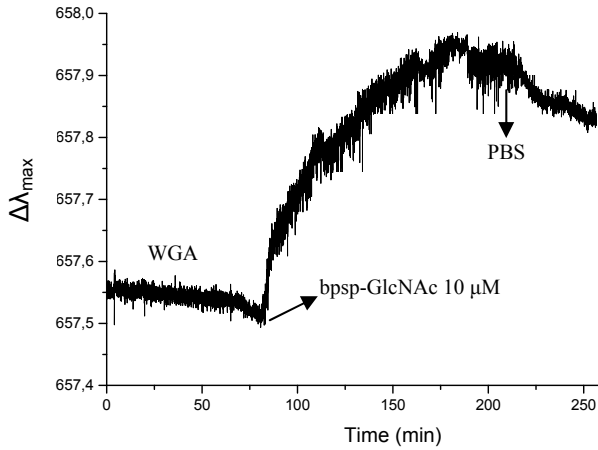
επιστρώθηκε η WGA από διάλυμα PBS συγκέντρωσης 0.8 μM (28 $\mu\text{g/mL}$) σε επιφάνεια AZ-5214 οπότε και παρατηρήθηκε ταχεία μεταβολή του λ_{max} και άνοδος της γραμμής βάσης (baseline) κατά 29 Å, όπως φαίνεται στο Σχήμα 8.8. Η επιστροφή της WGA έγινε ομοιόμορφα σε παράλληλα κανάλια (fluidic channels), και εν συνεχεία η πρωτεΐνη αφέθηκε στο PBS για 12 ώρες ώστε να επέλθει ισορροπία στην επιφανειακή οργάνωσή της.



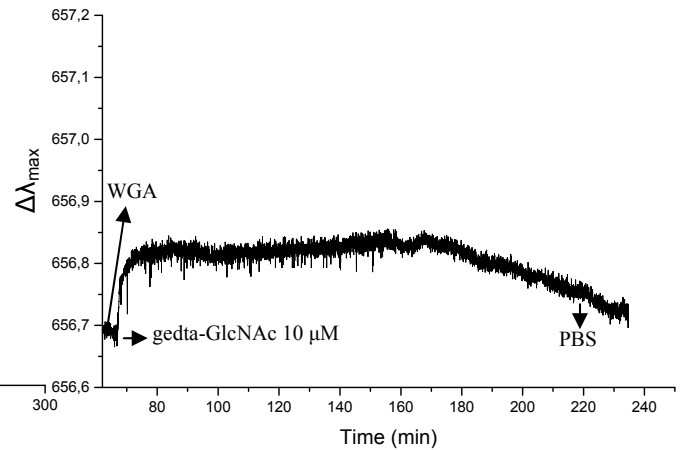
Σχήμα 8.8: Σχηματισμός στοιβάδας WGA σε πραγματικό χρόνο, μετά από ροή διαλύματος WGA σε PBS πάνω από επιφάνεια AZ-5214

Από το σχήμα 8.8 συνάγεται ότι η WGA επικάθεται σχεδόν ακαριαία σχηματίζοντας στοιβάδα η οποία παραμένει σταθερή επί ώρες. Σημειωτέον ότι μεταβολή του λ_{max} δεν μειώθηκε μετά από έκπλυση με PBS. Εν συνεχεία στο κάθε κανάλι προστέθηκε η προς μελέτη ουσία υπό μορφή διαλύματος σε PBS (Σχήματα 8.9-8.14) και αφού παρατηρήθηκε η δημιουργία πλατώ ακολούθησε έκπλυση με PBS pH 7.4. Παρουσιάστηκε ικανοποιητική μεταβολή του $\Delta\lambda_{\text{max}}$ στην περίπτωση των υδατανθρακικών συμπλεγμάτων που διέθεταν 7, 14 ή 16 σάκχαρα αναγνώρισης, ενώ στην περίπτωση που το υδατανθρακικό σύμπλεγμα διέθετε μόλις 1 σάκχαρο αναγνώρισης ή χρησιμοποιήθηκε το απλό σάκχαρο δεν υπήρξε καμία αλληλεπίδραση. Συγκεκριμένα στην **bpsp-GlcNAc (6.37)** [10 μM] παρατηρήθηκε μεταβολή του $\Delta\lambda_{\text{max}}$ κατά 4.1 Å ενώ μετά την έκπλυση παρέμειναν 3.2 Å (Σχήμα 8.9). Στην **gedta-GlcNAc (6.53)** [10 μM] παρατηρήθηκε μεταβολή του $\Delta\lambda_{\text{max}}$ κατά 1.5 Å και μετά την έκπλυση παρέμειναν μόλις 0.4 Å (Σχήμα 8.10). Στην **bedta-GlcNAc (6.52)** [10 μM] παρατηρήθηκε μεταβολή του $\Delta\lambda_{\text{max}}$ κατά 3.1 Å και μετά την έκπλυση παρέμειναν 1.9 Å (Σχήμα 8.11). Τέλος στις περιπτώσεις του υδατανθρακικού

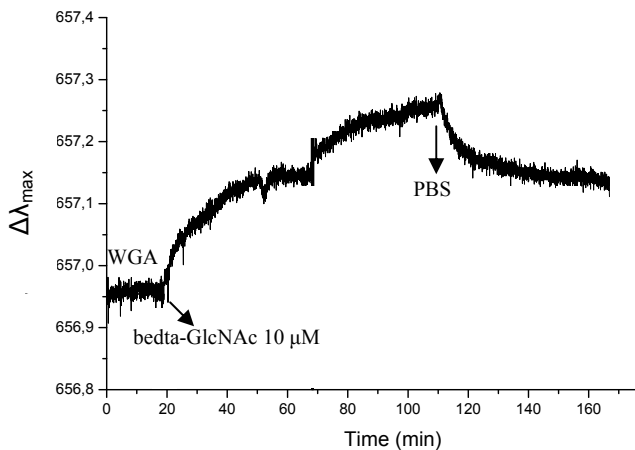
συμπλέγματος που διαθέτει 1 σάκχαρο αναγνώρισης **bmsp-GlcNAc (6.42)** [100 μM] (Σχήμα 8.12) καθώς και του αντίστοιχου μονομερούς **GlcNAc (5.7)** [1 mM] (Σχήμα 8.13) δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή του $\Delta\lambda_{\text{max}}$. Οι μεταβολές συνοψίζονται στον πίνακα 8.2.



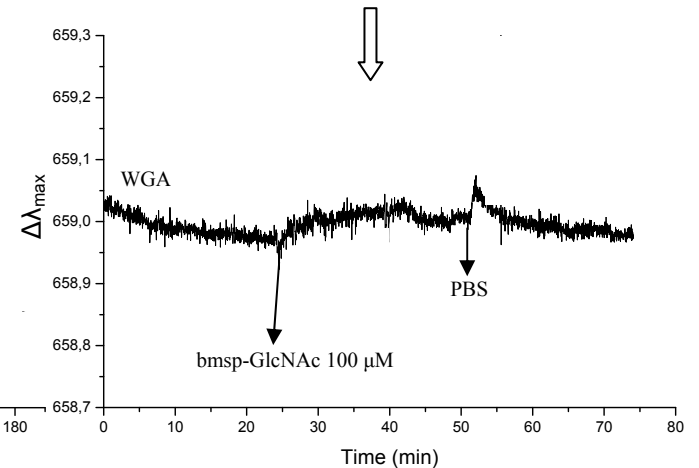
Σχήμα 8.9: *bmsp-GlcNAc* επί στοιβάδας WGA



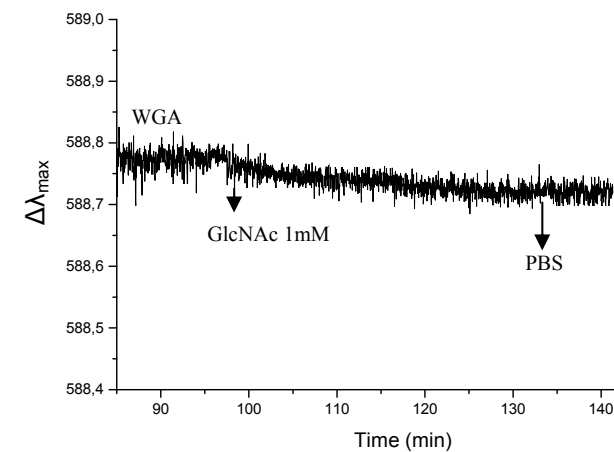
Σχήμα 8.10: *gedta-GlcNAc* επί στοιβάδας WGA



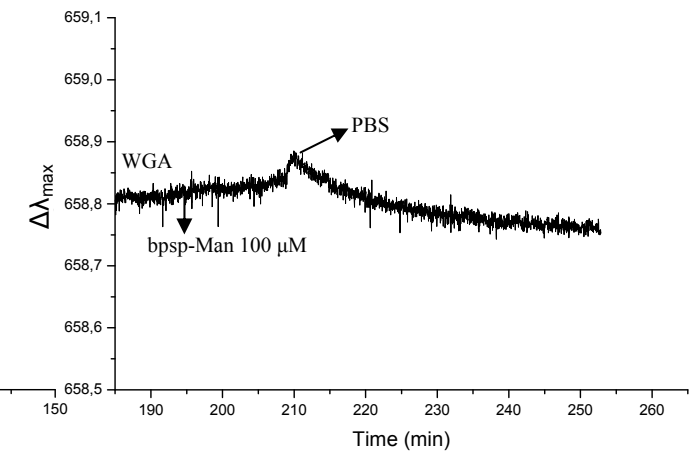
Σχήμα 8.11: *bedta-GlcNAc* επί στοιβάδας WGA



Σχήμα 8.12: *bmsp-GlcNAc* επί στοιβάδας WGA



Σχήμα 8.13: *GlcNAc* επί στοιβάδας WGA



Σχήμα 8.14: *bmsp-Man* επί στοιβάδας WGA

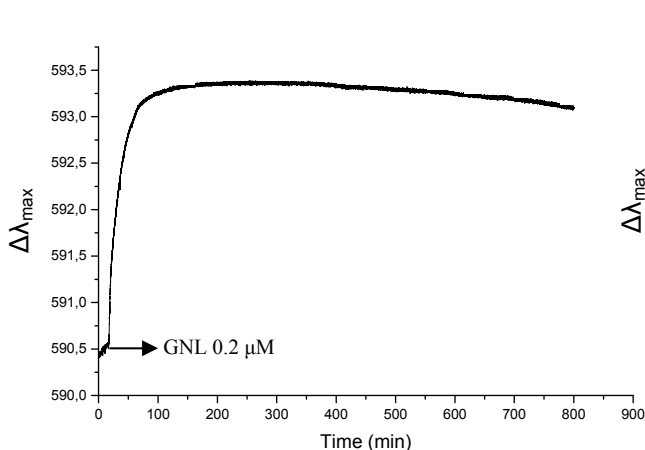
Διαπιστώνεται συνεπώς ότι η αλληλεπίδραση των σακχάρων με τις βακτηριακές λεκτίνες είναι ισχυρότερη όταν αυτά προσεγγίζουν τις λεκτίνες ως υδατανθρακικά συμπλέγματα (glycoclusters), από ότι ως τα αντίστοιχα μονομερή τους. Επιπροσθέτως στο κανάλι του Σχήματος 8.12, εφ'όσον δεν είχε παρατηρηθεί μεταβολή και μετά από εκτεταμένη έκπλυση, διοχετεύθηκε η **bpsp-Man (6.33)** σε συγκέντρωση 100 μM , δεκαπλάσια από αυτές των Σχημάτων 8.9, 8.10 και 8.11. Δεν παρατηρήθηκε μεταβολή του λ_{max} , επομένως η **bpsp-Man (6.33)** δεν δεσμεύεται δηλαδή δεν αναγνωρίζεται από την WGA. Η **gedta-GlcNAc (6.53)** δεσμεύεται ταχύτερα αλλά λιγότερο από την **bpsp-GlcNAc (6.37)**. Η **bpsp-GlcNAc (6.37)** παραμένει μετά την έκπλυση, σχηματίζοντας ατελείς στοιβάδες. Η **bedta-GlcNAc (6.52)** φαίνεται επίσης να σχηματίζει ατελή στοιβάδα, ενώ η δέσμευσή της είναι πιο ισχυρή. Τα ακριβή αποτελέσματα που ελήφθησαν για κάθε ουσία καθώς και οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν συνοψίζονται στον πίνακα 8.2.

Πίνακας 8.2: Αποτελέσματα οπτικού συμβολόμετρου με τη λεκτίνη WGA

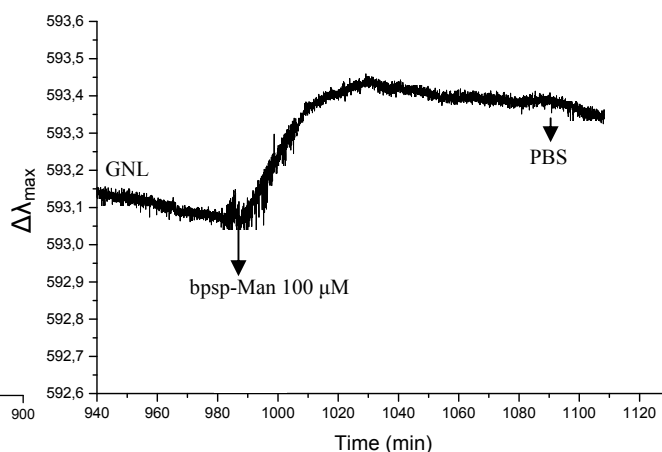
Ουσία	Συγκέντρωση	$\Delta\lambda_{\text{max}}$	M.W	Λόγος MW πρωτεΐνης/ ουσίας	Λόγος $\Delta\lambda_{\text{max}}$ πρωτεΐνης/ ουσίας
WGA	0.8 μM	29 Å	17.5 kDa (μονομερές)		
bpsp-GlcNAc (6.37)	10 μM	3.2 Å	3475	5	9
bedta-GlcNAc (6.52)	10 μM	1.9 Å	5584	3	15
gedta-GlcNAc (6.53)	10 μM	0.4 Å	6382	2.7	72
bmsp-GlcNAc (6.42)	100 μM	0	1469	11.9	-
GlcNAc (5.7)	1 mM	0	221	79	-
bpsp-Man (6.33)	100 μM	0	3188	5.5	-

GNL / Man

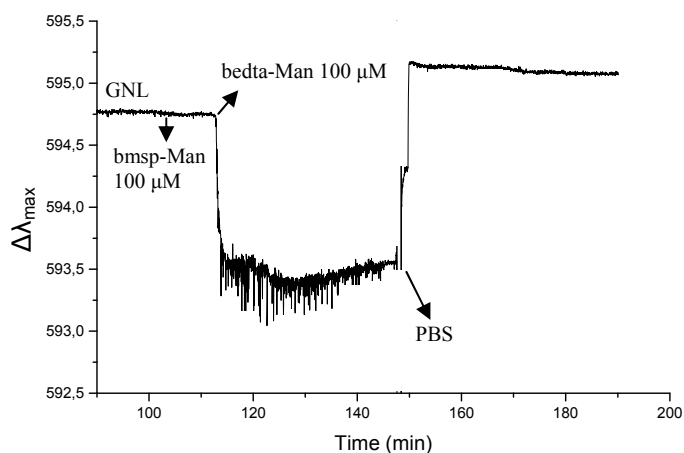
Τέλος μελετήθηκε η λεκτίνη GNL, η οποία αναγνωρίζει την μαννόζη (Man). Όπως στα προαναφερθέντα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν υδατανθρακικά συμπλέγματα με 1, με 7 και με 14 σάκχαρα αναγνώρισης, η **bmsp-Man (6.40)** (Σχήμα 8.17), η **bpsp-Man (6.33)** (Σχήμα 8.16) και η **bedta-Man (6.49)** (Σχήμα 8.17) αντιστοίχως. Η λεκτίνη GNL (0.2 μM σε PBS, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) προσδέθηκε στην επιφάνεια του πολυμερούς AZ-5214 εμφανίζοντας $\Delta\lambda_{\text{max}} = 25 \text{ \AA}$, ενώ αύξηση του μήκους κύματος κατά 3.6 \AA παρατηρήθηκε όταν διοχετεύτηκε η **bpsp-Man (6.33)**, ενώ για την **bmsp-Man (6.40)** δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή. Σε όλες τις περιπτώσεις η έκπλυση με PBS δεν επηρέασε την μεταβολή του $\Delta\lambda_{\text{max}}$.



Σχήμα 8.15: Σχηματισμός στοιβάδας GNL σε πραγματικό χρόνο, μετά από ροή διαλύματος GNL σε PBS πάνω από επιφάνεια AZ-5214



Σχήμα 8.16: bpsp-Man επί στοιβάδας GNL



Σχήμα 8.17: bmsp-Man και bedta-Man επί στοιβάδας GNL

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα στον πίνακα 8.3, διαπιστώνεται ότι το υδατανθρακικό σύμπλεγμα με 7 σάκχαρα εξειδίκευσης **bpsp-Man (6.33)** προσκολλάται σε ιδιαίτερα ικανοποιητικό βαθμό στην πρωτεΐνη GNL, ενώ σε εκείνο που διαθέτει μόλις 1 σάκχαρο αναγνώρισης, το **bmsp-Man (6.40)** δεν παρατηρείται καμία μεταβολή του $\Delta\lambda_{max}$. Η **bpsp-Man (6.33)** αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη GNL σχηματίζοντας ατελείς στοιβάδες και η δέσμευσή της είναι σχετικώς μη αντιστρεπτή καθώς παραμένει κατόπιν εκπλύσεως με PBS. Στην περίπτωση του υδατανθρακικού συμπλέγματος **bedta-Man (6.49)** τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά καθώς η ελαφριά χρώση του διαλύματος επηρέασε τον δείκτη διάθλασης και προκάλεσε την παρουσία έντονου θορύβου, όμως η ακαριαία αλλαγή της γραμμής βάσης δείχνει μεγάλη αλλαγή του δείκτη διάθλασης, άρα και ταχύτατη αντίδραση, που όμως δεν είναι δυνατόν να αναλυθεί.

Πίνακας 8.3: Αποτελέσματα οπτικού συμβολόμετρου με τη λεκτίνη GNL

Ουσία	Συγκέντρωση	$\Delta\lambda_{max}$	M.W	Λόγος MW πρωτεΐνης/ ουσίας	Λόγος $\Delta\lambda_{max}$ πρωτεΐνης/ ουσίας
GNL	0.2 μ M	25 Å	13 kDa (μονομερές)		
bpsp-Man (6.33)	100 μ M	3.6 Å	3188	4	7
bmsp-Man (6.40)	100 μ M	0	1428	9	-

Τα δεδομένα των διαγραμμάτων αλληλεπίδρασης (binding) των ουσιών με ακινητοποιημένες πρωτεΐνες υπεβλήθησαν σε επεξεργασία θεωρώντας την διαδικασία σύνδεσης αντίδρασης 1^{ης} τάξης. Πρόκειται για μονο-εκθετική αντίδραση, η οποία περιγράφεται με την εξίσωση:

$$y = a(1 - e^{-bt})$$

όπου

$$y = \Delta\lambda_{max}$$

$$t = \text{χρόνος (s)}$$

$$b(s^{-1}) = k_{on}[ουσία] \Rightarrow k_{on} = b/[ουσία] (s^{-1} \cdot M^{-1}) \Rightarrow k_{on} = b \cdot [ουσία]^{-1} (s^{-1} \cdot M^{-1})$$

Επομένως η σταθερά σύνδεσης k_{on} εξαρτάται μόνο από την συγκέντρωση της προς μελέτη ουσίας.

Για την επεξεργασία των δεδομένων των διαγραμμάτων αποσύνδεσης (dissociation) χρησιμοποιήθηκε η μονοεκθετική εξίσωση:

$$y = A_1 e^{-x/t_1}$$

όπου

$$y = \Delta\lambda_{max}$$

$$t = \text{χρόνος (s)}$$

$$t_1 = 1/k_{off}$$

$$k_{off} = 1/t_1 (s^{-1})$$

Τα αποτελέσματα των εκθετικών προσαρμογών των πειραματικών δεδομένων παρουσιάζονται στον πίνακα 8.4.

Πίνακας 8.4: Αποτελέσματα των εκθετικών προσαρμογών των πειραματικών δεδομένων

ΣΥΝΔΕΣΗ (BINDING)				ΑΠΟΣΥΝΔΕΣΗ (DISSOCIATION)		
Ουσία	Συγκ/ση (M)	R ²	k_{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{off} (s ⁻¹)	R ²	K = k_{on}/k_{off} (M ⁻¹)
PHA-P						
bpsp-Gal (6.35)	10 ⁻⁴ M	0.9853	6.7	1.88 x 10 ⁻⁴	0.9075	3.55 x 10 ⁴
bpen-Gal (6.47)	10 ⁻⁴ M	0.9745	28.7	4.58 x 10 ⁻⁴	0.9956	6.26 x 10 ⁴
WGA						
bpsp-GlcNAc (6.37)	10 ⁻⁵ M	0.9728	49	1.00 x 10 ⁻³	0.9327	4.9 x 10 ⁴
bedta-GlcNAc (6.52)	10 ⁻⁵ M	0.9878	349	1.6 x 10 ⁻³	0.9758	2.2 x 10 ⁵
gedta-GlcNAc (6.53)	10 ⁻⁵ M	0.9736	940	1.89 x 10 ⁻⁶	0.9881	49.5 x 10 ^{7*}
GNL						
bpsp-Man (6.33)	10 ⁻⁴ M	0.9862	10	3.34 x 10 ⁻⁶	0.90211	3 x 10 ⁶

* Η ποιότητα των δεδομένων δεν ήταν ικανοποιητική, άρα ο αριθμός είναι ενδεικτικός

Η ταχύτητα σύνδεσης της **bpen-Gal** με την λεκτίνη PHA-P, όπως φαίνεται στον πίνακα 8.4 είναι ~τετραπλάσια από αυτήν της **bpsp-Gal**, ενώ η αποσύνδεση είναι ~διπλάσια, η δε σταθερά σύνδεσης K, είναι μετρίως ισχυρή και επίσης περίπου διπλάσια, σε συμφωνία με την ποιοτική εκτίμηση που έγινε στην σελίδα 146. Οι ταχύτητες σύνδεσης και αποσύνδεσης στην WGA είναι γενικώς μεγαλύτερες. Η σχέση k_{on} είναι 1:7:20 για τις **bpsp-GlcNAc**, **bedta-GlcNAc** και **gedta-GlcNAc**,

αντιστοίχως, οι δε σταθερές ισορροπίας αυξάνουν τουλάχιστον κατά τέσσερις έως εκατό φορές, αν και τα δεδομένα αποσύνδεσης της **gedta-GlcNAc** δεν είναι τελείως αξιόπιστα. Παρ'όλα αυτά είναι σαφής η αύξηση της ταχύτητας και της σταθεράς σύνδεσης με την σειρά **bpsp-GlcNAc** < **bedta-GlcNAc** < **gedta-GlcNAc**, ενώ η εξειδίκευση αυτή της WGA, σε υποστρώματα με GlcNAc ενισχύεται και από τη μη αναγνώριση της μαννόζης (σελίδα 150). Τέλος η σύνδεση της μαννόζης μέσω **bpsp-Man** με την GNL είναι ισχυρή, της τάξεως $K = 10^6 \text{ M}^{-1}$, μεγαλύτερη από όλα τα προηγούμενα παράγωγα τύπου bpsp με τις PHA-P και WGA.

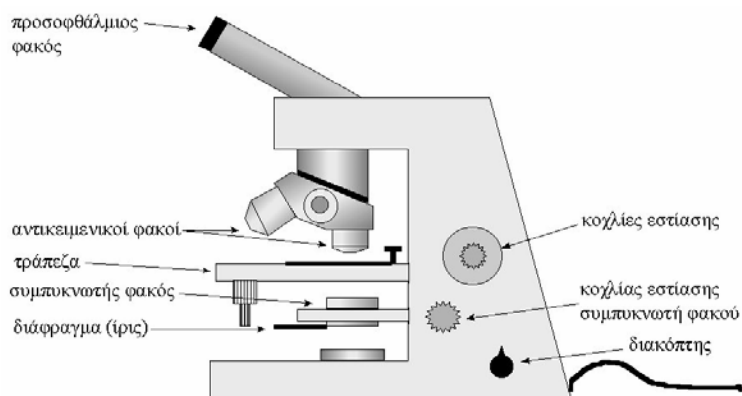
Εν κατακλείδι, τα πειράματα με την διάταξη WLRS επιτρέπουν την ποσοτική εκτίμηση της κινητικής *on/off* και της K σύνδεσης των ουσιών με λεκτίνες, καθώς και την σύγκριση μεταξύ τους. Οι ευρεθείσες τιμές K εμπίπτουν στο εύρος των αλληλεπιδράσεων που έχουν αναφερθεί για παρεμφερή συστήματα υδατανθράκων-πρωτεϊνών.¹⁰

Η προσαρμογή των δεδομένων σε εκθετική εξίσωση σύνδεσης με δύο σταθερές χρόνου [bi-exponential, $y = y_0 + A_1(1 - e^{-x/t_1}) + A_2(1 - e^{-x/t_2})$] ήταν σε όλες τις περιπτώσεις καλύτερη ($R^2 \geq 0.9900$), οπότε η διαδικασία σύνδεσης των σακχάρων στις πρωτεΐνες (άρα και η αποσύνδεση τους) είναι πιο πολύπλοκη διαδικασία. Επομένως τα αποτελέσματα των προσαρμογών του πίνακα 8.4 είναι ενδεικτικά της τάξης μεγέθους της σταθεράς σύνδεσης, επιτρέπουν δε την σύγκριση των αλληλεπιδράσεων της κάθε πρωτεΐνης με τα υδατανθρακικά συμπλέγματα.

8.3 Μικροσκοπία Φθορισμού

Η μικροσκοπία φθορισμού είναι μία πολύ διαδεδομένη τεχνική, τόσο στην Ιατρική όσο και στις βιολογικές επιστήμες, καθώς χρησιμοποιείται κυρίως για την παρατήρηση κυττάρων και κυτταρικών συστατικών. Βασίζεται στο φαινόμενο κατά το οποίο όταν κάποιο υλικό διεγερθεί με ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος, εκπέμπει ακτινοβολία φθορισμού σε μεγαλύτερο μήκος κύματος, στην περιοχή του ορατού. Ορισμένα συστατικά του κυττάρου μπορούν να παρατηρηθούν στο μικροσκόπιο φθορισμού, λόγω αυτοφθορισμού, ενώ άλλα παρουσιάζουν συγγένεια με διάφορες φθορίζουσες ουσίες (π.χ. DNA-DAPI). Επίσης, υπάρχουν μόρια που έχουν συγγένεια με ορισμένα κυτταρικά συστατικά, τα οποία,

συμπλοκοποιούμενα τα μόρια αυτά με φθορίζουσες ομάδες, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για έμμεση παρατήρηση των κυτταρικών συστατικών. Τέλος, ορισμένα μόρια, συζευγμένα ομοιοπολικά με φθορίζουσες ενώσεις, δύνανται να παρατηρηθούν σε κυτταρικές καλλιέργειες.^{11,12}



Σχήμα 8.17: Σχηματική αναπαράσταση του μικροσκοπίου φθορισμού¹³

Τα παθογόνα βακτήρια επιμολύνουν τα υγιή κύτταρα καθώς μπορούν μέσω συγκεκριμένων πρωτεϊνών να αλληλεπιδρούν με τους υδατάνθρακες που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι το βακτήριο *Escherichia coli* (*E. coli*), το οποίο μολύνει τα υγιή κύτταρα αλληλεπιδρώντας με τη μαννόζη που βρίσκεται στις γλυκοπρωτεΐνες των υγιών κυττάρων. Επίσης ο ιός της γρίπης (influenza virus) αναγνωρίζει το σιαλικό οξύ^{14,15} υγιών κυττάρων, προσκολλάται πάνω τους και προκαλεί τη μόλυνσή τους. Μία από τις μεθόδους μελέτης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των λεκτινών των βακτηρίων και των σακχάρων υγιών κυττάρων είναι η μικροσκοπία φθορισμού. Στην βιβλιογραφία έχουν μελετηθεί οι αλληλεπιδράσεις πολυμερών που διαθέτουν σάκχαρα με διάφορα βακτήρια. Αναλυτικότερα η ομάδα των Seeberger *et al.*¹⁶ έχει μελετήσει το φθορίζον πολυμερές πολυ(*p*-φαινυλαιθυλένιο ως αυτούσιο (PPE) καθώς και ως τροποποιημένο με σάκχαρα αναγνώρισης λεκτινών. Συγκεκριμένα μελέτησαν τη συμπεριφορά του ανωτέρω πολυμερούς στο οποίο είχε ομοιοπολικά συνδεθεί η μαννόζη (PPE-Man)_x, με το βακτηριακό στέλεχος του *E. coli*, ORN178. Το συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος διαθέτει λεκτίνες, οι οποίες αναγνωρίζουν τη μαννόζη. Επίσης η ίδια ομάδα μελέτησε το ίδιο πολυμερές με το στέλεχος ORN208, στο οποίο η πρωτεΐνη FimH, υπεύθυνη για την αναγνώριση της μαννόζης, είχε μεταλλαχθεί κατά τέτοιο τρόπο ώστε πλέον η αναγνώριση να μην είναι εφικτή.¹⁷ Τα ανωτέρω πολυμερή PPE-(Man)_x και PPE, μελετήθηκαν με μικροσκοπία φθορισμού. Οι ερευνητές συμπέραναν ότι

πράγματι υπάρχει αλληλεπίδραση (binding) μεταξύ του στελέχους του βακτηρίου *E. coli* ORN178 και του πολυμερούς PPE-Man, ενώ η αλληλεπίδραση αυτή απουσιάζει όταν το πολυμερές δεν διαθέτει το σάκχαρο αναγνώρισης. Όταν χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος ORN208 που δεν είναι ειδικό για το συγκεκριμένο σάκχαρο καθώς και όταν χρησιμοποιήθηκε το μονομερές της μαννόζης, δεν παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση. Επιπλέον διαπιστώθηκε ότι το ελάχιστο όριο ανίχνευσης των βακτηρίων είναι 10^4 , παρόμοιο με αυτό των επισημασμένων αντισωμάτων.¹⁸ Τέλος, πειράματα παρεμπόδισης συγκόλλησης των ερυθροκυττάρων έδειξαν ότι όταν χρησιμοποιούσαν το μονομερές της μαννόζης απαιτείτο 500πλάσια συγκέντρωση από ότι όταν χρησιμοποιούσαν το πολυμερές PPE-(Man)_x. Επομένως είναι φανερή η αξία της πολυδυναμικότητας στην αναγνώριση σακχάρων από κατάλληλες λεκτίνες βακτηρίων.

Στην παρούσα εργασία επελέγησαν τα βακτηριακά στελέχη *Ralstonia solanacearum* (ATCC 11696) και *Aeromonas caviae* (ATCC 15468) προκειμένου να μελετηθεί η ικανότητα προσκόλλησής τους στα επισημασμένα με φλουορεσκεΐνη υδατανθρακικά συμπλέγματα που περιγράφηκαν στο κεφάλαιο 6. Τα μικρόβια αυτά επελέγησαν κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας, ώστε να διαθέτουν τουλάχιστον μία λεκτίνη γνωστή ως προς την εξειδίκευσή της έναντι των σακχάρων αναγνώρισης των ουσιών μας και επιπλέον να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε εργαστήριο βιολογικής ασφάλειας επιπέδου 1 (Biosafety Level 1), το οποίο διατίθεται στο Ινστιτούτο ΡΡΠ ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος».

Το βακτήριο *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*) παράγει δύο βακτηριακές λεκτίνες, την RSL και την RS-III με διαφορετική εξειδίκευση στα σάκχαρα. Η λεκτίνη RSL αναγνωρίζει τα σάκχαρα με την εξής σειρά: L-φουκόζη > L-γαλακτόζη > D-αραβινόζη > D-φρουκτόζη > D-μαννόζη ενώ η λεκτίνη RS-III παρουσιάζει σειρά αναγνώρισης D-φρουκτόζη > D-μαννόζη > L-φουκόζη > L-γαλακτόζη > D-αραβινόζη^{19,20} όπως αναφέρθηκε στην σελίδα 143. Το βακτήριο αυτό είναι φυτοπαθογόνο και προκαλεί την ασθένεια "Καστανή σήψη της πατάτας" και "Βακτηριακή μάρανση της τομάτας", προσβάλλει τα φυτά: πατάτα (*Solanum tuberosum*), τομάτα (*Lycopersicon esculentum*), πιπεριά (*Capsicum annuum*), μελιτζάνα (*Solanum melongena*), πελαργόνιο (*Pelargonium* spp.), στρύχνο τον γλυκύπικρο (*Solanum dulcamara*), στρύχνο τον μέλανα ή αγριοντοματιά (*Solanum nigrum*) καθώς και την τσουκνίδα (*Urtica dioica*).

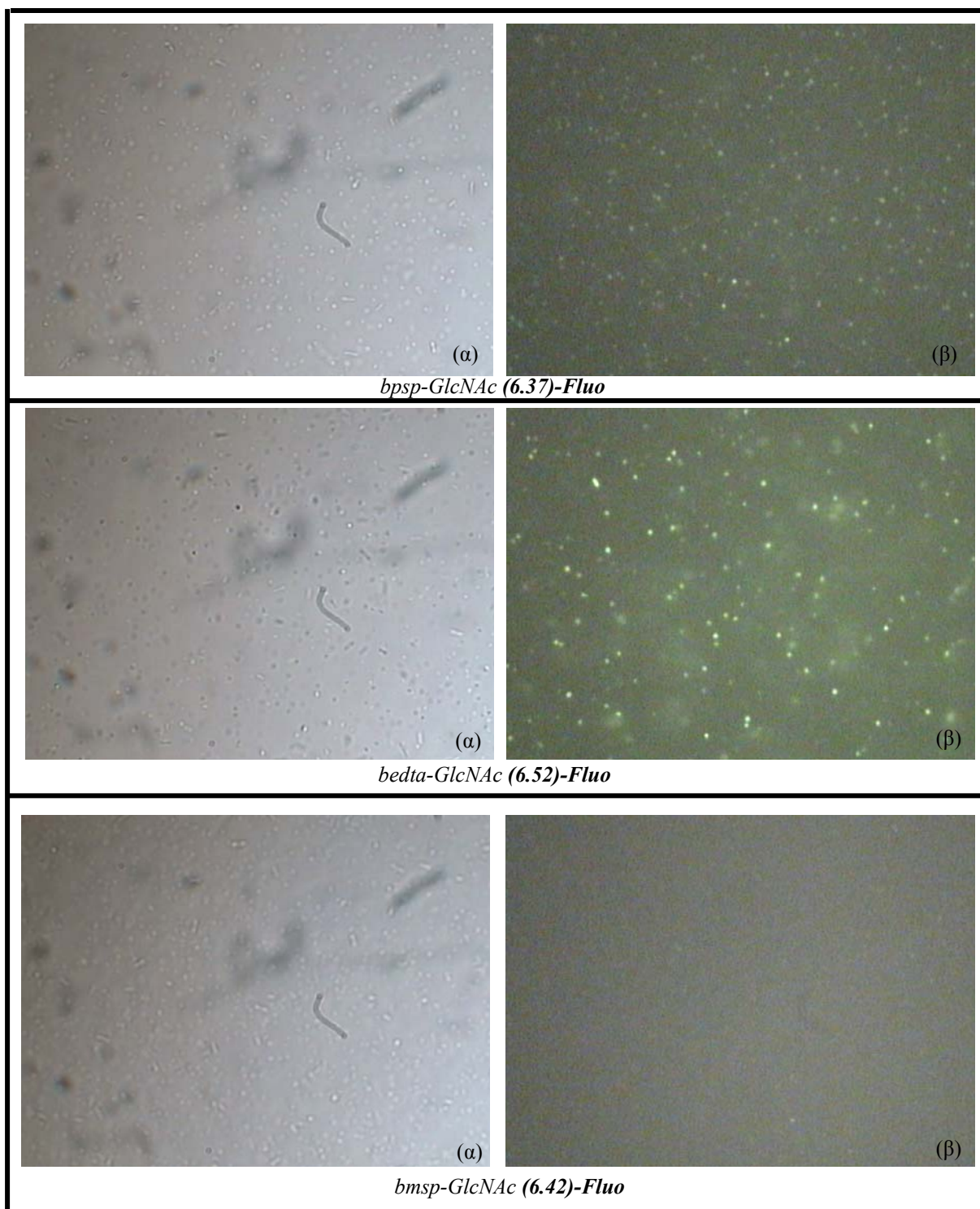
Το βακτήριο μεταδίδεται σε άλλα υγιή φυτά και αμόλυντες περιοχές με μολυσμένο νερό άρδευσης, μολυσμένα γεωργικά μηχανήματα, μολυσμένα μέσα αποθήκευσης, μολυσμένα και μη απολυμανθέντα εργαλεία, την αφή όταν γίνεται χειρισμός μολυσμένου φυτικού υλικού κατά τις καλλιεργητικές εργασίες καθώς και τα υπολείμματα της προηγούμενης μολυσμένης καλλιέργειας. Επίσης μεταδίδεται από τα υπολείμματα μολυσμένων κονδύλων πατάτας που δίδονται ως τροφή στα ζώα και από το μολυσμένο φυτικό υλικό (κόνδυλοι, φυτά) που απορρίπτεται.^{19,21}

Το βακτήριο *Aeromonas caviae* (*A. caviae*) περιέχει τα σάκχαρα D-GlcNAc και D-GalNAc. Στην κροσσωτή (fimbriated) κατάσταση του βακτηρίου το πρώτο σάκχαρο αλληλεπιδρά με τη λεκτίνη WGA (από το *Triticum vulgare*), την LEL (από το *Lycopersion esculentum*) και την STA (από το *Solanum tuberosum*), ενώ το δεύτερο σάκχαρο αλληλεπιδρά με τη λεκτίνη ConA (από το *Canavalia ensiformis*).²² Οι διαφορετικοί τύποι του βακτηρίου *A. caviae* είναι ευρέως διαδεδομένοι στο υδάτινο περιβάλλον και στα ζώα (πτηνά, ψάρια, οστρακόδερμα). Επιβιώνουν σε νωπές και διατηρημένες τροφές ακόμη και σε θερμοκρασία 4 °C. Τα είδη *A. hydrophila* και *A. veronii* απαντώνται συχνότερα σε παιδιά αναπτυσσόμενων χωρών και της Αυστραλίας, ενώ η *A. caviae* σε νήπια και ενηλίκους αναπτυσσόμενων χωρών.^{23,24} Αν και ο ρόλος των αερομονάδων στην πρόκληση γαστρεντερίτιδας έχει αμφισβητηθεί, πρόσφατες μελέτες μεμονωμένων περιστατικών αλλά και επιδημιών έχουν επιβεβαιώσει την κλινική τους σημασία. Ωστόσο η γαστρεντερίτιδα από το βακτήριο *A. caviae* αφήνει κάποιου βαθμού ανοσία μόνο γι' αυτό το είδος.

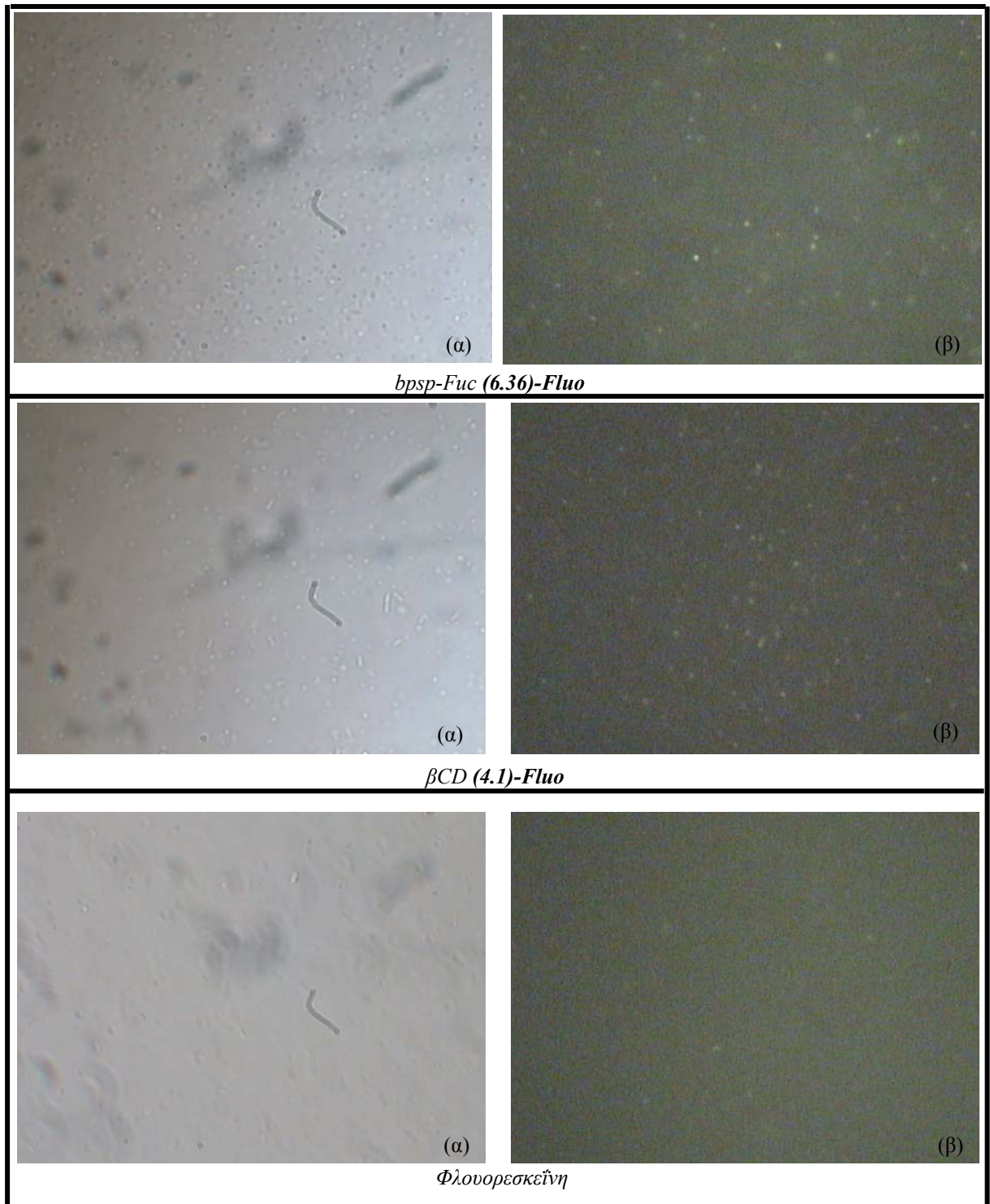
Η επιλογή των στελεχών ATCC 11696 και ATCC 15468 έγινε βάσει βιβλιογραφικής έρευνας: όπως προαναφέρθηκε αναζητήθηκαν οι λεκτίνες οι οποίες παρουσιάζουν εξειδίκευση σύνδεσης με κάποιον από τους μονοσακχαρίτες του κεφαλαίου 6 και η αναζήτηση αυτή οδήγησε κατά σειρά σε μικροβιακά στελέχη της ATCC (American Type Culture Collection), *Ralstonia solanacearum* και *Aeromonas caviae*. Αναλυτικότερα μελετήθηκε η ικανότητα προσκόλλησης των υδατανθρακικών συμπλεγμάτων επισημασμένων με ίδια ποσότητα FITC το καθένα, **bpsp-Man (6.33)-Fluo**, **gedta-Man (6.50)-Fluo**, **bmsp-Man (6.40)-Fluo**, **bpsp-Gal (6.35)-Fluo** καθώς και της φυσικής **βCD (4.1)-Fluo** με το βακτηριακό στέλεχος *R. solanacearum*. Με το βακτηριακό στέλεχος *A. caviae* μελετήθηκαν τα υδατανθρακικά συμπλέγματα **bpsp-GlcNAc (6.37)-Fluo**, **bedta-GlcNAc (6.52)-Fluo**, **bmsp-GlcNAc (6.42)-Fluo**, **bpsp-Fuc (6.36)-Fluo** καθώς και η φυσική **βCD (4.1)-Fluo**. Επιπλέον και τα δύο βακτηριακά στελέχη μελετήθηκαν ως προς πιθανή αλληλεπίδραση με καθαρή

φλουορεσκεΐνη, προκειμένου να αποκλειστεί η πιθανότητα αλληλεπίδρασης των λεκτινών με την χρωστική, αντί των σακχάρων, και να επιβεβαιωθεί ότι οποιαδήποτε αλληλεπίδραση που παρατηρείται, οφείλεται αποκλειστικά στην αναγνώριση των σακχάρων από τις λεκτίνες. Τα ζωντανά βακτήρια επώασθηκαν με τις ανωτέρω ουσίες και ξεπλύθηκαν επιμελώς, σύμφωνα με πρωτόκολλο που αναλύεται στο πειραματικό μέρος. Μέρος της καλλιέργειας τοποθετήθηκε σε πλακίδιο μικροσκοπίου και τα μικρόβια παρατηρήθηκαν κάτω από οπτικό μικροσκόπιο και μικροσκόπιο φθορισμού. Στα σχήματα που ακολουθούν για κάθε ένωση φαίνεται αριστερά η εικόνα των βακτηρίων στο οπτικό μικροσκόπιο και δεξιά το ίδιο πεδίο στο μικροσκόπιο φθορισμού (Σχήμα 8.18, Σχήμα 8.19, Σχήμα 8.20 και Σχήμα 8.21). Σημειωτέον ότι το διάλυμα επώασης περιείχε CaCl_2 ώστε πιθανώς να ευνοηθεί η διαμόρφωση της θέσης σύνδεσης των λεκτινών που εκφράζονται στην επιφάνεια των βακτηρίων με τα σάκχαρα των ενώσεων, διότι όπως έχει αναλυθεί στην ενότητα 8.2 τα κατιόντα Ca^{2+} σταθεροποιούν την αλληλεπίδραση των μονοσακχαριτών με τις λεκτίνες. Στο μικροσκόπιο φθορισμού είναι δυνατή η παρατήρηση φθορισμού της φλουορεσκεΐνης σε μήκος κύματος $\lambda = 518 \text{ nm}$ αφού προηγηθεί διέγερση σε μήκος κύματος $\lambda = 493 \text{ nm}$.

Aeromonas caviae



Σχήμα 8.18: Φωτογραφίες του οπτικού (α) και μικροσκοπίου φθορισμού (β) του βακτηρίου *Aeromonas caviae*



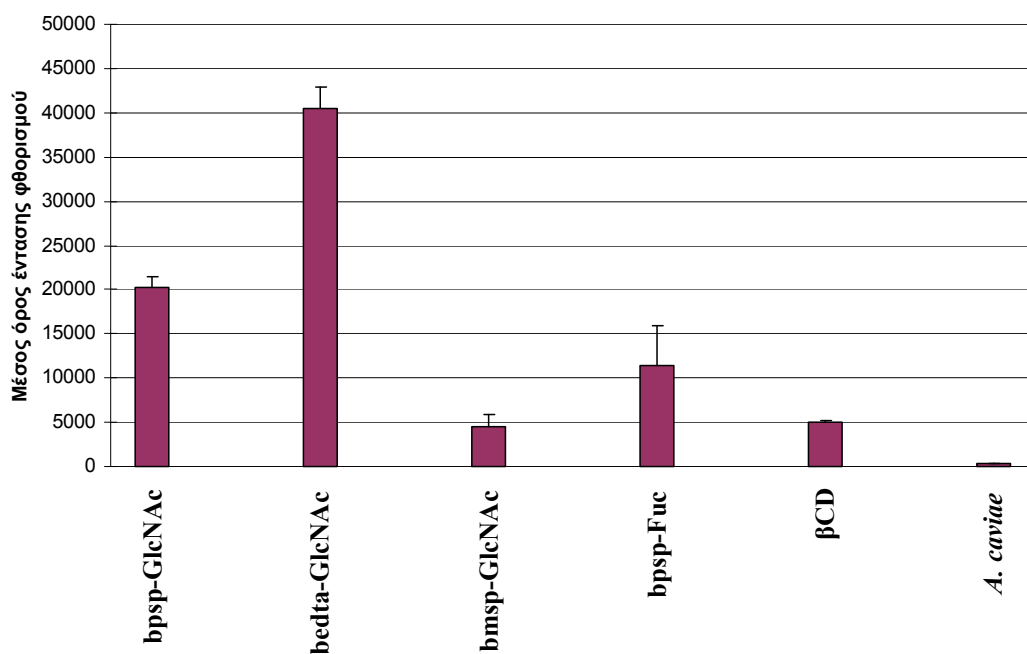
Σχήμα 8.19: Φωτογραφίες του οπτικού (α) και μικροσκοπίου φθορισμού (β) του βακτηρίου *Aeromonas caviae*

Στις εικόνες των σχημάτων 8.18 και 8.19, παρατηρούμε ότι στο οπτικό μικροσκόπιο (εικόνες (α)), τα βακτήρια εμφανίζονται ως διάσπαρτα, κυκλικά ή επιμήκη σωματίδια, σε μεγάλη ή μέτρια πυκνότητα ανά πεδίο παρατήρησης. Σημειωτέον ότι τα βακτήρια ήταν ζωντανά καθώς η κίνησή τους ήταν εμφανής και ιδιαίτερα αυξημένη στην διάρκεια κάθε μικροσκοπικής εξέτασης.

Εξέταση των αντίστοιχων εικόνων στο μικροσκόπιο φθορισμού (εικόνες (β)) ανέδειξε διαφορές μεταξύ των υδατανθρακικών συμπλεγμάτων, αναλόγως του αριθμού των συνδεδεμένων σακχάρων: τα βακτήρια που επώασθησαν με **bedta-GlcNAc (6.52)-Fluo** εμφανίζουν εντονότερο φθορισμό από ότι όταν χρησιμοποιήθηκε η **bpsp-GlcNAc (6.37)-Fluo**. Επομένως οι ουσίες **6.52** και **6.37** (α) προσκολλώνται στην επιφάνεια των βακτηρίων χωρίς να επηρεάζουν την ζωτικότητα του και (β) η προσκόλληση είναι μεγαλύτερη στο **6.52** (14 μονάδες GlcNAc ανά μόριο) από ότι στο **6.37**. Άρα η ύπαρξη περισσότερων σακχάρων στα υδατανθρακικά συμπλέγματα ευνοεί την αλληλεπίδρασή τους με τις βακτηριακές λεκτίνες. Στις περιπτώσεις που είτε υπάρχει μόνο ένα σάκχαρο [**bmsp-GlcNAc (6.42)-Fluo**] ή δεν υπάρχει κανένα [**βCD (4.1)-Fluo**] δεν παρατηρείται φθορισμός. Επιπλέον το υδατανθρακικό σύμπλεγμα που διαθέτει ως σάκχαρο αναγνώρισης τη φουκόζη [**bpsp-Fuc (6.36)-Fluo**], αλληλεπιδρά με τις λεκτίνες του συγκεκριμένου στελέχους καθώς παρατηρείται φθορισμός των βακτηρίων, αν και η φουκόζη δεν είναι βιβλιογραφικός καταγεγραμμένο σάκχαρο αναγνώρισης.

Οι παρατηρήσεις του μικροσκοπίου φθορισμού μας οδήγησαν στην ποσοτική αποτίμηση της έντασης του φθορισμού, η οποία είναι ευθέως ανάλογη του αριθμού των μορίων που προσκολλώνται στα βακτήρια. Για το σκοπό αυτό οι ανωτέρω ουσίες επώασθησαν με τα μικρόβια σε πλακίδια των 96 φρεατίων. Ανά τέσσερα φρεάτια τοποθετήθηκε η ίδια ουσία και πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις για την καθεμία. Τα πλακίδια τοποθετήθηκαν αυτούσια σε ειδικό φθορισμόμετρο και η ένταση φθορισμού ($\lambda = 518 \text{ nm}$) εκπεφρασμένη σε αυθαίρετες μονάδες έντασης, μετρήθηκε σε κάθε ένα από τα 96 φρεάτια. Στο γράφημα 8.1 και στον πίνακα 8.5 που ακολουθούν παρουσιάζεται ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων. Η σειρά φθορισμού κατά μειούμενη ένταση είναι η εξής: **bedta-GlcNAc (6.52)-Fluo > bpsp-GlcNAc (6.37)-Fluo > bpsp-Fuc (6.36)-Fluo > bmsp-GlcNAc (6.42)-Fluo \approx βCD (4.1)-Fluo**. Τα αποτελέσματα αυτά σε συνδυασμό με τις εικόνες από το μικροσκόπιο φθορισμού (Σχήμα 8.18) οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η αλληλεπίδραση των υδατανθρακικών συμπλεγμάτων ισχυροποιείται καθώς αυξάνεται ο αριθμός των

σακχάρων που διαθέτουν στην πρωτοταγή τους πλευρά. Επομένως διαπιστώνεται και *in vitro* ότι η ύπαρξη πολυδυναμικότητας ευνοεί την αναγνώριση σακχάρων από εξειδικευμένες λεκτίνες των βακτηριακών κυττάρων.

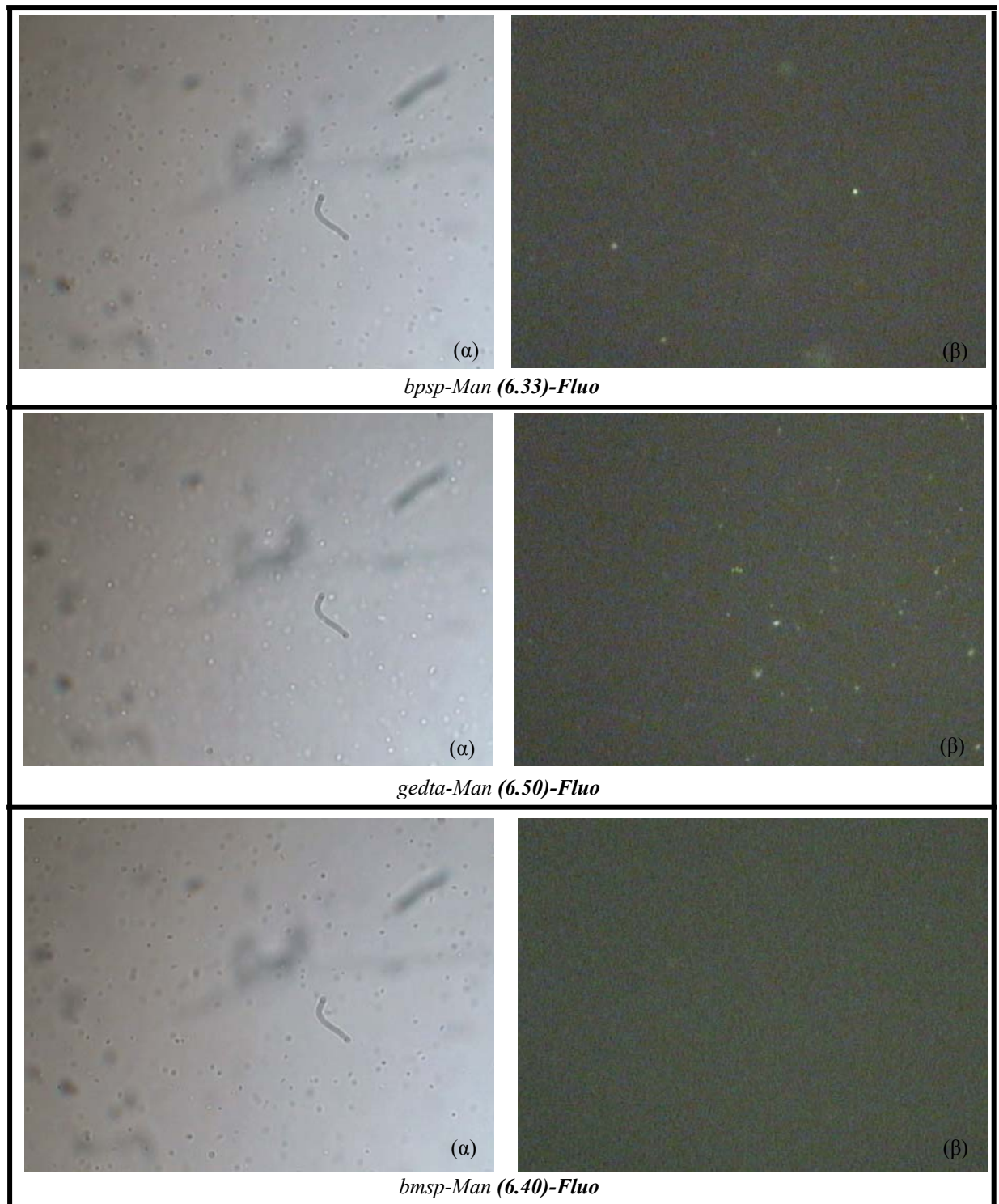


Γράφημα 8.1: Αποτελέσματα μέτρησης της έντασης φθορισμού σε αυθαίρετες μονάδες του βακτηρίου *Aeromonas caviae*

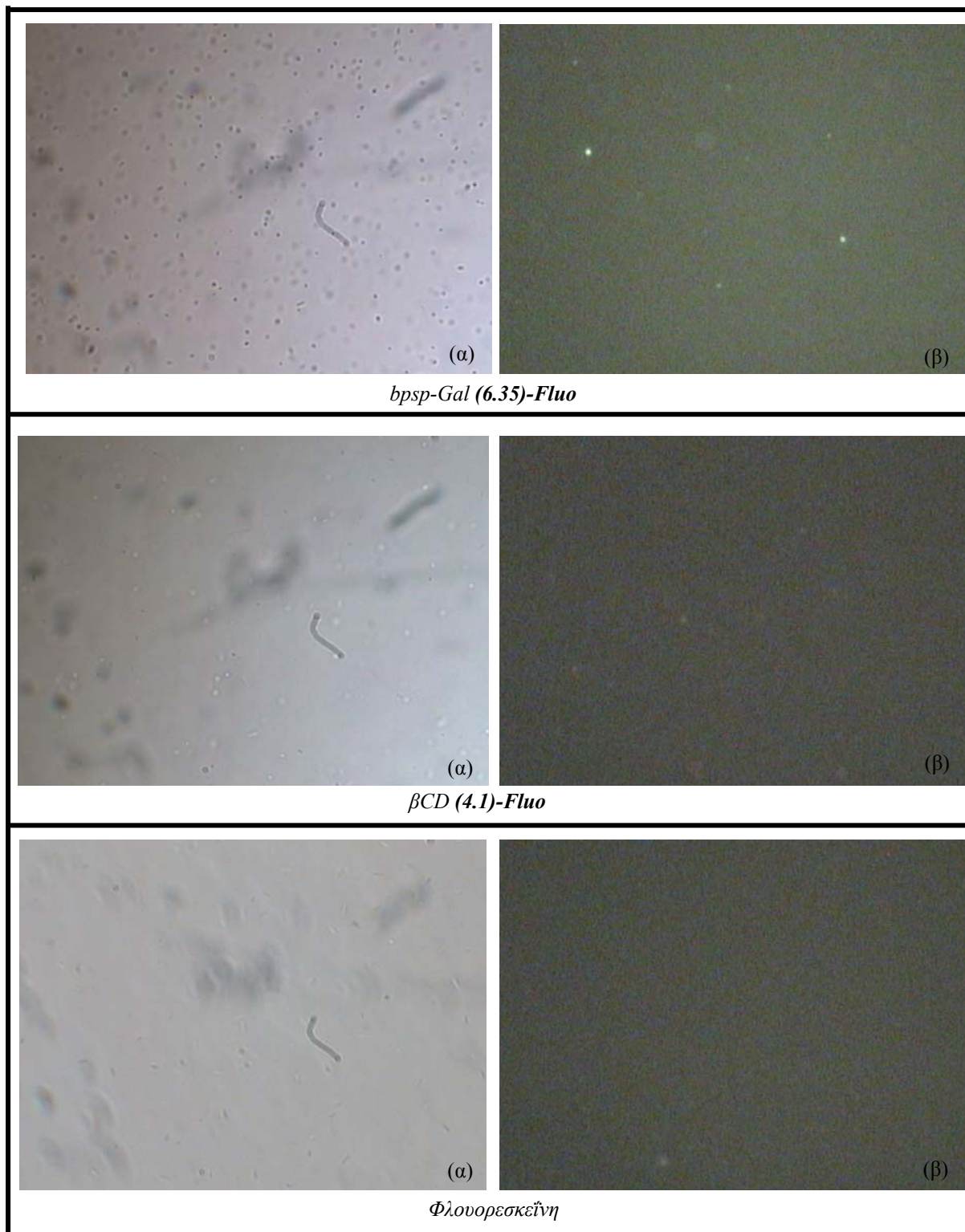
Πίνακας 8.5: Αποτελέσματα μέτρησης της έντασης φθορισμού σε αυθαιρετές μονάδες του βακτηρίου *Aeromonas caviae*

	<i>A. caviae</i> + bDsp-GlcNAc-Fluo	<i>A. caviae</i> + beta-GlcNAc-Fluo	<i>A. caviae</i> + bmsp-GlcNAc-Fluo	<i>A. caviae</i> + bDsp-Fuc-Fluo	<i>A. caviae</i> + βCD-Fluo	<i>A. caviae</i>
Αριθμός Επαναλήψεων του Πειράματος	17495	43793	4927,5	7635,3	5130,5	375,5
	18652	42265	4714,3	7677,5	5073	360
	18717	43360	4939,5	7452	5146,5	345,25
	20668	39643	4904,8	7490,3	4922,5	383
M.O τερπύδας	21666	40173	3113,8	10255	5117,3	329,75
	21930	40543	3162,3	10237	5251,8	320
	20284	40543	3164,3	9937,8	5032	357,5
	21395	42664	5385,5	15789	4930,8	315,75
M.O Τενκός	20844	40873	5713,8	16723	4725,8	395
	20784	42890	6228,8	16700	4833,3	367,5
	18883	42265	4871	7564	5068	366
	21279	37698	3160	10066	5208	331
Τυπική Απόκλιση	20635	41512	5690	16517	4767	366
	20266	40492	4573	11382	5014	354
	1240	2448	1291	4619	224	19

Ralstonia solanacearum



Σχήμα 8.20: Φωτογραφίες του οπτικού (α) και μικροσκοπίου φθορισμού (β) του βακτηρίου *Ralstonia solanacearum*



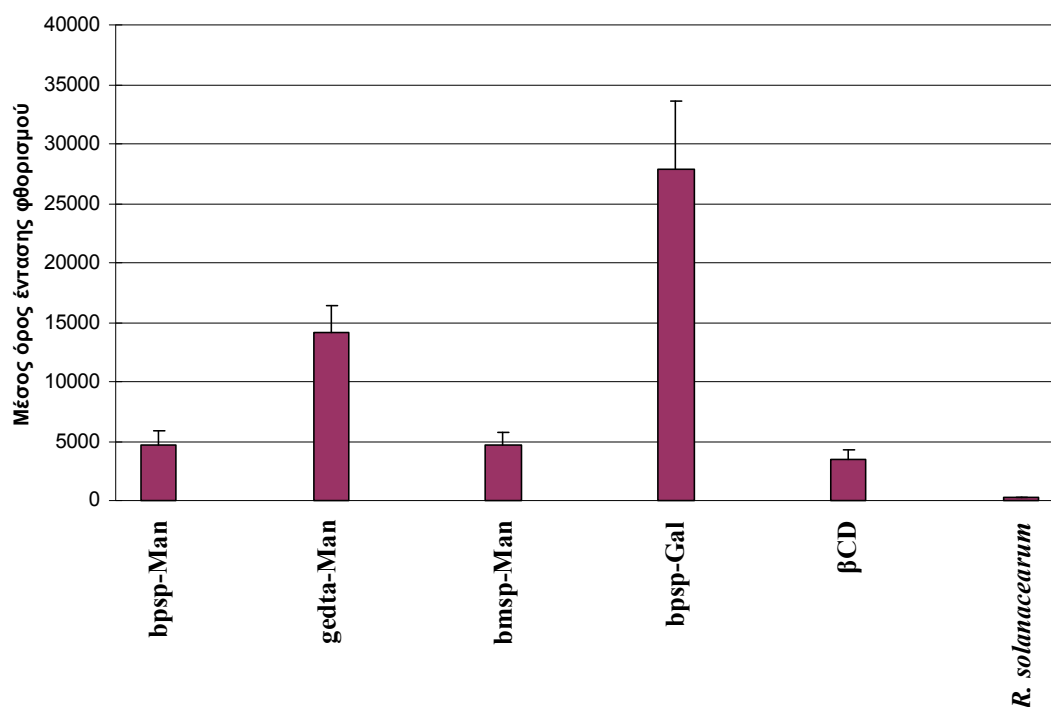
Σχήμα 8.21: Φωτογραφίες του οπτικού (α) και μικροσκοπίου φθορισμού (β) του βακτηρίου *Ralstonia solanacearum*

Αντίστοιχα αποτελέσματα ελήφθησαν και με το βακτήριο *Ralstonia solanacearum*. Στο οπτικό μικροσκόπιο (εικόνες (α)), παρατηρούμε ότι τα βακτήρια του συγκεκριμένου στελέχους εμφανίζονται με έντονη πυκνότητα ως διάσπαρτοι κόκκοι, δηλαδή ως σφαιρικά σωματίδια, τα οποία διαθέτουν αυξημένη κινητικότητα. Στο μικροσκόπιο φθορισμού (εικόνες (β)) παρατηρείται διαφοροποίηση στον φθορισμό ανάλογα με την ουσία που μελετάται. Αναλυτικότερα στα βακτήρια που επώασθησαν με το υδατανθρακικό σύμπλεγμα **gedta-Man (6.50)-Fluo**, το οποίο διαθέτει 16 σάκχαρα στην πρωτοταγή πλευρά, παρουσιάζεται μεγαλύτερος αριθμός φθορίζοντων βακτηρίων από ότι στα αντίστοιχα με **bpsp-Man (6.33)-Fluo** και **bpsp-Gal (6.35)-Fluo** που φέρουν 7 σάκχαρα αναγνώρισης λεκτινών. Επίσης η **bmsp-Man (6.40)-Fluo**, καθώς και η φυσική **βCD (4.1)-Fluo** δεν φαίνεται να προσκολλώνται στα βακτήρια καθώς δεν ανιχνεύθηκαν φθορίζοντα βακτηριακά στελέχη.

Για τη μέτρηση της έντασης του φθορισμού και την ποσοτική αποτίμηση των διαφορών μεταξύ των ενώσεων έγινε επώαση του βακτηρίου σε πλακίδια 96 φρεατίων στα οποία τοποθετήθηκε η ίδια ουσία ανά τέσσερα φρεάτια και πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις για την καθεμία. Στο γράφημα 8.2 και στον πίνακα 8.6 που ακολουθούν παρουσιάζεται ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων. Η μετρηθείσα ένταση φθορισμού, κατά μειούμενη σειρά, είναι η εξής: **gedta-Man (6.50)-Fluo > bpsp-Man (6.33)-Fluo ≈ bmsp-Man (6.40)-Fluo ≈ βCD (4.1)-Fluo**. Επομένως διαπιστώνεται ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ των σακχάρων και των βακτηριακών λεκτινών πραγματοποιείται με επιτυχία όταν τα σάκχαρα χρησιμοποιούνται ως υδατανθρακικά συμπλέγματα τα οποία προσκολλώνται στα κύτταρα, και ενισχύεται καθώς αυξάνεται ο αριθμός των σακχάρων που διαθέτουν τα υδατανθρακικά συμπλέγματα. Επιπλέον, το υδατανθρακικό σύμπλεγμα **bpsp-Gal (6.35)-Fluo** παρουσιάζει φθορισμό ιδιαίτερα υψηλής έντασης και επομένως μπορούμε να υποθέσουμε ότι το βακτήριο *R. solanacearum* παρουσιάζει μεγαλύτερη εξειδίκευση στην γαλακτόζη από ότι στη μαννόζη, εφ'όσον ο αριθμός των κυττάρων είναι κατά μέσο όρο ίδιος και στις δύο περιπτώσεις.

Τα ανωτέρω πειράματα κατέδειξαν την σημασία της πολυδυναμικότητας (multivalency) *in vitro*: όσο περισσότερα σάκχαρα αναγνώρισης συνδέονται στην κυκλοδεξτρίνη, τόσο αποτελεσματικότερη είναι η προσκόλλησή τους στα βακτήρια. Τα πειράματα έδειξαν ότι τα βακτήρια ως ζώντες οργανισμοί δεν παρουσιάζουν εξειδίκευση στα σάκχαρα: η φουκόζη αναγνωρίζεται από την *A. caviae* και η γαλακτόζη από την *R. solanacearum*, και μάλιστα πολύ αποτελεσματικά. Αυτό

μπορεί να οφείλεται σε δύο λόγους: (α) τα βακτήρια εκφράζουν πολλές λεκτίνες στην επιφάνειά τους, οπότε, και για λόγους επιβίωσης, μπορούν να αναγνωρίσουν διαφορετικά σάκχαρα (β) οι βιβλιογραφικές πληροφορίες ως προς την ειδίκευση των στελεχών της ATCC να είναι ατελείς.



Γράφημα 8.2: Αποτελέσματα μέτρησης της έντασης φθορισμού σε αυθαίρετες μονάδες του βακτηρίου *Ralstonia Solanacearum*

Τα ανωτέρω *in vitro* πειράματα κατέδειξαν την ικανότητα των υδατανθρακικών συμπλεγμάτων που παρασκευάσαμε να προσκολλώνται σε ζωντανά μικρόβια. Αυτή η ιδιότητα ενδεχομένως να αναστέλλει την δυνατότητα των συγκεκριμένων παθογόνων να μολύνουν ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς, αποτρέποντας των προσκόλλησή τους στους ιστούς λόγω ανενεργών, πλέον, λεκτινών.

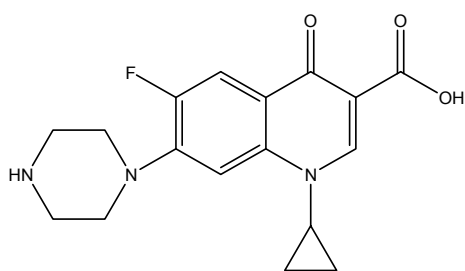
Πίνακας 8.6: Αποτελέσματα μέτρησης της έντασης φθορισμού σε αδιαίρετες μονάδες του βακτηρίου *Ralstonia Solanacearum*

Αριθμός Επανάληψων του Πειράματος	bppsp-Man-Fluo +	<i>R. solanacearum</i>	+	bmsp-Man-Fluo +	<i>R. solanacearum</i>	+	bppsp-Gal-Fluo +	<i>R. solanacearum</i>	BCD-Fluo +	<i>R. solanacearum</i>	<i>R. solanacearum</i>	4070	11708	4279.5	31389	4267.3	275,5
												4300	11769	6324.5	39006	4187.5	277.5
												4541	13267	4088,3	32856	4187.8	315
												3940	19188	4001	34609	5030.8	359.25
M.O	6048	3608	1270	2286	1009	5670	833	315	10	314	327	6617	12072	3586.8	23233	2514	300.75
												5969.5	11899	3391.8	26841	2645,8	314
												5324.5	12131	3959.3	24334	2380	325.25
												3711.5	16055	5544.5	25131	3047.5	305.25
M.O	4213	13983	4673	34465	4418	307	314	327	315	307	314	3612	15982	5787	25014	3862	397.25
												3502	17063	5812	25355	2426.8	307.5
												3608	16488	5756	24646	3171	327
M.O	4622	14131	4723	27916	3475	315	315	315	315	315	315	6048	11922	3740	24639	2536	314
												3608	16488	5756	24646	3171	327
Τυπική Απόκλιση			1270	2286	1009	5670	833	315	10	314	327						

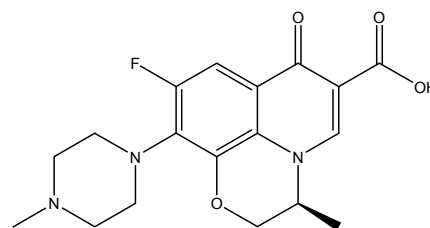
8.4 Παράγωγα κυκλοδεξτρινών ως μοριακοί μεταφορείς αντιμικροβιακών παραγόντων. Μελέτες σε στελέχη μικροβίων.

Όπως ήδη έχει αναφερθεί ο σκοπός σύνθεσης των κυκλοδεξτρινικών παραγώγων είναι και η συμπλοκοποίησή τους με αντιβιοτικά καθώς και η μελέτη τους έναντι μικροβιακών στελεχών. Οι μελέτες που πραγματοποιήθηκαν βασίζονται κυρίως στη χρήση του μικροβίου *Escherichia coli*. Το *E-coli* είναι ένα βακτήριο που έχει συνδεθεί με ποικίλες ασθένειες, όπως την ουρολοίμωξη, την πνευμονία και τη μηνιγγίτιδα. Ως τμήμα της κανονικής χλωρίδας του ανθρώπινου εντερικού τμήματος διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην πέψη των τροφίμων με την παραγωγή της βιταμίνης Κ.²⁵

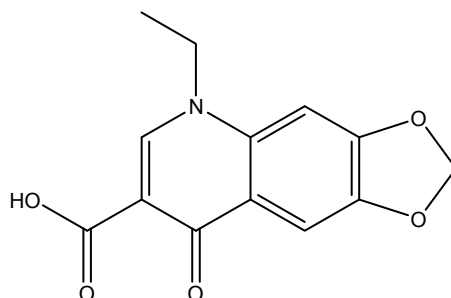
Μικροβιολογικός έλεγχος και εύρεση των τιμών MIC των σκευασμάτων στα διαφορετικά στελέχη των μικροβίων. Τα σκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν σύμπλοκα της φυσικής βCD και των τροποποιημένων κυκλοδεξτρινών **bpsp (4.8)**, **gpsp (4.19)** και **bpen (4.9)** με αντιβιοτικά. Ως αντιβιοτικά χρησιμοποιήθηκαν η σιπροφλοξασίνη (cipro) (Σχήμα 8.20), η λεβοφλοξασίνη (levo) (Σχήμα 8.21) και το οξολινικό οξύ (oxo) (Σχήμα 8.22), τα οποία ανήκουν στην κατηγορία των κινολών και συγκεκριμένα των φθοροκινολών.



Σχήμα 8.20: σιπροφλοξασίνη



Σχήμα 8.21: λεβοφλοξασίνη



Σχήμα 8.22: οξολινικό οξύ

Από τους πίνακες του παραρτήματος 1, στους οποίους παρουσιάζεται ο έλεγχος της δραστηριότητας των συμπλόκων και παρατίθεται η συγκέντρωση κατά την οποία παρουσιάστηκε μικροβιακή αποικία στις διαφορετικές επαναλήψεις που έγιναν εξάγονται τα εξής συμπεράσματα.

α) Οι δοκιμές με σιπροφλοξασίνη έγιναν σε 39 στελέχη *Staphylococcus haemolyticus*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* ανθεκτικά σε σιπροφλοξασίνη με τρεις συνθετικές κυκλοδεξτρίνες, **bpsp (4.8)** **gpsp (4.19)** και **bpen (4.9)** (δύο ανιοντικές και μία κατιοντική), σύνολο 156 έλεγχοι. Χρησιμοποιήθηκε αναλογία κυκλοδεξτρίνης/αντιβιοτικού 1:1 και 1:3. Εξ' αυτών το 14% έδειξε θετικά αποτελέσματα (υποδιπλασιασμός της δραστηρικής συγκέντρωσης) ενώ το 9% έδειξε αρνητικά (διπλασιασμός της δραστηρικής συγκέντρωσης). Από τα θετικά αποτελέσματα το 36% οφείλεται στην **bpen**, το 32% στην **bpsp** και το 18% στην **gpsp**.

(β) Οι δοκιμές με λεβοφλοξασίνη έγιναν σε 12 στελέχη *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, ανθεκτικά σε λεβοφλοξασίνη με τις **bpsp (4.8)**, **gpsp (4.19)** και **bpen (4.9)**, και βρέθηκαν θετικά αποτελέσματα στο 10% των ελέγχων, εκ των οποίων το 60% οφείλεται στην **bpen**, 20% στην **bpsp** και 20% στην **gpsp**. Επίσης βρέθηκαν και 14% αρνητικά αποτελέσματα, ισοκατανεμημένα στις τρεις CDs.

(γ) Οι δοκιμές με οξολινικό οξύ έγιναν σε 10 στελέχη *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* και ελέγχθηκαν με τις **bpsp (4.8)**, **gpsp (4.19)** και **bpen (4.9)**. Βρέθηκε ένα θετικό αποτέλεσμα στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε η **bpen** με το στέλεχος *Staphylococcus haemolyticus*, όπου η ανάπτυξη των μικροβίων πραγματοποιείται σε συγκέντρωση 4 φορές μικρότερη από ότι με το αντιβιοτικό μόνο του ή από ότι με το αντιβιοτικό ως σύμπλοκο με τη βCD.

8.5 Συμπεράσματα

Στο κεφάλαιο αυτό μελετήθηκε η ικανότητα αλληλεπίδρασης των σακχάρων των υδατανθρακικών συμπλεγμάτων τόσο με λεκτίνες ακινητοποιημένες σε κατάλληλο υπόστρωμα όσο και με μικροβιακά στελέχη, τα οποία διαθέτουν τις αντίστοιχες λεκτίνες που αναγνωρίζουν τα σάκχαρα αυτά. Αναλυτικότερα στην παρούσα διατριβή συντέθηκαν επτα-, οκτα-, δωδεκα-, δεκατετρα- και δεκαεξα-υποκατεστημένα παράγωγα α -, β - και γ -κυκλοδεξτρίνης (κεφάλαιο 4) και συζεύχθηκαν (κεφάλαιο 6) με τα ακόλουθα τροποποιημένα σάκχαρα (κεφάλαιο 5) D-(+)-μαννόζη (Man), D-(+)-γαλακτόζη (Gal), D-(+)-γλυκόζη (Glc), L-(-)-φουκόζη (Fuc), *N*-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνη (GlcNAc), *N*-ακετυλο-D-γαλακτοζαμίνη (GalNAc). Τα αποτελέσματα της μελέτης με φασματοσκοπία οπτικού συμβολομέτρου επιβεβαίωσαν την αξία της πολυδυναμικότητας (multivalency), αφού αυξανόμενου του αριθμού σακχάρων που διαθέτουν οι γλυκοκυκλοδεξτρίνες αυξάνεται η ισχύς της αλληλεπίδρασης με τις λεκτίνες. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι μετρίως ισχυρές αφού η σταθερά σύνδεσης *K* κυμαίνεται μεταξύ του 10^4 M^{-1} έως $\sim 10^6 \text{ M}^{-1}$, αλλά υπολείπονται κατά πολύ των αλληλεπιδράσεων π.χ. αντιγόνου/αντισώματος ($\gg 10^8$), είναι δηλαδή τυπικές αλληλεπιδράσεις υδατανθράκων - πρωτεϊνών. Επιπλέον, μελέτες αλληλεπίδρασης φθορίζοντων υδατανθρακικών συμπλεγμάτων με μικροβιακά στελέχη με πειράματα φθορισμού και φθορισμομετρίας έδειξαν ότι τα εν λόγω συμπλέγματα προσκολλώνται αποτελεσματικά στα μικρόβια ακολουθώντας το φαινόμενο της πολυδυναμικότητας, άρα η δραστηρότητα τους *in vitro* ενδέχεται να αναστέλλει την ικανότητα προσκόλλησης των μικροβίων σε ιστούς. Επιπροσθέτως, πειράματα ενζυμικής υδρόλυσης (κεφάλαιο 7) του αντιβιοτικού αμικικιλίνη έδειξαν αναστολή υδρόλυσης έως και 30% παρουσία υδατανθρακικών συμπλεγμάτων και επιβεβαιώθηκε με φασματοσκοπία NMR η ικανότητα των υδατανθρακικών συμπλεγμάτων να διατηρούν την δυνατότητα εγκλεισμού μικρών υδρόφοβων μορίων στην κυκλοδεξτρινική κοιλότητα.

ΜΕΡΟΣ ΙΙΙ
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ

9

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

9.1 Γενικά δεδομένα για τη σύνθεση και το χαρακτηρισμό παραγώγων κυκλοδεξτρινών

9.1.1.Αντιδραστήρια

Όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στις συνθέσεις ήταν αναλυτικής καθαρότητας. Το οξείδιο του δευτερίου (D_2O), το δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο ($DMSO-d_6$) και το δευτεριωμένο χλωροφόρμιο ($CDCl_3$) που χρησιμοποιήθηκαν στη φασματοσκοπία NMR ήταν προϊόντα της εταιρείας GmbH. Η δευτεριωμένη μεθανόλη (CD_3OD) ήταν προϊόν της εταιρείας Merck. Η τριφαινυλοφωσφίνη, η οποία ανακρυσταλλώθηκε από n-εξάνιο και η υδροχλωρική 1*H*-πυραζολοκαρβοξαμίδινη ήταν της εταιρείας Aldrich. Το νατραζίδιο, το βρώμιο και η *N,N'*-δισοπροπυλοαιθυλαμίνη ήταν της εταιρείας Merck. Η προμήθεια των β CD και γ CD έγινε από την εταιρεία Cyclolab. Οι κυκλοδεξτρίνες που χρησιμοποιήθηκαν ξηράνθηκαν με θέρμανση στους 70 °C υπό κενό για 20 ώρες. Το διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) αποστάχθηκε από κονιορτοποιημένα μοριακά κόσκινα τύπου 3Å υπό ελαττωμένη πίεση και φυλάχθηκε σε φιάλη που περιείχε μοριακά κόσκινα τύπου 4Å. Τα αντιδραστήρια 1,2-διαμιναιθάνιο, 1,3-διαμινοπροπάνιο και η πυριδίνη αποστάχθηκαν από μείγμα CaO-KOH και φυλάχθηκαν σε φιάλες που περιείχαν μοριακά κόσκινα τύπου 4Å. Η μεμβράνη διαπίδυσης (dialysis cellulose tubing, benzoylated, 32 mm) αγοράστηκε από τη Sigma και χρησιμοποιήθηκε για το καθαρισμό ενώσεων με μοριακά βάρη ≥ 1.200 g/mol. Η ανιονανταλλακτική ρητίνη ιόντων Cl^- (Dowex Type I 1x2-400) ήταν της εταιρείας Fluka.

9.1.2 Οργανολογία

Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR): Τα φάσματα NMR καταγράφηκαν σε φασματόμετρο BRUKER AC 250 με συχνότητα λειτουργίας (α) 250.13 MHz για ^1H και 62.90 MHz για ^{13}C και (β) BRUKER AVANCE DRX 500 με συχνότητα λειτουργίας 500.13 MHz για ^1H και 125.77 MHz για ^{13}C (Ινστιτούτο Φυσικοχημείας, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»), με BBI (inverse broad band), ανιχνευτή (probe).

Αυτόκλειστο: Οι αντιδράσεις υπό πίεση N_2 (7 atm) και θερμοκρασία έγιναν σε μικροαντιδραστήρα από ανοξείδωτο χάλυβα χωρητικότητας 25 mL (μοντέλο 4590) της εταιρείας Parr με στοιχείο ελέγχου θερμοκρασίας (μοντέλο 4835) της ίδιας εταιρείας.

Φασματομετρία Μάζας: Ελήφθη MALDI-TOF φασματομετρία μάζας και ESI-MS.

9.1.3 Παράμετροι λήψης φασμάτων NMR δύο διαστάσεων

Φάσματα ομοπυρηνικού συσχετισμού 2D COSY: Τα φάσματα ελήφθησαν στους 298 K στα 500 MHz με χρήση βαθμωτού πεδίου στον άξονα z (z-gradient selection). Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: χρόνος αναμονής $D1 = 0.7\text{-}1$ s, μέγεθος πειράματος (TD) 1024 ή 2048 data points στην F2, σαρώσεις (NS) 2, 4, 8 ή 16.

Φάσματα ετεροπυρηνικού συσχετισμού 2D HSQC: Τα φάσματα ελήφθησαν στους 298 K στα 500 MHz με z-gradients. Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: χρόνος αναμονής $D1 = 0.8\text{-}1$ s, μέγεθος πειράματος (TD) 1024 ή 2048 data points στην F2, σαρώσεις (NS) 8 ή 16 και χρόνοι που αντιστοιχούν σε $^1J_{\text{C-H}} = 140$ Hz.

Φάσματα ετεροπυρηνικού συσχετισμού 2D HMBC: Τα φάσματα ελήφθησαν στους 298 K στα 500 MHz είτε με χρήση βαθμωτού πεδίου στον άξονα z (z-gradient selection) είτε με κλασική επιλογή των συμφωνιών (coherences) μέσω κύκλων φάσεων (phase cycling). Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: χρόνος αναμονής $D1 = 1.8$ s, μέγεθος πειράματος (TD) 1024 ή 2048 πειράματα, σαρώσεις (NS) 64 ή 128, $D6 = 65$ ms (που αντιστοιχεί σε $^2J_{\text{C-H}}$ ή $^3J_{\text{C-H}} \approx 7$ Hz).

Φάσματα ^1H NMR με κορεσμό της κορυφής του διαλύτη (presaturation) ελήφθησαν με $D1 = 1.5$ s και ισχύ ακτινοβολίας 55-58 dB.

9.2 Σύνθεση 6-περι-υποκατεστημένων κυκλοδεξτρινών με λειτουργικές ομάδες

9.2.1 Σύνθεση παραγώγων α-κυκλοδεξτρίνης

Εξακис(6-βρωμο-6-δεοξυ)-α-κυκλοδεξτρίνη (4.22)

Σε διάλυμα τριφαινυλοφωσφίνης (Ph_3P , 6.47 g, 24.70 mmol) σε ξηρό DMF (40 mL) προστίθεται στάγδην για 1 ώρα και υπό συνεχή ανάδευση Br_2 (1.27 mL, 24.60 mmol) σε θερμοκρασία δωματίου. Κατά τη διάρκεια της προσθήκης η θερμοκρασία δεν πρέπει να υπερβεί τους $60\text{ }^\circ\text{C}$ καθώς η αντίδραση είναι εξώθερμη. Μετά την προσθήκη του Br_2 η ανάδευση συνεχίζεται στους $60\text{ }^\circ\text{C}$ για 45 λεπτά. Με αυτό τον τρόπο δημιουργείται το αντιδραστήριο Vilsmeier ($[(\text{CH}_3)_2\text{NCHBr}]^+\text{Br}^-$) *in situ*, ως κίτρινο στερεό. Κατόπιν το διάλυμα ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθεται η αCD **4.21** (1g, 1.03 mmol) σε μικρές ποσότητες. Στη συνέχεια, το μίγμα θερμαίνεται στους $75\text{ }^\circ\text{C}$ - $80\text{ }^\circ\text{C}$ για 19 ώρες. Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν προστίθεται στάγδην σε διάλυμα MeONa (4.05 g) σε MeOH (25 mL) (pH=10-12), το οποίο είχε προηγουμένως ψυχθεί στους $0\text{ }^\circ\text{C}$. Το μίγμα που προκύπτει αναδεύεται για 1 ώρα και αποχύνεται σε παγωμένο νερό (300 mL), οπότε καταβυθίζεται λευκό ίζημα που διηθείται και εκπλένεται με EtOH ώστε να εκδιωχθεί το οξείδιο της τριφαινυλοφωσφίνης ($\text{Ph}_3\text{P}=\text{O}$) που προκύπτει ως παραπροϊόν και τελικά προκύπτει το επιθυμητό προϊόν **4.22** ως λευκό στερεό. Απόδοση: 85%. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 298K, 500 MHz) δ 5.82 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H, OH2), 5.66 (brs, 6H, OH3), 4.94 (brs, 6H, H1), 3.92-3.98 (m, 12H, H5, H6), 3.81 (t, $J = 8.4$ Hz, 6H, H3), 3.74 (dd, $J = 6.6$ Hz, $J = 4.2$ Hz, 6H, H6'), 3.42 (t, $J = 8.9$ Hz, 6H, H4), 3.35-3.32 (m, 6H, H2) ppm. ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz) δ 102.75(C1), 85.59 (C4), 73.37 (C3), 72.53 (C2), 71.52 (C5), 35.68 (C6) ppm [σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία].^{1,2}

Εξακис(6-αζιδο-6-δεοξυ)-α-κυκλοδεξτρίνη (4.23)

Η εξακис(6-βρωμο-6-δεοξυ)-α-κυκλοδεξτρίνη **4.22** (320 mg, 0.237 mmol), διαλύεται σε DMF (8 mL). Στη συνέχεια προστίθεται νατραζίδιο (NaN_3 , 940 mg, 14.459 mmol, 61 eq) και καταλυτική ποσότητα ιωδιούχου νατρίου (NaI , 21 mg, 0.144 mmol, 0.61 eq) και το μίγμα θερμαίνεται στους $110\text{ }^\circ\text{C}$ για 18 ώρες. Το μίγμα

συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση έως μικρού όγκου (~2 mL). Στη συνέχεια, προστίθεται μεγάλη ποσότητα νερού, οπότε και σχηματίζεται ένα λευκό κρεμώδες ίζημα που διηθείται και εκπλένεται με νερό και EtOH. Το επιθυμητό προϊόν **4.23** παραλαμβάνεται ως λευκό στερεό. Απόδοση: 95%. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 298K, 500 MHz) δ 6.59 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H, OH2), 5.47 (s, 6H, OH3), 4.88 (d, *J* = 2.4 Hz, 6H, H1), 3.82-3.72 (m, 12H, H6, H3), 3.61-3.56 (m, 12H, H6', H5), 3.45-3.35 (m, 12H, H2, H4) ppm. ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ 101.8 (C1), 83.48 (C4), 72.7 (C5), 71.58 (C2), 70.4 (C3), 51.37 (C6) ppm [σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία].³

Εξακίς(6-αζιδο-6-δεοξυ-2,3-δι-Ο-μεθυλο)-α-κυκλοδεξτρίνη (DMarN₃) (4.24)

Η εξακίς(6-αζιδο-6-δεοξυ)-α-κυκλοδεξτρίνη **4.23** (253 mg, 0.225 mmol) σε THF (6 mL), προστίθεται στάγδην σε διάλυμα υδριδίου του νατρίου (NaH, 163 mg, 6.82 mmol) σε THF (6 mL) στους 0 °C. Το μίγμα αναδεύεται για 30 λεπτά και στη συνέχεια προστίθεται μεθυλοιωδίδιο (2 mL) στους 0 °C και αναδεύεται στην ίδια θερμοκρασία για 1 ώρα σε ατμόσφαιρα N₂. Κατόπιν απομακρύνεται ο πάγος και αφήνεται υπό ανάδευση και απουσία φωτός για 18 ώρες σε r.t. Έπειτα ρυθμίζεται η θερμοκρασία στους 0 °C και προστίθεται στάγδην MeOH (6 mL), το μίγμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και εκχυλίζεται με CH₂Cl₂ και κορεσμένο διάλυμα NaCl. Ακολουθεί ξήρανση με MgSO₄ και συμπύκνωση μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση. Το επιθυμητό προϊόν **4.24** προκύπτει ως λευκό στερεό με απόδοση 99%. ¹H NMR (CDCl₃, 298K, 500 MHz) δ 5.01 (d, *J* = 3.0 Hz, 6H, H1), 3.81-3.76 (m, 12H, H5, H6), 3.63 (s, 18H, CH₃), 3.60-3.54 (m, 6H, H6'), 3.51 (s, 18H, CH₃), 3.48-3.42 (m, 12H, H3, H4), 3.16 (dd, *J* = 9.6 Hz, *J* = 3.2 Hz, 6H, H2) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 99.8 (C1), 83.4 (C4), 81.9 (C3), 81.1 (C2), 71.3 (C5), 61.9 (CH₃), 58.3 (CH₃), 52.1 (C6-N₃) ppm [σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία].⁴

Εξακίς(6-αμινο-6-δεοξυ-2,3-δι-Ο-μεθυλο)-α-κυκλοδεξτρίνη (DMarNH₂) (4.25)

Η εξακίς(6-αζιδο-6-δεοξυ-2,3-δι-Ο-μεθυλο)-α-κυκλοδεξτρίνη **4.24** (199 mg, 0.154 mmol), διαλύεται σε DMF (5 mL) και προστίθεται τριφαινυλοφωσφίνη (Ph₃P, 553 mg, 2.108 mmol). Το μίγμα αναδεύεται για 1.5 ώρα και εν συνεχεία προστίθεται αμμωνία (30%, 565 μL). Η ανάδευση συνεχίζεται για ακόμα 20 ώρες σε r.t. Κατόπιν το διάλυμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση, οξινίζεται σε pH 4 με διάλυμα HCl 1N και εκχυλίζεται με CH₂Cl₂. Η υδατική φάση συμπυκνώνεται προς παραλαβή του επιθυμητού προϊόντος **4.25** ως κίτρινο στερεό. Απόδοση: 44%. ¹H

NMR (D₂O, 298K, 500 MHz) δ 5.39 (brs, 6H, H1), 4.25 (brs, 6H, H5), 3.73-3.66 (m, 18H, H2, H3, H4), 3.58 (s, 18H, CH₃), 3.53 (s, 18H, CH₃), 3.43-3.37 (m, 12H, H6) ppm. ¹³C NMR (D₂O, 125 MHz) δ 98.7 (C1), 81.4 (C4), 80.2 (C3), 79.9 (C2), 68.0 (C5), 60.8 (CH₃), 58.1 (CH₃), 40.4 (C6-NH₂) ppm.⁵

Εξακίς[6-δι(*t*-βουτυλοξυκαρβονυλομεθυλαμινο)(2,3-δι-*O*-μεθυλο)-6-δεοξυ- α -κυκλοδεξτρίνη (4.26)

Η εξακίς(6-αμινο-6-δεοξυ-2,3-δι-*O*-μεθυλο)- α -κυκλοδεξτρίνη **4.25** (77 mg, 0.067 mmol) διαλύεται σε ακετονιτρίλιο (5 mL). Εν συνεχεία προστίθεται καταλυτική ποσότητα ιωδιούχου καλίου (KI), ανθρακικό κάλιο (24 eq, 225 mg, 1.63 mmol) και *tert*-βουτυλεστέρας του βρωμοοξικού οξέος (24 eq, 1.63 mmol, 245 μ L). Το μίγμα αναδεύεται με επαναροή στους 82 °C σε ατμόσφαιρα N₂ για 4 ημέρες. Κατόπιν συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και προστίθεται H₂O και CH₂Cl₂. Οι δύο φάσεις διαχωρίζονται, η υδατική εκπλένεται με CH₂Cl₂ (2 x 10 mL) και τα οργανικά εκχυλίσματα εκπλένονται με νερό, ξηραίνονται υπεράνω MgSO₄ και συμπυκνώνονται υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης CH₂Cl₂/MeOH (98:2) του ακάθαρτου μίγματος παρέχει το επιθυμητό προϊόν **4.26** με απόδοση 88%. R_f = 0.38 σε σύστημα ανάπτυξης CH₂Cl₂:MeOH/95:5. ¹H NMR (CDCl₃, 298K, 500 MHz) δ 5.0 (s, 6H, H1), 4.15 (t, *J* = 8.9 Hz, 6H, H4), 3.56 (s, 18H, CH₃), 3.49 (brs, 6H, H3), 3.41 (s, 18H, CH₃), 3.35-3.32 (m, 24H, H7, H8), 3.20-3.05 (m, 12H, H2, H6) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 171.3 (C=O), 99.7 (C1), 82.3 (C2), 81.8 (C3), 81.15 (C4), 80.3 (C-*t*Bu), 73.7 (C5), 61.8 (CH₃), 58.4 (CH₃), 57.5 (C7, C8), 40.4 (C6), 28.4 (tBu) ppm.⁶

MS (MALDI-TOF) *m/z*: 2526.4 ([*M*+Na]⁺), θεωρ. για C₁₂₀H₂₁₀N₆O₄₈Na: 2526.41.

Εξακίς[6-δι(καρβοξυμεθυλαμινο)](2,3-δι-*O*-μεθυλο)-6-δεοξυ- α -κυκλοδεξτρίνη (*aedta*) (4.27)

Η εξακίς[6-δι(*t*-βουτυλοξυκαρβονυλομεθυλαμινο)(2,3-δι-*O*-μεθυλο)-6-δεοξυ- α -κυκλοδεξτρίνη **4.26** (120 mg, 0.048 mmol) διαλύεται σε CHCl₃ (4 mL). Εν συνεχεία προστίθεται στάγδην τριφθοροοξικό οξύ (369 μ L, 4.79 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για δύο ημέρες στους 25 °C. Ακολουθεί συμπύκνωση υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού και διαδοχικές πλύσεις με CH₂Cl₂. Στη συνέχεια το στερεό υπόλειμμα διαλύεται σε νερό (3 mL), ρυθμίζεται σε pH = 7 και τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης, προς απομάκρυνση των προσμίξεων μικρού μοριακού

βάρους, επί 4 ημέρες. Λαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **4.27** ως λευκό προϊόν με απόδοση 42 %. ^1H NMR (D_2O , 298K, 500 MHz) δ 5.38 (s, 6H, H1), 4.41 (brs, 6H, H5), 3.97-3.93 (m, 30H, H3, H7, H8), 3.85-3.75 (m, 6H, H6), 3.60 (s, 18H, CH_3), 3.55 (s, 18H, CH_3), 3.31-3.47 (m, 18H, H2, H4, H6') ppm. ^{13}C NMR (D_2O , 125 MHz) δ 170.5 (C=O), 97.3 (C1), 79.3 (C2, C3), 78.8 (C4), 68.4 (C5), 59.6 (CH_3), 59.2 (CH_3), 58.1 (C7, C8), 56.2 (C6) ppm.⁵

MS (MALDI-TOF) m/z : 1853.7 ($[M+\text{Na}]^+$), θεωρ. για $\text{C}_{72}\text{H}_{114}\text{N}_6\text{O}_{48}\text{Na}$: 1853.66.⁶

9.2.2 Σύνθεση παραγώγων β-κυκλοδεξτρίνης

Επτακίς(6-βρωμο-6-δεοξυ)-β-κυκλοδεξτρίνη (4.2)

Σε διάλυμα τριφαινυλοφωσφίνης (Ph_3P , 12.94 g, 49.4 mmol) σε ξηρό DMF (40 mL) προστίθεται στάγδην για 1 ώρα και υπό συνεχή ανάδευση Br_2 (2.54 mL, 49.2 mmol) σε θερμοκρασία δωματίου. Κατά τη διάρκεια της προσθήκης η θερμοκρασία δεν πρέπει να υπερβεί τους 60 $^\circ\text{C}$ καθώς η αντίδραση είναι εξώθερμη. Μετά την προσθήκη του Br_2 η ανάδευση συνεχίζεται στους 60 $^\circ\text{C}$ για 45 λεπτά. Με αυτό τον τρόπο δημιουργείται το αντιδραστήριο Vilsmeier ($[(\text{CH}_3)_2\text{NCHBr}]^+\text{Br}^-$) *in situ*. Κατόπιν το διάλυμα ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθεται η βCD **4.1** (2.2 g, 2 mmol) σε μικρές ποσότητες. Στη συνέχεια, το μίγμα θερμαίνεται στους 75 $^\circ\text{C}$ - 80 $^\circ\text{C}$ για 19 ώρες. Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν προστίθεται στάγδην σε διάλυμα MeONa (8.1 g) σε MeOH (50 mL) (pH=10-12), το οποίο είχε προηγουμένως ψυχθεί στους 0 $^\circ\text{C}$. Το μίγμα που προκύπτει αναδεύεται για 1 ώρα και αποχύνεται σε παγωμένο νερό (600 mL), οπότε καταβυθίζεται λευκό ίζημα που διηθείται και εκπλένεται με EtOH ώστε να εκδιωχθεί το οξείδιο της τριφαινυλοφωσφίνης ($\text{Ph}_3\text{P}=\text{O}$) που προκύπτει ως παραπροϊόν και τελικά λαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **4.2** ως λευκό στερεό. Απόδοση: 85%. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 298K, 500 MHz) δ 5.99 (d, $J = 5.1$ Hz, 7H, OH2), 5.87 (brs, 7H, OH3), 4.98 (brs, 7H, H1), 4.01 (d, $J = 10.2$ Hz, 7H, H6), 3.84 (t, $J = 8.6$ Hz, 7H, H5), 3.70-3.63 (m, 14H, H6', H3), 3.37 (t, $J = 8.9$ Hz, 14H, H2, H4) ppm. ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz) δ 102.96 (C1), 85.48 (C4), 73.14 (C3), 72.91 (C2), 71.87 (C5), 35.30 (C6) ppm [σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία].^{1,2}

Επτακίς[6-(καρβοξυαιθυλοθειο)-6-δεοξυ]-β-κυκλοδεξτρίνη (bvsp) (4.8)

Σε διάλυμα 3-μερκαπτοπροπανοϊκού οξέος (554 μL , 6.36 mmol) σε DMF (15 mL) προστίθεται υδρίδιο του νατρίου (NaH, 586 mg, 24.2 mmol) σε 10 ισόποσες δόσεις και το μίγμα αναδεύεται για 1 ώρα. Κατόπιν προστίθεται η επτακίς(6-δεοξυ-6-βρωμο)-β-κυκλοδεξτρίνη **4.2** (1 g, 0.630 mmol) σε ισόποσες δόσεις και το μίγμα αναδεύεται για 24 ώρες στους 72 $^{\circ}\text{C}$. Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθεται νερό (30 mL). Εν συνεχεία συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση στη μισή ποσότητα και προστίθεται EtOH (300 mL). Καταβυθίζεται ίζημα και αφήνεται στους 4 $^{\circ}\text{C}$ για 12 ώρες και στη συνέχεια διηθείται και εκπλένεται με EtOH και το στερεό υπόλειμμα τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης, προς απομάκρυνση των προσμίξεων μικρού μοριακού βάρους, επί 3 ημέρες. Λαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **4.8** με απόδοση: 79%. ^1H NMR (D_2O , 298K, 500 MHz) δ 5.25 (d, $J = 3.3$ Hz, 7H, H1), 4.11-4.02 (m, 14H), 3.74-3.68 (m, 14H), 3.21 (d, $J = 12.0$ Hz, 7H), 3.06 (dd, $J = 6.7$ Hz, $J = 6.6$ Hz, 7H), 2.93 (t, $J = 7.2$ Hz, 14H), 2.56 (t, $J = 7.3$ Hz, 14H) ppm. ^{13}C NMR (D_2O , 125 MHz) δ 180.9 (C=O), 101.0 (C1), 83.0 (C4), 73.0 (C3), 72.3 (C2), 71.6 (C5), 38.1 (C7), 33.8 (C6), 29.8 (C8) ppm [σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία].³

Επτακίς(6-αζιδο-6-δεοξυ)-β-κυκλοδεξτρίνη (4.3)

Η επτακίς(6-βρωμο-6-δεοξυ)-β-κυκλοδεξτρίνη **4.2** (1 g, 0.63 mmol), διαλύεται σε DMF (20 mL). Στη συνέχεια προστίθεται νατραζίδιο (NaN_3 , 1.6 g, 24.6 mmol, 39 eq) και καταλυτική ποσότητα ιωδιούχου νατρίου (NaI, 37 mg, 0.25 mmol, 0.39 eq) και το μίγμα θερμαίνεται στους 110 $^{\circ}\text{C}$ για 18 ώρες. Το μίγμα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση έως μικρού όγκου (~1 mL). Στη συνέχεια, προστίθεται μεγάλη ποσότητα νερού, οπότε και σχηματίζεται ένα λευκό κρεμώδες ίζημα που διηθείται και εκπλένεται με νερό και EtOH. Το επιθυμητό προϊόν **4.3** παραλαμβάνεται ως λευκό στερεό. Απόδοση: 95%. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 298K, 500 MHz) δ 5.89 (d, $J = 6.7$ Hz, 7H, OH2), 5.75 (d, s, 7H, OH3), 4.91 (d, $J = 3.1$ Hz, 7H, H1), 3.77-3.72 (m, 14H, H6, H3), 3.63-3.58 (m, 14H, H6', H5), 3.40-3.34 (m, 14H, H2, H4) ppm. ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz) δ 102.9 (C1), 84.0 (C4), 73.4 (C5), 72.8 (C2), 71.2 (C3), 52.2 (C6) ppm [σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία].³

Επτακίς(6-αμινο-6-δεοξυ)-β-κυκλοδεξτρίνη (4.4)

Η επτακίς(6-αζιδο-6-δεοξυ)-β-κυκλοδεξτρίνη **4.3** (750 mg, 0.68 mmol), διαλύεται σε DMF (13 mL) και προστίθεται τριφαινυλοφωσφίνη (Ph₃P, 3.72 g, 13.81 mmol). Το μίγμα αναδεύεται για 1.5 ώρα και εν συνεχεία προστίθεται αμμωνία (30%, 14 mL). Η ανάδευση συνεχίζεται για ακόμα 16 ώρες σε r.t. Κατόπιν το διάλυμα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι το μισό όγκο και προστίθεται EtOH. Με την προσθήκη EtOH σχηματίζεται λευκό ίζημα που διηθείται προς παραλαβή του επιθυμητού προϊόντος **4.4**. Απόδοση: 60%. ¹H NMR (D₂O, 298K, 500 MHz) δ 5.15 (d, *J* = 3.5 Hz, 7H, H1), 4.0 (t, *J* = 9.4 Hz, 7H, H5), 3.90 (t, *J* = 9.5 Hz, 7H, H3), 3.73-3.68 (m, 14H, H2, H4), 3.54 (t, *J* = 9.3 Hz, 7H, H6), 3.18 (dd, *J* = 13.8 Hz, *J* = 2.2 Hz, 7H, H6') ppm. ¹³C NMR (D₂O, 125 MHz) δ 101.9 (C1), 82.9 (C4), 72.9 (C3), 72.2 (C2), 69.9 (C5), 41.1 (C6-NH₂) ppm [σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία].³

Επτακίς[6-(γουανιδινο)-6-δεοξυ]-β-κυκλοδεξτρίνη (bguan) (4.5)

Η υδροχλωρική επτακίς(6-αμινο-6-δεοξυ)-β-κυκλοδεξτρίνη **4.4** (496 mg, 0.43 mmol) διαλύεται σε ξηρό DMF (5 mL) και στο μίγμα προστίθεται υδροχλωρική 1*H*-πυραζόλο-1-καρβοξαμιδίνη (14 eq, 6.16 mmol, 905 mg) και DIPEA (14 eq, 6.06 mmol, 890 μl). Το μίγμα αναδεύεται στους 70 °C για 20 ώρες σε ατμόσφαιρα αζώτου. Κατόπιν προστίθεται υδροχλωρική 1*H*-πυραζόλο-1-καρβοξαμιδίνη (14 eq, 6.16 mmol, 905 mg) και *N,N'*-δισοπροπυλαιθυλαμίνη (DIPEA) (14 eq, 6.06 mmol, 890 μl) και αναδεύεται στους 70 °C για ακόμα 20 ώρες σε ατμόσφαιρα αζώτου. Στη συνέχεια αφήνεται να έρθει σε r.t και προστίθεται στάγδην διαιθυλαιθέρας (150 mL) και αναδεύεται για 2 ώρες. Ο αιθέρας απομακρύνεται με απόχυση, το στερεό διαλύεται σε πολύ μικρή ποσότητα νερού (3 mL) και προστίθεται EtOH. Το στερεό που καταβυθίζεται, διηθείται, εν συνεχεία αλκαλοποιείται σε pH 8.5 και εκχυλίζεται με CHCl₃. Λαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **4.5** με απόδοση: 64%. ¹H NMR (D₂O, 298K, 500 MHz) δ 5.12 (d, *J* = 2.6 Hz, 7H, H1), 4.05 (t, *J* = 6.7 Hz, 7H, H5), 3.97 (t, *J* = 9.2 Hz, 7H, H3), 3.71-3.63 (m, 14H, H2, H6), 3.54-3.50 (m, 14H, H4, H6') ppm. ¹³C NMR (D₂O, 125 MHz) δ 158.1 (C=), 102.1 (C1), 83.1 (C4), 72.8 (C5), 72.1 (C2), 71.3 (C3), 42.6 (C6) ppm [σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία].⁷

Επτακίς(6-αζιδο-6-δεοξυ-2,3-δι-Ο-μεθυλο)-β-κυκλοδεξτρίνη (DMβρN₃) (4.6)

Η επτακίς(6-αζιδο-6-δεοξυ)-β-κυκλοδεξτρίνη **4.3** (500 mg, 0.38 mmol) σε THF (12 mL), προστίθεται στάγδην σε διάλυμα υδριδίου του νατρίου (NaH, 323 mg, 13.45 mmol) σε THF (12 mL) στους 0 °C. Το μίγμα αναδεύεται για 30 λεπτά και στη συνέχεια προστίθεται μεθυλοιωδίδιο (4 mL) στους 0 °C και αναδεύεται στην ίδια θερμοκρασία για 1 ώρα σε ατμόσφαιρα N₂. Κατόπιν απομακρύνεται ο πάγος και αφήνεται υπό ανάδευση και απουσία φωτός για 25 ώρες σε r.t. Έπειτα ρυθμίζεται η θερμοκρασία στους 0 °C και προστίθεται στάγδην MeOH (15 mL), το μίγμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και εκχυλίζεται με CH₂Cl₂ και κορεσμένο διάλυμα NaCl. Ακολουθεί ξήρανση με MgSO₄ και συμπύκνωση μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και προκύπτει το επιθυμητό προϊόν **4.6** με απόδοση 99%. ¹H NMR (CDCl₃, 298K, 500 MHz) δ 5.12 (d, *J* = 3.5 Hz, 7H, H1), 3.84 (t, *J* = 6.7 Hz, 7H, H5), 3.75 (dd, *J* = 13.2 Hz, *J* = 1.6 Hz, 7H, H6), 3.66 (s, 21H, CH₃), 3.64-3.60 (m, 7H, H6'), 3.56 (s, 21H, CH₃), 3.53-3.48 (m, 14H, H3, H4), 3.22 (dd, *J* = 9.2 Hz, *J* = 3.5 Hz, 7H, H2) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 98.2 (C1), 81.1 (C4, C3), 80.5 (C2), 70.5 (C5), 61.0 (CH₃), 58.4 (CH₃), 51.4 (C6-N₃) ppm [σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία].⁸

Επτακίς(6-αμινο-6-δεοξυ-2,3-δι-Ο-μεθυλο)-β-κυκλοδεξτρίνη (DMβρNH₂) (4.7)

Η επτακίς(6-αζιδο-6-δεοξυ-2,3-δι-Ο-μεθυλο)-β-κυκλοδεξτρίνη **4.6** (346 mg, 0.23 mmol), διαλύεται σε DMF (10 mL) και προστίθεται τριφαινυλοφωσφίνη (Ph₃P, 961 mg, 3.66 mmol). Το μίγμα αναδεύεται για 1.5 ώρα και εν συνεχεία προστίθεται αμμωνία (30%, 982 μL). Η ανάδευση συνεχίζεται για ακόμα 20 ώρες σε r.t. Κατόπιν το διάλυμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση, οξινίζεται σε pH 4 και εκχυλίζεται με CH₂Cl₂. Η υδατική φάση συμπυκνώνεται προς παραλαβή του επιθυμητού προϊόντος **4.7** υπό μορφήν κίτρινου στερεού. Απόδοση: 100%. ¹H NMR (D₂O, 298K, 500 MHz) δ 5.32 (d, *J* = 1.3 Hz, 7H, H1), 4.13 (t, *J* = 7.9 Hz, 7H, H5), 3.55-3.77 (m, 21H, H2, H3, H4), 3.62 (s, 21H, CH₃), 3.52 (s, 21H, CH₃), 3.41 (d, *J* = 8.2 Hz, 7H, H6), 3.23 (t, *J* = 8.2 Hz, 7H, H6') ppm. ¹³C NMR (D₂O, 125 MHz) δ 98.3 (C1), 80.7 (C4), 80.4 (C3), 80.0 (C2), 68.5 (C5), 60.7 (CH₃), 58.8 (CH₃), 41.0 (C6-NH₂) ppm [σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία].⁵

Επτακίς[6-δι(*t*-βουτυλοξυκαρβονυλομεθυλαμινο)(2,3-δι-*O*-μεθυλο)-6-δεοξυ-β-κυκλοδεξτρίνη (4.28)

Η επτακίς(6-αμινο-6-δεοξυ-2,3-δι-*O*-μεθυλο)-β-κυκλοδεξτρίνη **4.7** (324 mg, 0.244 mmol) διαλύεται σε ακετονιτρίλιο (20 mL). Εν συνεχεία προστίθεται καταλυτικά ιωδιούχο κάλιο (KI), ανθρακικό κάλιο (K₂CO₃, 28 eq, 946 mg, 6.849 mmol) και *tert*-βουτυλεστέρας του βρωμοοξικού οξέος (28 eq, 6.849 mmol, 1031 μ L). Το μίγμα αναδεύεται με επαναροή στους 82 °C σε ατμόσφαιρα N₂ για 3 ημέρες. Κατόπιν συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και προστίθεται H₂O και CH₂Cl₂. Οι δύο φάσεις διαχωρίζονται, η υδατική εκπλένεται με CH₂Cl₂ (2 x 20 mL) και τα οργανικά εκχυλίσματα εκπλένονται με νερό, ξηραίνονται υπεράνω Na₂SO₄ και συμπυκνώνονται υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης CH₂Cl₂/MeOH (98:2) του ακάθαρτου μίγματος παρέχει το επιθυμητό προϊόν **4.28** με απόδοση 22%. R_f = 0.52 σε σύστημα ανάπτυξης CH₂Cl₂:MeOH/95:5. ¹H NMR (CDCl₃, 298K, 500 MHz) δ 5.16 (s, 7H, H1), 3.98-3.95 (t, *J* = 9.3 Hz, 7H, H4), 3.69-3.67 (m, 7H, H5), 3.55 (s, 21H, CH₃), 3.52-3.50 (m, 7H, H3), 3.45 (s, 21H, CH₃), 3.38-3.34 (m, 28H, H7, H8), 3.20-3.02 (m, 14H, H2, H6) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 171.08 (C=O), 98.9 (C1), 82.1 (C2), 81.6 (C3), 81.0 (C4), 80.3 (C-*t*Bu), 73.2 (C5), 61.4 (CH₃), 58.3 (CH₃), 57.9 (C7, C8), 55.1 (C6), 28.4 (*t*Bu) ppm.⁶
MS (ESI-TOF) *m/z*: 1484.3 ([*M*+2Na]²⁺), θεωρ. για C₁₄₀H₂₁₀N₇O₅₆Na: 1484.1.

Επτακίς[6-δι(καρβοξυμεθυλαμινο)](2,3-δι-*O*-μεθυλο)-6-δεοξυ-β-κυκλοδεξτρίνη (*bedta*) (4.29)

Η επτακίς[6-δι(*t*-βουτυλοξυκαρβονυλομεθυλαμινο)(2,3-δι-*O*-μεθυλο)-6-δεοξυ-β-κυκλοδεξτρίνη **4.28** (118 mg, 0.040 mmol) διαλύεται σε CHCl₃ (3 mL). Εν συνεχεία προστίθεται στάγδην τριφθοροοξικό οξύ (311 μ L, 4.03 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για δύο ημέρες στους 25 °C. Ακολουθεί συμπύκνωση υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού και διαδοχικές πλύσεις με CH₂Cl₂. Στη συνέχεια το στερεό υπόλειμμα διαλύεται σε νερό (3 mL), ρυθμίζεται σε pH = 7 και τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης, προς απομάκρυνση των προσμίξεων μικρού μοριακού βάρους, επί 4 ημέρες. Λαμβάνεται λευκό προϊόν **4.29** με απόδοση 62 %. ¹H NMR (D₂O, 298K, 500 MHz) δ 5.39 (s, 7H, H1), 4.36 (brs, 7H, H5), 3.95 (brs, 35H, H3, H7, H8), 3.91-3.84 (m, 7H, H6), 3.60-3.55 (m, 63H, CH₃x2, H2, H4, H6') ppm. ¹³C NMR (D₂O, 125 MHz) δ 170.5 (C=O), 97.02 (C1), 79.5 (C2, C3, C4), 68.1 (C5), 59.2 (CH₃), 58.8 (CH₃), 58.5 (C7, C8), 56.0 (C6) ppm.⁶

MS (MALDI-TOF) m/z : 2158.8 ($[M+Na]^+$), θεωρ. για $C_{84}H_{133}N_7O_{56}Na$: 2158.99.

Επτακίς(6-ιωδο-6-δεοξυ)-β-κυκλοδεξτρίνη (4.12)

Σε διάλυμα τριφαινυλοφωσφίνης (Ph_3P , 8.3 g, 32 mmol) σε ξηρό DMF (40 mL) προστίθεται σταδιακά για 1 ώρα και υπό συνεχή ανάδευση I_2 (8.1 g, 32 mmol) σε θερμοκρασία δωματίου. Κατά τη διάρκεια της προσθήκης η θερμοκρασία δεν πρέπει να υπερβεί τους $60\text{ }^\circ\text{C}$ καθώς η αντίδραση είναι εξώθερμη. Μετά την προσθήκη του I_2 η ανάδευση συνεχίζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Με αυτό τον τρόπο δημιουργείται το αντιδραστήριο Vilsmeier ($[(CH_3)_2NCHI]^+I^-$) *in situ*. Κατόπιν προστίθεται η β CD **4.1** (1.7 g, 1.5 mmol) σε μικρές ποσότητες. Στη συνέχεια, το μίγμα θερμαίνεται στους $75\text{ }^\circ\text{C}$ - $80\text{ }^\circ\text{C}$ για 17 ώρες. Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου, συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση στο μισό όγκο και κατόπιν προστίθεται στάγδην σε διάλυμα $MeONa$ (1.94 g) σε $MeOH$ (15 mL) ($pH=10-12$), το οποίο είχε προηγουμένως ψυχθεί στους $0\text{ }^\circ\text{C}$. Το μίγμα που προκύπτει αναδεύεται για 30 λεπτά και αποχύνεται σε παγωμένο νερό (600 mL), οπότε καταβυθίζεται μαύρο ίζημα που διηθείται και εκπλένεται με νερό (400 mL) και CH_2Cl_2 (400 mL + 2 x 100 mL). Με αυτή τη διαδικασία παραλαμβάνεται καφέ ίζημα. Στη συνέχεια το στερεό επαναδιαλύεται σε DMF (30 mL) και καταβυθίζεται με απόχυση σε παγωμένο νερό (500 mL). Έπειτα από διήθηση, έκπλυση με $MeOH$ (3 x 100 mL), διαδοχική ξήρανση στον αέρα και στους $80\text{ }^\circ\text{C}$ υπό κενό για 18 ώρες λαμβάνεται το προϊόν **4.12** ως λευκό στερεό. Απόδοση: 96%. 1H NMR ($DMSO-d_6$, 298K, 500 MHz) δ 6.02 (d, $J = 5.1$ Hz, 7H, OH2), 5.92 (brs, 7H, OH3), 4.99 (brs, 7H, H1), 3.80 (d, $J = 9.7$ Hz, 7H, H6), 3.65 (brs, 7H, H5), 3.59 (brs, 7H, H3), 3.44 (brs, 7H, H6'), 3.37 (brs, 7H, H2) ppm. ^{13}C NMR ($DMSO-d_6$, 125 MHz) δ 102.0 (C1), 85.8 (C4), 72.0 (C3), 71.7 (C2), 70.8 (C5), 9.3 (C6-I) ppm [σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία].⁹

Επτακίς [6-(αμινοαιθυλαμινο)-6-δεοξυ]-β-κυκλοδεξτρίνη (bren) (4.9)

Η επτακίς(6-βρωμο-6-δεοξυ)- β CD **4.2** (316 mg, 0.2 mmol) προστίθεται σε 1,2-διαμινοαιθάνιο (3.7 mL, 56 mmol) και το μίγμα παραμένει υπό συνεχή ανάδευση σε αυτόκλειστο σε θερμοκρασία $80\text{ }^\circ\text{C}$ και πίεση N_2 7 Atm επί 3 ημέρες. Κατόπιν η περίσσεια του διαμινοαιθανίου απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση και το ελαιώδες υπόλειμμα ρυθμίζεται σε $pH = 7$, διαλύεται σε δις απεσταγμένο νερό (3 mL)

και τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης, προς απομάκρυνση των προσμίξεων μικρού μοριακού βάρους, επί 3 ημέρες. Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση, από την οποία λαμβάνεται το προϊόν **4.9** σε απόδοση 99%. ¹H NMR (D₂O, 298 K, 500 MHz) δ 5.08 (brs, 7H, H1), 3.89 (brm, 14H, H3, H5), 3.61 (brm, 14H, H2, H4), 3.07 (brs, 14H, H8), 2.94-2.87 (brs, 28H, H6, H7) ppm. ¹³C NMR (D₂O, 125 MHz) δ 101.8 (C1), 82.2 (C4), 73.2 (C3), 72.4 (C2), 70.8 (C5), 48.7 (C6), 46.7 (C7), 39.0 (C8) ppm [σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία].⁹

6-Μονο-p-τολουολοσουλφονυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (4.10)

Αιώρημα βCD **4.1** (4 g, 3.5 mmol) και *p*TsCl (1.6 g, 8.4 mmol) σε υδατικό διάλυμα NaOH (120 mL, 1.7% κ.ο.) αφήνεται υπό ανάδευση στους 0 °C για 2 ώρες. Ακολουθεί προσθήκη του *p*TsCl (2.4 g, 12.5 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 3 ώρες στους 0 °C. Εν συνεχεία διηθείται από σελίτη και το διήθημα τοποθετείται στους 0 °C όπου προστίθεται 10% HCl (28 mL) έως ότου το pH να γίνει 1. Το ίζημα διηθείται και λαμβάνεται το προϊόν **4.10** υπό μορφή λευκής σκόνης σε απόδοση 55%. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 298 K, 500 MHz) δ 7.75 (d, 2H), 7.42 (d, 2H), 5.68 (m, 14H, OH₂, OH₃), 4.78 (m, 5H, H1), 4.68 (m, 2H, H1), 4.55-4.15 (m, 8H, OH₆, CH₂), 2.77 (s, 3H) ppm. ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ 144.82, 132.68, 129.91, 127.6 (αρωματικά), 101.96 (C1), 81.53 (C4), 73.08 (C3), 72.4 (C2), 72.46 (C5), 59.92 (C6), 21.23 (CH₃) ppm [σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία].¹⁰

Μονο[6-(καρβοξυαιθυλοθειο)-6-δεοξυ]-β-κυκλοδεξτρίνη (bm_{sp}) (4.11)

Σε διάλυμα 3-μερκαπτοπροπανοϊκού οξέος (14.6 μL, 0.168 mmol) σε DMF (2 mL) προστίθεται υδρίδιο του νατρίου (15 mg, 0.62 mmol) σε 10 ισόποσες δόσεις και το μίγμα αναδεύεται για 1 ώρα. Κατόπιν προστίθεται η 6-μονο-p-τολουολοσουλφονυλο-β-κυκλοδεξτρίνη **4.10** (100 mg, 0.077 mmol) και το μίγμα αναδεύεται για 2 ώρες στους 100 °C. Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθεται νερό (2 mL). Εν συνεχεία συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού. Ακολουθεί ρύθμιση του pH σε 7 και τοποθέτηση σε μεμβράνη διαπίδυσης, προς απομάκρυνση των προσμίξεων μικρού μοριακού βάρους, επί 1 ημέρα. Λαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **4.11** με απόδοση: 98%. ¹H NMR (D₂O, 298K, 500 MHz) δ 5.15 (brs, 1H, H1'), 5.09 (brs, 6H, H1), 3.96-3.88 (m, 22H), 3.69-3.59 (m, 12H), 3.17 (m, 1H), 2.94-2.85 (m, 2H), 2.63 (m, 2H) ppm. ¹³C

NMR (D₂O, 125 MHz) δ 180.8 (C=O), 102.0 (C1), 101.8 (C1'), 81.3 (C4), 73.3 (C3), 72.3 (C2), 72.1 (C5), 60.4 (C6'), 37.8 (C7), 33.2 (C6), 29.4 (C8) ppm.

MS (MALDI-TOF) m/z : 1245.67 ($[M+Na]^+$, θεωρ.: 1245.37).

9.2.3 Σύνθεση παραγώγων γ -κυκλοδεξτρίνης

Οκτακίς(6-βρωμο-6-δεοξυ)- γ -κυκλοδεξτρίνη (4.14)

Σε διάλυμα τριφαινυλοφωσφίνης (Ph₃P, 6.47 g, 24.7 mmol) σε ξηρό DMF (20 mL) προστίθεται στάγδην για 1 ώρα και υπό συνεχή ανάδευση Br₂ (1.27 mL, 24.6 mmol) σε θερμοκρασία δωματίου. Κατά τη διάρκεια της προσθήκης η θερμοκρασία δεν πρέπει να υπερβεί τους 60 °C καθώς η αντίδραση είναι εξώθερμη. Μετά την προσθήκη του Br₂ η ανάδευση συνεχίζεται στους 60 °C για 45 λεπτά. Με αυτό τον τρόπο δημιουργείται το αντιδραστήριο Vilsmeier ($[(CH_3)_2NCHBr]^+Br^-$) και χρησιμοποιείται *in situ*. Κατόπιν το διάλυμα ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθεται η γ CD **4.13** (1.04 g, 820 mmol) σε μικρές ποσότητες. Στη συνέχεια, το μίγμα θερμαίνεται στους 75 °C - 80 °C για 19 ώρες. Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν προστίθεται στάγδην σε διάλυμα MeONa (4.05 g) σε MeOH (25 mL) (pH=10-12), το οποίο είχε προηγουμένως ψυχθεί στους 0 °C. Το μίγμα που προκύπτει αναδεύεται για 1 ώρα και αποχύνεται σε παγωμένο νερό (300 mL), οπότε καταβυθίζεται λευκό ίζημα που διηθείται και εκπλένεται με EtOH ώστε να εκδιωχθεί το οξείδιο της τριφαινυλοφωσφίνης (Ph₃P=O) που προκύπτει ως παραπροϊόν και τελικά προκύπτει το επιθυμητό προϊόν **4.14** υπό μορφήν λευκού στερεού. Απόδοση: 65%. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 298K, 500 MHz) δ 6.05 (d, J = 6.8 Hz, 8H, OH2), 5.97 (brs, 8H, OH3), 5.02 (d, J = 1.4 Hz, 8H, H1), 3.98 (d, J = 10.8 Hz, 8H, H6), 3.82 (t, J = 7.3 Hz, 8H, H5), 3.68 (t, J = 10.9 Hz, 8H, H6'), 3.62 (t, J = 8.4 Hz, 8H, H3), 3.42-3.38 (m, 16H, H2, H4) ppm. ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ 101.9 (C1), 83.91 (C4), 72.15 (C2), 72.06 (C3), 70.89 (C5), 34.25 (C6-Br) ppm [σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία].^{1,2}

Οκτακίς[6-(καρβοξυαιθυλοθειο)-6-δεοξυ]- γ -κυκλοδεξτρίνη (grsp) (4.19)

Σε διάλυμα 3-μερκαπτοπροπανοϊκού οξέος (338 μ L, 3.88 mmol) σε DMF (10 mL) προστίθεται υδρίδιο του νατρίου (NaH, 357 mg, 14.9 mmol) σε 10 ισόποσες δόσεις και το μίγμα αναδεύεται για 1 ώρα. Κατόπιν προστίθεται η οκτακίς(6-δεοξυ-6-

βρωμο)-γ-κυκλοδεξτρίνη **4.14** (700 mg, 0.385 mmol) σε DMF (10 mL) και το μίγμα αναδεύεται για 24 ώρες στους 72 °C. Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθεται νερό (20 mL). Εν συνεχεία συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση στη μισή ποσότητα και προστίθεται EtOH (200 mL). Καταβυθίζεται ίζημα και αφήνεται στους 4 °C για 12 ώρες και στη συνέχεια διηθείται και εκπλένεται με EtOH και το στερεό υπόλειμμα τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης, προς απομάκρυνση των προσμίξεων μικρού μοριακού βάρους, επί 3 ημέρες. Λαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **4.19** με απόδοση: 69%. ¹H NMR (D₂O, 298K, 500 MHz) δ 5.21 (brs, 8H, H1), 4.06-3.97 (m, 16H), 3.68-3.65 (m, 16H), 3.19 (brs, 8H), 3.02 (brs, 8H), 2.90 (s, 16H), 2.53 (s, 16H) ppm. ¹³C NMR (D₂O, 125 MHz) δ 180.8 (C=O), 101.4 (C1), 83.0 (C4), 73.0 (C3), 72.6 (C2), 71.6 (C5), 37.9 (C7), 33.7 (C6), 29.7 (C8) ppm [σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία].³

Οκτακίς(6-αζιδο-6-δεοξυ)-γ-κυκλοδεξτρίνη (4.15)

Η οκτακίς(6-βρωμο-6-δεοξυ)-γ-κυκλοδεξτρίνη **4.14** (400 mg, 0.22 mmol), διαλύεται σε DMF (10 mL). Στη συνέχεια προστίθεται νατραζίδιο (NaN₃, 772 mg, 11.88 mmol, 54 eq) και καταλυτική ποσότητα ιωδιούχου νατρίου (NaI, 18 mg, 0.118 mmol, 0.54 eq) και το μίγμα θερμαίνεται στους 110 °C για 18 ώρες. Το μίγμα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση έως μικρού όγκου (~2 mL). Στη συνέχεια, προστίθεται μεγάλη ποσότητα νερού, οπότε και σχηματίζεται λευκό κρεμώδες ίζημα, το οποίο διηθείται και εκπλένεται με νερό και EtOH. Το επιθυμητό προϊόν **4.15** παραλαμβάνεται ως λευκό στερεό. Απόδοση: 80%. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 298K, 500 MHz) δ 5.92 (d, *J* = 7.1 Hz, 8H, OH2), 5.86 (s, 8H, OH3), 4.92 (brs, 8H, H1), 3.74-3.71 (m, 16H, H6, H3), 3.59-3.55 (m, 16H, H6', H5), 3.45-3.34 (m, 16H, H2, H4) ppm. IR (neat) ν 2104.59 [σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία].³

Οκτακίς(6-αζιδο-6-δεοξυ-2,3-δι-Ο-μεθυλο)-γ-κυκλοδεξτρίνη (DMγρN₃) (4.16)

Η οκτακίς(6-αζιδο-6-δεοξυ)-γ-κυκλοδεξτρίνη **4.15** (263 mg, 0.175 mmol) σε THF (6 mL), προστίθεται στάγδην σε διάλυμα υδριδίου του νατρίου (NaH, 170 mg, 7.083 mmol) σε THF (6 mL) στους 0 °C. Το μίγμα αναδεύεται για 30 λεπτά και στη συνέχεια προστίθεται μεθυλοιωδίδιο (3 mL) στους 0 °C και αναδεύεται στην ίδια θερμοκρασία για 1 ώρα σε ατμόσφαιρα N₂. Κατόπιν απομακρύνεται ο πάγος και το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση και απουσία φωτός για 25 ώρες σε r.t. Έπειτα ρυθμίζεται η θερμοκρασία στους 0 °C και προστίθεται στάγδην MeOH (6 mL), το

μίγμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και εκχυλίζεται με CH₂Cl₂ και κορεσμένο διάλυμα NaCl. Ακολουθεί ξήρανση με MgSO₄ και συμπύκνωση μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και προκύπτει το επιθυμητό προϊόν **4.16** με απόδοση 88%. ¹H NMR (CDCl₃, 298K, 500 MHz) δ 5.22 (brs, 8H, H1), 3.74 (brs, 8H, H5), 3.65 (m, 8H, H6), 3.57 (s, 24H, CH₃), 3.50 (m, 24H, H6', H3, H4), 3.47 (s, 24H, CH₃), 3.14 (m, 8H, H2) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 98.02 (C1), 81.7 (C4, C3), 79.4 (C2), 70.9 (C5), 61.28 (CH₃), 59.06 (CH₃), 51.63 (C6-N₃) ppm [σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία].¹¹

Οκτακίς(6-αμινο-6-δεοξυ-2,3-δι-Ο-μεθυλο)-γ-κυκλοδεξτρίνη (DMγρNH₂) (4.17)

Η οκτακίς(6-αζιδο-6-δεοξυ-2,3-δι-Ο-μεθυλο)-γ-κυκλοδεξτρίνη **4.16** (267 mg, 0.155 mmol), διαλύεται σε DMF (6 mL) και προστίθεται τριφαινυλοφωσφίνη (Ph₃P, 742 mg, 2.829 mmol). Το μίγμα αναδεύεται για 1.5 ώρα και εν συνεχεία προστίθεται αμμωνία (30%, 758 μL). Η ανάδευση συνεχίζεται για ακόμα 20 ώρες σε r.t. Κατόπιν το διάλυμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση, οξινίζεται σε pH 4 και εκχυλίζεται με CH₂Cl₂. Η υδατική φάση συμπυκνώνεται προς παραλαβή του επιθυμητού προϊόντος **4.17** υπό μορφήν κίτρινου στερεού. Απόδοση: 95%. ¹H NMR (D₂O, 298K, 500 MHz) δ 5.42 (brs, 8H, H1), 4.11 (brs, 8H, H5), 3.74 (m, 24H, H2, H3, H4), 3.49 (s, 24H, CH₃), 3.48 (s, 24H, CH₃), 3.38 (m, 8H, H6), 3.24 (ap.t, 8H, H6') ppm. ¹³C NMR (D₂O, 125 MHz) δ 96.5 (C1), 79.5 (C4, C3, C2), 67.3 (C5), 59.13 (CH₃x2), 40.7 (C6-NH₂) ppm.⁸

Οκτακίς[6-δι(t-βουτυλοξυκαρβονυλομεθυλαμινο)(2,3-δι-Ο-μεθυλο)-6-δεοξυ-γ-κυκλοδεξτρίνη (4.30)

Η οκτακίς(6-αμινο-6-δεοξυ-2,3-δι-Ο-μεθυλο)-γ-κυκλοδεξτρίνη **4.17** (300 mg, 0.198 mmol) διαλύεται σε ακετονιτρίλιο (18 mL). Εν συνεχεία προστίθεται καταλυτικά ιωδιούχο κάλιο (KI), ανθρακικό κάλιο (K₂CO₃, 32 eq, 876 mg, 6.342 mmol) και *tert*-βουτυλεστέρας του βρωμοοξικού οξέος (32 eq, 6.342 mmol, 955 μL). Το μίγμα αναδεύεται με επαναροή στους 82 °C σε ατμόσφαιρα N₂ για 4 ημέρες. Κατόπιν συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και προστίθεται H₂O και CH₂Cl₂. Οι δύο φάσεις διαχωρίζονται, η υδατική εκπλένεται με CH₂Cl₂ (2 x 20 mL) και τα οργανικά εκχυλίσματα εκπλένονται με νερό, ξηραίνονται υπεράνω MgSO₄ και συμπυκνώνονται υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης CH₂Cl₂/MeOH (98:2) του ακάθαρτου μίγματος παρέχει το επιθυμητό προϊόν **4.30** με απόδοση 45%.

$R_f = 0.40$ σε σύστημα ανάπτυξης $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}/95:5$. ^1H NMR (CDCl_3 , 298K, 500 MHz) δ 5.38 (s, 8H, H1), 4.05 (m, 8H, H4), 3.70 (m, 8H, H5), 3.62 (s, 24H, CH_3), 3.53 (m, 16H, H7), 3.52 (s, 24H, CH_3), 3.49 (m, 24H, H3, H8), 3.28 (brs, 8H, H6), 3.12 (m, 28H, 8H, H2), 3.11 (m, 8H8, H6') ppm. ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 170.8 (C=O), 98.39 (C1), 82.0 (C2, C3), 80.46 ($\underline{\text{C}}\text{-tBu}$), 79.9 (C4), 72.9 (C5), 61.59 (CH_3), 58.7 (CH_3), 57.45 (C7, C8), 55.18 (C6), 28.39 ($\underline{\text{tBu}}$) ppm.⁶

MS (MALDI-TOF) m/z : 3362.6 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), θεωρ. για $\text{C}_{160}\text{H}_{280}\text{N}_8\text{O}_{64}\text{Na}$: 3360.89.

Οκτακίς[6-δι(καρβοξυμεθυλαμινο)](2,3-δι-Ο-μεθυλο)-6-δεοξυ-γ-κυκλοδεξτρίνη (gedta) (4.31)

Η οκτακίς[6-δι(*t*-βουτυλοξυκαρβονυλομεθυλαμινο)(2,3-δι-Ο-μεθυλο)-6-δεοξυ-γ-κυκλοδεξτρίνη **4.30** (249 mg, 0.0745 mmol) διαλύεται σε CHCl_3 (7 mL). Εν συνεχεία προστίθεται στάγδην τριφθοροοξικό οξύ (655 μL , 8.498 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για δύο ημέρες στους 25 $^\circ\text{C}$. Ακολουθεί συμπύκνωση υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού και διαδοχικές πλύσεις με CH_2Cl_2 . Στη συνέχεια το στερεό υπόλειμμα διαλύεται σε νερό (3 mL), ρυθμίζεται σε pH = 7 και τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης, προς απομάκρυνση των προσμίξεων μικρού μοριακού βάρους, επί 4 ημέρες. Λαμβάνεται λευκό προϊόν **4.31** με απόδοση 50%. ^1H NMR (D_2O , 298K, 500 MHz) δ 5.40 (s, 8H, H1), 4.27 (brs, 8H, H3), 3.88 (m, 32H, H7, H8), 3.85 (m, 8H, H5), 3.73 (m, 8H, H6'), 3.62 (s, 24H, CH_3), 3.57 (s, 24H, CH_3), 3.51 (m, 16H, H2, H4), 3.49 (m, 8H, H6) ppm. ^{13}C NMR (D_2O , 125 MHz) δ 170.4 (C=O), 96.83 (C1), 79.7 (C4), 79.67 (C5), 79.6 (C2), 67.8 (C3), 59.53(CH_3), 59 (CH_3 , C7, C8), 55.96 (C6) ppm.⁶

MS (MALDI-TOF) m/z : 2464.8 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), θεωρ. για $\text{C}_{96}\text{H}_{152}\text{N}_8\text{O}_{64}\text{Na}$: 2463.89.

Οκτακίς [6-(αμινοαιθυλαμινο)-6-δεοξυ]-γ-κυκλοδεξτρίνη (gren) (4.18)

Η οκτακίς(6-βρωμο-6-δεοξυ)-γCD **4.14** (250 mg, 0.13 mmol) προστίθεται σε 1,2-διαμιναιθάνιο (2.67 mL, 44.3 mmol) και το μίγμα παραμένει υπό συνεχή ανάδευση σε αυτόκλειστο σε θερμοκρασία 80 $^\circ\text{C}$ και πίεση N_2 7 Atm επί 3 ημέρες. Κατόπιν η περίσσεια του διαμιναιθανίου απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση και το ελαιώδες υπόλειμμα ρυθμίζεται σε pH = 7, διαλύεται σε δις απεσταγμένο νερό (3 mL) και τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης, προς απομάκρυνση των προσμίξεων μικρού μοριακού βάρους, επί 3 ημέρες. Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση, από την οποία λαμβάνεται το προϊόν **4.18** σε απόδοση 98%.

^1H NMR (D_2O , 298 K, 500 MHz) δ 5.09 (br, 8H, H1), 3.84 (br, 16H, H3, H5), 3.53 (br, 16H, H2, H4), 3.03 (br, 16H, H8), 2.88 (br, 32H, H6, H7) ppm. ^{13}C NMR (D_2O , 125 MHz) δ 100.2 (C1), 80.2 (C4), 72.2 (C3), 71.7 (C2), 70.0 (C5), 48.1 (C6), 45.8 (C7), 38.2 (C8) ppm [σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία].⁹

Οκτακίς [6-(αμινοπροπυλαμινο)-6-δεοξυ]- γ -κυκλοδεξτρίνη (gpren) (4.20)

Η οκτακίς(6-βρωμο-6-δεοξυ)-6-δεοξυ- γ CD **4.14** (150 mg, 0.082 mmol) προστίθεται σε 1,3-διαμινοπροπάνιο (2.2 mL, 26.6 mmol) και το μίγμα παραμένει υπό συνεχή ανάδευση σε αυτόκλειστο σε θερμοκρασία 80 $^{\circ}\text{C}$ και πίεση N_2 7 Atm επί 3 ημέρες. Κατόπιν η περίσσεια του διαμινοπροπανίου απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση και το ελαιώδες υπόλειμμα ρυθμίζεται σε pH = 7, διαλύεται σε δις απεσταγμένο νερό (3 mL) και τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης, προς απομάκρυνση των προσμίξεων μικρού μοριακού βάρους, επί 3 ημέρες. Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση, από την οποία λαμβάνεται το προϊόν **4.20** σε απόδοση 79%. ^1H NMR (D_2O , 298 K, 500 MHz) δ 5.28 (brs, 8H, H1), 4.04 (brs, 8H, H3), 3.96 (t, $J = 9.3$ Hz, 8H, H5), 3.65 (dd, $J = 9.7$ Hz, $J = 3.0$ Hz, 8H, H2), 3.60 (t, $J = 9.4$ Hz, 8H, H4), 3.08-3.06 (brm, 32H, H9, H6), 2.90 (d, $J = 5.0$ Hz, 16H, H7), 1.98 (t, $J = 7.2$ Hz, 16H, H8) ppm. ^{13}C NMR (D_2O , 125 MHz) δ 99.2 (C1), 79.5 (C4), 71.9 (C3), 71.3 (C2), 68.7 (C5), 48.5 (C6), 45.9 (C7), 37.2 (C9), 25.2 (C8) ppm [σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία].⁹

9.3 Τροποποίηση σακχάρων αναγνώρισης με λειτουργικές ομάδες

9.3.1 Σύνθεση παραγώγων D-(+)-μαννόζης

Πενταακετολο-D-μαννοπυρανόζη (5.2)

Σε διάλυμα D-(+)-μαννόζης **5.1** (2 g, 11.1 mmol) σε πυριδίνη (13.5 mL, 266.5 mmol) προστίθεται οξικός ανυδρίτης (10.5 mL, 111 mmol) και καταλυτική ποσότητα DMAP. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε για 1.5 ώρα, συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και προστίθεται κορεσμένο υδατικό διάλυμα CuSO_4 (3 x 50 mL) και AcOEt . Οι δύο φάσεις διαχωρίζονται και η οργανική εκπλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl . Η οργανική φάση ξηραίνεται υπέρνω MgSO_4 και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης με εξάνιο/ AcOEt

(5:5) του ακάθαρτου μίγματος παρέχει το επιθυμητό προϊόν **5.2** με απόδοση 100%. Αναλογία ανωμερών $\alpha:\beta = 3:1$. $R_f = 0.43$. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 298K, 500 MHz) δ 6.10 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H- α), 5.88 (brs, 1H- β), 5.50 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H- β), 5.37-5.36 (m, 2H- α), 5.31 (s, 1H- β), 5.28 (s, 1H- α), 5.15 (dd, $J = 3.2$ Hz, $J = 9.9$ Hz 1H- β), 4.34 (m, 1H- β), 4.31 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H- α), 4.29 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H- α), 4.17-4.15 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H- β), 4.12 (dd, $J = 2.1$ Hz, $J = 12.4$ Hz, 1H- α), 4.08-4.06 (m, 1H- α), 3.84-3.80 (m, 1H- β), 2.23 (s, CH_3 , β), 2.19 (s, CH_3 , α), 2.18 (s, CH_3 , α), 2.12 (s, CH_3 , β), 2.11 (s, CH_3 , α), 2.07 (s, CH_3 , α), 2.02 (s, CH_3 , α) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz) δ 169.7 (O=C), 169.3 (O=C), 169.1 (O=C), 168.9 (O=C), 168.8 (O=C), 167.6 (O=C), 167.4 (O=C), 89.9 (C1), 72.4 70.0, 68.2, 67.7, 64.9, 61.4, 19.9 (CH_3) ppm [σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία].¹²

2'-Βρωμοαιθυλο-2,3,4,6-τετρα-Ο-ακετυλο- α -D-μαννοπυρανόζη (5.3)

Σε διάλυμα πενταακετυλο-D-μαννοπυρανόζης **5.2** (2.2 g, 5.63 mmol) και 1-βρωμοαιθανόλης (399 μL , 5.63 mmol) σε CH_2Cl_2 (20 mL) προστίθεται $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (2.4 mL, 19.14 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 10 ώρες σε r.t, υπό ατμόσφαιρα αζώτου και απουσία φωτός. Εν συνεχεία προστίθεται CH_2Cl_2 (20 mL) και κορεσμένο NaHCO_3 (20 mL) και ξεπλένεται με απιονισμένο νερό (2 x 30 mL). Οι δύο φάσεις διαχωρίζονται και η οργανική ξηραίνεται υπεράνω MgSO_4 και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης με εξάνιο/ AcOEt (5:5) του ακάθαρτου μίγματος παρέχει το επιθυμητό προϊόν **5.3** με απόδοση 67%, $R_f = 0.56$. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 298K, 500 MHz) δ 5.38 (dd, $J = 3.3$ Hz, $J = 10.0$ Hz 1H, H2), 5.33-5.29 (m 2H, H3, H4), 4.90 (s, 1H, H1), 4.29 (dd, $J = 5.7$ Hz, $J = 12.4$ Hz 1H, H6), 4.16 (m, 2H, H5, H6), 4.02-3.98 (m, 1H, H7), 3.93-3.89 (m, 1H, H7'), 3.54 (t, $J = 6.0$ Hz, Hz, 2H, H8), 2.18 (s, CH_3), 2.13 (s, CH_3), 2.07 (s, CH_3), 2.02 (s, CH_3) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz) δ 170.1 (O=C), 169.5 (O=C), 169.4 (O=C), 169.3 (O=C), 97.3 (C1), 60.01 (CH), 68.6 (CH), 68.5 (CH), 68.0 (CH), 65.6 (CH_2O), 62.0 (CH_2), 29.2, (CH_2Br), 20.4 (CH_3), 20.2 (3x CH_3) ppm [σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία].¹³

2'-Αζιδοαιθυλο-2,3,4,6-τετρα-Ο-ακετυλο- α -D-μαννοπυρανόζη (5.4)

Σε διάλυμα 2'-βρωμοαιθυλο-2,3,4,6-τετρα-Ο-ακετυλο- α -D-μαννοπυρανόζης **5.3** (500 mg, 1.09 mmol) σε DMF (30 mL) προστίθεται NaN_3 (428 mg, 6.58 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 3 ώρες στους 60 $^\circ\text{C}$ υπό ατμόσφαιρα

αζώτου. En συνεχεία συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση προστίθεται CH_2Cl_2 (20 mL) και ξεπλένεται με απιονισμένο νερό (2 x 20 mL). Οι δύο φάσεις διαχωρίζονται και η οργανική ξηραίνεται υπεράνω MgSO_4 και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης με εξάνιο/ AcOEt (7:3) του ακάθαρτου μίγματος παρέχει το επιθυμητό προϊόν **5.4** με απόδοση 88%, $R_f = 0.2$. ^1H NMR (CDCl_3 , 298K, 500 MHz) δ 5.38 (dd, $J = 3.2$ Hz, $J = 9.9$ Hz 1H, H3), 5.34-5.32 (m 1H, H4), 5.30 (m, 1H, H2), 4.89 (brs, 1H, H1), 4.30 (dd, $J = 5.3$ Hz, $J = 12.2$ Hz 1H, H6), 4.15 (dd, $J = 1.8$ Hz, $J = 12.2$ Hz 1H, H6), 4.08-4.05 (m, 1H, H5), 3.91-3.87 (m, 1H, H7), 3.71-3.67 (m, 1H, H7'), 3.54-3.45 (m, 2H, H8), 2.18 (s, CH_3), 2.12 (s, CH_3), 2.07 (s, CH_3), 2.01 (s, CH_3) ppm. ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 169.8 (O=C), 169.2 (O=C), 169.1 (O=Cx2), 97.1 (C1), 68.7 (CH), 68.3 (CH), 68.2 (CH), 66.4 (CH_2O), 65.4 (CH), 61.8 (CH_2), 49.8 (CH_2N_3), 20.2 (CH_3), 20.1 (2x CH_3), 20.0 (CH_3) ppm [σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία].¹³

2'-Ακετυλοαμινοαιθυλο- α -D-μαννοπυρανόζη (5.9)

Σε διάλυμα 2'-αζιδοαιθυλο-2,3,4,6-τετρα-*O*-ακετυλο- α -D-μαννοπυρανόζης **5.4** (398 mg, 0.953 mmol) σε MeOH (15 mL) προστίθεται Pd/C 10% (39.8 mg). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 18 ώρες σε r.t υπό ατμόσφαιρα υδρογόνου. En συνεχεία διηθείται από σελίτη και συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης με $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95:5) του ακάθαρτου μίγματος παρέχει το επιθυμητό προϊόν **5.9** με απόδοση 24%. $R_f = 0.09$. ^1H NMR (D_2O , 298K, 500 MHz) δ 4.76 (brs, 1H, H1), 3.83 (brs 1H, H6), 3.78-3.76 (m, 1H, H6'), 3.69-3.63 (m, 3H, H2, H4, H5), 3.56-3.54 (m, 1H, H3), 3.51 (m, 2H, H7), 3.36-3.33 (m, 2H, H8) ppm. ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) δ 172.6 (O=C), 100.7 (C1), 73.7 (CH), 71.5 (CH), 71.1 (CH), 67.6 (CH_2O), 66.3 (CH), 61.8 (CH_2), 39.4 ($\text{CH}_2\text{NH-Ac}$), 21.7 ($\text{CH}_2\text{NH-CH}_3$) ppm.

2'-Αζιδοαιθυλο- α -D-μαννοπυρανόζη (5.11)

Σε διάλυμα 2'-αζιδοαιθυλο-2,3,4,6-τετρα-*O*-ακετυλο- α -D-μαννοπυρανόζης **5.4** (839 mg, 2.01 mmol) σε MeOH (10.9 mL) προστίθεται MeONa (26.8 mg, 0.0496 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 3 ώρες σε r.t. En συνεχεία ρυθμίζεται σε ουδέτερο pH, με ρητίνη DOWEX 50 WX2 (H^+) διηθείται και συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης με $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9:1) του ακάθαρτου μίγματος παρέχει το επιθυμητό προϊόν **5.11** με

απόδοση 100%, $R_f = 0.2$. ^1H NMR (CD_3OD , 298K, 500 MHz) δ 4.84 (s, 1H, H1), 3.96-3.92 (m 1H, H5), 3.88-3.86 (m, 2H, H2, H3), 3.77-3.72 (m, 2H, H6), 3.68-3.60 (m 3H, H4, H7) ppm. ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 101.0 (C1), 74.1 (C4), 71.7 (C3), 71.3 (C2), 67.8 (CH_2O), 66.9 (C5), 62.1 (CH_2), 51.0 (CH_2N_3) ppm [σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία].¹⁴

2'-Αμινοαιθυλο- α -D-μαννοπυρανόζη (5.12)

Σε διάλυμα 2'-αζιδοαιθυλο- α -D-μαννοπυρανόζης **5.11** (504 mg, 2.022 mmol) σε MeOH (15 mL) προστίθεται Pd/C 10% (50.4 mg). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 18 ώρες σε r.t υπό ατμόσφαιρα υδρογόνου. Εν συνεχεία διηθείται από σελλίτη και συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση. Το επιθυμητό προϊόν **5.12** παραλαμβάνεται σε απόδοση 98%. ^1H NMR (D_2O , 298K, 500 MHz) δ 4.86 (brs, 1H, H1), 3.95 (brs 1H, H2), 3.89-3.87 (m, 1H, H3), 3.80 (m, 1H, H4), 3.75-3.73 (m, 2H, H5, H6), 3.64-3.62 (m, 2H, H7), 3.53-3.51 (m, 1H, H6'), 2.85-2.78 (m, 2H, H8) ppm. ^{13}C NMR (D_2O , 125 MHz) δ 101.2 (C1), 74.1 (C4), 71.9 (C3), 71.4 (C2), 70.3 (CH_2O), 68.2 (C5), 62.3 (C6), 41.39 (C8) ppm [σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία].¹⁴

2'-N-ηλεκτριμιδοξοκαρβονυλοαιθυλο- α -D-μαννοπυρανόζη (5.14)

Διάλυμα 2'-αμινοαιθυλο- α -D-μαννοπυρανόζης **5.12** (72 mg, 0.322 mmol) σε DMF (1.3 mL) προστίθεται στάγδην σε διάλυμα ανθρακικού εστέρα του *N,N'*-διηλεκτρολυϊμιδίου (165.2 mg, 0.645 mmol) και τριαιθυλαμίνης (89.9 μL , 0.645 mmol) σε DMF (4.9 mL). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 2 ώρες σε r.t υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Εν συνεχεία συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης με $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (3:1) του ακάθαρτου μίγματος παρέχει το επιθυμητό προϊόν **5.14** με απόδοση 30%, $R_f = 0.25$. ^1H NMR (CD_3OD , 298K, 500 MHz) δ 5.35 (OH), 5.22 (OH), 5.16 (OH), 4.77 (s, 1H, H1), 4.55 (brs, 1H, NH), 3.84-3.76 (m, 3H), 3.72-3.66 (m, 3H), 3.61-3.53 (m, 3H), 2.79 (s, 4H) ppm. ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) δ 172.6 (C=O), 101.6 (C1), 74.7 (C4), 72.5 (C3), 72.0 (C2), 68.6 (C7), 66.9 (C5), 62.9 (C6), 42.5 (C8), 26.4 (CH-DSC) ppm [σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία].¹⁵

2'-Καρβοξυλοαιθυλοθειο-2,3,4,6-τετρα-Ο-ακετυλο-α,β-D-μαννοπυρανόζη (5.35)

Σε διάλυμα πενταακετυλο-D-μαννοπυρανόζης **5.2** (1.0 g, 2.56 mmol) σε CH₂Cl₂ (30 mL) προστίθεται 3-μερκαπτοπροπανοϊκό οξύ (893 μL, 10.24 mmol) και BF₃·OEt₂ (485 mL, 3.84 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 10 ώρες σε r.t. υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Εν συνεχεία προστίθεται CH₂Cl₂ (60 mL) και HCl 0.1 M (20 mL) και ξεπλένεται με απιονισμένο νερό (3 x 40 mL). Οι δύο φάσεις διαχωρίζονται και η οργανική ξηραίνεται υπεράνω MgSO₄ και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης με εξάνιο/AcOEt (7:5) του ακάθαρτου μίγματος παρέχει το επιθυμητό προϊόν **5.35** με απόδοση 72%, R_f = 0.23 σε σύστημα ανάπτυξης CH₂Cl₂:MeOH/90:10. Αναλογία ανωμερών α:β = 78:12. ¹H NMR (CDCl₃, 298K, 500 MHz) δ 9.65 (brs, OH), 5.18 (m, 2H, H2, H4), 5.13-5.10 (m, 1H, H3), 5.06 (m, 1H, H1), 4.24 (1H, H6), 4.15-4.12 (m, 1H, H6), 3.97 (m, 1H, H5), 2.83-2.70 (m, 2H, H7'), 2.59 (m, 2H, H8), 2.02 (s, CH₃), 1.95 (s, CH₃), 1.91 (s, CH₃), 1.83 (s, CH₃) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 175.8 (O=C-OH), 170.7 (O=C-CH₃), 169.9 (O=C), 169.7 (O=C), 82.8 (C1), 70.7 (C5), 69.24 (C3), 68.9 (C4), 66.1 (C2), 62.3 (C6), 34.3 (CH₂O), 26.2, (SCH₂), 20.4 (CH₃) ppm.

MS (ESI) *m/z*: 459.3 ([*M*+Na]⁺), θεωρ. για C₁₇H₂₄O₁₁SNa: 459.1

2'-Καρβοξυλοαιθυλοθειο-α,β-D-μαννοπυρανόζη (5.36)

Σε διάλυμα 2'-καρβοξυλοαιθυλοθειο-2,3,4,6-τετρα-Ο-ακετυλο-α,β-D-μαννοπυρανόζης **5.35** (442 mg, 1.012 mmol) σε MeOH (8.3 mL) προστίθεται MeONa (450 mg, 8.33 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 3 ώρες σε r.t. Εν συνεχεία διηθείται, συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και ρυθμίζεται σε pH 4.5 με ρητίνη DOWEX 50 WX2 (H⁺). Λαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **5.36** με απόδοση 100%. Αναλογία ανωμερών α:β = 78:12. ¹H NMR (D₂O, 298K, 500 MHz) δ 5.35 (brs, 1H, H1-α), 4.88 (brs, 1H, H1-β), 4.07-4.01 (m, 2H, H4-α,β), 3.91-3.88 (m, 2H, H6-α,β), 3.82-3.78 (m, 2H, H6-α,β), 3.73-3.68 (m, 2H, H3-α,β), 2.96-2.85 (m, 4H, S-CH₂-α,β), 2.62 (brs, 4H, CH₂COOH-α,β) ppm. ¹³C NMR (D₂O, 125 MHz) δ 179.8 (O=C-α,β), 85.1, (C1-α), 84.7 (C1-β), 74.01 (C5-β), 73.3 (C5-α), 72.4 (C3-β), 71.9 (C3-α), 71.2 (C2-α,β), 67.3 (C4-α), 66.8 (C4-β), 61.3 (C6-β), 61.0 (C6-α), 37.4 (CH₂COOH-β), 36.8 (CH₂COOH-α), 27.4 (S-CH₂-β), 27.2 (S-CH₂-α) ppm.

MS (ESI) *m/z*: 313.3 ([*M*+Na]⁺), θεωρ. για C₉H₁₅O₇SNa: 313.06

9.3.2 Σύνθεση παραγώγων D-(+)-γαλακτόζης

Πενταακετυλο-D-γαλακτοπυρανόζη (5.15)

Σε διάλυμα D-(+)-γαλακτόζης **5.5** (3 g, 16.65 mmol) σε πυριδίνη (20.2 mL, 249.7 mmol) προστίθεται οξικός ανυδρίτης (15.7 mL, 166.5 mmol) και καταλυτική ποσότητα DMAP. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε για 1.5 ώρα, συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και προστίθεται κορεσμένο υδατικό διάλυμα CuSO₄ (3 x 50 mL) και AcOEt. Οι δύο φάσεις διαχωρίζονται και η οργανική εκπλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl. Η οργανική φάση ξηραίνεται υπεράνω MgSO₄ και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης με εξάνιο/AcOEt (5:5) του ακάθαρτου μίγματος παρέχει το επιθυμητό προϊόν **5.15** με απόδοση 62%. Αναλογία ανωμερών $\alpha:\beta = 98:2$. $R_f = 0.56$. ¹H NMR (CDCl₃, 298K, 500 MHz) δ 6.37 (brs, 1H- α), 5.49 (brs, 1H- α), 5.33 (brs, 2H- β), 4.34 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H- α), 4.13-4.06 (m, 2H- α), 2.15 (s, CH₃, α), 2.04 (s, CH₃, α), 2.01 (s, CH₃, α), 2.00 (s, CH₃, α) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 169.2 (O=Cx2), 169.0 (O=C), 168.9 (O=C), 168.1 (O=C), 88.8 (C1), 68.7 66.8, 66.6, 65.8, 60.5, 19.7, 19.5, 19.4 (CH₃) ppm.

2'-Βρωμοαιθυλο-2,3,4,6-τετρα-O-ακετυλο- α,β -D-γαλακτοπυρανόζη (5.16)

Σε διάλυμα πενταακετυλο-D-γαλακτοπυρανόζης **5.15** (2.0 g, 5.27 mmol) και 1-βρωμοαιθανόλης (374 μ L, 5.27 mmol) σε CH₂Cl₂ (20 mL) προστίθεται BF₃·OEt₂ (2.27 mL, 19.14 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 10 ώρες σε r.t, υπό ατμόσφαιρα αζώτου και απουσία φωτός. Εν συνεχεία προστίθεται CH₂Cl₂ (20 mL) και κορεσμένο NaHCO₃ (20 mL) και ξεπλένεται με απιονισμένο νερό (2 x 30 mL). Οι δύο φάσεις διαχωρίζονται και η οργανική ξηραίνεται υπεράνω MgSO₄ και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης με εξάνιο/AcOEt (5:5) του ακάθαρτου μίγματος παρέχει μίγμα ίδιας πολικότητας που αποτελείται από την πρώτη ύλη **5.15** και το προϊόν **5.16** σε μικρή αναλογία (πρώτη ύλη:προϊόν = 8:1). $R_f = 0.56$. ¹H NMR (CDCl₃, 298K, 500 MHz) δ 6.26 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 5.39 (brs 1H), 5.22 (d, $J = 2.7$ Hz, 2H), 4.97-4.88 (m, 1H), 4.25 (m, 1H), 4.05-3.96 (m, 3H), 3.86-3.70 (m, 1H), 3.39 (m, 1H), 2.05-1.87 (m, 18H) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 170.1 (O=C), 170.0 (O=C), 169.8 (O=C), 89.7 (C1), 68.8 (CH), 68.6 (CH),

67.5 (CH), 67.4 (CH), 67.1 (CH₂O), 66.5 (CH₂), 61.3 (CH), 30.0 (CH₂Br), 20.8 (CH₃), 20.6 (3xCH₃) ppm.

2'-Χλωροαιθυλο-α,β-D-γαλακτοπυρανόζη (5.17)

A' Τρόπος

Σε διάλυμα γαλακτόζης **5.5** (500 mg, 2.77 mmol) και 1-χλωροαιθανόλης (2.73 mL) προστίθεται ρητίνη DOWEX 50 WX2 (H⁺) (277 mg). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 4 ώρες στους 80 °C και για 10 ώρες σε r.t. Εν συνεχεία διηθείται και συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης CH₂Cl₂/MeOH (9:1) του ακάθαρτου μίγματος παρέχει το επιθυμητό προϊόν **5.17** με απόδοση 50% και αναλογία ανωμερών α:β = 3:1. R_f = 0.2.

B' Τρόπος

Σε διάλυμα γαλακτόζης **5.5** (500 mg, 2.77 mmol) και 1-χλωροαιθανόλης (7.5 mL) προστίθεται ακετυλοχλωρίδιο (200 μL). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 4 ώρες στους 70 °C και για 10 ώρες σε r.t. υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Εν συνεχεία συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης με διάλυμα έκλουσης CH₂Cl₂/MeOH (9:1) του ακάθαρτου μίγματος παρέχει το επιθυμητό προϊόν **5.17** με απόδοση 49% και αναλογία ανωμερών α:β = 3:1. R_f = 0.2. ¹H NMR (CD₃OD, 298K, 500 MHz) δ 4.60 (s, 1H), 4.30 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 4.10-4.08 (m, 1H), 3.98-3.91 (m, 2H), 3.89-3.69 (m, 5H), 3.57-3.53 (m, 1H), 3.48 (dd, J = 3.0 Hz, J = 9.8 Hz, 1H) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 103.9 (C1-β), 99.5 (C2-α), 75.5 (C3-β), 73.6 (C5-β), 71.4 (C3-α), 71.2 (C2-β), 70.2 (C5-α), 69.8 (C2-α), 69.7 (C7-β), 69.0 (C4-β), 68.9 (C7-α), 68.4 (C4-α), 61.4 (C6-α), 61.2 (C6-β), 42.6 (C8-α), 42.4 (C8-β) ppm [σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία].^{16,17}

2'-Αζιδοαιθυλο-α,β-D-γαλακτοπυρανόζη (5.18)

Σε διάλυμα 2'-χλωροαιθυλο-α,β-D-γαλακτοπυρανόζης **5.17** (320 mg, 1.318 mmol) σε DMF (6 mL), προστίθενται NaN₃ (857 mg, 13.18 mmol) και NaI (198 mg, 1.318 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 12 ώρες. Στη συνέχεια το διάλυμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης με CH₂Cl₂/MeOH (80:20) του ακάθαρτου μίγματος παρέχει το επιθυμητό προϊόν **5.18** με απόδοση 100%. Αναλογία ανωμερών α:β = 3:1. R_f = 0.23 σε σύστημα ανάπτυξης CH₂Cl₂:MeOH (9:1). ¹H NMR (D₂O, 298K, 500 MHz) δ 4.95 (s, 1H, H1-α), 4.53 (s, 1H), 4.39-4.37(m, 1H-H1-β), 4.11-4.06 (m 1H), 4.00-3.92 (m, 14H), 3.80-3.78 (m,

6H), 3.73-3.69 (m, 2H), 3.67-3.62 (m, 2H), 3.60-3.59 (m, 1H), 3.57-3.54 (m, 1H), 3.51-3.46 (m, 2H) ppm. ^{13}C NMR (D_2O , 125 MHz) δ 103.7 (C1- β), 99.3 (C1- α), 75.2 (C3- β), 73.5 (C5- β), 71.2 (C3- α), 69.9 (C2- β , C5- β), 69.2 (C7- β), 68.7 (C7- α), 68 (C4- β), 66.8 (C4- α), 61.5 (C6- α), 61.3 (C6- β), 50.9 (C8- β), 50.7 (C8- α) ppm. [σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία].¹⁶

2'-Αμινοαιθυλο- α,β -D-γαλακτοπυρανόζη (5.19)

Σε διάλυμα 2'-αζιδοαιθυλο- α,β -D-γαλακτοπυρανόζης **5.18** (155 mg, 0.621 mmol) σε MeOH (4.6 mL), προστίθεται Pd/C 10% (31 mg) υπό ατμόσφαιρα υδρογόνου. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 36 ώρες. Στη συνέχεια διηθείται από σελλίτη και το διάλυμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και λαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **5.19** με απόδοση 100%. Αναλογία ανωμερών $\alpha:\beta = 3:1$. ^1H NMR (D_2O , 298K, 500 MHz) δ 5.04 (s, 1H, H1- α), 4.52-4.50 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H, H1- β), 4.06-3.74 (m, 10H), 3.63-3.61 (d, $J = 5.1$ Hz, 2H), 2.99 (brs, 2H) ppm. ^{13}C NMR (D_2O , 125 MHz) δ 103.0 (C1- β), 98.6 (C1- α), 75.3 (C3- β), 72.9 (C5- β), 71.1 (C3- α), 70.8 (C2- β), 69.6 (C7- β), 69.5 (C5- α , C2- α), 68.9 (C4- β), 68.6 (C7- α , C4- α), 61.5 (C6- α), 61.2 (C6- β), 40.3 (C8- β), 40.2 (C8- α) ppm [σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία].¹⁶

2'-N-ηλεκτριμιδοξυκαρβονυλοαιθυλο- α,β -D-γαλακτοπυρανόζη (5.20)

Ανθρακικός εστέρας του *N,N'*-διηλεκτρολυοϊμιδίου (22.9 mg, 0.089 mmol) προστίθεται στάγδην σε διάλυμα 2'-αμινοαιθυλο- α,β -D-γαλακτοπυρανόζης **5.19** (20 mg, 0.089 mmol) και τριαιθυλαμίνης (12.47 μL , 0.089 mmol) σε DMF (4 mL). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 3 ώρες σε r.t υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Εν συνεχεία συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης με $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9:1) του ακάθαρτου μίγματος παρέχει το επιθυμητό προϊόν **5.20** με απόδοση 27%. Αναλογία ανωμερών $\alpha:\beta = 3:1$. $R_f = 0.22$. ^1H NMR (CD_3OD , 298K, 500 MHz) δ 4.60 (s, 1H, H1), 4.55 (brs, 1H, NH), 3.95-3.51 (m, 9H), 2.83 (s, 4H) ppm.

2'-Καρβοξυλοαιθυλοθειο-2,3,4,6-τετρα-O-ακετυλο- β -D-γαλακτοπυρανόζη (5.38)

Σε διάλυμα πενταακετυλο-D- β -γαλακτοπυρανόζης **5.37** (1.0 g, 2.56 mmol) σε CH_2Cl_2 (15 mL) προστίθεται 3-μερκαπτοπροπανοϊκό οξύ (446 μL , 5.123 mmol) και $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ (242 mL, 1.92 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 2 ώρες σε

r.t, υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Εν συνεχεία προστίθεται CH₂Cl₂ (30 mL) και HCl 0.1 M (40 mL) και ξεπλένεται με απιονισμένο νερό (2 x 20 mL). Οι δύο φάσεις διαχωρίζονται και η οργανική ξηραίνεται υπεράνω MgSO₄ και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης με CH₂Cl₂:MeOH (99:1) του ακάθαρτου μίγματος παρέχει το επιθυμητό προϊόν **5.38** με απόδοση 100%. R_f = 0.48 σε σύστημα ανάπτυξης CH₂Cl₂:MeOH (95:5). ¹H NMR (CDCl₃, 298K, 500 MHz) δ 10.33 (brs, OH), 5.31 (brs, 1H, H4), 5.09 (t, J = 9.6 Hz, 1H, H2), 4.97-4.95 (m, 1H, H3), 4.47 (d, J = 9.7 Hz, 1H, H1), 4.06-3.97 (m, 2H, H6), 3.88-3.85 (m, 1H, H5), 2.89-2.76 (m, 2H, S-CH₂), 2.64 (m, 2H, CH₂COOH), 2.05 (s, CH₃), 1.95 (s, CH₃x2), 1.87 (s, CH₃) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 176.67 (O=C-OH), 170.57 (O=C-CH₃), 170.29 (O=C-CH₃), 170.06 (O=C-CH₃), 169.6 (O=C-CH₃), 82.43 (C1), 74.34 (C5), 71.76 (C3), 67.34 (C4), 67.06 (C2), 61.58 (C6), 35.22 (CH₂COOH), 25.24, (S-CH₂), 20.66 (CH₃), 20.54 (CH₃x2), 20.47 (CH₃) ppm [σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία].^{18,19,20,21,22}

2'-Καρβοξυλοαιθυλοθειο-β-D-γαλακτοπυρανόζη (5.39)

Σε διάλυμα 2'-καρβοξυλοαιθυλοθειο-2,3,4,6-τετρα-Ο-ακετυλο-β-D-γαλακτοπυρανόζης **5.38** (339 mg, 0.776 mmol) σε MeOH (6.4 mL) προστίθεται MeONa (345 mg, 6.38 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 2 ώρες σε r.t. Εν συνεχεία διηθείται, συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και ρυθμίζεται σε pH 2.5 με HCl 1N. Λαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **5.39** με απόδοση 100%. ¹H NMR (D₂O, 298K, 500 MHz) δ 4.66 (d, J = 10.2 Hz, 1H, H1), 4.14 (d, J = 2.8 Hz, 1H, H4), 3.87 (brs, 3H, H5, H6), 3.84-3.82 (m, 1H, H3), 3.69 (t, J = 9.7 Hz, 1H, H2), 3.15-3.03 (m, 2H, S-CH₂), 2.83 (t, J = 6.94 Hz, 2H, CH₂COOH) ppm. ¹³C NMR (D₂O, 125 MHz) δ 178.68 (O=C-OH), 86.25 (C1), 79.19 (C5), 74.14 (C3), 69.9 (C2), 69.3 (C4), 61.56 (C6), 36.64 (CH₂COOH), 26.16 (S-CH₂) ppm [σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία].^{18,19,20,21,22}

9.3.3 Σύνθεση παραγώγων L-(-)-φουκόζης

Τετραακετυλο-L-φουκοπυρανόζη (5.21)

Σε διάλυμα L-(-)-φουκόζης **5.6** (3 g, 18.27 mmol) σε πυριδίνη (22.1 mL, 274.1 mmol) προστίθεται οξικός ανυδρίτης (17.2 mL, 182.7 mmol) και καταλυτική ποσότητα DMAP. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε για 3 ώρες,

συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και προστίθεται κορεσμένο υδατικό διάλυμα CuSO_4 (3 x 50 mL) και AcOEt . Οι δύο φάσεις διαχωρίζονται και η οργανική εκπλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl . Η οργανική φάση ξηραίνεται υπεράνω MgSO_4 και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης με εξάνιο/ AcOEt (5:5) του ακάθαρτου μίγματος παρέχει το μίγμα πλήρως και μερικώς ακετυλιωμένου προϊόντος ίδιας πολικότητας με απόδοση 100%. Αναλογία ανωμερών $\alpha:\beta = 5:1$. $R_f = 0.80$. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 298K, 500 MHz) δ 6.33 (brs, 1H- α), 6.18 (brs, 1H- β), 5.68 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H- β), 5.67 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H- β), 6.33 (s, 3H- α), 5.17-5.07 (m, 1H- β), 4.27 (d, $J = 5,1$ Hz 1H- α), 4.12 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H- β), 3.98-3.94 (m, 1H- β), 2.17 (s, CH_3 , α), 2.14 (s, CH_3 , α), 2.11 (s, CH_3 , β), 2.07 (s, CH_3 , β), 2.03 (s, CH_3 , β), 2.01 (s, CH_3 , β), 2.0 (s, 2 x CH_3 , α), 1.57 (m, 1H- α), 1.30 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H- β), 1.22 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H- α), 1.16 (m, 3H- α) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz) δ 169.6, 169.0, 168.5, 168.4, 168.3, 98.4, 92.3, 91.4, 89.1, 84.6, 81.5, 80.2, 75.8, 74.9, 73.0, 70.4, 69.9, 69.4, 68.9, 67.9, 67.3, 67.1, 66.5, 65.8, 19.9, 19.7, 19.1, 15.1 ppm.

2'-Βρωμοαιθυλο-2,3,4,-τρι-Ο-ακετυλο- α,β -L-φουκοπυρανόζη (5.22)

Σε διάλυμα τετραακετυλο-L-φουκοπυρανόζης **5.21** (2.0 g, 6.06 mmol) και 1-βρωμοαιθανόλης (430 μL , 6.06 mmol) σε CH_2Cl_2 (20 mL) προστίθεται $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (2.61 mL, 20.62 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 15 ώρες σε r.t, υπό ατμόσφαιρα αζώτου και απουσία φωτός. Εν συνεχεία προστίθεται CH_2Cl_2 (20 mL) και κορεσμένο NaHCO_3 (20 mL) και ξεπλένεται με απιονισμένο νερό (2 x 30 mL). Οι δύο φάσεις διαχωρίζονται και η οργανική ξηραίνεται υπεράνω MgSO_4 και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης με εξάνιο/ AcOEt (5:5) του ακάθαρτου μίγματος παρέχει μίγμα προϊόντων ίδιας πολικότητας που αποτελείται από την πρώτη ύλη **5.21** και το προϊόν **5.22** με αναλογία πρώτης ύλης:προϊόν = 1:2. $R_f = 0.80$. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 298K, 500 MHz) δ 5.28-5.24 (m), 5.18 (d, $J = 2.4$ Hz), 5.15 (brs), 5.12 (d, $J = 2.1$ Hz), 5.10 (m), 4.96 (d, $J = 3.2$ Hz), 4.94 (d, $J = 3.3$ Hz), 4.45 (m), 4.21 (m), 4.13-4.08 (m), 4.05-4.01 (m), 3.77-3.70 (m), 3.44-3.38 (m), 2.09 (s), 2.07 (s), 2.02 (s), 2.01 (s), 2.00 (s), 1.99 (s), 1.95 (s), 1.93 (s), 1.92 (s), 1.90 (s), 1.24-1.14 (m), 0.89-0.75 (m) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz) δ 170.6, 170.1, 169.6, 105.5, 101.3, 90.0, 83.3, 81.7, 71.2, 69.6, 69.3, 68.7, 68.1, 68.0, 67.9, 67.6, 67.3, 66.6, 38.8, 32.8, 30.2, 29.7, 29.5, 29.4, 29.0, 23.8, 22.7, 21.1, 21.0, 20.9, 20.7, 20.6, 16.2, 16.1, 16.0 ppm.

2'-Αζιδοαιθυλο-2,3,4,-τρι-Ο-ακετυλο-α,β-L-φουκοπυρανόζη (5.23)

Σε διάλυμα 2'-βρωμοαιθυλο-2,3,4,-τρι-Ο-ακετυλο-α,β-L-φουκοπυρανόζης **5.22** (1.72 g, 4.35 mmol) σε DMF (5 mL) προστίθεται NaN₃ (1.41 g, 21.75 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 15 ώρες στους 60 °C. Εν συνεχεία συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση προστίθεται AcOEt (20 mL) και ξεπλένεται με απιονισμένο νερό (2 x 20 mL) και κορεσμένο διάλυμα NaCl. Οι δύο φάσεις διαχωρίζονται και η οργανική ξηραίνεται υπεράνω MgSO₄ και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Παρέχεται μίγμα προϊόντων ίδιας πολικότητας. ¹H NMR (CDCl₃, 298K, 500 MHz) δ 5.1-4.8 (m), 4.30 (d, *J* = 7.6 Hz), 4.02-3.90 (m), 3.70 (d, *J* = 5.9 Hz), 3.50-3.11 (m), 1.98 (s), 1.97 (s), 1.91 (s), 1.88 (s), 1.86 (s), 1.83 (s), 1.80 (s), 1.77 (s), 1.12 (d, *J* = 6.1 Hz), 1.07 (d, *J* = 7.0 Hz), 1.03 (d, *J* = 6.1 Hz), 0.97 (d, *J* = 5.9 Hz) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 169.9, 169.8, 169.4, 169.2, 168.8, 104.9, 100.2, 95.8, 82.9, 80.9, 76.0, 70.7, 70.4, 69.8, 69.7, 68.6, 68.1, 67.5, 67.4, 67.3, 66.5, 64.9, 59.6, 50.0, 49.8, 20.1, 20.0, 19.9, 15.4, 15.3, 12.2 ppm.

2'-Χλωροαιθυλο-α,β-L-φουκοπυρανόζη (5.24)

Σε διάλυμα L-(-)-φουκόζης **5.6** (500 mg, 3.04 mmol) και 1-χλωροαιθανόλης (3 mL) προστίθεται ρητίνη DOWEX 50 WX2 (H⁺) (304 mg). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 5 ώρες στους 80 °C και για 10 ώρες σε r.t. Εν συνεχεία διηθείται και συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης με CH₂Cl₂/MeOH (9:1) του ακάθαρτου μίγματος παρέχει το επιθυμητό προϊόν **5.24** με απόδοση 54% και αναλογία ανωμερών α:β = 2:1. R_f = 0.35. ¹H NMR (D₂O, 298K, 500 MHz) δ 4.95 (s, H1, 1H-α), 4.44 (d, *J* = 7.7 Hz, H1, 1H-β), 4.19-4.18 (m, H5, 1H-α), 4.15-4.11 (m, H5, 1H-β), 3.96-3.76 (m, 10H, 7H-α, 3H-β), 3.66-3.64 (m, H7, 2H-β), 3.51 (t, *J* = 8.7 Hz, H8, 2H-β), 1.26 (d, *J* = 6.1 Hz, CH₃-β), 1.23 (d, *J* = 6.2 Hz, CH₃-α) ppm. ¹³C NMR (D₃O, 125 MHz) δ 102.8 (C1-β), 98.6 (C1-α), 72.8 (C4-β), 71.8 (C4-α), 71.3 (C3-β), 71.0 (C2-β), 70.4 (C7-β), 70.1 (C5-β), 69.5 (C3-α), 68.4 (C2-α), 67.9 (C7-β), 66.8 (C5-α), 43.3 (C8-α), 43.2 (C8-β), 15.2 (CH₃ α-β) ppm [σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία].^{16,17}

2'-Αζιδοαιθυλο-α,β-L-φουκοπυρανόζη (5.25)

Σε διάλυμα 2'-χλωροαιθυλο-α,β-L-φουκοπυρανόζης **5.24** (370 mg, 1.63 mmol) σε DMF (8 mL) προστίθεται NaN₃ (1 g, 16.32 mmol) και NaI (244 mg, 1.632 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 15 ώρες στους 80 °C υπό

ατμόσφαιρα αζώτου. Εν συνεχεία συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης με CH₂Cl₂/MeOH (9:1) του ακάθαρτου μίγματος παρέχει το επιθυμητό προϊόν **5.25** με απόδοση 78% και αναλογία ανωμερών α:β = 2:1. R_f = 0.41. ¹H NMR (D₂O, 298K, 500 MHz) δ 4.97 (s, H1, 1H-α), 4.47 (d, J = 7.7 Hz, H1, 1H-β), 4.16 (m, H5, 1H-α), 4.07-4.04 (m, H5, 1H-β), 3.94-3.92 (m, H7, 2H-β), 3.87-3.83 (m, H7, 2H-α), 3.80-3.64 (m, H7, 3H-β), 3.63-3.61 (m, H8, 2H-β), 3.54-3.52 (m, H8, 2H-α), 1.31 (m, CH₃-β), 1.29 (d, J = 3 Hz, CH₃-α) ppm. ¹³C NMR (D₃O, 125 MHz) δ 102.8 (C1-β), 98.5 (C1-α), 72.9 (C3-β), 71.8 (C3-α), 71.3 (C5-β), 70.9 (C2-β), 70.5 (C4-β), 69.5 (C5-α), 68.4 (C7-β), 67.9 (C2-α), 66.8 (C4-α, C7-α), 50.6 (C8-β), 50.5 (C8-α), 15.5 (CH₃ α-β) ppm [σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία].^{16,17}

2'-Αμινοαιθυλο-α,β-L-φουκοπυρανόζη (5.26)

Σε διάλυμα 2'-αζιδοαιθυλο-α,β-L-φουκοπυρανόζης **5.25** (103 mg, 0.441 mmol) σε MeOH (3.1 mL), προστίθεται Pd/C 10% (22.3 mg) υπό ατμόσφαιρα υδρογόνου. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 36 ώρες. Στη συνέχεια διηθείται από σελλίτη και το διάλυμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και λαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **5.26** με απόδοση 99% και αναλογία ανωμερών α:β = 2:1. ¹H NMR (D₂O, 298K, 500 MHz) δ 4.91-4.90 (d, J = 3.7 Hz, 1H, H1-α), 4.41-4.39 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H1-β), 4.11-4.07 (q, J = 6.5 Hz, 1H), 3.95-3.92 (m, 1H), 3.89 (dd, J = 3.3 Hz, J = 10.4 Hz, 2H), 3.81-3.70 (m, 5H), 3.65 (dd, J = 3.2 Hz, J = 9.9 Hz, 1H), 3.55-3.48 (m, 2H), 3.31-3.20 (m, 1H), 2.95-2.85 (m, 3H), 1.26-1.25 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 1.23-1.22 (d, J = 6.5 Hz, 3H) ppm. ¹³C NMR (D₂O, 125 MHz) δ 102.9 (C1-β), 98.6 (C1-α), 73.0 (C3-β), 72.0 (C3-α), 71.5 (C5-β), 71.0 (C5-α), 70.7 (C7-β), 69.7 (C7-α), 68.8 (C2-β), 68.2 (C2-α), 66.8 (C4-α, C4-β), 40.3 (C8-β), 40.2 (C8-α), 15.6 (CH₃-α- CH₃-β) ppm [σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία].¹⁶

9.3.4 Σύνθεση παραγώγων N-ακετυλο-D-(+)-γλυκοζαμίνης

2'-Χλωροαιθυλο-2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-α-D-γλυκοπυρανόζη (5.27)

Σε διάλυμα N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνης **5.7** (1 g, 4.52 mmol) και 2-χλωροαιθανόλης (15 mL), ακετυλοχλωρίδιο (387 μL) προστίθεται στάγδην στους 0 °C. Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται στους 70 °C για 4 ώρες και στους 25 °C για 8 ώρες. Στη συνέχεια το διάλυμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση.

Χρωματογραφία στήλης με CH₂Cl₂/MeOH (90:10) του ακάθαρτου μίγματος παρέχει το επιθυμητό προϊόν **5.27** με απόδοση 70%. R_f = 0.18 σε σύστημα ανάπτυξης CH₂Cl₂:MeOH (90:10). ¹H NMR (D₂O, 298K, 500 MHz) δ 5.00 (d, *J* = 3.1 Hz, H1), 4.05-3.92 (m, 3H), 3.87-3.82 (m 6H), 3.56-3.52 (t, *J* = 9.3 Hz, 1H), 2.10 (s, 3H, CH₃) ppm. ¹³C NMR (D₂O, 125 MHz) δ 177.1 (O=C), 100.0 (C1), 74.9 (C5), 73.8 (C3), 71.9 (C4), 71.1 (CH₂O), 63.5 (C6), 55.5 (C2), 46.5 (CH₂Cl), 24.9 (CH₃) ppm [σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία].^{23,24}

2'-Αζιδοαιθυλο-2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-α-D-γλυκοπυρανόζη (5.28)

Σε διάλυμα 2'-χλωροαιθυλο-2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-α-D-γλυκοπυρανόζης **5.27** (300 mg, 1.059 mmol) σε DMF (5 mL), προστίθενται NaN₃ (688 mg, 10.59 mmol) και NaI (158 mg, 1.059 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 12 ώρες. Στη συνέχεια το διάλυμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης με CH₂Cl₂/MeOH (80:20) του ακάθαρτου μίγματος παρέχει το επιθυμητό προϊόν **5.28** με απόδοση 100%. R_f = 0.29 σε σύστημα ανάπτυξης CH₂Cl₂:MeOH (90:10). ¹H NMR (D₂O, 298K, 500 MHz) δ 4.96 (s, 1H, H1), 3.94-3.88 (m, 3H), 3.82-3.75 (m, 3H), 3.69 (brs, 1H), 3.52 (brs, 1H), 2.06 (s, 3H, CH₃) ppm. ¹³C NMR (D₂O, 125 MHz) δ 174.0 (O=C), 96.8 (C1), 71.8 (C5), 70.7 (C3), 69.7 (C4), 66.5 (CH₂O), 60.4 (C6), 53.4 (C2), 50.2 (CH₂N₃), 22.4 (CH₃) ppm [σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία].^{23,24}

2'-Αμινοαιθυλο-2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-α-D-γλυκοπυρανόζη (5.29)

Σε διάλυμα 2'-αζιδοαιθυλο-2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-α-D-γλυκοπυρανόζης **5.28** (150 mg, 0.517 mmol) σε MeOH (4.5 mL), προστίθεται Pd/C 10% (15 mg) υπό ατμόσφαιρα υδρογόνου. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 15 ώρες. Στη συνέχεια διηθείται από σελλίτη και το διάλυμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και λαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **5.29** με απόδοση 100%. ¹H NMR (D₂O, 298K, 500 MHz) δ 4.90 (s, 1H, H1), 3.97-3.95 (m, 1H, H2), 3.91-3.88 (m, 1H, H6), 3.82-3.74 (m, 4H, H3, H4, CH₂O), 3.53-3.49 (m, 2H, H4, CH₂O), 2.90-2.88 (m, 2H, CH₂NH₂), 1.07 (s, 3H) ppm. ¹³C NMR (D₂O, 125 MHz) δ 174.0 (O=C), 96.7 (C1), 71.5 (C5), 70.6 (C3), 69.6 (C4), 68.5 (CH₂O), 60.2 (C6), 53.2 (C2), 39.6 (CH₂NH₂), 21.5 (CH₃) ppm.

MS (ESI) *m/z*: 265.3 ([*M*+H]⁺), θεωρ. για C₁₀H₂₀N₂O₆H: 265.13

2'-N-ηλεκτριμιδοξυκαρβονυλοαιθυλο-2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-α-D-γλυκοπυρανόζη

(5.30)

Διάλυμα 2'-αμινοαιθυλο-α-D-γλυκοπυρανόζης **5.29** (41.26 mg, 0.156 mmol) και τριαιθυλαμίνης (10.87 μ L, 0.078 mmol) σε DMF (4 mL) προστίθεται στάγδην στους 0 $^{\circ}$ C σε διάλυμα ανθρακικού εστέρα του *N,N*'διηλεκτρολυϊμιδίου (20 mg, 0.078 mmol) σε DMF (4 mL). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 3 ημέρες σε r.t υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Εν συνεχεία συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και εκπλένεται διαδοχικά με CHCl_3 . Ακολουθεί χρωματογραφία στήλης με CH_2Cl_2 :MeOH (9:1) και το επιθυμητό προϊόν **5.30** παραλαμβάνεται σε απόδοση 44%. $R_f = 0.26$ σε CH_2Cl_2 :MeOH (9:1). $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 298K, 500 MHz) δ 4.79 (s, 1H, H1), 4.57 (brs, 1H, NH), 3.95-3.89 (m, 1H), 3.85-3.81 (m, 2H), 3.71-3.60 (m, 4H), 3.52-3.33 (m, 3H), 2.68 (brs, 2H), 2.0 (s, 3H, CH_3) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz) δ 172.8 ($\text{O}=\underline{\text{C}}-\text{CH}_3$), 157.5 ($\text{C}=\text{O}$), 99.2 (C1), 74.1 (C5), 73.1 (C3), 72.5 (C4), 67.7 (C7), 62.8 (C6), 55.41 (C2), 42.7 (C8), 26.4 (CH-DSC) ppm. MS (ESI) m/z : 459.4 ($[\text{M}+\text{HCl}+\text{H}_2\text{O}]^+$), θεωρ. για $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_{10}$: 405.14

9.3.5 Σύνθεση παραγώγων N-ακετυλο-D-(+)-γαλακτοζαμίνης

2'-Χλωροαιθυλο-2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-α-D-γαλακτοπυρανόζη (5.31)

Σε διάλυμα *N*-ακετυλο-D-γαλακτοζαμίνης **5.8** (74 mg, 0.334 mmol) και 2-χλωροαιθανόλης (3 mL), ακετυλοχλωρίδιο (30 μ L), προστίθεται στάγδην στους 0 $^{\circ}$ C. Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται στους 70 $^{\circ}$ C για 4 ώρες και στους 25 $^{\circ}$ C για 8 ώρες. Στη συνέχεια το διάλυμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης με CH_2Cl_2 /MeOH (90:10) του ακάθαρτου μίγματος παρέχει το επιθυμητό προϊόν **5.31** με απόδοση 70%. $R_f = 0.31$ σε σύστημα ανάπτυξης CH_2Cl_2 :MeOH (90:10). $^1\text{H NMR}$ (D_2O , 298K, 500 MHz) δ 4.99 (d, $J = 3.5$ Hz, H1), 4.18 (dd, $J = 3.4$ Hz, $J = 10.9$ Hz 1H), 4.06 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 4.01-3.95 (m, 3H), 3.82-3.77 (m, 5H), 2.06 (s, 3H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (D_2O , 125 MHz) δ 177.4 ($\text{O}=\text{C}$), 100.0 (C1), 73.9 (C5), 71.3 (C4), 71.0 (C3), 70.4 (C7), 64.0 (C6), 52.7 (C2), 46.4 (C8), 24.8 (CH_3) ppm.

2'-Αζιδοαιθυλο-2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-α-D-γαλακτοπυρανόζη (5.32)

Σε διάλυμα 2'-γλωροαιθυλο-2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-α-D-γαλακτοπυρανόζης **5.31** (80 mg, 0.282 mmol) σε DMF (2 mL), προστίθενται NaN₃ (183 mg, 2.82 mmol) και NaI (42 mg, 0.282 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 12 ώρες. Στη συνέχεια το διάλυμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης με CH₂Cl₂/MeOH (80:20) του ακάθαρτου μίγματος παρέχει το επιθυμητό προϊόν **5.32** με απόδοση 100%. R_f = 0.51 σε σύστημα ανάπτυξης CH₂Cl₂:MeOH (95:5). ¹H NMR (D₂O, 298K, 500 MHz) δ 5.02-5.01 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H, H1), 4.24 (dd, *J* = 3.4 Hz, *J* = 10.9 Hz, 1H), 4.06-3.93 (m, 4H), 3.82-3.81 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H), 3.75-3.71 (m, 1H), 3.62-3.54 (m, 2H), 2.11 (s, 3H) ppm. ¹³C NMR (D₂O, 125 MHz) δ 174.3 (O=C), 96.7 (C1), 70.7 (C5), 68.2 (C4), 67.2 (C3), 66.3 (C7), 60.9 (C6), 50.0 (C8), 49.5 (C2), 21,8 (CH₃) ppm [σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία].²⁵

2'-Αμινοαιθυλο 2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-α-D-γαλακτοπυρανόζη (5.33)

Σε διάλυμα 2'-αζιδοαιθυλο-2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-α-D-γαλακτοπυρανόζης **5.32** (114 mg, 0.393 mmol) σε MeOH (3.4 mL), προστίθεται Pd/C 10% (27.4 mg) υπό ατμόσφαιρα υδρογόνου. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 45 ώρες. Στη συνέχεια διηθείται από σελλίτη, το διάλυμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και λαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **5.33** με απόδοση 100%. ¹H NMR (D₂O, 298K, 500 MHz) δ 4.96 (s, 1H, H1), 4.24-4.22 (m, 1H), 4.04-4.02 (m, 3H), 3.85-3.80 (m, 3H), 3.60-3.57 (m, 1H), 3.00 (brs, 2H), 2.09 (s, 3H) ppm. ¹³C NMR (D₂O, 125 MHz) δ 174.2 (O=C), 96.9 (C1), 70.7 (C5), 68.2 (C4), 67.5 (C3), 67.3 (C7), 60.9 (C6), 49.5 (C2), 39.5 (C8), 21.8 (CH₃) ppm. MS (ESI) *m/z*: 287.3 ([*M*+Na]⁺), θεωρ. για C₁₀H₂₀N₂O₆Na: 287.13

9.3.6 Σύνθεση παραγώγων D-(+)-γλυκόζης

2'-Καρβοξυλοαιθυλοθειο-2,3,4,6-τετρα-Ο-ακετυλο-α, β-D-γλυκοπυρανόζη (5.41)

Σε διάλυμα πενταακετυλο-α-D-γλυκόζης **5.40** (1 g, 2.56 mmol) σε CH₂Cl₂ (30 mL) προστίθεται 3-μερκαπτοπροπανοϊκό οξύ (893 μL, 10.24 mmol) και BF₃·OEt₂ (485 mL, 3.84 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 1 ημέρα σε r.t, υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Εν συνεχεία στο αιώρημα προστίθεται CH₂Cl₂ (30 mL) και HCl 0.1 M (40 mL) και το όλον ξεπλένεται με απιονισμένο νερό (2 x 20 mL). Οι δύο

φάσεις διαχωρίζονται και η οργανική ξηραίνεται υπεράνω MgSO_4 και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης με $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (99:1, v/v) του ακάθαρτου μίγματος παρέχει το επιθυμητό προϊόν **5.41** σε απόδοση 55% και αναλογία ανωμερών $\alpha:\beta = 1:1$. $R_f = 0.64$ σε σύστημα ανάπτυξης $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$, 90:10. ^1H NMR (CDCl_3 , 298K, 500 MHz) δ 8.98 (brs, OH), 5.53 (brs, 1H, H1- α), 5.14-5.04 (m, 2H), 4.91-4.84 (m, 3H), 4.45-4.43 (d, $J = 10.3$ Hz, 1H, H1- β), 4.26 (brs, 1H), 4.12-3.93 (m, 3H), 3.62 (brs, 1H) 2.96-2.53 (m, 10H), 1.91-1.82 (brs, 24H, $\text{CH}_3 \times 8$) ppm. ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 175.9 (O=C-OH), 175.7 (O=C-OH), 170.7 (O=C- CH_3), 170.6 (O=C- CH_3), 170.1 (O=C- CH_3), 169.8 (O=C- CH_3), 169.7 (O=C- CH_3), 169.6 (O=C- CH_3), 169.4 (O=C- CH_3), 169.3 (O=C- CH_3), 83.4 (C1- α), 82.3 (C1- β), 75.4 (C5- β), 73.5 (C5- α), 70.3 (C3- α), 70.1 (C3- β), 69.5 (C4- α), 68.3 (C4- β), 67.6 (C2- β), 62.0 (C6- α), 61.8 (C6- β), 35.0 (CH_2COOH - α), 34.3 (CH_2COOH - β), 25.1 (S- CH_2 - β), 24.8 (S- CH_2 - α), 23.7, 20.4-20.3 (CH_3) ppm. MS (ESI) m/z : 459.3 ($[M+\text{Na}]^+$), θεωρ. για $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_{11}\text{SNa}$: 459.1

2'-Καρβοξυλοαιθυλοθειο- α,β -D-γλυκοπυρανόζη (5.42)

Σε διάλυμα 2'-καρβοξυλοαιθυλοθειο-2,3,4,6-τετρα-*O*-ακετυλο- α,β -D-γλυκοπυρανόζης **5.41** (532 mg, 1.218 mmol) σε MeOH (10 mL) προστίθεται MeONa (542 mg, 10.03 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 3 ώρες σε r.t. Εν συνεχεία διηθείται, συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και ρυθμίζεται σε pH 2.5 με HCl 1M. Λαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **5.42** με απόδοση 100%. Αναλογία ανωμερών $\alpha:\beta = 1:1$. ^1H NMR (D_2O , 298K, 500 MHz) 5.64-5.63 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H, H1- α), 4.14 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H1- β), 4.04-3.94 (m, 4H), 3.88-3.85 (m, 1H), 3.74-3.59 (m, 6H), 3.52-3.48 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H), 3.11-2.97 (m, 4H, S- CH_2), 2.89-2.83 (m, 4H, CH_2COOH) ppm. ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 178.4 (O=C-OH), 86.1 (C1- β), 85.7 (C1- α), 80.04 (C5- α), 77.4 (C5- β), 73.9 (C3- β), 72.9 (C3- α), 72.5 (C4- α), 71.3 (C4- β), 69.9 (C2- α), 69.8 (C2- β), 61.3 (C6- α), 60.9 (C6- β), 36.6 (CH_2COOH - α), 36.2 (CH_2COOH - β), 26.1 (S- CH_2 - β), 26.0 (S- CH_2 - α) ppm. MS (ESI) m/z : 313.3 ($[M+\text{Na}]^+$), θεωρ. για $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{O}_7\text{SNa}$: 313.06

9.4 ΟΜΟΙΟΠΟΛΙΚΗ ΣΥΝΔΕΣΗ ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΩΝ ΜΕ ΣΑΚΧΑΡΑ ΜΕΣΩ ΑΜΙΔΙΚΩΝ ΔΕΣΜΩΝ – ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΙΚΩΝ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΩΝ (GLYCOCLUSTERS)

9.4.1 Σύνδεση αμινο σακχάρων με καρβόξυ κυκλοδεξτρίνες

Οκτακισ[6-δεοξυ-6-S-[6-(α-D-μαννοπυρανοζο-1'-υλο)-4-αζα-3-οξοεξανο-1-υλο]-6-θειο]-γ-κυκλοδεξτρίνη (6.34)

Η οκτακισ[6-(καρβοξυαιθυλοθειο)-6-δεοξυ]-γ-κυκλοδεξτρίνη (gpcsp) **4.19** (50 mg, 0.0229 mmol) διαλύεται σε DMF (16 mL). Ακολουθεί σταδιακή προσθήκη του HATU (266 mg, 0.701 mmol) στους 0 °C και ανάδευση σε r.t για 1 ώρα. Εν συνεχεία προστίθεται DIPEA (85 μL, 0.499 mmol) και η 2'-αμινοαιθυλο-α-D-μαννοπυρανόζη **5.12** (69 mg, 0.312 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 3 ημέρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση, ρυθμίζεται σε pH 7 με HCl 1N, διαλύεται σε δις απεσταγμένο νερό (2 mL) και τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης, προς απομάκρυνση των προσμίξεων μικρού μοριακού βάρους, επί 2 ημέρες. Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και κατόπιν λυοφιλοποίηση προς παραλαβή του επιθυμητού προϊόντος **6.34** με απόδοση 74%. ¹H NMR (D₂O, 298K, 500 MHz) δ 5.15 (brs, 1H, gpcsp-H1), 4.88 (s, 1H, man-H1), 3.96 (s, 1H, man-H2), 3.91-3.86 (m, 3H, gpcsp-H3, man-H4, man-H6), 3.80 (brs, 3H, man-H3, man-H7, man-H6'), 3.70 (s, 1H, gpcsp-H5), 3.68 (s, 1H, man-H5), 3.66 (s, 1H, gpcsp-H2), 3.63 (brs, 2H, man-H7', gpcsp-H4), 3.49-3.43 (m, 2H, man-H8), 3.28-3.26 (m, 1H, gpcsp-H6), 2.96 (s, 3H, gpcsp-H6', gpcsp-H8), 2.62 (s, gpcsp-H7) ppm. ¹³C NMR (D₂O, 125 MHz) δ 173.6 (C=O), 101.4 (gpcsp-C1), 99.4 (man-C1), 83.7 (gpcsp-C4), 72.4 (man-C4, gpcsp-C2), 71.8 (gpcsp-C3, gpcsp-C5), 70.3 (man-C3), 69.8 (man-C2), 66.3 (man-C5), 65.6 (man-C7), 60.5 (man-C6), 38.7 (man-C8), 35.6 (gpcsp-C7), 32.8 (gpcsp-C6), 28.3 (gpcsp-C8) ppm.

MS (MALDI-TOF) *m/z*: 3664.24 ([*M*+Na]⁺), θεωρ. για C₁₃₆H₂₃₂O₈₈S₈N₈Na: 3664.17.

Οκτακισ[6-δεοξυ-6-S-[6-(2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-α-D-γλυκοπυρανοζο-1'-υλο)-4-αζα-3-οξοεξανο-1-υλο]-6-θειο]-γ-κυκλοδεξτρίνη (6.38)

Η οκτακισ[6-(καρβοξυαιθυλοθειο)-6-δεοξυ]-γ-κυκλοδεξτρίνη (gpsp) **4.19** (100 mg, 0.0459 mmol) διαλύεται σε DMF (22 mL). Ακολουθεί σταδιακή προσθήκη του HATU (535 mg, 1.4074 mmol) στους 0 °C και ανάδευση σε r.t για 1 ώρα. Εν συνεχεία προστίθεται DIPEA (168 μL, 0.991 mmol) και η 2'-αμινοαιθυλο-2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-α-D-γλυκοπυρανόζη **5.29** (165 mg, 0.624 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 2 ημέρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση, ρυθμίζεται σε pH 7 με HCl 1N, διαλύεται σε δις απεσταγμένο νερό (2 mL) και τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης, προς απομάκρυνση των προσμίξεων μικρού μοριακού βάρους, επί 3 ημέρες. Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και κατόπιν λυοφιλοποίηση προς παραλαβή του επιθυμητού προϊόντος **6.38** με απόδοση 83%. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 298K, 500 MHz) δ 7.84 (s, 1H, -NH-, άμιδο), 7.63 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, -NH-Ac), 4.99 (s, OH), 4.90 (brs, 1H, gpsp-H1), 4.78 (s, OH), 4.66 (s, 1H, GlcNAc-H1), 4.54 (s, OH), 3.68 (s, 1H, GlcNAc-H2), 3.64-3.63 (brs, 2H, GlcNAc-H6, GlcNAc-H7), 3.49-3.45 (brs, 2H, GlcNAc-H6', GlcNAc-H7'), 3.39 (επικαλύπτεται με την κορυφή του H₂O, 1H, GlcNAc-H8), 3.33 (επικαλύπτεται με την κορυφή του H₂O, 1H, GlcNAc-H3), 3.15 (brs, GlcNAc-H7', GlcNAc-H8'), 2.98 (m, 1H, gpsp-H6), 2.77 (brs, 3H, gpsp-H6', gpsp-H8), 2.36 (brs, 2H, gpsp-H7), 1.86 (s, 3H, GlcNAc, CH₃) ppm. ¹³C NMR (D₂O, 125 MHz) δ 173.8 (O=C-Ac), 173.6 (O=C-NH-), 101.4 (gpsp-C1), 96.8 (GlcNAc-C1), 83.4 (gpsp-C4), 72.3 (GlcNAc-C4), 71.7 (gpsp-C3, gpsp-C2), 70.8 (GlcNAc-C3), 69.4 (GlcNAc-C7), 66.2 (gpsp-C5), 60.2 (GlcNAc-C6), 53.1 (GlcNAc-C2), 38.7 (GlcNAc-C8), 35.6 (gpsp-C7), 32.7 (gpsp-C6), 28.4 (gpsp-C8), 21.7 (GlcNAc-CH₃) ppm. MS (MALDI-TOF) *m/z*: 3992.94 ([*M*+Na]⁺), θεωρ. για C₁₅₂H₂₅₆O₈₈S₈N₁₆Na: 3992.38.

Επτακισ[6-δεοξυ-6-S-[6-(α-D-μαννοπυρανοζο-1'-υλο)-4-αζα-3-οξοεξανο-1-υλο]-6-θειο]-β-κυκλοδεξτρίνη (6.33)

Η επτακισ[6-(καρβοξυαιθυλοθειο)-6-δεοξυ]-β-κυκλοδεξτρίνη (bpsp) **4.8** (85 mg, 0.0445 mmol) διαλύεται σε DMF (13 mL). Ακολουθεί σταδιακή προσθήκη του HATU (454 mg, 1.195 mmol) στους 0 °C και ανάδευση σε r.t για 1 ώρα. Εν συνεχεία προστίθεται DIPEA (143 μL, 0.541 mmol) και η 2'-αμινοαιθυλο-α-D-μαννοπυρανόζη

5.12 (118 mg, 0.529 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 2 ημέρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση, ρυθμίζεται σε pH 7 με HCl 1N, διαλύεται σε δις απεσταγμένο νερό (2 mL) και τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης, προς απομάκρυνση των προσμίξεων μικρού μοριακού βάρους, επί 2 ημέρες. Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και κατόπιν λυοφιλοποίηση προς παραλαβή του επιθυμητού προϊόντος **6.33** με απόδοση 81%. ¹H NMR (D₂O, 298K, 500 MHz) δ 5.13 (brs, 1H, bpsp-H1), 4.88 (s, 1H, man-H1), 3.96 (s, 2H, man-H2, bpsp-H3), 3.89 (brs, 1H, man-H4), 3.87 (brs, 1H, man-H6), 3.80 (brs, 3H, man-H3, man-H7, man-H6'), 3.49-3.42 (m, 4H, man-H5), 3.25-3.20 (m, 1H, bpsp-H6), 2.95 (brs, 3H, bpsp-H8, bpsp-H6'), 2.60 (s, 2H, bpsp-H7) ppm. ¹³C NMR (D₂O, 125 MHz) δ 173.6 (C=O), 101.4 (bpsp-C1), 99.4 (man-C1), 83.9 (bpsp-C4), 72.5 (man-C4, bpsp-C2), 71.5 (bpsp-C3, bpsp-C5), 70.2 (man-C3), 69.7 (man-C2), 66.3 (man-C5), 65.5 (man-C7), 60.5 (man-C6), 38.6 (man-C8), 35.6 (bpsp-C7), 32.8 (bpsp-C6), 28.4 (bpsp-C8) ppm. MS (MALDI-TOF) *m/z*: 3209.15 ([*M*+Na]⁺), θεωρ. για C₁₁₉H₂₀₃O₇₇S₇N₇Na: 3209.02.

Επτακίς[6-δεοξυ-6-S-[6-(2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-α-D-γλυκοκυρανοζο-1'-υλο)-4-αζα-3-οξοεξανο-1-υλο]-6-θειο]-β-κυκλοδεξτρίνη (6.37)

Η επτακίς[6-(καρβοξυαιθυλοθειο)-6-δεοξυ]-β-κυκλοδεξτρίνη (bpsp) **4.8** (100 mg, 0.0524 mmol) διαλύεται σε DMF (23 mL). Ακολουθεί σταδιακή προσθήκη του HATU (535 mg, 1.4074 mmol) στους 0 °C και ανάδευση σε r.t για 1 ώρα. Εν συνεχεία προστίθεται DIPEA (168 μL, 0.991 mmol) και η 2'-αμινοαιθυλο-2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-α-D-γλυκοκυρανόζη **5.29** (165 mg, 0.624 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 2 ημέρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση, ρυθμίζεται σε pH 7 με HCl 1N, διαλύεται σε δις απεσταγμένο νερό (2 mL) και τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης, προς απομάκρυνση των προσμίξεων μικρού μοριακού βάρους, επί 3 ημέρες. Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και κατόπιν λυοφιλοποίηση προς παραλαβή του επιθυμητού προϊόντος **6.37** με απόδοση 83% ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 298K, 500 MHz) δ 7.83 (s, 1H, -NH-, άμιδο), 7.62 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, -NH-Ac), 4.99 (s, OH), 4.86 (brs, 1H, bpsp-H1), 4.77 (s, OH), 4.60 (s, 1H, GlcNAc-H1), 4.53 (s, OH), 3.77 (brs, 2H, GlcNAc-H2, GlcNAc-H3), 3.68 (brs, 2H, GlcNAc-H4, GlcNAc-H6), 3.62 (brs, 1H, GlcNAc-H7), 3.56 (brs, 3H, GlcNAc-H6', bpsp-H3, bpsp-H2), 3.47 (brs, 1H, GlcNAc-H7'), 3.39 (brs, 1H, GlcNAc-H8), 3.34

(επικαλύπτεται με την κορυφή του H₂O, 1H, GlcNAc-H5), 3.47 (brs, 1H, GlcNAc-H8'), 3.02-2.95 (m, 1H, bpsp-H6), 2.83-2.76 (m, 3H, bpsp-H6', bpsp-H8), 2.36 (brs, 2H, bpsp-H7), 1.86 (s, 3H, GlcNAc, CH₃) ppm. ¹³C NMR (D₂O, 125 MHz) δ 173.8 (O=C-Ac, O=C-NH-), 101.4 (bpsp-C1), 96.8 (GlcNAc-C1), 83.9 (bpsp-C4), 72.7 (bpsp-C2), 72.2 (GlcNAc-C2), 71.7 (bpsp-C3, GlcNAc-C3, GlcNAc-C7), 71.3 (bpsp-C5), 70.8 (GlcNAc-C6), 69.5 (GlcNAc-C4), 66.1 (GlcNAc-C8), 60.2 (bpsp-C7), 53.2 (bpsp-C6), 38.7 (GlcNAc-C8), 35.6 (bpsp-C7), 32.8 (bpsp-C6), 28.5 (bpsp-C8), 21.7 (GlcNAc-CH₃) ppm.

MS (MALDI-TOF) *m/z*: 3496.50 ([*M*+Na]⁺), θεωρ. για C₁₃₃H₂₂₄O₇₇S₇N₁₄Na: 3496.21.

Επτακισ[6-δεοξυ-6-S-]6-(2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-α-D-γαλακτοπυρανοζο-1'-υλο)-4-αζα-3-οξοεξανο-1-υλο]-6-θειο]-β-κυκλοδεξτρίνη (6.39)

Η επτακισ[6-(καρβοξυαιθυλοθειο)-6-δεοξυ]-β-κυκλοδεξτρίνη (bpsp) **4.8** (100 mg, 0.0524 mmol) διαλύεται σε DMF (22 mL). Ακολουθεί σταδιακή προσθήκη του HATU (534 mg, 1.406 mmol) στους 0 °C και ανάδευση σε r.t για 1 ώρα. Εν συνεχεία προστίθεται DIPEA (168 μL, 0.990 mmol) και η 2'-αμινοαιθυλο-2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-α-D-γαλακτοπυρανόζη **5.33** (164 mg, 0.623 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 2 ημέρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση, ρυθμίζεται σε pH 7 με HCl 1N, διαλύεται σε δις απεσταγμένο νερό (2 mL) και τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης, προς απομάκρυνση των προσμίξεων μικρού μοριακού βάρους, επί 3 ημέρες. Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και κατόπιν λυοφιλοποίηση προς παραλαβή του επιθυμητού προϊόντος **6.39** με απόδοση 89%. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 298K, 500 MHz) δ 7.85 (s, 1H, -NH-, άμιδο), 7.52 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, -NH-Ac), 4.86 (s, OH), 4.61 (brs, 1H, bpsp-H1), 4.56 (s, OH), 4.45 (s, 1H, GalNAc-H1), 4.07 (m, 2H, GalNAc-H2, GalNAc-H3), 3.73 (brs, 2H, GalNAc-H4, GalNAc-H6), 3.64-3.60 (m, 2H, GalNAc-H3, GalNAc-H7), 3.54-3.46 (m, 4H, GlcNAc-H6', bpsp-H3, bpsp-H2, GlcNAc-H7'), 3.37 (επικαλύπτεται με την κορυφή του H₂O, 2H, GalNAc-H5, GalNAc-H8), 3.15 (brs, 1H, GalNAc-H8'), 3.03-2.95 (m, 1H, bpsp-H6), 2.82-2.75 (m, 3H, bpsp-H6', bpsp-H8), 2.37 (brs, 2H, bpsp-H7), 1.86 (s, 3H, GlcNAc, CH₃) ppm. ¹³C NMR (D₂O, 125 MHz) δ 173.9 (O=C-Ac), 173.7 (O=C-NH-), 101.5 (bpsp-C1), 96.9 (GalNAc-C1), 84.1 (bpsp-C4), 72.8 (bpsp-C2), 72.6 (GalNAc-C2), 71.6 (bpsp-C3, GalNAc-C3), 70.7 (bpsp-C5, GalNAc-C7), 38.2 (GalNAc-C6), 67.6 (GalNAc-C4), 66.2 (GalNAc-C8), 60.9 (bpsp-C7), 49.5 (bpsp-

C6), 38.7 (GalNAc-C8), 35.6 (bpsp-C7), 32.9 (bpsp-C6), 28.6 (bpsp-C8), 21.6 (GalNAc-CH₃) ppm.

MS (MALDI-TOF) m/z : 3496.37 ($[M+Na]^+$), θεωρ. για C₁₃₃H₂₂₄O₇₇S₇N₁₄Na: 3496.21.

Επτακισ[6-δεοξυ-6-S-[6-(α,β-D-γαλακτοπυρανοζο-1'-υλο)-4-αζα-3-οξοεξανο-1-υλο]-6-θειο]-β-κυκλοδεξτρίνη (6.35)

Η επτακισ[6-(καρβοξυαιθυλοθειο)-6-δεοξυ]-β-κυκλοδεξτρίνη (bpsp) **4.8** (100 mg, 0.524 mmol) διαλύεται σε DMF (22 mL). Ακολουθεί σταδιακή προσθήκη του HATU (534 mg, 1.405 mmol) στους 0 °C και ανάδευση σε r.t για 1 ώρα. Εν συνεχεία προστίθεται DIPEA (168 μL, 0.99 mmol) και η 2'-αμινοαιθυλο-α,β-D-γαλακτοπυρανόζη **5.19** (139 mg, 0.623 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 2 ημέρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση, ρυθμίζεται σε pH 7 με HCl 1N, διαλύεται σε δις απεσταγμένο νερό (2 mL) και τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης, προς απομάκρυνση των προσμίξεων μικρού μοριακού βάρους, επί 2 ημέρες. Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και κατόπιν λυοφιλοποίηση προς παραλαβή του επιθυμητού προϊόντος **6.35** με απόδοση 78% και αναλογία ανωμερών α:β = 3:1. ¹H NMR (D₂O, 298K, 500 MHz) δ 5.13 (brs, 1H, bpsp-H1), 4.98 (s, 1H, gal-α-H1), 4.43 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H, gal-β-H1), 4.25 (brs, 1H, gal-β-H2), 4.00 (s, 2H, gal-α-H2, bpsp-H3), 3.94 (brs, 2H, gal-H4, gal-H6), 3.85 (brs, 3H, gal-H3, gal-H7, gal-H6'), 3.76 (brs, 2H, bpsp-H5, gal-H5), 3.70 (brs, 1H, bpsp-H2), 3.61 (brs, 2H, bpsp-H4, gal-H7'), 3.41 (brs, 2H, gal-H8), 3.24 (brs, 1H, bpsp-H6), 3.11 (brs, 1H, bpsp-H6'), 2.96 (brs, 2H, bpsp-H8), 2.62 (s, 2H, bpsp-H7) ppm. ¹³C NMR (D₂O, 125 MHz) δ 173.7 (C=O), 102.7 (gal-β-C1), 101.5 (bpsp-C1), 98.1 (gal-α-C1), 83.9 (bpsp-C4), 72.5 (gal-C4, bpsp-C2), 71.6 (bpsp-C5), 70.7 (bpsp-C3), 69.2 (gal-C3), 68.9 (gal-C2), 68.0 (gal-C5), 66.2 (gal-C7), 60.8 (gal-α-C6), 60.6 (gal-β-C6), 38.8 (gal-C8), 35.6 (bpsp-C7), 32.8 (bpsp-C6), 28.5 (bpsp-C8) ppm.

MS (MALDI-TOF) m/z : 3209.97 ($[M+Na]^+$), θεωρ. για C₁₁₉H₂₀₃O₇₇S₇N₇Na: 3209.02.

Επτακισ[6-δεοξυ-6-S-[6-(α,β-L-φουκοπυρανοζο-1'-υλο)-4-αζα-3-οξοεξανο-1-υλο]-6-θειο]-β-κυκλοδεξτρίνη (6.36)

Η επτακισ[6-(καρβοξυαιθυλοθειο)-6-δεοξυ]-β-κυκλοδεξτρίνη (bpsp) **4.8** (100 mg, 0.0524 mmol) διαλύεται σε DMF (22 mL). Ακολουθεί σταδιακή προσθήκη του HATU (534 mg, 1.405 mmol) στους 0 °C και ανάδευση σε r.t για 1 ώρα. Εν συνεχεία

προστίθεται DIPEA (168 μ L, 0.99 mmol) και η 2'-αμινοαιθυλο- α,β -L-φουκοπυρανόζη **5.26** (129 mg, 0.623 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 2 ημέρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση, ρυθμίζεται σε pH 7 με HCl 1N, διαλύεται σε δις απεσταγμένο νερό (2 mL) και τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης, προς απομάκρυνση των προσμίξεων μικρού μοριακού βάρους, επί 2 ημέρες. Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και κατόπιν λυοφιλοποίηση προς παραλαβή του επιθυμητού προϊόντος **6.36** με απόδοση 78% και αναλογία ανωμερών $\alpha:\beta = 2:1$. ^1H NMR (D_2O , 298K, 500 MHz) δ 5.13 (brs, 1H, bpsp-H1), 4.91 (s, 1H, fuc- α -H1), 4.39 (ap.d, 1H, gal- β -H1), 4.05 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, fuc-H2), 3.88 (brs, 3H, bpsp-H3, fuc-H4, fuc-H6), 3.81 (s, 3H, fuc-H6', fuc-H7, fuc-H3), 3.70 (brs, 2H, bpsp-H5, fuc-H5), 3.58 (brs, 3H, fuc-H7', bpsp-H2, bpsp-H4), 3.43 (brs, 2H, fuc-H8), 3.30-3.32 (m, 1H, bpsp-H6), 3.96 (brs, 3H, bpsp-H6', bpsp-H8), 2.61 (s, 2H, bpsp-H7), 1.24 (s, 3H, fuc- CH_3) ppm. ^{13}C NMR (D_2O , 125 MHz) δ 173.5 (C=O), 102.7 (fuc- β -C1), 101.5 (bpsp-C1), 98.2 (fuc- α -C1), 72.6 (bpsp-C3, bpsp-C5), 71.5 (bpsp-C2, fuc-C4, fuc-C3), 69.3 (fuc-C3), 67.7 (fuc-C5), 66.3 (fuc-C7), 38.8 (fuc-C8), 35.6 (bpsp-C7), 32.7 (bpsp-C6), 28.4 (bpsp-C8) 15.2 (fuc- CH_3) ppm. MS (MALDI-TOF) m/z : 3097.58 ($[M+\text{Na}]^+$), θεωρ. για $\text{C}_{119}\text{H}_{203}\text{O}_{70}\text{S}_7\text{N}_7\text{Na}$: 3097.06.

Μονο[6-δεοξυ-6-S-[6-(2-ακεταμιδο-2-δεοξυ- α -D-γλυκοπυρανόζο-1'-υλο)-4- α -3-οξοεξανο-1-υλο]-6-θειο]- β -κυκλοδεξτρίνη (6.42)

Η μονο[6-(καρβοξυαιθυλοθειο)-6-δεοξυ]- β -κυκλοδεξτρίνη (bmsp) **4.11** (104 mg, 0.0835 mmol) διαλύεται σε DMF (22 mL). Ακολουθεί σταδιακή προσθήκη του HATU (121 mg, 0.3199 mmol) στους 0 $^\circ\text{C}$ και ανάδευση σε r.t για 1 ώρα. Εν συνεχεία προστίθεται DIPEA (38 μ L, 0.225 mmol) και διάλυμα της 2'-αμινοαιθυλο-2-ακεταμιδο-2-δεοξυ- α -D-γλυκοπυρανόζη **5.29** (37.5 mg, 0.1419 mmol) σε DMF (0.3 mL). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 1 ημέρα. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση, ρυθμίζεται σε pH 7 με HCl 1N, διαλύεται σε δις απεσταγμένο νερό (2 mL) και τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης, προς απομάκρυνση των προσμίξεων μικρού μοριακού βάρους, επί 3 ημέρες. Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και κατόπιν λυοφιλοποίηση προς παραλαβή του επιθυμητού προϊόντος **6.42** με απόδοση 76%. ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 298K, 500 MHz) δ 5.78-5.70 (m, OH), 4.82 (brs, 1H, bmsp-H1), 4.59 (s, 1H, GlcNAc-H1), 4.54 (s, OH), 4.45 (s,

OH), 3.65-3.60 (m, 4H, GlcNAc-H2, GlcNAc-H8, bmsp-H6-unsubstituted), 3.56 (brs, 1H, GlcNAc-H7), 3.46 (m, 2H, GlcNAc-H6), 3.33 (επικαλύπτεται με την κορυφή του H₂O, 4H, GlcNAc-H7, bmsp-H4, bmsp-H2, bmsp-H3), 3.15-3.11 (m, 1H, GlcNAc-H8'), 3.01 (m, 2H, bmsp-H6-substituted), 2.75 (m, 2H, bmsp-H8), 2.35 (m, 2H, bmsp-H7), 1.85 (s, 3H, GlcNAc, CH₃) ppm. ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ 170.7 (O=C-Ac), 169.5 (O=C-NH-), 101.9 (bmsp-C1), 97.4 (GlcNAc-C1), 81.5 (bmsp-C4), 73.0 (bmsp-C2), 66.4 (GlcNAc-C7), 60.8 (GlcNAc-C6), 58.9 (bmsp-C6-unsubstituted), 35.9 (GlcNAc-C8), 35.6 (bmsp-C7), 33.3 (bmsp-C6-substituted), 28.5 (bmsp-C8), 22.7 (GlcNAc-CH₃) ppm.

MS (MALDI-TOF) *m/z*: 1491.7 ([*M*+Na]⁺), θεωρ. για C₅₅H₉₂N₂O₄₁SNa: 1491.49.

Μονο[6-δεοξυ-6-S-[6-(α-D-μαννοπυρανοζο-1'-υλο)-4-αζα-3-οξοεξανο-1-υλο]-6-θειο]-β-κυκλοδεξτρίνη (6.40)

Η μονο[6-(καρβοξυαιθυλοθειο)-6-δεοξυ]-β-κυκλοδεξτρίνη (bmsp) **4.11** (52 mg, 0.0417 mmol) διαλύεται σε DMF (5 mL). Ακολουθεί σταδιακή προσθήκη του HATU (61 mg, 0.159 mmol) στους 0 °C και ανάδευση σε r.t για 1 ώρα. Εν συνεχεία προστίθεται DIPEA (19 μL, 0.1127 mmol) και διάλυμα της 2'-αμινοαιθυλο-α-D-μαννοπυρανόζης **5.12** (16 mg, 0.071 mmol) σε DMF (4 mL). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 1 ημέρα. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση, ρυθμίζεται σε pH 7 με HCl 1N, διαλύεται σε δις απεσταγμένο νερό (2 mL) και τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης, προς απομάκρυνση των προσμίξεων μικρού μοριακού βάρους, επί 3 ημέρες. Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και κατόπιν λυοφιλοποίηση προς παραλαβή του επιθυμητού προϊόντος **6.40** με απόδοση 52%. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 298K, 500 MHz) δ 5.75 (m, OH), 4.82 (brs, 1H, bmsp-H1), 4.59 (s, 1H, Man-H1), 4.45 (s, OH), 3.37 (ap.d, 1H, man-H2), 3.66 (m, 4H, bmsp-H3, bmsp-H6-unsubstituted, man-H7), 3.53 (m, 1H, man-H7'), 3.36 (επικαλύπτεται με την κορυφή του H₂O, 6H, man-H6, bmsp-H4, bmsp-H2, man-H8), 3.13 (m, 2H, bmsp-H6-substituted), 3.02 (m, 2H, bmsp-H8), 2.34 (m, 2H, bmsp-H7) ppm. ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ 170.7 (O=C-Ac), 169.5 (O=C-NH-), 101.7 (bmsp-C1), 99.5 (man-C1), 81.0 (bmsp-C4), 72.4 (bmsp-C3), 71.8 (bmsp-C2), 69.8 (man-C2), 65.2 (man-C7), 60.8 (man-C6), 60.2 (bmsp-C6-unsubstituted), 38.3 (bmsp-C6-substituted), 35.2 (bmsp-C7), 32.9 (bmsp-C8) ppm.

MS (ESI) *m/z*: 1450.9 ([*M*+Na]⁺), θεωρ. για C₅₃H₈₉NO₄₁SNa: 1450.46.

Μono[6-δεοξυ-6-S-[6-(α,β-D-γαλακτοπυρανοζο-1'-υλο)-4-αζα-3-οξοεξανο-1-υλο]-6-θειο]-β-κυκλοδεξτρίνη (6.41)

Η μονο[6-(καρβοξυαιθυλοθειο)-6-δεοξυ]-β-κυκλοδεξτρίνη (bmsp) **4.11** (56 mg, 0.04449 mmol) διαλύεται σε DMF (5 mL). Ακολουθεί σταδιακή προσθήκη του HATU (66 mg, 0.172 mmol) στους 0 °C και ανάδευση σε r.t για 1 ώρα. Εν συνεχεία προστίθεται DIPEA (20 µL, 0.121 mmol) και διάλυμα της 2'-αμινοαιθυλο-α,β-D-γαλακτοπυρανόζης **5.19** (17 mg, 0.076 mmol) σε DMF (4 mL). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 1 ημέρα. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση, ρυθμίζεται σε pH 7 με HCl 1N, διαλύεται σε δις απεσταγμένο νερό (2 mL) και τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης, προς απομάκρυνση των προσμίξεων μικρού μοριακού βάρους, επί 3 ημέρες. Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και κατόπιν λυοφιλοποίηση προς παραλαβή του επιθυμητού προϊόντος **6.41** με απόδοση 81% και αναλογία ανωμερών α:β = 2:1. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 298K, 500 MHz) δ 7.89 (-NH-άμιδο), 5.73 (m, OH), 4.78 (brs, 1H, bmsp-H1), 4.64 (s, 1H, gal-H1), 4.42 (s, OH), 3.66-3.51 (m, 6H, bmsp-H6-unsubstituted, bmsp-H3, gal-H7, gal-H6), 3.66-3.24 (επικαλύπτεται με την κορυφή του H₂O, 6H, bmsp-H4, bmsp-H2, bmsp-H6-substituted, gal-H7', gal-H8), 3.11 (m, 1H, gal-H8'), 2.87 (m, 2H, bmsp-H8), 2.31 (m, 2H, bmsp-H7) ppm. ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ 171.5 (O=C-NH-), 101.0 (bmsp-C1), 98.0 (gal-C1), 80.9 (bmsp-C4), 71.4 (bmsp-C3, bmsp-C2), 66.3 (gal-C7), 59.4 (gal-C6), 59.1 (bmsp-C6-unsubstituted), 39.7 (bmsp-C7), 36.7 (gal-C8), 33.3 (bmsp-C8), 32.9 (bmsp-C6-substituted) ppm.

MS (ESI) *m/z*: 1450.9 ([*M*+Na]⁺), θεωρ. για C₅₃H₈₉NO₄₁SNa: 1450.46.

Εξακισ[6-δεοξυ-6-N,N-δι[5-(α,β-D-γαλακτοπυρανοζο-1'-υλο)-2-οξο-3-αζα-πεντανο-1-υλο-6-αζα]-α-κυκλοδεξτρίνη (6.51)

Η εξακισ[6-δι(καρβοξυμεθυλαμινο)](2,3-δι-*O*-μεθυλο)-6-δεοξυ-α-κυκλοδεξτρίνη (aedta) **4.27** (20 mg, 0.0109 mmol) διαλύεται σε DMF (4 mL). Ακολουθεί σταδιακή προσθήκη του HATU (222 mg, 0.585 mmol) στους 0 °C και ανάδευση σε r.t για 1 ώρα. Εν συνεχεία προστίθεται DIPEA (70 µL, 0.412 mmol) και διάλυμα της 2'-αμινοαιθυλο-α,β-D-γαλακτοπυρανόζης **5.19** (58 mg, 0.259 mmol) σε DMF (4 mL) κατά τη διάρκεια 2 ημερών. Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 5 ημέρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση, ρυθμίζεται σε pH 7 με HCl 1N, διαλύεται σε δις

απεσταγμένο νερό (2 mL) και τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης, προς απομάκρυνση των προσμίξεων μικρού μοριακού βάρους, επί 3 ημέρες. Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και κατόπιν λυοφιλοποίηση προς παραλαβή του επιθυμητού προϊόντος **6.51** με απόδοση 57% και αναλογία ανωμερών $\alpha:\beta = 3:1$. ^1H NMR (D_2O , 298K, 500 MHz) δ 4.98 (brs, 1H, gal- α -H1), 4.42 (s, 1H, gal- β -H1), 4.12 (brs, 1H, gal-H4), 3.98 (brs, 1H, gal-H3), 3.84 (brs, 4H, gal-H5, gal-H6, gal-H7- CH_2O), 3.75 (brs, 4H, gal-H7', aedta- CH_3), 3.53 (brs, 5H, aedta- CH_3 , gal-H8- CH_2NH -) ppm. ^{13}C NMR (D_2O , 125 MHz) δ 174.3 (O= $\underline{\text{C}}$ -NH), 103.0 (gal- β -C1), 98.0 (gal- α -C1), 98.0 (aedta-C2, aedta-C3, aedta-C4), 69.3 (gal-C3), 69.6 (gal-C5), 67.9 (gal-C4), 66.3 (gal-C7- CH_2O), 61.5 (gal-C6), 59.8 (aedta- OCH_3), 58.1 (aedta- OCH_3), 39.2 (gal-C8- CH_2NH -) ppm. Βαθμός υποκατάστασης βάσει ολοκληρώσεων NMR: 12/12.

Επτακίς[6-δεοξυ-6-N,N-δι[5-(2-ακεταμιδο-2-δεοξυ- α -D-γλυκοπυρανοζο-1'-υλο)-2-οξο-3- α -πεντανο-1-υλο-6- α ζα]- β -κυκλοδεξτρίνη (6.52)

H επτακίς[6-δι(καρβοξυμεθυλαμινο)](2,3-δι-*O*-μεθυλο)-6-δεοξυ- β -κυκλοδεξτρίνη (bedta) **4.29** (30 mg, 0.014 mmol) διαλύεται σε DMF (6 mL). Ακολουθεί σταδιακή προσθήκη του HATU (286 mg, 0.752 mmol) στους 0 °C και ανάδευση σε r.t για 1 ώρα. Εν συνεχεία προστίθεται DIPEA (90 μL , 0.530 mmol) και διάλυμα της 2'-αμινοαιθυλο-2-ακεταμιδο-2-δεοξυ- α -D-γλυκοπυρανόζης **5.29** (88 mg, 0.334 mmol) σε DMF (4 mL) κατά τη διάρκεια 2 ημερών. Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 5 ημέρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση, ρυθμίζεται σε pH 7 με HCl 1N, διαλύεται σε δις απεσταγμένο νερό (2 mL) και τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης, προς απομάκρυνση των προσμίξεων μικρού μοριακού βάρους, επί 3 ημέρες. Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και κατόπιν λυοφιλοποίηση προς παραλαβή του επιθυμητού προϊόντος **6.52** με απόδοση 46%. ^1H NMR (D_2O , 298K, 500 MHz) δ 5.63 (brs, 1H, bedta-H1), 4.86 (brs, 1H, GlcNAc-H1), 3.93 (brs, 1H, GlcNAc-H1), 3.84 (brs, 1H, GlcNAc-H4), 3.79 (brs, 3H, GlcNAc-H3, GlcNAc-H7- CH_2O), 3.71 (brs, 1H, GlcNAc-H3), 3.61-3.45 (brs, 7H, GlcNAc-H5, aedta- OCH_3 , GlcNAc-H7'- CH_2O , GlcNAc-H8- CH_2NH -), 2.07 (s, 3H, GlcNAc, CH_3) ppm. ^{13}C NMR (D_2O , 125 MHz) δ 174.3 (O= $\underline{\text{C}}$ -NH-, O= $\underline{\text{C}}$ -Ac), 97.5 (GlcNAc-C1), 95.3 (bedta-C1), 75.5-73.6 (bedta-C2, bedta-C3, bedta-C4), 72.3 (GlcNAc-C5), 71.3 (GlcNAc-C3), 70.2 (GlcNAc-C4), 66.5 (GlcNAc-C7- CH_2O), 60.8 (GlcNAc-C6), 59.4

(bedta-OCH₃), 53.8 (GlcNAc-C2), 39.2 (GlcNAc-C8-CH₂NH-), 22.2 (GlcNAc, CH₃) ppm. Βαθμός υποκατάστασης βάσει ολοκληρώσεων NMR: 14/14.

MS (MALDI-TOF) *m/z*: 2575.3 ([*M*+Na+K]²⁺), θεωρ. για C₂₂₄H₃₈₅N₃₅O₁₂₆: 5581.48.

Επτακίς{6-δεοξυ-6-*N,N*-δι[5-(*α*-*D*-μαννοπυρανοζο-1'-υλο)-2-οξο-3-αζα-πεντανο-1-υλο-6-αζα]-β-κυκλοδεξτρίνη (6.49)

Η επτακίς[6-δι(καρβοξυμεθυλαμινο)](2,3-δι-*O*-μεθυλο)-6-δεοξυ-γ-κυκλοδεξτρίνη (bedta) **4.29** (55 mg, 0.0254 mmol) διαλύεται σε DMF (12 mL). Ακολουθεί σταδιακή προσθήκη του HATU (519 mg, 1.36 mmol) στους 0 °C και ανάδευση σε r.t για 1 ώρα. Εν συνεχεία προστίθεται DIPEA (164 μL, 0.96 mmol) και διάλυμα της 2'-αμινοαιθυλο-*α*-*D*-μαννοπυρανόζης **5.12** (134 mg, 0.606 mmol) σε DMF (7 mL) κατά τη διάρκεια 3 ημερών. Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 5 ημέρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση, ρυθμίζεται σε pH 7 με HCl 1N, διαλύεται σε δις απεσταγμένο νερό (2 mL) και τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης, προς απομάκρυνση των προσμίξεων μικρού μοριακού βάρους, επί 3 ημέρες. Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και κατόπιν λυοφιλοποίηση προς παραλαβή του επιθυμητού προϊόντος **6.49** με απόδοση 48%. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 298K, 500 MHz) δ 8.67-7.65 (-NH-), 5.06 (brs, 1H, bedta-H1), 4.69 (brs, OH), 4.63 (brs, 1H, man-H1), 4.49 (brs, OH), 4.43 (brs, OH2-man), 3.63 (brs, 3H, man-H2, man-H6, man-H7-CH₂O), 3.46 (brs, 5H, man-H6', man-H3, bedta-OCH₃), 3.39 (brs, 5H, man-H5, man-H7'-CH₂O, bedta-OCH₃), 3.31 (επικαλύπτεται με την κορυφή του H₂O, 3H, man-H4, man-H8'-CH₂NH-) ppm. ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ 174.9-171.8 (O=C-NH-), 99.6 (man-C1), 97.6 (bedta-C1), 81.0 (bedta-C2, bedta-C3, bedta-C4), 69.7 (man-C2), 66.5 (man-C5), 64.9 (man-C7-CH₂O), 60.8 (man-C6), 59.2 (bedta-OCH₃), 57.3 (bedta-OCH₃), 37.9 (man-C8-CH₂NH-) ppm.

MS (MALDI-TOF) *m/z*: 2540.0 ([*M*+2H]²⁺+2H₂O), θεωρ. για C₁₉₆H₃₄₃N₂₁O₁₂₆: 5007.11.

Οκτακίς{6-δεοξυ-6-*N,N*-δι[5-(2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-*α*-*D*-γλυκοπυρανοζο-1'-υλο)-2-οξο-3-αζα-πεντανο-1-υλο-6-αζα]-γ-κυκλοδεξτρίνη (6.53)

Η οκτακίς[6-δι(καρβοξυμεθυλαμινο)](2,3-δι-*O*-μεθυλο)-6-δεοξυ-β-κυκλοδεξτρίνη (gedta) **4.31** (30 mg, 0.012 mmol) διαλύεται σε DMF (6 mL). Ακολουθεί σταδιακή προσθήκη του HATU (250 mg, 0.658 mmol) στους 0 °C και

ανάδευση σε r.t για 1 ώρα. Εν συνεχεία προστίθεται DIPEA (80 μ L, 0.464 mmol) και διάλυμα της 2'-αμινοαιθυλο-2-ακεταμιδο-2-δεοξυ- α -D-γλυκοπυρανόζης **5.29** (77 mg, 0.292 mmol) σε DMF (4 mL) κατά τη διάρκεια 2 ημερών. Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 5 ημέρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση, ρυθμίζεται σε pH 7 με HCl 1N, διαλύεται σε δις απεσταγμένο νερό (2 mL) και τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης, προς απομάκρυνση των προσμίξεων μικρού μοριακού βάρους, επί 3 ημέρες. Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και κατόπιν λυοφιλοποίηση προς παραλαβή του επιθυμητού προϊόντος **6.53** με απόδοση 52%. ^1H NMR (D_2O , 298K, 500 MHz) δ 4.87 (brs, 1H, GlcNAc-H1), 4.45 (gedta, 1H, H5), 3.94 (brs, 1H, GlcNAc-H2), 3.86-3.78 (m, 4H, GlcNAc-H4, GlcNAc-H7- CH_2O , GlcNAc-H6), 3.91-3.65 (brs, 11H, GlcNAc-H3, GlcNAc-H5, GlcNAc-H7'- CH_2O , GlcNAc-H8- CH_2NH -, gedta-OCH₃), 2.06 (s, 3H, GlcNAc-CH₃) ppm. ^{13}C NMR (D_2O , 125 MHz) δ 174.4 (O=C-NH-, O=C=Ac), 97.6 (GlcNAc-C1), 80.8 (gedta-C2, gedta-C3, gedta-C4), 72.3 (GlcNAc-C5), 71.4 (GlcNAc-C3), 70.1 (GlcNAc-C4), 66.6 (GlcNAc-C7- CH_2O), 63.1 (gedta-C5), 60.7 (GlcNAc-C6), 59.7 (gedta-OCH₃), 58.4 (gedta-OCH₃), 53.7 (GlcNAc-C2), 39.0 (GlcNAc-C8- CH_2NH -), 22.2 (GlcNAc, CH₃) ppm. Βαθμός υποκατάστασης βάσει ολοκληρώσεων NMR: 16/16. MS (MALDI-TOF) m/z : 2844.4 ($[M+2\text{Na}]^{2+}$), θεωρ. για $\text{C}_{256}\text{H}_{440}\text{N}_{40}\text{O}_{144}$: 6378.83.

Οκτακίς[6-δεοξυ-6-N,N-δι[5-(α -D-μαννοπυρανόζο-1'-υλο)-2-οξο-3-αζα-πεντανο-1-υλο-6-αζα]-γ-κυκλοδεξτρίνη (6.50)

Η οκτακίς[6-δι(καρβοξυμεθυλαμινο)](2,3-δι-*O*-μεθυλο)-6-δεοξυ-γ-κυκλοδεξτρίνη (gedta) **4.31** (30 mg, 0.012 mmol) διαλύεται σε DMF (6 mL). Ακολουθεί σταδιακή προσθήκη του HATU (250 mg, 0.658 mmol) στους 0 $^{\circ}\text{C}$ και ανάδευση σε r.t για 1 ώρα. Εν συνεχεία προστίθεται DIPEA (80 μ L, 0.464 mmol) και διάλυμα της 2'-αμινοαιθυλο- α -D-μαννοπυρανόζης **5.12** (65 mg, 0.292 mmol) σε DMF (4 mL) κατά τη διάρκεια 2 ημερών. Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 5 ημέρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση, ρυθμίζεται σε pH 7 με HCl 1N, διαλύεται σε δις απεσταγμένο νερό (2 mL) και τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης, προς απομάκρυνση των προσμίξεων μικρού μοριακού βάρους, επί 3 ημέρες. Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και κατόπιν λυοφιλοποίηση προς παραλαβή του επιθυμητού προϊόντος **6.50** με απόδοση 70%. ^1H NMR (D_2O , 298K,

500 MHz) δ 5.17 (brs, 1H, gedta-H1), 4.89 (brs, 1H, man-H1), 3.95 (brs, 1H, man-H2), 3.89 (brs, 1H, man-H6), 3.81 (brs, 3H, man-H3, man-H7-CH₂O, man-H6'), 3.68-3.61 (m, 7H, man-H4, man-H5, man-H7'-CH₂O, man-H8-CH₂NH-, gedta-OCH₃), 3.41 (brs, 7H, man-H8'-CH₂NH-) ppm. ¹³C NMR (D₂O, 125 MHz) δ 174.3-173.3 (O=C-NH-, O=C-Ac), 99.8 (man-C1), 97.6 (gedta-C1), 80.6 (gedta-C2, gedta-C3, gedta-C4), 73.5 (man-C5), 70.8 (man-C3), 70.3 (man-C2), 66.9 (man-C4), 65.8 (man-C7-CH₂O), 61.8 (man-C6), 59.7 (gedta-OCH₃), 39.2 (man-C8-CH₂NH-) ppm. MS (MALDI-TOF) m/z : 2871.4 ([*M*+*K*+*H*-H₂O]²⁺), θεωρ. για C₂₂₄H₃₉₂N₂₄O₁₄₄: 5722.41.

9.4.2 Σύνδεση καρβόξυ σακχάρων με αμίνιο κυκλοδεξτρίνες

Επτακισ[6-δεοξυ-6-αζα-β-1-(α-D-μαννοπυρανοζο-1'-υλο)-3-αζα-4-οξο-5-αζα-επτανο-1-υλο]-6-αμινο-β-κυκλοδεξτρίνη (6.43)

Διάλυμα 2'-*N*-(ηλεκτρολυοϊμιδο)αμινοαιθυλο-α-D-μαννοπυρανόζης **5.14** (36 mg, 0.095 mmol) σε DMF (2 mL) προστίθεται στάγδην σε διάλυμα επτακισ[6-(αμινοαιθυλαμινο)-6-δεοξυ]-β-κυκλοδεξτρίνης (bpen) **4.9** (17.6 mg, 0.0123 mmol) και τριαιθυλαμίνης (150 μ L, 1.076 mmol) σε DMF (0.6 mL). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 7 ημέρες στους 30 °C υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Εν συνεχεία συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση. Ακολουθεί ρύθμιση σε pH = 7 με HCl 1N, διάλυση σε δις απεσταγμένο νερό (3 mL) και τοποθέτηση σε μεμβράνη διαπίδυσης, προς απομάκρυνση των προσμίξεων μικρού μοριακού βάρους, επί 3 ημέρες. Εν συνεχεία συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και κατόπιν λυοφιλοποιείται προς παραλαβή του επιθυμητού προϊόντος **6.43** με απόδοση 48%. ¹H NMR (D₂O, 298K, 500 MHz) δ 5.12 (brs, 1H, bpen-H1), 4.88 (brs, 1H, man-H1), 3.96 (brs, 3H, bpen-H3, bpen-H5, man-H2), 3.88 (m, 2H, man-H4, man-H6), 3.78 (brs, 3H, man-H6', man-H7, man-H3), 3.65 (brs, 3H, man-H7', bpen-H2, bpen-H4), 3.36 (brs, 1H, bpen-H6), 3.10 (brs, 2H, bpen-H8), 3.01-2.88 (m, 3H, bpen-H6', bpen-H7) ppm. ¹³C NMR (D₂O, 125 MHz) δ 160.1 (O=C), 101.5 (bpen-C1), 99.4 (man-C1), 82.3 (bpen-C4), 72.4 (man-C4), 71.7 (bpen-C3), 70.2 (man-C3, bpen-C2), 69.7 (man-C2, bpen-C5), 66.4 (man-C7, man-C5), 60.5 (man-C6), 48.1 (bpen-C6), 46.1 (bpen-C7), 39.8 (man-C8), 38.3 (bpen-C8) ppm. MS (MALDI-TOF) m/z : 1617.73 ([*M*+*Na*+*K*]²⁺), θεωρ. για C₁₁₉H₂₁₇O₇₇N₂: 3172.37.

Επτακιν[6-δεοξυ-6-αζα-17-(2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-α-D-γλυκοκυρανοζο-1'-υλο)-3-αζα-4-οξο-5-αζα-επτανο-1-υλο]-6-αμινο]-β-κυκλοδεξτρίνη (6.45)

Η επτακιν[6-(αμινοαιθυλαμινο)-6-δεοξυ]-β-κυκλοδεξτρίνη **4.9** (bpen) (6.4 mg, 0.00448 mmol) προστίθεται σε τρεις ισόποσες δόσεις κατά τη διάρκεια 2 ημερών σε διάλυμα των 2'-N-(ηλεκτρολοϊμιδο)αμινοαιθυλο-2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-α-D-γλυκοκυρανόζης **5.30** (14 mg, 0.0123 mmol) και τριαιθυλαμίνης (97.5 μ L, 0.699 mmol) σε DMF (1.5 mL). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 3 ημέρες στους 30 $^{\circ}$ C υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Εν συνεχεία συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση. Ακολουθεί ρύθμιση σε pH = 7 με HCl 1N, διάλυση σε δις απεσταγμένο νερό (3 mL) και τοποθέτηση σε μεμβράνη διαπίδυσης, προς απομάκρυνση των προσμίξεων μικρού μοριακού βάρους, επί 3 ημέρες. Εν συνεχεία συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και κατόπιν λυοφιλοποιείται προς παραλαβή του επιθυμητού προϊόντος **6.45** με απόδοση 19%. ^1H NMR (D_2O , 298K, 500 MHz) δ 5.12 (brs, 1H, bpen-H1), 4.87 (brs, 1H, GlcNac-H1), 3.96 (brs, 2H, bpen-H3, GlcNac-H4), 3.85 (brs, 1H, GlcNac-H6), 3.80 (brs, 1H, GlcNac-H2), 3.77 (brs, 1H, GlcNac-H6'), 3.73 (brs, 1H, GlcNac-H7), 3.67 (brs, 2H, bpen-H2, GlcNac-H3), 3.52 (brs, 1H, bpen-H4), 3.38 (brs, 1H, GlcNac-H7'), 3.27 (brs, 1H, bpen-H8), 3.06-2.82 (m, 5H, bpen-H6, bpen-H7, bpen-H8') ppm. ^{13}C NMR (D_2O , 125 MHz) δ 160.1 (O=C), 100.7 (bpen-C1), 96.2 (GlcNac-C1), 82.0 (bpen-C4), 72.2 (GlcNac-C4), 71.5 (GlcNac-C3), 70.7 (GlcNac-C2), 70.0 (bpen-C3), 66.6 (GlcNac-C7), 60.0 (GlcNac-C6), 48.1 (bpen-C6), 46.3 (bpen-C7), 38.0 (bpen-C8) ppm. Βαθμός υποκατάστασης βάσει ολοκληρώσεων NMR: 3-4/7

Προσπάθεια σύνθεσης: Επτακιν[6-δεοξυ-6-αζα-17-(α,β-D-γαλακτοκυρανοζο-1'-υλο)-3-αζα-4-οξο-5-αζα-επτανο-1-υλο]-6-αμινο]-β-κυκλοδεξτρίνη (6.44)

Α' Τρόπος

Η επτακιν[6-(αμινοαιθυλαμινο)-6-δεοξυ]-β-κυκλοδεξτρίνη (bpen) **4.9** (4.4 mg, 0.0313 mmol) προστίθεται σε τρεις ισόποσες δόσεις κατά τη διάρκεια 2 ημερών σε διάλυμα των 2'-N-(ηλεκτρολοϊμιδο)αμινοαιθυλο-α,β-D-γαλακτοκυρανόζης **5.20** (8.8 mg, 0.0241 mmol) και τριαιθυλαμίνης (132 μ L, 0.947 mmol) σε DMF (1 mL). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 3 ημέρες στους 30 $^{\circ}$ C υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Εν συνεχεία συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση. Ακολουθεί ρύθμιση σε pH = 7, διάλυση σε δις απεσταγμένο νερό (3 mL) και τοποθέτηση σε μεμβράνη διαπίδυσης, προς απομάκρυνση των προσμίξεων μικρού μοριακού βάρους, επί 3

ημέρες. Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού και η λήψη ^1H NMR φάσματος έδειξε ότι πρόκειται για μη επιθυμητό προϊόν.

B' Τρόπος

Η επτακίς[6-(αμινοαιθυλαμινο)-6-δεοξυ]-β-κυκλοδεξτρίνη (bpen) **4.9** (30 mg, 0.021 mmol) προστίθεται σε τρεις ισόποσες δόσεις κατά τη διάρκεια 3 ημερών σε διάλυμα του ανθρακικού εστέρα του *N,N'*-διηλεκτρολυοϊμιδίου (41.4 mg, 0.162 mmol) και της 2-αμινοαιθυλο- α,β -D-γαλακτοπυρανόζης **5.19** (36 mg, 0.0162 mmol) και τριαιθυλαμίνης (395 μL , 2.83 mmol) σε DMF (4 mL). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 3 ημέρες στους 30 $^\circ\text{C}$ υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Εν συνεχεία συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση. Ακολουθεί ρύθμιση σε pH = 7, διάλυση σε δις απεσταγμένο νερό (3 mL) και τοποθέτηση σε μεμβράνη διαπίδυσης, προς απομάκρυνση των προσμίξεων μικρού μοριακού βάρους, επί 3 ημέρες. Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού και η λήψη ^1H NMR φάσματος έδειξε ότι πρόκειται για μη επιθυμητό προϊόν.

Επτακίς{6-δεοξυ-6- $\alpha\alpha$ -[6-(β -D-γαλακτοπυρανοζο-1'-υλοθειο)-3- $\alpha\alpha$ -4-οξοεξανο-1-υλο]-6-αμινο}-β-κυκλοδεξτρίνη (6.47)

Η 2'-καρβοξυλοαιθυλοθειο- β -D-γαλακτοπυρανόζη **5.39** (57 mg, 0.212 mmol) διαλύεται σε DMF (7 mL). Ακολουθεί σταδιακή προσθήκη του HATU (181 mg, 0.477 mmol) στους 0 $^\circ\text{C}$ και ανάδευση σε r.t για 1 ώρα. Εν συνεχεία προστίθεται DIPEA (85 μL , 0.336 mmol) και η επτακίς[6-(αμινοαιθυλαμινο)-6-δεοξυ]-β-κυκλοδεξτρίνη (bpen) **4.9** (30.2 mg, 0.0178 mmol) κατά τη διάρκεια 3 ημερών. Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 5 ημέρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση, ρυθμίζεται σε pH 7 με HCl 1N, διαλύεται σε δις απεσταγμένο νερό (2 mL) και τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης, προς απομάκρυνση των προσμίξεων μικρού μοριακού βάρους, επί 2 ημέρες. Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και κατόπιν λυοφιλοποίηση προς παραλαβή του επιθυμητού προϊόντος **6.47** με απόδοση 55%. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 298K, 500 MHz) δ 7.85 (s, 1H, -NH-, άμιδο), 5.79 (s, OH), 4.87 (brs, 1H, bpen-H1), 4.21 (d, J = 8.8 Hz, 1H, gal-H1), 3.68 (s, 2H, gal-H4, bpen-H5), 3.62 (brs, 1H, bpen-H3), 3.49 (s, 2H, gal-H6, bpen-H4), 3.64-3.28 (m, 4H, gal-H5, gal-H2, bpen-H2, gal-H3), 3.14 (brs, 2H, bpen-H8), 2.78 (brs, 2H, gal-H7, SCH₂), 2.66 (1H, bpen-H6), 2.53 (επικαλύπτεται με την κορυφή του H₂O, 1H, bpen-H6'), 2.39 (s, 2H, gal-H8, CH₂C=O) ppm. ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ 171.0 (O=C-

NH-), 102.2 (bpen-C1), 85.9 (gal-C1), 79.1 (gal-C5), 74.6 (gal-C3), 72.8-72.3 (bpen-C3, bpen-C2), 70.9 (bpen-C5), 69.7 (gal-C2), 68.4 (gal-C4), 60.6 (gal-C6), 48.7 (bpen-C6, bpen-C7), 36.2 (gal-C8-CH₂C=O), 25.3 (gal-C7- SCH₂) ppm.

MS (MALDI-TOF) *m/z*: 1591.62 ([*M*+2H]²⁺), θεωρ. για C₁₁₉H₂₁₀N₁₄O₇₀S₇: 3179.13.

Επτακίς[6-δεοξυ-6-αζα-[6-(α,β-D-γλυκοπυρανοζο-1'-υλοθειο)-3-αζα-4-οξοεξανο-1-υλο]-6-αμινο]-β-κυκλοδεξτρίνη (6.48)

Η 2'-καρβοξυλοαιθυλοθειο-α,β-D-γλυκοπυρανόζη **5.42** (76 mg, 0.283 mmol) διαλύεται σε DMF (8 mL). Ακολουθεί σταδιακή προσθήκη του HATU (242 mg, 0.638 mmol) στους 0 °C και ανάδευση σε r.t για 1 ώρα. Εν συνεχεία προστίθεται DIPEA (114 μL, 0.449 mmol) και η επτακίς[6-(αμινοαιθυλαμινο)-6-δεοξυ]-β-κυκλοδεξτρίνη (bpen) **4.9** (40 mg, 0.0238 mmol) κατά τη διάρκεια 2 ημερών. Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 5 ημέρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση, ρυθμίζεται σε pH 7 με HCl 1N, διαλύεται σε δις απεσταγμένο νερό (2 mL) και τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης, προς απομάκρυνση των προσμίξεων μικρού μοριακού βάρους, επί 2 ημέρες. Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και κατόπιν λυοφιλοποίηση προς παραλαβή του επιθυμητού προϊόντος **6.48** με απόδοση 39% και αναλογία ανωμερών α:β = 1:1. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 298K, 500 MHz) δ 7.89 (s, 1H, -NH-, άμιδο), 5.86 (s, OH), 5.22 (brs, 1H, glc-α-H1), 4.87 (brs, 1H, bpen-H1), 4.25 (ap. d, 1H, glc-β-H1), 3.67 (s, 2H, glc-α-H6, glc-β-H6), 3.48 (brs, 1H, glc-α-H2), 3.41 (brs, 3H, glc-α-H6', glc-β-H6', bpen-H4), 3.32 (brs, 1H, bpen-H2), 3.12 (brs, 6H, glc-α-H3, glc-β-H3, glc-α-H5, glc-β-H5, bpen-H8), 2.99 (brs, 2H, glc-β-H2, bpen-H3), 2.77 (5H, bpen-H6, bpen-H7, glc-β-H7-SCH₂), 2.64 (31H, bpen-H6', glc-α-H7-SCH₂), 2.37 (s, 4H, glc-α-H8, glc-β-H8, CH₂C=O) ppm. ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ 171.0 (O=C-NH-), 101.6 (bpen-C1), 84.9 (glc-β-C1), 84.8 (glc-α-C1), 82.6 (bpen-C4), 80.4 (glc-C5), 77.7 (glc-C3), 73.5 (bpen-C2), 72.4 (bpen-C3), 71.1 (glc-C2), 60.7 (glc-C6), 48.3 (bpen-C6), 38.7 (bpen-C7), 38.4 (bpen-C8), 35.8 (glc-C8-CH₂C=O), 24.9 (glc-C7- SCH₂) ppm.

MS (ESI-TOF) *m/z*: 1090.47 ([*M*+K+2Na]³⁺), θεωρ. για C₁₁₉H₂₁₀N₁₄O₇₀S₇: 3179.13.

Προσπάθεια σύνθεσης: Επτάκις{6-δεοξυ-6-αζα-[6-(α,β -D-μαννοπυρανοζο-1-υλοθειο)-3-αζα-4-οξοεξανο-1-υλο]-6-αμινο}-β-κυκλοδεξτρίνη (6.46)

Η 2'-καρβοξυλοαιθυλοθειο- α,β -D-μαννοπυρανόζη **5.36** (51 mg, 0.190 mmol) διαλύεται σε DMF (7 mL). Ακολουθεί σταδιακή προσθήκη του HATU (162 mg, 0.426 mmol) στους 0 °C και ανάδευση σε r.t για 1 ώρα. Εν συνεχεία προστίθεται DIPEA (51 μ L, 0.300 mmol) και η επτάκις[6-(αμινοαιθυλαμινο)-6-δεοξυ]-β-κυκλοδεξτρίνη (bren) **4.9** (27 mg, 0.0159 mmol) κατά τη διάρκεια 2 ημερών. Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 5 ημέρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση, ρυθμίζεται σε pH 7 με HCl 1N, διαλύεται σε δις απεσταγμένο νερό (2 mL) και τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης, προς απομάκρυνση των προσμίξεων μικρού μοριακού βάρους, επί 2 ημέρες. Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και κατόπιν φασματογραφία NMR, η οποία έδειξε πολύ μικρό βαθμό υποκατάστασης.

9.5 Επισήμανση υδατανθρακικών συμπλεγμάτων με φλουορεσκεΐνη

Επτάκις{6-δεοξυ-6-αζα-[6-(β -D-γαλακτοπυρανοζο-1'-υλοθειο)-3-αζα-4-οξοεξανο-1-υλο]-6-αμινο}-β-κυκλοδεξτρίνη (6.47)-Fluo

Η επτάκις{6-δεοξυ-6-αζα-[6-(β -D-γαλακτοπυρανοζο-1'-υλοθειο)-3-αζα-4-οξοεξανο-1-υλο]-6-αμινο}-β-κυκλοδεξτρίνη **6.47** (5 mg, 2 μ mol) διασπείρεται σε ξηρό DMF (300 μ L) που περιέχει DIPEA (3.5 μ L, 14 μ mol) και κατόπιν προστίθεται στάγδην σε χρονικό διάστημα 1 ώρας διάλυμα ισοθειοκυανικής φλουορεσκεΐνης (0.04 mg, 0.1 μ mol) σε DMF (400 μ L). Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται στους 70 °C υπό συνεχή ανάδευση και ατμόσφαιρα N₂ επί 3 ώρες. Κατόπιν το διάλυμα ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου και ο διαλύτης απομακρύνεται με απόσταξη υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό που λαμβάνεται διαλύεται σε δις απεσταγμένο H₂O (4 mL) και το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στην τιμή 11 με διάλυμα NH₄OH 1N. Στη συνέχεια, το διάλυμα εκχυλίζεται με CHCl₃ (3 x 7 mL) προς απομάκρυνση της περίσσειας DIPEA και το pH ρυθμίζεται στην τιμή 7 με διάλυμα HCl 1N. Με τον τρόπο αυτό, η μη καταναλωθείσα ποσότητα της **6.47** καταβυθίζεται και απομακρύνεται με φυγοκέντρηση. Τέλος, το διάλυμα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού, διαλύεται σε δις απεσταγμένο H₂O (3 mL) και τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης, προς απομάκρυνση του NH₄Cl. Ακολουθεί

απομάκρυνση του H₂O με συμπύκνωση μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση, και λυοφιλοποίηση από την οποία λαμβάνονται 2.8 mg πορτοκαλέρυθρου στερεού (μοριακή αναλογία κυκλοδεξτρίνης/φλουορεσκεΐνης 100/5). ¹H NMR (D₂O, 298K, 500 MHz): δ 8.13 (m, H_{fluo}) ppm.

Επτακισ{6-δεοξυ-6-S-[6-(α-D-μαννοπυρανοζο-1'-υλο)-4-αζα-3-οξοεξανο-1-υλο]-6-θειο}-β-κυκλοδεξτρίνη (6.33)-Fluo

Η επτακισ{6-δεοξυ-6-S-[6-(α-D-μαννοπυρανοζο-1'-υλο)-4-αζα-3-οξοεξανο-1-υλο]-6-θειο}-β-κυκλοδεξτρίνη **6.33** (10 mg, 3 μmol) διασπείρεται σε DMSO (600 μL) που περιέχει NaOH (0.87 mg, 22 μmol) και κατόπιν προστίθεται στάγδην σε χρονικό διάστημα 1 ώρας διάλυμα ισοθειοκυανικής φλουορεσκεΐνης (0.06 mg, 0.15 μmol) σε DMSO (800 μL). Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται στους 70°C υπό συνεχή ανάδευση και ατμόσφαιρα N₂ επί 3 ώρες. Κατόπιν το διάλυμα ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου και ο διαλύτης απομακρύνεται με απόσταξη υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό που λαμβάνεται διαλύεται σε δις απεσταγμένο H₂O (4 mL) και το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στην τιμή 11 με διάλυμα NH₄OH 1N. Στη συνέχεια, το διάλυμα εκχυλίζεται με CHCl₃ (3 x 7 mL) και το pH ρυθμίζεται στην τιμή 7 με διάλυμα HCl 1N. Τέλος, το διάλυμα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού, διαλύεται σε δις απεσταγμένο H₂O (3 mL) και τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης, προς απομάκρυνση του NH₄Cl. Ακολουθεί απομάκρυνση του H₂O με συμπύκνωση μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση, και λυοφιλοποίηση από την οποία λαμβάνονται 2.4 mg πορτοκαλέρυθρου στερεού (μοριακή αναλογία κυκλοδεξτρίνης/φλουορεσκεΐνης 100/5). ¹H NMR (D₂O, 298K, 500 MHz): δ 6.76 (m, H_{fluo}) ppm.

Επτακισ{6-δεοξυ-6-S-[6-(2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-α-D-γλυκοπυρανοζο-1'-υλο)-4-αζα-3-οξοεξανο-1-υλο]-6-θειο}-β-κυκλοδεξτρίνη (6.37)-Fluo

Η σύνθεση έγινε με ανάλογο τρόπο όπως η **6.33**. Ελήφθησαν 1.4 mg πορτοκαλέρυθρου στερεού (μοριακή αναλογία κυκλοδεξτρίνης/φλουορεσκεΐνης 100/5). ¹H NMR (D₂O, 298K, 500 MHz): δ 6.82 (m, H_{fluo}) ppm.

Επτακίς{6-δεοξυ-6-S-[6-(α,β-D-γαλακτοπυρανοζο-1'-υλο)-4-αζα-3-οξοεξανο-1-υλο]-6-θειο}-β-κυκλοδεξτρίνη (6.35)-Fluo

Η σύνθεση έγινε με ανάλογο τρόπο όπως η **6.33**. Ελήφθησαν 3.1 mg πορτοκαλέρυθρου στερεού (μοριακή αναλογία κυκλοδεξτρίνης/φλουορεσκεΐνης 100/5). ¹H NMR (D₂O, 298K, 500 MHz): δ 6.85 (m, H_{fluo}) ppm.

Επτακίς{6-δεοξυ-6-S-[6-(α,β-L-φουκοπυρανοζο-1'-υλο)-4-αζα-3-οξοεξανο-1-υλο]-6-θειο}-β-κυκλοδεξτρίνη (6.36)-Fluo

Η σύνθεση έγινε με ανάλογο τρόπο όπως η **6.33**. Ελήφθησαν 4.4 mg πορτοκαλέρυθρου στερεού (μοριακή αναλογία κυκλοδεξτρίνης/φλουορεσκεΐνης 100/5). ¹H NMR (D₂O, 298K, 500 MHz): δ 6.83 (m, H_{fluo}) ppm.

Μονο{6-δεοξυ-6-S-[6-(2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-α-D-γλυκοπυρανοζο-1'-υλο)-4-αζα-3-οξοεξανο-1-υλο]-6-θειο}-β-κυκλοδεξτρίνη (6.42)-Fluo

Η μονο {6-δεοξυ-6-S-[6-(2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-α-D-γλυκοπυρανοζο-1'-υλο)-4-αζα-3-οξοεξανο-1-υλο]-6-θειο}-β-κυκλοδεξτρίνη **6.42** (10 mg, 6.8 μmol) διασπείρεται σε DMSO (600 μL) που περιέχει NaOH (0.3 mg, 6.8 μmol) και κατόπιν προστίθεται στάγδην σε χρονικό διάστημα 1 ώρας διάλυμα ισοθειοκυανικής φλουορεσκεΐνης (0.13 mg, 0.34 μmol) σε DMSO (800 μL). Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται στους 70 °C υπό συνεχή ανάδευση και ατμόσφαιρα N₂ επί 3 ώρες. Κατόπιν το διάλυμα ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου και ο διαλύτης απομακρύνεται με απόσταξη υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό που λαμβάνεται διαλύεται σε δις απεσταγμένο H₂O (4 mL) και το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στην τιμή 11 με διάλυμα NH₄OH 1N. Στη συνέχεια, το διάλυμα εκχυλίζεται με CHCl₃ (3 x 7 mL) και το pH ρυθμίζεται στην τιμή 7 με διάλυμα HCl 1N. Τέλος, το διάλυμα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού, διαλύεται σε δις απεσταγμένο H₂O (3 mL) και τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης, προς απομάκρυνση του NH₄Cl. Ακολουθεί απομάκρυνση του H₂O με συμπύκνωση μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση, και λυοφιλοποίηση από την οποία λαμβάνονται 1.4 mg πορτοκαλέρυθρου στερεού (μοριακή αναλογία κυκλοδεξτρίνης/φλουορεσκεΐνης 100/5). ¹H NMR (D₂O, 298K, 500 MHz): δ 6.64 (m, H_{fluo}) ppm.

Μονο{6-δεοξυ-6-S-[6-(α-D-μαννοπυρανοζο-1'-υλο)-4-αζα-3-οξοεξανο-1-υλο]-6-θειο}-β-κυκλοδεξτρίνη (6.40)-Fluo

Η σύνθεση έγινε με ανάλογο τρόπο όπως η 6.42. Ελήφθησαν 5.3 mg πορτοκαλέρυθρου στερεού (μοριακή αναλογία κυκλοδεξτρίνης/φλουορεσκεΐνης 100/5). ¹H NMR (D₂O, 298K, 500 MHz): δ 6.83 (m, H_{fluo}) ppm.

Μονο{6-δεοξυ-6-S-[6-(α,β-D-γαλακτοπυρανοζο-1'-υλο)-4-αζα-3-οξοεξανο-1-υλο]-6-θειο}-β-κυκλοδεξτρίνη (6.41)-Fluo

Η σύνθεση έγινε με ανάλογο τρόπο όπως η 6.42. Ελήφθησαν 4.6 mg πορτοκαλέρυθρου στερεού (μοριακή αναλογία κυκλοδεξτρίνης/φλουορεσκεΐνης 100/5). ¹H NMR (D₂O, 298K, 500 MHz): δ 6.59 (m, H_{fluo}) ppm.

Επτακισ{6-δεοξυ-6-N,N-δι[5-(α-D-μαννοπυρανοζο-1'-υλο)-2-οξο-3-αζα-πεντανο-1-υλο-6-αζα]-β-κυκλοδεξτρίνη (6.49)-Fluo

Η σύνθεση έγινε με ανάλογο τρόπο όπως η 6.42. Ελήφθησαν 4.6 mg πορτοκαλέρυθρου στερεού (μοριακή αναλογία κυκλοδεξτρίνης/φλουορεσκεΐνης 100/5). ¹H NMR (D₂O, 298K, 500 MHz): δ 6.68 (m, H_{fluo}) ppm.

Επτακισ{6-δεοξυ-6-N,N-δι[5-(2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-α-D-γλυκοπυρανοζο-1'-υλο)-2-οξο-3-αζα-πεντανο-1-υλο-6-αζα]-β-κυκλοδεξτρίνη (6.52)-Fluo

Η σύνθεση έγινε με ανάλογο τρόπο όπως η 6.42. Ελήφθησαν 4.6 mg πορτοκαλέρυθρου στερεού (μοριακή αναλογία κυκλοδεξτρίνης/φλουορεσκεΐνης 100/5). ¹H NMR (D₂O, 298K, 500 MHz): δ 6.84 (m, H_{fluo}) ppm.

Οκτακισ{6-δεοξυ-6-N,N-δι[5-(α-D-μαννοπυρανοζο-1'-υλο)-2-οξο-3-αζα-πεντανο-1-υλο-6-αζα]-γ-κυκλοδεξτρίνη (6.50)-Fluo

Η σύνθεση έγινε με ανάλογο τρόπο όπως η 6.42. Ελήφθησαν 4.6 mg πορτοκαλέρυθρου στερεού (μοριακή αναλογία κυκλοδεξτρίνης/φλουορεσκεΐνης 100/5). ¹H NMR (D₂O, 298K, 500 MHz): δ 6.84 (m, H_{fluo}) ppm.

Επτακισ(6-δεοξυ)-β-κυκλοδεξτρίνη (4.1)-Fluo

Η σύνθεση έγινε με ανάλογο τρόπο όπως η 6.42. Ελήφθησαν 4.6 mg πορτοκαλέρυθρου στερεού (μοριακή αναλογία κυκλοδεξτρίνης/φλουορεσκεΐνης 100/5). ¹H NMR (D₂O, 298K, 500 MHz): δ 7.97-6.55 (m, H_{fluo}) ppm.

9.6 Μελέτες υδρόλυσης της αμπικιλλίνης παρουσία του ενζύμου

β-λακταμάσης

Προετοιμασία διαλυμάτων

Ρυθμιστικό Διάλυμα

Το buffer αποτελείται από Na_2HPO_4 (152.5 μL) και $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (97.5 μL) σε D_2O (250 μL).

Διάλυμα αμπικιλλίνης

Το διάλυμα της αμπικιλλίνης συγκέντρωσης 2.69 mM περιείχε αμπικιλλίνη (0.5 mg / 0.5 mL) σε buffer με pH 7. Στη συνέχεια προστέθηκε διάλυμα (100 μL) που περιείχε β-λακταμάση (0.5 mg / 1 mL) σε D_2O .

Διάλυμα Gpsp (4.19)

Το διάλυμα της gpsp **4.19** συγκέντρωσης 13.45 mM (14.64 mg) περιείχε αμπικιλλίνη (0.5 mg / 0.5 mL) σε buffer με pH 7. Στη συνέχεια προστέθηκε διάλυμα (100 μL) που περιείχε β-λακταμάση (0.5 mg / 1 mL) σε D_2O .

Διάλυμα Gpsp-GlcNAc (6.38)

Το διάλυμα της gpsp-GlcNAc (**6.38**) συγκέντρωσης 13.45 mM (26.71 mg) περιείχε αμπικιλλίνη (0.5 mg / 0.5 mL) σε buffer με pH 7. Στη συνέχεια προστέθηκε διάλυμα (100 μL) που περιείχε β-λακταμάση (0.5 mg / 1 mL) σε D_2O .

Διάλυμα Gpsp-Man (6.34)

Το διάλυμα της gpsp-Man (**6.34**) 13.45 mM (24.5 mg) περιείχε αμπικιλλίνη (0.5 mg / 0.5 mL) σε buffer με pH 7. Στη συνέχεια προστέθηκε διάλυμα (100 μL) που περιείχε β-λακταμάση (0.5 mg / 1 mL) σε D_2O .

Διάλυμα Μαλτοεπταόζης

Το διάλυμα της μαλτοεπταόζης συγκέντρωσης 13.45 mM (7.75 mg) περιείχε (0.5 mg / 0.5 mL) αμπικιλλίνη σε buffer με pH 7. Στη συνέχεια προστέθηκε διάλυμα (100 μL) που περιείχε β-λακταμάση (0.5 mg / 1 mL) σε D_2O .

Διάλυμα Μαννόζης (5.1)

Το διάλυμα της της μαννόζης (5.1) συγκέντρωσης 107.6 mM (9.69 mg) περιείχε (0.5 mg / 0.5 mL) αμπικιλίνη σε buffer με pH 7. Στη συνέχεια προστέθηκε διάλυμα (100 μ L) που περιείχε β -λακταμάση (0.5 mg / 1 mL) σε D₂O.

Διάλυμα GlcNAc (5.7)

Το διάλυμα της GlcNAc (5.7) συγκέντρωσης 107.6 mM (11.9 mg) περιείχε (0.5 mg / 0.5 mL) αμπικιλίνη σε buffer με pH 7. Στη συνέχεια προστέθηκε διάλυμα (100 μ L) που περιείχε β -λακταμάση (0.5 mg / 1 mL) σε D₂O.

Επεξεργασία των γραφικών παραστάσεων

Τα διαγράμματα υπέστησαν επεξεργασία με το πρόγραμμα Origin προκειμένου να μπορούν να συγκριθούν μεταξύ τους με μεγαλύτερη ακρίβεια. Αναλυτικότερα όλα τα σημεία μετακινήθηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να ξεκινούν από το ίδιο σημείο και συγκεκριμένα από το σημείο του άξονα y στο οποίο ξεκινάει η αμπικιλίνη στην υδρόλυση Γ στο χρόνο μηδέν. Για κάθε σημείο δεδομένων αφαιρέθηκε ακριβώς ο ίδιος αριθμός που είχε αφαιρεθεί για το σημείο στο χρόνο μηδέν, ώστε να γίνει μείωση των τεταγμένων κατά ίση ποσότητα. Επίσης σε ορισμένες περιπτώσεις τα δείγματα δεν είχαν ληφθεί ακριβώς στις ίδιες ώρες, οπότε από τα διαγράμματα των υδρολύσεων A και B υπολογίσθηκαν από την πειραματική καμπύλη τα σημεία που αντιστοιχούν στις ίδιες ώρες που ελήφθησαν τα φάσματα NMR στην υδρόλυση Γ.

9.7 Μελέτες με Οπτικό Συμβολόμετρο

Ετοιμάσθηκαν διαλύματα πρωτεϊνών σε PBS pH 7.4. Οι συγκεντρώσεις κάθε πρωτεΐνης ήταν 0.2 μ M για την PHA-P, 0.8 μ M για την WGA και 0.2 μ M για την GNL. Τα ανωτέρω διαλύματα αφέθηκαν για 12 ώρες στου 4 °C πριν χρησιμοποιηθούν. Εν συνεχεία τα διαλύματα των πρωτεϊνών διοχετεύτηκαν με αντλία μικροροής (60 μ L/min) μέσω μικροσωληνών στην διάταξη WLRS (Ινστιτούτο Μικροηλεκτρονικής του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος») και αφέθηκαν ώστε να οργανωθούν σε στοιβάδα για 12 ώρες. Κατόπιν ακολούθησε έκπλυση με PBS με ροή 60 μ L/min και εισαγωγή των προς μελέτη ουσιών διαλυμένων σε PBS με την ίδια ροή. Ταυτοχρόνως καταγραφόταν μέσω υπολογιστή η μεταβολή $\Delta\lambda_{\max}$ στην διάρκεια του χρόνου. Οι συγκεντρώσεις των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη PHA-P ήταν 100 μ M για την **bpsp-Gal (6.35)**, 100

μM για την **bpen-Gal (6.47)**, 100 μM για την **bmsp-Gal (6.41)** και 1 mM για την **Gal (5.5)**. Για την πρωτεΐνη WGA χρησιμοποιήθηκαν 10 μM **bpsp-GlcNAc (6.37)**, 10 μM **bedta-GlcNAc (6.52)**, 10 μM **gedta-GlcNAc (6.53)**, 100 μM **bmsp-GlcNAc (6.42)**, 1 mM **GlcNAc (5.7)** και 100 μM **bpsp-Man (6.33)**. Τέλος η πρωτεΐνη GNL μελετήθηκε με τις ουσίες **bpsp-Man (6.33)** 100 μM, **bmsp-Man (6.40)** 100 μM και **bedta-Man (6.49)** 100 μM. Μετά από κάθε εισαγωγή της εκάστοτε προς μελέτη ουσίας ακολουθούσε διεξοδική έπλυση με PBS με ροή 60 μL/min. Τα διαγράμματα επεξεργάστηκαν στο πρόγραμμα Origin50.

9.8 Βιολογικές Μελέτες

9.8.1. Μελέτες με Μικροσκοπία Φθορισμού

9.8.1.1 Υλικά

Το ρυθμιστικό διάλυμα PBS 1X (Phosphate Buffer Saline) παρασκευάστηκε με διάλυση NaCl (8 gr), KCl (0.2 gr), Na₂HPO₄ (1.44 gr) και KH₂PO₄ (0.24 gr) σε απεσταγμένο H₂O (1 L) και ρύθμιση του pH στην τιμή 7.4 με αραιό διάλυμα HCl και στη συνέχεια αποστειρώθηκε. Τα βακτήρια *Aeromonas caviae* (ATCC 15468) και *Ralstonia solanacearum* (ATCC 11696) αγοράστηκαν από την American Type Culture Collection (ATCC) και απαιτούν εργαστηριακή υποδομή βιολογικής ασφάλειας επιπέδου 1, η οποία διατίθεται στο Ινστιτούτο Ραδιοϊσοτόπων και Ραδιοδιαγνωστικών Προϊόντων του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος». Οι αποστειρωμένες πλαστικές φιάλες καλλιέργειας 25 mL, οι σωλήνες φυγοκέντρησης erpendorf (2 ml) και οι σωλήνες falcon (50 ml) αγοράστηκαν από την Orange Scientific. Για την καταμέτρηση των βακτηριακών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε ειδικό υάλινο πλακίδιο της εταιρίας Neubauer. Η επώαση των κυττάρων σε επωαστικό θάλαμο έγινε σε όλες τις περιπτώσεις σε θερμοκρασία 30 °C. Όλες οι διαδικασίες που αφορούσαν τον χειρισμό των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν εντός θαλάμου νηματικής ροής (laminar flow), προς διασφάλιση της στειρότητας. Για την παρατήρηση των βακτηριακών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε μικροσκόπιο φθορισμού Nikon ECLIPSE E400 με τριπλό φίλτρο DAPI-FITC-Texas Red, φακοί Nikon 10X, 20X και 100X και φωτογραφική μηχανή JVC TK-C1381 color video camera.

9.8.1.2 Πειραματικά βήματα

1. Τα βακτηριακά στελέχη αναπτύχθηκαν για 24 ώρες στους 30 °C σε θρεπτικό υλικό Luria Broth (LB). Η OD₆₀₀ ήταν 1 (10⁸ βακτήρια/1 mL). Το θρεπτικό υλικό αποτελείται από Bacto-Tryptone (10 g), Bacto-yeast extract (5 g), NaCl (10 g) και δις απεσταγμένο H₂O (975 mL).
2. Σε 1.5 mL μικροβιακού στελέχους *A. caviae* ή σε 2 mL μικροβιακού στελέχους *R. solanacearum* προστέθηκαν 500 μL PBS 1X. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στα 10000g και απόχυση του υπερκείμενου διαλύματος. Εν συνεχεία προστέθηκαν επιπλέον 500 μL PBS 1X, το αιώρημα υπέστη φυγοκέντρηση και το υπερκείμενο διάλυμα αποχύθηκε.
3. Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν CaCl₂ (100 μL) από διάλυμα 100 mM και 5 μL από το διάλυμα που περιείχε την προς μελέτη ουσία συγκέντρωσης 10 mM. Κατά αυτόν τον τρόπο προέκυψαν διαλύματα με τελική συγκέντρωση υδατανθρακικού συμπλέγματος 500 μM.
4. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε συσκευή vortex για ένα λεπτό και εν συνεχεία επώασθησαν για 2 ώρες στους 30 °C.
5. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στα 10000g, απόχυση του υπερκείμενου διαλύματος και προσθήκη CaCl₂ (100 μL) από διάλυμα 100 mM. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε για 2 φορές προς απομάκρυνση των υδατανθρακικών συμπλεγμάτων που δεν είχαν αλληλεπιδράσει με τις βακτηριακές λεκτίνες των μικροβίων.
6. Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν CaCl₂ (450 μL) από διάλυμα 100 mM. Στη συνέχεια τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν επανειλημμένως και τοποθετήθηκαν 5 μL σε αντικειμενοφόρο πλάκα.
7. Η κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα εξετάστηκε κάτω από οπτικό μικροσκόπιο και μικροσκόπιο φθορισμού. Έγινε έλεγχος στο σύνολο της επιφάνειας και ελήφθησαν φωτογραφίες οπτικού μικροσκοπίου και φθορισμού στο ίδιο πεδίο.

Με την ανωτέρω διαδικασία μελετήθηκαν τα εξής υδατανθρακικά συμπλέγματα: bpsp-Man **(6.33)-Fluo**, gedta-Man **(6.49)-Fluo**, bmsp-Man **(6.40)-Fluo**, bpsp-Gal **(6.35)-Fluo**, bpsp-GlcNAc **(6.37)-Fluo**, bedta-GlcNAc **(6.52)-Fluo**, bmsp-GlcNAc **(6.42)-Fluo**, bpsp-Fuc **(6.36)-Fluo**, bmsp-Gal **(6.41)-Fluo**, καθώς και η βCD **(4.1)-Fluo**.

9.8.2 Μελέτες με Φθορισμομετρία

9.8.2.1 Υλικά

Για τις μελέτες με φθορισμομετρία χρησιμοποιήθηκαν υλικά όπως περιγράφονται στην παράγραφο 9.8.1.1. Η μέτρηση του φθορισμού έγινε σε πλακίδια 96 φρεατίων μαύρου χρώματος, κατάλληλα για τον μετρητή Tecan infinite M200. Η μέτρηση του φθορισμού έγινε σε μήκος κύματος $\lambda_{ex} = 490 \text{ nm}$.

9.8.2.2 Πειραματικά βήματα

Κατά την πειραματική διαδικασία για την μέτρηση της έντασης του φθορισμού ακολουθήθηκαν τα πειραματικά βήματα 1-5 όπως αναλύθηκαν ανωτέρω για τις μελέτες μικροσκοπίας φθορισμού. Κατόπιν σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 450 μL διαλύματος CaCl_2 100 mM, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν επανειλημμένως και τοποθετήθηκαν 100 μL σε κάθε φρεάτιο. Ανά τέσσερα φρεάτια τοποθετήθηκε η ίδια ουσία και πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις για κάθε ουσία.

Με την ανωτέρω διαδικασία μελετήθηκαν τα εξής υδατανθρακικά συμπλέγματα: bpsp-Man (6.33)-*Fluo*, gedta-Man (6.49)-*Fluo*, bmsp-Man (6.40)-*Fluo*, bpsp-Gal (6.35)-*Fluo*, bpsp-GlcNAc (6.37)-*Fluo*, bedta-GlcNAc (6.52)-*Fluo*, bmsp-GlcNAc (6.42)-*Fluo*, bpsp-Fuc (6.36)-*Fluo*, bmsp-Gal (6.41)-*Fluo*, καθώς και η βCD (4.1)-*Fluo*.

9.9 Μελέτες δράσης αντιβιοτικών σε μικροβιακά στελέχη παρουσία επιλεγμένων βCDs ²⁶

Οι κυκλοδεξτρίνες επτακίς[6-(καρβοξυαιθυλοθειο)-6-δεοξυ]- β -κυκλοδεξτρίνη (bpsp) **4.8**, οκτακίς[6-(καρβοξυαιθυλοθειο)-6-δεοξυ]- γ -κυκλοδεξτρίνη (gpsp) **4.19**, επτακίς[6-(αμινοαιθυλαμινο)-6-δεοξυ]- β -κυκλοδεξτρίνη (bpen) **4.9** και η φυσική βCD συμπλοκοποιήθηκαν με το αντιβιοτικό *σιπροφλοξασίνη* σε αναλογίες 1:1 και 3:1, με τη *λεβοφλοξασίνη* σε αναλογία 3:1 και με το *οξολινικό οξύ* σε αναλογία 1:1.²⁷ Χρησιμοποιήθηκαν πλακίδια 96 φρεατίων σε κάθε ένα από τα οποία τοποθετήθηκε θρεπτικό υλικό Müller Hinton Broth (100 μL). Στη συνέχεια τοποθετήθηκε το κάθε σύμπλοκο (64 μg) σε αποστειρωμένο νερό με pH 8 (100 μL). Ακολούθησαν 10 διαδοχικές αραιώσεις, οι οποίες ξεκίνησαν από 64 μg / 100 μL και

υποδιπλασιάζοντας κάθε φορά τη συγκέντρωση κατέληξαν σε τελική συγκέντρωση 0.0625 μg/100 μL. Τέλος, σε κάθε φρεάτιο τοποθετήθηκε 1 μL από τα προς μελέτη βακτήρια, τα οποία είχαν καλλιεργηθεί σε υγρό θρεπτικό υλικό. Τα πλακίδια αφέθηκαν στον κλίβανο στους 37 °C για 24 ώρες και την επομένη μέρα ελέγχθηκε εάν η δράση του συμπλόκου με το αντιβιοτικό είχε διαφοροποιηθεί σε σχέση με αυτή του αντιβιοτικού απουσία κυκλοδεξτρίνης, δηλαδή σε ποια συγκέντρωση ανιχνεύθηκε οπτικά. Η ύπαρξη των ζώντων μικροβιακών στελεχών έγινε αντιληπτή με την εμφάνιση κομβίου, δηλαδή την εντοπισμένη βακτηριακή αποικία στο υγρό θρεπτικό υλικό Müller Hinton Broth. Τα αποτελέσματα έδειξαν διαφοροποίηση κυρίως στο σύμπλοκο με το bren καθώς τα μικροβιακά στελέχη αναπτύχθηκαν στην υποδιπλάσια συγκέντρωση αντιβιοτικού.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

**ΠΙΝΑΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ MIC
ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΕ
ΛΕΒΟΦΛΟΞΑΣΙΝΗ, ΣΙΠΡΟΦΛΟΞΑΣΙΝΗ
ΚΑΙ ΟΞΟΛΙΝΙΚΟ ΟΞΥ**

Cipro/CD, 1/1												
Α/Α	ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ	M.I.C. (µg/mL)									
			Cipro		Cipro/βCD		Cipro/gpsp		Cipro/bpsp		Cipro/bpen	
1	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	84257	16	16	16	16	4	32	8	16	4	16
2	<i>Enterococcus faecium</i>	36356	64		64		64		64		64	
3	<i>Staphylococcus aureus</i>	84823	16	8	16	8	16	8	16	8	16	8
4	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	36295	32		16		16		32		32	
5	<i>Enterococcus faecalis</i>	84621	64	32	64	32	64	32	64	32	64	32
6	<i>Acinetobacter baumannii</i>	84513	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36285	32	16	32	16	16	16	16	16	16	8
8	<i>Enterobacter cloacae</i>	84929	2	1	4	1	2	1	4	1	2	1
9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	84814	0	32	0	32	32	32	32	16	0	16
10	<i>Listeria monocytogenes</i>	36123	0	0.25	64	0.25	64	0.25	64	0.5	0	0.25

Cipro/CD, 1/1												
A/A	BAKTHPIAKO ΣΤΕΛΕΧΟΣ	APIΘΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ	M.I.C. (µg/mL)									
			Cipro		Cipro/βCD		Cipro/gpsp		Cipro/bpsp		Cipro/bpen	
11	<i>Proteus mirabilis</i>	84237	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64
12	<i>Escherichia coli</i>	43152	32	32	32	32	32	32	32	32	16	16
13	<i>Escherichia coli</i>	4239	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	<i>Escherichia coli</i>	6050M	0.25	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
15	<i>Escherichia coli</i>	6050µ	0.25	0.125	0.125	0.25	0.25	0.25	0.125	0.125	0.125	0.125
16	<i>Escherichia coli</i>	4625	0.25	0.125	0.125	0	0	0	0	0	0.125	0.125
17	<i>Escherichia coli</i>	4037	32	16	16	32	32	32	32	32	32	32
18	<i>Escherichia coli</i>	6021	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	<i>Escherichia coli</i>	6019p	0.0625	0.0625	0.0625	0.0625	0.0625	0.0625	0.0625	0.0625	0.0625	0.0625
20	<i>Escherichia coli</i>	6034	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Cipro/CD, 1/1																			
Α/Α	ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ	M.I.C. (µg/mL)																
			Cipro			Cipro/βCD			Cipro/gpsp			Cipro/bpsp			Cipro/bpen				
21	<i>Escherichia coli</i>	4624	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
22	<i>Escherichia coli</i>	4061	16	16	16	16	8	8	16	16	16	16	8	16	16	16	16	16	16
23	<i>Escherichia coli</i>	4016	16	16	16	8	8	8	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
24	<i>Escherichia coli</i>	4783	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	<i>Escherichia coli</i>	4008	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
26	<i>Citrobacter freundii</i>	6033	0.0625	0.0625	0.0625	0.0625	0.0625	0.0625	0.0625	0.0625	0.0625	0	0.0625	0.0625	0.0625	0.0625	0.0625	0.0625	0.0625
27	<i>A. baumannii</i>	MR3854	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
28	<i>A. baumannii</i>	MR3824	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	8	8
29	<i>P. aeruginosa</i>	MR3745	8	8	8	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	8	8
30	<i>S. epidermidis</i>	MR3376	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.5	0.5

Cipro/CD, 1/1									
A/A	BAKTHPIAKO ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ	M.I.C. (µg/mL)						
			Cipro	Cipro/βCD	Cipro/gpsp	Cipro/bpsp	Cipro/bpen		
31	<i>A. baumannii</i>	4020	2	4	2	4	2	2	
32	<i>K. pneumoniae</i>	4018	32	32	32	32	16		
33	<i>E.coli</i>	4015	2 2	2 2	4 4	2 2	2 2	4	
34	<i>E. faecalis</i>	3633	32	32	32	32	32		
35	<i>S. aureus</i>	BL3923	0.0625	0.0625	0.0625	0.0625	0.0625		
36	<i>K. pneumoniae</i>	BL3703	8	8	8	8	8		
37	<i>P. aeruginosa</i>	BL3535	8	8	8	8	8		
38	<i>P. aeruginosa</i>	BL3351	16	16	16	16	16		
39	<i>Escherichia coli</i>	4240	16	16	32	32	32		

Cipro/CD, 1/3												
A/A	BAKTHPIAKO ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ	M.I.C. (µg/mL)									
			Cipro		Cipro/βCD		Cipro/gpsp		Cipro/bpsp		Cipro/bpen	
1	<i>Escherichia coli</i>	4061	16	16	16	16	16	16	16	16	8	16
2	<i>Escherichia coli</i>	4624	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
3	<i>Escherichia coli</i>	4008	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
4	<i>Escherichia coli</i>	4016	16	8	8	16	16	16	16	8	16	16
5	<i>Escherichia coli</i>	4783	0	0	no	no	no	no	8	8	8	32

Levo/CD, 1/3													
Α/Α	ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ	M.I.C. (µg/mL)										
			Levo		Levo/βCD		Levo/gsp		Levo/bpsp		Levo/bpen		
1	<i>Enterococcus faecalis</i>	84621	16	16	16	16	16	16	32	16	16	16	16
2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	84513	4	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36285	32	32	32	32	32	32	32	32	32	16	16
4	<i>Enterobacter cloacae</i>	84929	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1
5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	84814	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
6	<i>Listeria monocytogenes</i>	36123	0.5	0.25	0.5	0.25	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
7	<i>Escherichia coli</i>	43152	16	16	16	16	16	16	16	16	16	8	8
8	<i>A. baumannii</i>	MR3854	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
9	<i>A. baumannii</i>	MR3824	4	4	4	4	2	2	2	2	2	2	2
10	<i>S. epidermidis</i>	MR3376	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.5	0.25

11	<i>A. baumannii</i>	4020	0.5	0.5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	<i>E. faecalis</i>	3633	8	8	8	8	8	8	32	32	32	32	32	32	32	32	16	16

Oxo/CD, 1/1														
A/A	BAKTHPIAKO ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ	M.I.C. (µg/mL)											
			Oxo		Oxo/βCD		Oxo/gpsp		Oxo/bpsp		Oxo/bpen			
1	<i>Escherichia coli</i>	44566	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64
2	<i>Enterobacter cloacae</i>	44666	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64
3	<i>Enterococcus faecium</i>	45395	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64
4	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	45898	32	32	32	32	64	32	64	64	64	32	32	32
5	<i>Staphylococcus aureus</i>	43565	16	16	32	32	32	32	32	32	64	64	64	32
6	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	44856	32	32	32	32	32	32	32	32	32	8	8	8
7	<i>Escherichia coli</i>	4015	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64
8	<i>A. Baumannii</i>	4020	8	8	8	8	8	8	8	8	8	16	16	8
9	<i>K. pneumoniae</i>	4018	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64
10	<i>A. baumannii</i>	6	8	8	16	16	32	32	8	8	8	32	32	16

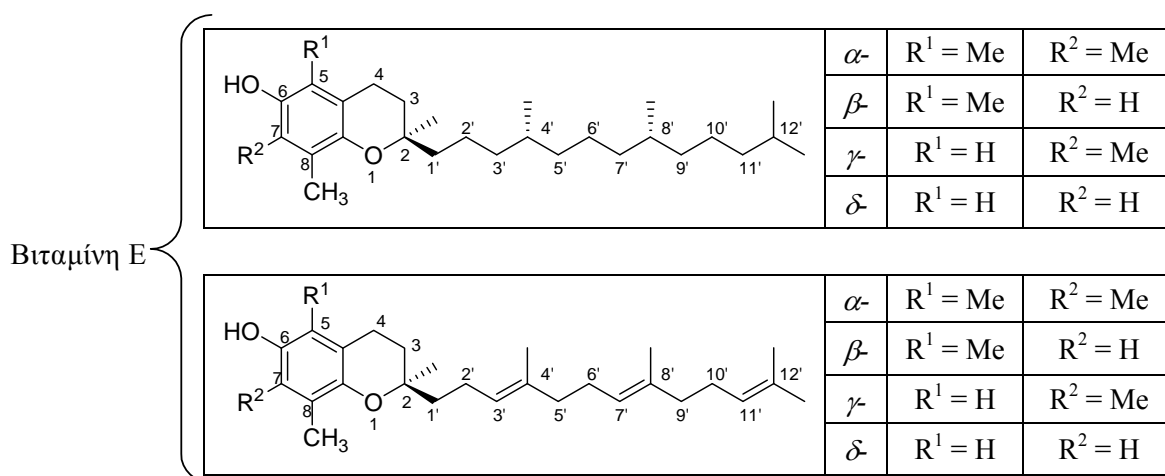
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΚΟΤΡΙΕΝΟΛΩΝ

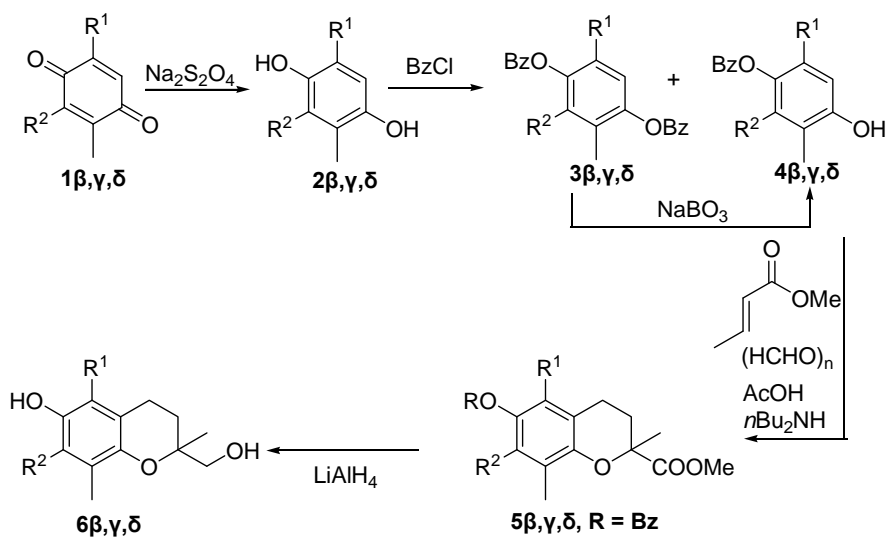
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

ΣΥΝΘΕΣΗ β -, γ -, ΚΑΙ δ - ΤΟΚΟΤΡΙΕΝΟΛΩΝ¹

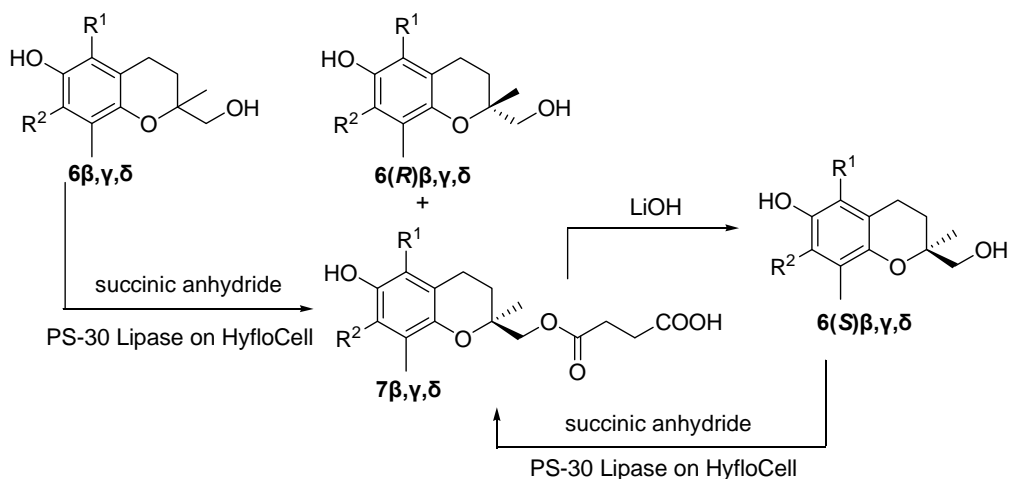
Η βιταμίνη E αποτελεί οικογένεια οκτώ φυσικών προϊόντων συναφούς χημικής δομής που διαφοροποιούνται μόνο στη θέση των μεθυλικών ομάδων στο βενζοπυρανικό δακτύλιο και το βαθμό ακορεστότητας της πλευρικής αλυσίδας. (α -, β -, γ -, δ - τοκοφερόλη και α -, β -, γ -, δ - τοκοτριενόλη) (Σχήμα Π1). Οι τοκοτριενόλες αποτελούν οικογένεια φυσικών προϊόντων που απαντώνται σε διάφορες φυσικές πηγές όπως στο φοινικέλαιο, στη βρώμη, στο σιτάρι και παρουσιάζουν υποχοληστερινική, αντιθρομβωτική, ανοσορυθμιστική και κυρίως αντιοξειδωτική δράση.² Η τελευταία σχετίζεται με τη δέσμευση των ελεύθερων ριζών, οι οποίες είναι καταστρεπτικές για τον άνθρωπο.³ Η σημαντική βιολογική δράση των τοκοτριενολών, η περιορισμένη ποσότητα που μπορεί να απομονωθεί από τη φύση και ο δαπανηρός τρόπος απομόνωσής τους, μας οδήγησε στην ανάπτυξη νέων εργαστηριακών τρόπων παρασκευής τους. Συγκεκριμένα συντέθηκαν οι β -, γ - και δ - τοκοτριενόλες εφαρμόζοντας ως βασικές αντιδράσεις την κυκλοποίηση⁴ του φαινολικού υποστρώματος **4**, (Σχήμα Π2) τη σύζευξη του εστέρα **9** με την σουλφόνη **11** και αποπροστασία του φαινολικού υδροξυλίου (Σχήμα Π4). Ιδιαίτερα σημαντικός είναι ο διαχωρισμός των δύο οπτικών αντιπόδων της αλκοόλης **6** με ενζυμική μέθοδο όπως περιγράφεται στο σχήμα Π3.



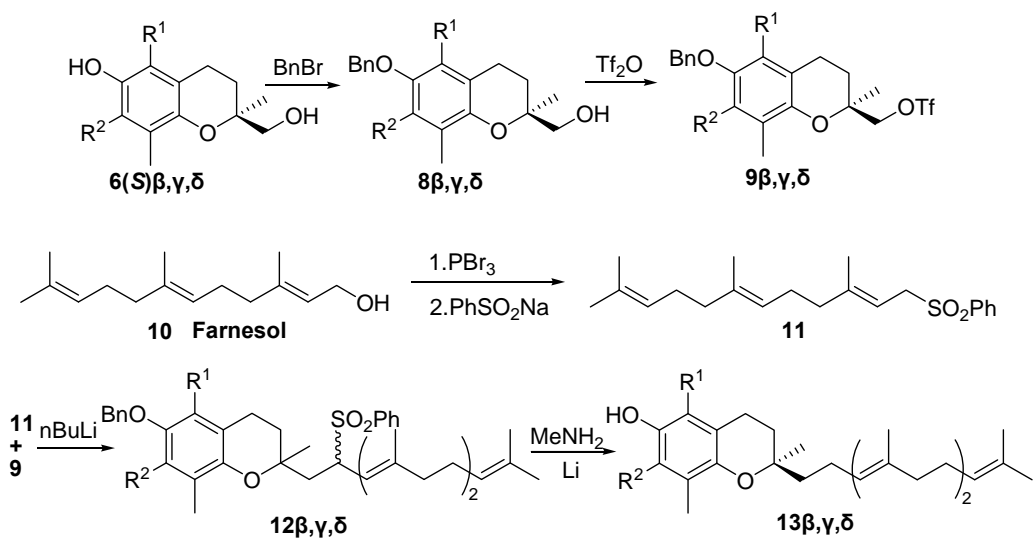
Σχήμα Π1: Κόρια συστατικά της βιταμίνης E



Σχήμα Π2: Σύνθεση μεθανολικών χρωμανίων



Σχήμα Π3: Ενζυμική ανάλυση μεθανολικών χρωμανίων



Σχήμα Π4: Ολική σύνθεση των β-, γ- και δ- τοκοτριενολών

Γενική Πειραματική Διαδικασία για τη σύνθεση των 2,5-διμεθυλο-μονοβενζοϊκού εστέρα της υδροκινόνης 4β, 2,3-διμεθυλο-μονοβενζοϊκού εστέρα της υδροκινόνης 4γ και 2-μεθυλο-μονοβενζοϊκού εστέρα της υδροκινόνης 4δ

Διάλυμα βενζοϋλοχλωριδίου (14.5 mmol) σε βενζόλιο (40 mL) προστίθεται στάγδην σε διάλυμα των υδροκινονών **2β**, **2γ** or **2δ** (14.5 mmol) σε πυριδίνη (10 mL) και βενζόλιο (20 mL) στους 0 °C για 1 h. Το μίγμα της αντίδρασης εκπλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα CuSO₄ (4 x 20 mL). Η υδατική φάση εκχύλιζεται με AcOEt (3 x 30 mL). Οι δύο φάσεις διαχωρίζονται και η οργανική εκπλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl (3 x 20 mL) και ξηραίνεται υπεράνω Na₂SO₄ και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης εξάνιο/AcOEt (9:1) του ακάθαρτου μίγματος παρέχει τα προϊόντα **4β**, **4γ** και **4δ** μαζί με τους διεστέρες **3β**, **3γ** και **3δ**.

2,5-διμεθυλο-διβενζοϊκός εστέρας της υδροκινόνης 3β

R_f = 0.65 (30% AcOEt σε εξάνιο). ¹H NMR (CDCl₃, 298K, 250 MHz) δ 8.22 (d, *J* = 7.3 Hz, 4H), 7.67-7.62 (m, 2H), 7.55-7.49 (m, 4H), 7.06 (brs, 2H), 2.21 (s, 6H) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 298K 62.5 MHz) δ 184.9, 146.9, 133.6, 130.2, 129.4, 129.0, 128.6, 124.3, 16.0 ppm. IR (neat): ν 3036, 2926, 1738.

2,3-διμεθυλο-διβενζοϊκός εστέρας της υδροκινόνης 3γ

R_f = 0.80 (30% AcOEt σε εξάνιο). ¹H NMR (CDCl₃, 298K, 250 MHz) δ 8.16 (d, *J* = 7.1 Hz, 3 H, m), 8.07 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.60-7.51 (m, 2H), 7.45-7.38 (m, 5H), 6.99 (s, 1H), 2.09 (s, 6H) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 62.5 MHz) δ 184.5, 164.7, 147.0, 137.7, 134.4, 133.4, 130.5, 130.3, 130.0, 129.2, 128.7, 128.5, 128.2, 128.1, 12.7 ppm. IR (neat): ν 3048, 2925, 1743.

2-μεθυλο-διβενζοϊκός εστέρας της υδροκινόνης 3δ

R_f = 0.62 (30% AcOEt σε εξάνιο). ¹H NMR (CDCl₃, 298K, 500 MHz) δ 8.27 (m, 4H), 7.68 (m, 2H), 7.56 (m, 4H), 7.02 (m, 3H), 2.31 (s, 3H) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 298K, 125 MHz) δ 165.0, 164.7, 148.4, 147.0, 133.6, 133.5, 131.7, 130.1, 129.5, 129.3, 128.6, 128.5, 124.0, 122.8, 120.0, 16.4 ppm.

IR (neat): ν 3042, 2923, 1735.

Γενική Πειραματική Διαδικασία για τη σύνθεση των μονοϋποκατεστημένων υδροκινονών 4β, 4γ και 4δ από τις διυποκατεστημένες υδροκινόνες 3β, 3γ και 3δ.

Τα προϊόντα **3β**, **3γ**, ή **3δ** (6.4 mmol) αναδεύονται σε MeOH (10 mL) με βορικό νάτριο (13 mmol) στους 40 °C για 6 h. Μετά το πέρας της αντίδρασης το NaBO₃ διηθείται και εκπλένεται με EtOAc (3 x 10 mL). Ο διαλύτης συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης εξάνιο/AcOEt (9:1) του ακάθαρτου μίγματος παρέχει το επιθυμητά προϊόντα **4β**, **4γ** και **4δ**.

4β: Απόδοση 70 %. R_f = 0.75 (30% AcOEt σε εξάνιο). ¹H NMR (CDCl₃, 298K, 250 MHz) δ 8.00 (m, 2H), 7.47-7.39 (m, 1H), 7.33-7.26 (m, 2H), 6.63 (s, 1H), 6.33 (s, 1H), 5.28-5.00 (brs, 1H), 1.96 (s, 3H), 1.89 (s, 3H) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 298K, 62.5 MHz) δ 165.9, 151.7, 142.4, 133.6, 130.2, 129.4, 128.6, 128.2, 123.7, 122.7, 117.2, 109.6, 15.8, 15.4 ppm. IR (neat): ν 3437, 1716.

4γ: Απόδοση 73 %. R_f = 0.63 (30% AcOEt σε εξάνιο). ¹H NMR (CDCl₃, 298K, 250 MHz) δ 8.20 (m, 2H), 7.64-7.58 (m, 1H), 7.52-7.46 (m, 2H), 6.79 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 6.59 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 4.89 (brs, 1H), 2.1 (s, 3H), 2.08 (s, 3 H) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 298K, 62.5 MHz) δ 171.1, 165.7, 151.4, 142.8, 133.8, 133.5, 130.2, 129.5, 129.2, 128.6, 128.6, 128.5, 124.2, 120.1, 119.4, 113.0, 13.1, 13.0, 12.1 ppm. IR (neat): ν 3441, 1710.

4δ: Απόδοση 72 %. R_f = 0.50 (30% AcOEt σε εξάνιο). ¹H NMR (CDCl₃, 298K, 250 MHz) δ 8.21 (d, J = 7.1 Hz, 2H), 7.64 (m, 1H), 7.51 (m, 2H), 6.98-6.81 (m, 2H), 6.69 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 5.48 (brs, 1H), 2.22 (s, 3H) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 298K, 62.5 MHz) δ 166.2, 151.8, 143.8, 133.6, 130.1, 128.6, 128.5, 125.4, 123.6, 119.6, 115.6, 15.9 ppm. IR (neat): ν 3445, 1712.

Γενική Πειραματική Διαδικασία για τη σύνθεση των 2,5,8-τριμεθυλο-6-βενζοϋλοξυγρωμαν-2-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα 5β, 2,7,8-τριμεθυλο-6-βενζοϋλοξυγρωμαν-2-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα 5γ και 2,8-διμεθυλο-6-βενζοϋλοξυγρωμαν-2-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα 5δ

Οι υδροκινονικοί μονοβενζοϋλο-εστέρες **4β**, **4γ** και **4δ** (13.2 mmol) προστίθενται σε μίγμα μεθακρυλικού μεθυλεστέρα (64.5 mmol) και παραφορμαλδεΐδης (421 mg). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται στους 0 °C και προστίθενται διβουτυλαμίνη (1.6 mmol) και οξικό οξύ (6.6 mmol). Ακολουθεί αναρροή για 23 ώρες. Το μίγμα της αντίδρασης προστίθεται σε κορεσμένο υδατικό

διάλυμα NaHCO_3 και εκχυλίζεται με EtOAc (3 x 10 mL). Οι δύο φάσεις διαχωρίζονται και η οργανική εκπλένεται με H_2O (10 mL) και με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl (3 x 10 mL). Ακολουθεί ξήρανση υπεράνω Na_2SO_4 και συμπύκνωση υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης εξάνιο/ AcOEt (9:1) του ακάθαρτου μίγματος παρέχει τα προϊόντα **5β**, **5γ** και **5δ**.

5β: Απόδοση 82 %. $R_f = 0.55$ (20% AcOEt σε εξάνιο). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 298K, 250 MHz) δ 8.11 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.59-7.48 (m, 1H), 7.46-7.37 (m, 2H), 6.71 (s, 1H), 3.60 (s, 3H), 2.64-2.32 (m, 2H), 2.14 (s, 3H), 1.90 (s, 3H), 1.88-1.73 (m, 2H), 1.53 (s, 3H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 298K, 62.5 MHz) δ 174.1, 165.4, 149.6, 142.0, 133.4, 130.1, 129.7, 128.5, 125.6, 124.6, 121.5, 119.8, 77.2, 52.4, 30.1, 25.4, 20.9, 15.9, 11.9 ppm. IR (KBr): ν 2934, 1757, 1732, 1601, 1479, 1450, 1268, 1230, 1102, 1066, 1024, 713.

HRMS θεωρ. για $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_5$: 354.1467, πειραμ.: 354.1359.

5γ: Απόδοση 80 %. $R_f = 0.46$ (20% AcOEt σε εξάνιο). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 298K, 250 MHz) δ 8.20-8.16 (m, 2H), 7.63-7.56 (m, 1H), 7.51-7.44 (m, 2H), 6.65 (s, 1H), 3.68 (s, 3H), 2.70-2.64 (m, 2H), 2.41-2.32 (m, 1H), 2.20 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 1.92-1.79 (s, 1H), 1.62 (s, 3H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 298K, 62.5 MHz) δ 174.0, 165.5, 149.2, 142.4, 133.4, 130.1, 129.7, 128.5, 125.9, 118.9, 118.1, 78.0, 52.4, 30.2, 29.6, 28.4, 25.5, 12.8, 12.0 ppm. IR (KBr): ν 2927, 1740, 1476, 1450, 1233, 1188, 1102, 1027, 893, 712.

HRMS θεωρ. για $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_5$: 354.1467, πειραμ.: 354.1473.

5δ: Απόδοση 82 %. $R_f = 0.61$ (20% AcOEt σε εξάνιο). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 298K, 500 MHz) δ 8.19 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.64 (m, 1H), 7.51 (m, 2H), 6.85 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 6.74 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 2.73 (m, 2H), 2.42 (m, 1H), 2.28 (s, 3H), 1.91 (m, 1H), 1.66 (s, 3H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 298K, 125 MHz) δ 174.1, 165.7, 149.5, 143.5, 133.4, 130.1, 128.5, 127.4, 121.6, 120.8, 119.1, 78.2, 52.5, 30.3, 25.5, 22.8, 16.1 ppm. IR (KBr): ν 2936, 1758, 1738, 1600, 1476, 1451, 1267, 1228, 1110, 1067, 1026, 719.

HRMS θεωρ. για $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_5$: 340.1311, πειραμ.: 340.1326.

Γενική Πειραματική Διαδικασία για τη σύνθεση των μεθυλο 2,5,8-τριμεθυλο-6-υδροξυγρωμαν-2-μεθανόλης 6β, 2,7,8-τριμεθυλο-6-υδροξυγρωμαν-2-μεθανόλης 6γ και 2,8-διμεθυλο-6-υδροξυγρωμαν-2-μεθανόλης 6δ

Σε διάλυμα των **5β**, **5γ** και **5δ** (10.7 mmol) σε Et₂O (10 mL) προστίθεται LAH στους 0 °C. Μετά το πέρας της αντίδρασης προστίθεται στάγδην HCl 1N και το μίγμα αναδεύεται για 15 λεπτά. Το μίγμα της αντίδρασης προστίθεται σε H₂O, εξουδετερώνεται με NaHCO₃ και εκχυλίζεται με EtOAc (3 x 30 mL). Οι δύο φάσεις διαχωρίζονται και η οργανική εκπλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl (3 x 20 mL). Ακολουθεί ξήρανση υπεράνω Na₂SO₄ και συμπύκνωση υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης εξάνιο/AcOEt (8:2) του ακάθαρτου μίγματος παρέχει τα προϊόντα **6β**, **4γ** και **4δ**.

6β: Απόδοση 98 %. R_f = 0.58 (50% AcOEt σε εξάνιο). ¹H NMR (CDCl₃, 298K, 250 MHz) δ 6.46 (s, 1H), 4.56 (brs, 0.5H, OH), 3.59 (ABq, J = 11.4 Hz, Δν = 15.9 Hz, 2.5H, , also OH brs), 2.67-2.60 (m, 2H), 2.07 (brs, 6H), 2.03-1.91 (m, 1H), 1.75-1.65 (m, 1H), 1.19 (s, 3H) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 298K, 62.5 MHz) δ 146.2, 144.9, 123.7, 120.2, 115.4, 109.4, 74.8, 69.1, 27.6, 20.3, 20.2, 15.8, 10.9 ppm. IR (neat): ν 3747, 3311, 2933, 1705, 1463, 1230.

HRMS θεωρ. για C₁₃H₁₈O₃: 222.1256, πειραμ.: 222.1250.

6γ: Απόδοση 99 %. R_f = 0.58 (50% AcOEt σε εξάνιο). ¹H NMR (CDCl₃, 298K, 250 MHz) δ 6.35 (s, 1H), 4.99 (brs, 1H), 3.60 (ABq, J = 11.3 Hz, Δν = 16.4 Hz, 2H), 2.80-2.56 (m, 2H), 2.11 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.01-1.89 (m, 1H), 1.68-1.58 (m, 1H), 1.21 (s, 3H) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 298K, 62.5 MHz) δ 146.9, 145.0, 128.2, 125.5, 121.8, 118.1, 112.3, 69.1, 29.5, 27.9, 21.9, 20.7, 12.0 ppm. IR (neat): ν 3745, 3290, 2930, 1715, 1453, 1210.

HRMS θεωρ. για C₁₃H₁₈O₃: 222.1256, πειραμ.: 222.1254.

6δ: Απόδοση 99 %. R_f = 0.48 (50% AcOEt σε εξάνιο). ¹H NMR (CDCl₃, 298K, 250 MHz) δ 6.49 (s, 1H), 6.41 (s, 1H), 3.62 (ABq, J = 11.4 Hz, Δν = 16.1 Hz, 2H), 2.73 (m, 2H), 2.12 (s, 3H), 1.99 (m, 1H), 1.67 (m, 1H), 1.24 (s, 3H) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 298K, 62.5 MHz) δ 148.2, 145.3, 127.3, 123.0, 115.8, 112.6, 76.1, 69.4, 27.7, 22.0, 20.7, 16.1 ppm. IR (neat): ν 3737, 3350, 2923, 1708, 1465, 1280.

HRMS θεωρ. για C₁₂H₁₆O₃: 208.1099, πειραμ.: 208.3216

Ενεργοποίηση της λιπάσης PS-30

Η λιπάση PS-30 (3 g) και hyflosupercell (10 g) προστίθενται σε ρυθμιστικό διάλυμα (10 mL) των Na₂HPO₄ (117.12 mg) και KH₂PO₄ (81.66 mg) σε απεσταγμένο H₂O (30 mL, pH 7). Το μίγμα αναδεύεται έντονα και ξηραίνεται για 24 ώρες.

Γενική Πειραματική Διαδικασία για τη σύνθεση των ρακεμικών χρωμανικών διολών 6β, 6γ και 6δ (1^{ος} κύκλος).

Μίγμα των 6β, 6γ και 6δ (2 g), της hyflosupercell-υποστηριζόμενης PS-30 λιπάσης (1.3 g), του ηλεκτρικού ανυδρίτη (1.2 g) και του *tert*-βουτυλομεθυλαιθέρα (33 mL) αναδεύονται σε r.t. για 5 ώρες. Μετά το πέρας των 5 ωρών TLC δείχνει το σχηματισμό ίσων ποσοτήτων ενός πολικού προϊόντος και αρχικής αλκοόλης. Το μίγμα αραιώνεται με οξικό αιθυλεστέρα και ακετόνη, διηθείται από σελλίτη και εκχυλίζεται 5 φορές με 5% υδατικό διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου. Οι δύο φάσεις διαχωρίζονται, η υδατική φάση οξινίζεται με υδατικό διάλυμα HCl 1N και εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα. Το διάλυμα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση προς παραλαβή των προϊόντων 7β, 7γ, και 7δ (απόδοση 55-65%), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

Τα οξέα 7β, 7γ και 7δ (1.4 mmol) διαλύονται σε MeOH (8 mL) και THF (8 mL), προστίθεται υδατικό διάλυμα LiOH 3N (150 μl) στους 0 °C και το μίγμα αναδεύεται για 20 λεπτά. Το μίγμα της αντίδρασης προστίθεται σε κορεσμένο υδατικό διάλυμα NH₄Cl (10 mL) και εκχυλίζεται με EtOAc (3 x 10 mL). Οι δύο φάσεις διαχωρίζονται και η οργανική εκπλένεται με με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl (3 x 10 mL). Ακολουθεί ξήρανση υπεράνω Na₂SO₄ και συμπύκνωση υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης εξάνιο/AcOEt (7:3) του ακάθαρτου μίγματος παρέχει τα προϊόντα 6(S)β, 6(S)γ και 6(S)δ. (απόδοση 90-95%, εναντιομερική περίσσεια 70-87%).

Γενική Πειραματική Διαδικασία για τη σύνθεση των χρωμανικών διολών 6(S)β, 6(S)γ και 6(S)δ (2^{ος} κύκλος).

Η ανωτέρω πειραματική διαδικασία ακολουθείται και για τις εμπλουτισμένες διόλες 6(S)β, 6(S)γ και 6(S)δ. Παρακάτω δίνονται οι τελικές αποδόσεις των ενζυμικών αντιδράσεων. (Όλα τα φασματοσκοπικά δεδομένα ήταν όμοια με τις αντίστοιχες ρακεμικές διόλες).

6(S)β: Απόδοση 38 %. $[\alpha]_D^{20} = -2.44$ ($c = 0.41$ σε CHCl_3).

HRMS θεωρ. για $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_3$: 222. 1256, πειραμ.: 222.1257

6(S)γ: Απόδοση 40 %. $[\alpha]_D^{20} = +6.3$ ($c = 0.98$ σε CHCl_3).

HRMS θεωρ. για $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_3$: 222. 1256, πειραμ.: 222.1257

6(S)δ: Απόδοση 38 %. $[\alpha]_D^{20} = +3.8$ ($c = 0.7$ σε CHCl_3).

HRMS θεωρ. για $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_3$: 208. 1099, πειραμ.: 1103

(Το προϊόν που χαρακτηρίστηκε ως **6(S)β** βρέθηκε μετά την ολική σύνθεση των τοκοτριενολών να είναι το εναντιομερές **6(R)β**. Ανάκτηση του αντίθετου εναντιομερούς από την ενζυμική αντίδραση έδωσε το σωστό (S) εναντιομερές, το οποίο κατέληξε στη φυσική β-τοκοτριενόλη.

Γενική Πειραματική Διαδικασία για τη σύνθεση των 2,5,8-τριμεθυλο-6-βενζυλοξυγρωμαν-2-μεθανόλης 8β, 2,7,8-τριμεθυλο-6-βενζυλοξυγρωμαν-2-μεθανόλης 8γ και 2,8-διμεθυλο-6-βενζυλοξυγρωμαν-2-μεθανόλης 8δ

Βενζυλοβρωμίδιο (2.68 mmol) και K_2CO_3 (2.68 mmol) προστίθενται σε διάλυμα των **6(S)β**, **6(S)γ** και **6(S)δ** (1.8 mmol) σε DMF (2 mL), σε r.t. για 12 ώρες. Εν συνεχεία το μίγμα της αντίδρασης εξουδετερώνεται με H_2O και HCl 1N και εκχυλίζεται με EtOAc (3 x 10 mL). Οι δύο φάσεις διαχωρίζονται και η οργανική εκπλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl (3 x 10 mL). Ακολουθεί ξήρανση υπεράνω Na_2SO_4 και συμπύκνωση υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης εξάνιο/AcOEt (9:1) του ακάθαρτου μίγματος παρέχει τα προϊόντα **8β**, **8γ** και **8δ**.

8β: Απόδοση 72 %. $R_f = 0.38$ (20% AcOEt σε εξάνιο). $[\alpha]_D^{20} = -0.87$ ($c = 0.46$ σε CHCl_3). ^1H NMR (CDCl_3 , 298K, 500 MHz) δ 7.48-7.26 (m, 4.3H), 6.69 (s, 1H), 5.00 (s, 2H), 3.65 (ABq, $J = 11.1$ Hz, $\Delta\nu = 19.5$ Hz, 2.4H), 2.72-2.66 (m, 2H), 2.18 (brs, 6H), 2.07-2.00 (m, 1H), 1.79-1.76 (m, 1H), 1.26 (s, 3H) ppm. ^{13}C NMR (CDCl_3 , 298K, 125 MHz) δ 149.7, 145.5, 137.9, 128.4, 127.6, 127.2, 123.3, 122.9, 120.5, 113.7, 75.1, 71.2, 69.3, 27.6, 20.4, 20.2, 16.2, 11.2 ppm. IR (KBr): ν 3300, 2940, 1705, 1440, 1160.

HRMS θεωρ. για $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_3$: 312. 1725, πειραμ.: 312.1720

8γ: Απόδοση 71 %. $R_f = 0.42$ (30% AcOEt σε εξάνιο). $[\alpha]_D^{20} = +0.81$ ($c = 0.37$ σε CHCl_3). ^1H NMR (CDCl_3 , 198K, 500 MHz) δ 7.56-7.27 (m, 5H), 6.53 (s, 1H), 4.99 (s, 2H), 3.64 (ABq, $J = 11.2$ Hz, $\Delta\nu = 25.2$ Hz, 2H), 2.86-2.80 (m, 1H), 2.75-2.69 (m, 1H), 2.21 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 2.04-1.89 (m, 1H), 1.72-1.67 (m, 1H), 1.26 (d, $J = 4.5$

Hz, 6H) ppm. ^{13}C NMR (CDCl_3 , 298K, 125 MHz) δ 164.3, 160.7, 150.3, 145.4, 137.9, 128.4, 127.6, 127.2, 126.9, 125.9, 125.1, 118.8, 117.5, 110.2, 109.5, 74.5, 70.9, 69.4, 68.3, 66.6, 29.7, 29.2, 29.0, 28.0, 27.8, 22.2, 20.7, 12.3, 12.0 ppm. IR (KBr): ν 3350, 2950, 1718, 1260.

HRMS θεωρ. για $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_3$: 312.1725, πειραμ.: 312.1720

8δ: Απόδοση 73 %. $R_f = 0.54$ (30% AcOEt σε εξάνιο). $[\alpha]_D^{20} = +2.5$ ($c = 0.7$ σε CHCl_3). ^1H NMR (CDCl_3 , 298K, 250 MHz) δ 7.48-7.27 (m, 5H), 6.67 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 6.55 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 4.98 (s, 2H), 3.62 (ABq, $J = 11.3$ Hz, $\Delta\nu = 16.2$ Hz, 2H), 2.92-2.64 (m, 2H), 2.15 (brs, 3H), 2.07-1.92 (m, 1H), 1.75-1.62 (m, 1H), 1.25 (s, 3H) ppm. ^{13}C NMR (CDCl_3 , 298K, 62.5 MHz) δ 151.8, 145.6, 137.5, 128.5, 127.8, 127.4, 127.2, 121.0, 115.9, 112.2, 76.1, 70.5, 69.5, 27.7, 22.2, 20.7, 16.2 ppm. IR (KBr): ν 3320, 2935, 1708, 1220.

HRMS θεωρ. για $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_3$: 298.1569, πειραμ.: 298.1559.

Γενική Πειραματική Διαδικασία για τη σύνθεση των τριφθορομεθανοσουλφονικού εστέρα της 2,5,8-τριμεθυλο-6-βενζυλοξυγρωμαν-2-μεθανόλης 9β, τριφθορομεθανοσουλφονικού εστέρα της 2,7,8-τριμεθυλο-6-βενζυλοξυγρωμαν-2-μεθανόλης 9γ και τριφθορομεθανοσουλφονικού εστέρα της 2,8-διμεθυλο-6-βενζυλοξυγρωμαν-2-μεθανόλης 9δ

Τριφθοροξικός ανυδρίτης (1.3 mmol) προστίθεται σε διάλυμα των **8β**, **8γ** και **8δ** (1.3 mmol) σε πυριδίνη (2 mL) στους 0 °C. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 2 ώρες. Εν συνεχεία εξουδετερώνεται με HCl 1N (2 mL) και εκχυλίζεται με EtOAc (3 x 10 mL). Οι δύο φάσεις διαχωρίζονται και η οργανική εκπλένεται με νερό (10 mL) και με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl (2 x 10 mL). Ακολουθεί ξήρανση υπεράνω Na_2SO_4 και συμπύκνωση υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης εξάνιο/AcOEt (8:2) του ακάθαρτου μίγματος παρέχει τα προϊόντα **9β**, **9γ** και **9δ**.

9β: Απόδοση 96 %. $R_f = 0.66$ (20% AcOEt σε εξάνιο). $[\alpha]_D^{20} = -0.23$ ($c = 0.51$ σε CHCl_3). ^1H NMR (500 MHz, 298K, CDCl_3) δ 7.47-7.30 (m, 5H), 6.68 (s, 1H), 4.99 (s, 2H), 4.47 (ABq, $J = 10.1$ Hz, $\Delta\nu = 18.8$ Hz, 2.4H), 2.70 (t, $J = 6.9$ Hz, 2.2H), 2.15 (brs, 6.6H), 2.03-1.96 (m, 1H), 1.89-1.83 (m, 1H), 1.37 (s, 3H) ppm. ^{13}C NMR (125MHz, 298K, CDCl_3) δ 150.2, 144.8, 137.9, 128.4, 127.7, 127.3, 123.9, 122.9, 119.5, 117.4, 114.0, 79.6, 71.3, 29.7, 27.9, 21.1, 19.9, 16.0, 11.2 ppm. IR (KBr): ν 2936, 1482, 1413, 1245, 1235, 1210, 1151, 962.

HRMS θεωρ. για C₂₁H₂₃F₃O₅S: 444.1218, πειραμ.: 444.1249.

9γ: Απόδοση 95%. R_f = 0.72 (30% EtOAc σε εξάνιο). [α]_D²⁰ = +0.70 (c = 0.52 σε CHCl₃). ¹H NMR (500 MHz, 298K, CDCl₃) δ 7.46-7.25 (m, 5H), 6.49 (s, 1H), 4.97 (s, 2H), 4.44 (ABq, J = 10.2 Hz, Δν = 15.4 Hz, 2H), 2.76 (ABq, J = 8.4 Hz, Δν = 15.6 Hz, 2H), 2.18 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.00-1.80 (m, 1H), 1.78-1.70 (m, 1H), 1.37 (s, 3H) ppm. ¹³C NMR (125 MHz, 298K, CDCl₃) δ 150.6, 144.5, 137.8, 128.4, 127.7, 127.1, 126.4, 125.5, 121.1, 116.5, 116.1, 109.8, 109.5, 79.6, 73.4, 70.8, 46.5, 29.7, 27.8, 21.7, 21.3, 12.1, 11.8 ppm. IR (KBr): ν 3744, 2925, 1542, 1459, 1207, 945.

HRMS θεωρ. για C₂₁H₂₃F₃O₅S: 444.1218, πειραμ.: 444.1239.

9δ: Απόδοση 95%. R_f = 0.50 (20% EtOAc σε εξάνιο). [α]_D²⁰ = +1.96 (c 0.97 σε CHCl₃). ¹H NMR (500 MHz, 298K, CDCl₃) δ 7.51-7.32 (m, 5H), 6.72 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 5.01 (s, 2H), 4.49 (ABq, J = 10.2 Hz, Δν = 18.8 Hz, 2H), 2.90-2.73 (m, 2H), 2.19 (brs, 3H), 2.04-1.96 (m, 1H), 1.88-1.81 (m, 1H), 1.41 (s, 3H) ppm. ¹³C NMR (125 MHz, 298K, CDCl₃) δ 152.2, 144.8, 137.4, 128.5, 127.8, 127.7, 127.4, 120.0, 116.3, 112.1, 79.5, 73.6, 70.5, 27.8, 21.8, 21.3, 16.0 ppm. IR (KBr): ν 2929, 2852, 1604, 1484, 1414, 1250, 1216, 1146, 975, 950, 623. Το προϊόν **9δ** ήταν ασταθές για να δώσει σωστή στοιχειακή ανάλυση και HRMS. Ωστόσο τα προϊόντα **12δ** και **13δ**, τα οποία συντέθηκαν από το **9δ** έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Γενική Πειραματική Διαδικασία για τη σύνθεση των 2'-φαινυλοσουλφονυλο-β-τοκοτριενυλο-βενζυλαιθέρα 12β, 2'-φαινυλοσουλφονυλο-γ-τοκοτριενυλο-βενζυλαιθέρα 12γ και 2'-φαινυλοσουλφονυλο-δ-τοκοτριενυλο-βενζυλαιθέρα

nΒουτυλολίθιο (1.6 M σε εξάνιο, 1.2 mmol) προστίθεται σε (2*E*,6*E*,10*E*)-φαρνεσυλο-βενζυλοσουλφόνη **11**⁵ (0.9 mmol) και HMPA (504 μL) σε THF (3 mL) στους -78 °C. Το ανιόν αναδεύεται για 45 λεπτά στους -78 °C. Ακολουθεί προσθήκη των **9β**, **9γ** και **9δ** (1.1 mmol) σε THF (350 μL) και ανάδευση για 2 ώρες με σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας από τους -78 °C σε r.t.. Το μίγμα της αντίδρασης προστίθεται σε κορεσμένο υδατικό διάλυμα NH₄Cl (5 mL) και HCl 1N (1 mL). Εκχυλίζεται με EtOAc (3 x 10 mL). Οι δύο φάσεις διαχωρίζονται και η οργανική εκπλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl (3 x 10 mL). Ακολουθεί ξήρανση υπεράνω Na₂SO₄ και συμπύκνωση υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης εξάνιο/Ακετόνη (9:1) του ακάθαρτου μίγματος παρέχει τα προϊόντα **12β**, **12γ** και **12δ**.

12β: Απόδοση 62 %. $R_f = 0.48$ (20% AcOEt σε εξάνιο). $[\alpha]_D^{20} = -28.30$ ($c = 1.29$ σε CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 298K, 500 MHz) δ 7.86 + 7.79 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.67-7.30 (m, 8H), 6.63 + 6.62 (s, 1H), 5.19-4.95 (m, 5H), 4.17 + 4.10 (t, $J = 10.2$ Hz, 1H), 2.67-2.50 (m, 2H), 2.18-1.55 (m, 30H), 1.32-1.16 (m, 3H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 298K, 125 MHz) δ 149.5, 149.4, 145.5, 145.3, 144.6, 144.0, 137.9, 137.7, 137.6, 135.4, 135.3, 133.2, 133.0, 131.1, 129.3, 128.8, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 127.5, 127.4, 127.1, 124.1, 123.4, 123.4, 123.2, 122.8, 122.7, 119.8, 119.7, 118.9, 118.8, 113.7, 113.6, 73.7, 73.4, 71.2, 71.1, 61.4, 61.0, 39.7, 39.6, 39.5, 37.2, 37.1, 32.1, 31.7, 26.5, 25.9, 25.8, 25.5, 24.0, 23.9, 20.5, 20.3, 17.5, 16.5, 16.4, 16.0, 15.8, 14.0, 11.1, 11.0 ppm. IR (neat): ν 3075, 2921, 2852, 1588, 1486, 1308, 1235, 1090, 1030, 842.

HRMS θεωρ. για $\text{C}_{41}\text{H}_{56}\text{NO}_4\text{S}$: $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 658.3930, πειραμ.: 658.3910.

12γ: Απόδοση 63%. $R_f = 0.44$ (20% EtOAc σε εξάνιο). $[\alpha]_D^{20} = +27.87$ (c 0.94 σε CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 298K, 500 MHz) δ 7.87 + 7.81 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.65-7.34 (m, 8H), 6.50 + 6.45 (s, 1H), 5.20-4.99 (m, 5H), 4.19 + 4.11 (t, $J = 9.5$ Hz, 1H), 2.74-2.58 (m, 2H), 2.20-1.62 (m, 30H), 1.32-1.17 (m, 3H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 298K, 125 MHz) δ 150.1, 150.1, 145.0, 144.7, 144.1, 137.9, 137.7, 137.5, 135.5, 135.5, 133.3, 133.1, 131.3, 129.4, 128.9, 128.6, 128.5, 128.3, 128.2, 127.5, 127.5, 127.1, 125.8, 125.5, 124.8, 124.8, 124.1, 123.4, 123.4, 118.9, 118.8, 116.8, 116.8, 110.0, 110.0 ppm. IR (neat): ν 2972, 2923, 2857, 2362, 1484, 1447, 1426, 1382, 1302, 1230, 1145, 1100, 1085, 742, 691.

HRMS θεωρ. για $\text{C}_{41}\text{H}_{56}\text{NO}_4\text{S}$: $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ 658.3930, πειραμ.: 658.3890.

12δ: Απόδοση 60%. $R_f = 0.40$ (20% EtOAc σε εξάνιο). $[\alpha]_D^{20} = +20.70$ (c 0.99 σε CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 298K, 500 MHz) δ 7.87 + 7.82 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.67-7.31 (m, 8H), 6.70-6.48 (m, 2H), 5.21-4.96 (m, 5H), 4.18 + 4.09 (t, $J = 10.1$ Hz, 1H), 2.78-2.54 (m, 2H), 2.19-1.57 (m, 27H), 1.32-1.14 (m, 3H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 298K, 62.5 MHz) δ 151.7, 151.6, 144.7, 144.1, 137.7, 137.6, 137.5, 135.6, 135.5, 133.3, 133.2, 131.3, 129.4, 129.0, 128.6, 128.6, 128.4, 128.3, 127.7, 127.4, 127.1, 126.8, 124.2, 123.4, 123.4, 120.3, 118.9, 118.9, 115.9, 115.8, 112.1, 112.0, 74.7, 74.5, 73.1, 70.4, 61.5, 61.0, 50.1, 39.8, 39.7, 39.6, 37.5, 37.2, 32.1, 31.7, 29.6, 28.0, 26.6, 26.0, 25.9, 25.6, 25.3, 24.2, 24.1, 22.4, 22.2, 21.9, 21.8, 21.3, 17.6, 16.5, 16.4, 16.2, 15.9, 13.4 ppm. IR (neat): ν 2972, 2921, 2853, 1603, 1480, 1450, 1304, 1224, 1147, 1086, 1058, 741, 696, 596.

HRMS θεωρ. για $\text{C}_{40}\text{H}_{54}\text{NO}_4\text{S}$: $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ 644.3774, πειραμ.: 644.3710.

Γενική Πειραματική Διαδικασία για τη σύνθεση των β-τοκοτριενόλης 13β, γ-τοκοτριενόλης 13γ και δ-τοκοτριενόλης 13δ

Λίθιο (1.15 mmol) και υγρή MeNH₂ (1.5 mL) προστίθενται σε διάλυμα της σουλφόνης **12β**, **12γ** και **12δ** (0.28 mmol) σε Et₂O (1.5 mL) στους -78 °C. Αναδεύεται στους -78 °C για 45 λεπτά και εν συνεχεία εξουδετερώνεται με προσθήκη MeOH. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 12 ώρες σε r.t.. Ακολουθεί προσθήκη σε κορεσμένο υδατικό διάλυμα NH₄Cl (10 mL) και εκχύλιση με EtOAc (3 x 15 mL). Οι δύο φάσεις διαχωρίζονται και η οργανική εκπλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl (2 x 10 mL). Ακολουθεί ξήρανση υπεράνω Na₂SO₄ και συμπύκνωση υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης εξάνιο/Ακετόνη (9:1) του ακάθαρτου μίγματος παρέχει τα προϊόντα **13β**, **13γ** και **13δ**.

13β Απόδοση 72 %. R_f = 0.20 (10% Ακετόνης σε εξάνιο). [α]_D²⁰ = -0.90 (c = 0.16 σε CHCl₃). ¹H NMR (CDCl₃, 298K, 500 MHz) δ 6.45 (s, 1H), 5.17-5.00 (m, 3H), 4.15 (brs, 1H), 2.58 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.13-1.94 (m, 18H), 1.78 (m, 2H), 1.65 (s, 3H), 1.56 (brs, 9H), 1.22 (s, 3H) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 298K, 500 MHz) δ 145.9, 139.9, 135.0, 134.9, 131.2, 124.4, 124.4, 124.2, 123.4, 120.3, 119.2, 115.4, 74.2, 39.7, 39.6, 39.4, 31.5, 26.8, 26.6, 25.7, 23.7, 22.2, 20.8, 17.7, 16.0, 15.9, 15.8, 10.9 ppm. IR (neat): ν 3370, 2945, 2935, 1616, 1450, 1233, 1110.

HRMS θεωρ. για C₂₈H₄₂O₂: 410.3185, πειραμ.: 410.3196.

13γ: Απόδοση 73%. R_f = 0.20 (10% Ακετόνης σε εξάνιο). [α]_D²⁰ = -5.7 (c 0.59 σε CHCl₃). ¹H NMR (CDCl₃, 298K, 500 MHz) δ 7.38 (s, 1H), 6.39 (s, 1H), 5.17-5.11 (m, 3H), 4.34 (s, 1H), 2.69 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 2.19-1.97 (m, 18H), 1.83-1.72 (m, 2H), 1.70 (s, 3H), 1.62 (s, 3H), 1.61 (s, 3H), 1.28 (s, 3H) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 298K, 500 MHz) δ 146.2, 145.6, 145.5, 139.9, 131.2, 128.3, 125.7, 124.4, 124.3, 124.1, 121.6, 118.2, 112.7, 75.2, 39.8, 39.6, 31.4, 26.7, 26.6, 25.6, 24.3, 24.0, 22.2, 22.2, 17.6, 15.9, 15.8, 11.8 ppm. IR (neat): ν 2966, 2972, 2854, 1446, 1374, 1227, 1087, 937, 849, 743. HRMS θεωρ. για C₂₈H₄₂O₂: 410.3185, πειραμ.: 410.3207.

13δ: Απόδοση 75%. R_f = 0.12 (10% Ακετόνης σε εξάνιο). [α]_D²⁰ = -1.32 (c 0.38 σε CHCl₃). ¹H NMR (CDCl₃, 298K, 500 MHz) δ 6.49 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.40 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 5.19-5.07 (m, 3H), 4.20 (brs, 1H), 2.71 (m, 2H), 2.15 (s, 3H), 2.11-1.95 (m, 15H), 1.86-1.72 (m, 2H), 1.70 (s, 3H), 1.62 (brs, 9H), 1.28 (s, 3H) ppm. IR (neat): ν 3389, 2965, 2932, 2856, 1606, 1473, 1378, 1259, 1221, 1098, 798.

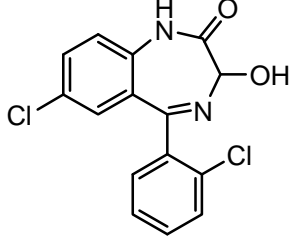
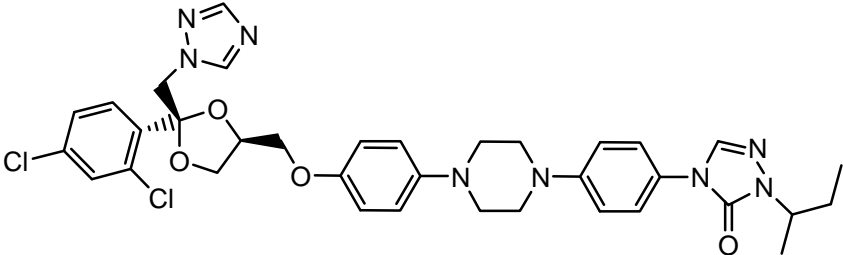
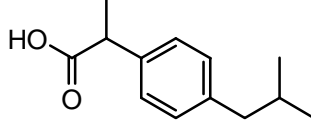
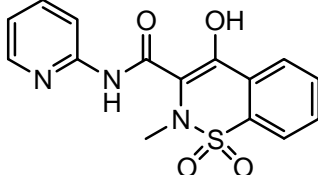
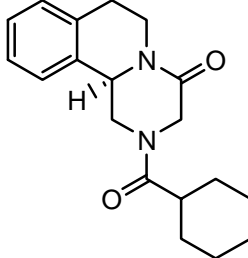
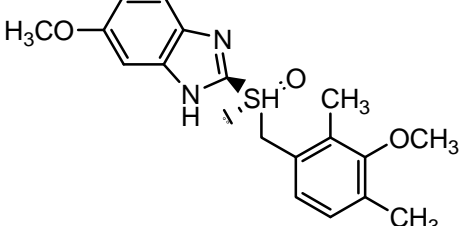
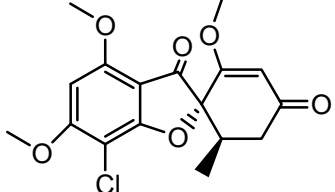
HRMS θεωρ. για C₂₇H₄₀O₂: 396.3028, πειραμ.: 396.3042.

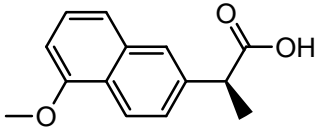
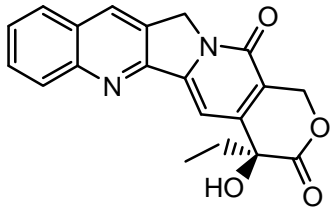
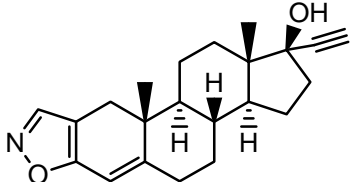
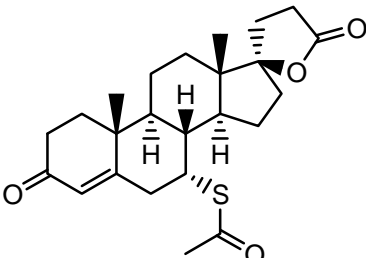
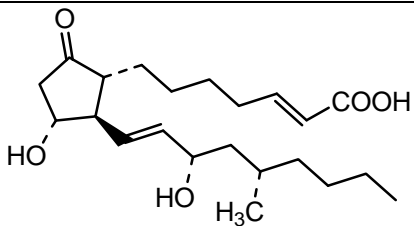
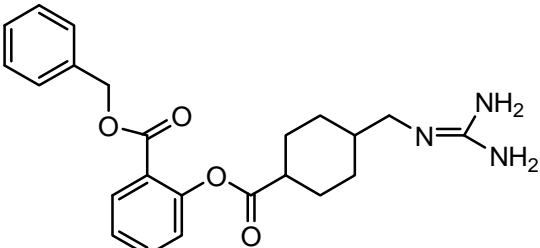
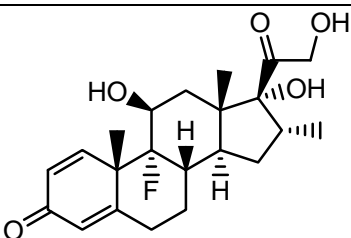
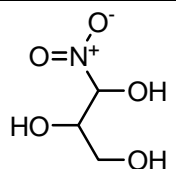
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3

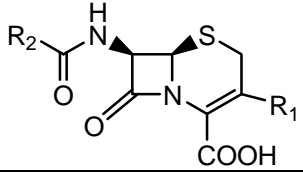
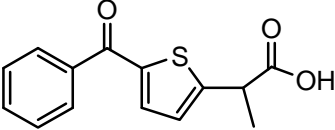
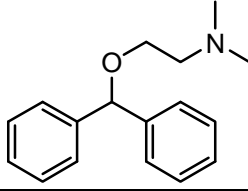
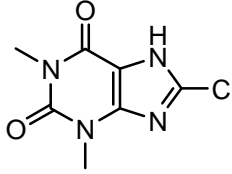
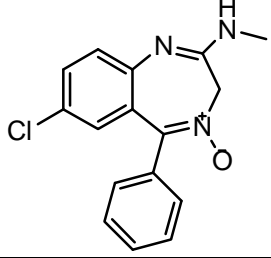
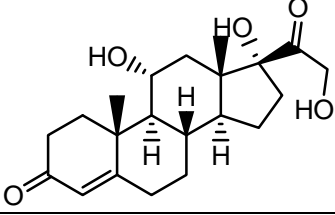
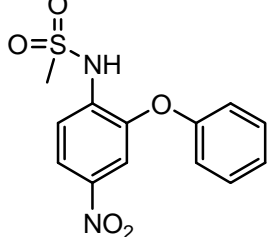
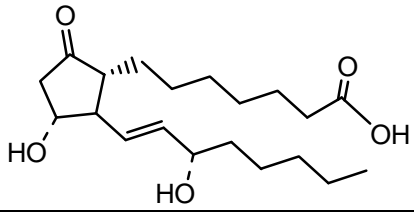
ΔΟΜΕΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3

ΔΟΜΕΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

Βιοδραστική ουσία	Δομή
Λοραζεπάμη	
Ιτρακοναζόλη	
Ιβουπροφένη	
Πιροξικάμη	
Πραζικουαντέλη	
Ομεπραζόλη	
Γκριζεοφουλβίνη	

Ναπροξένη	
Καμποθεκίνη	
Δαναζόλη	
Σπιρονολακτόνη	
OP-1206	
Μπενεξάτη	
Δεξαμεθαζόνη	
Νιτρογλυκερίνη	

Κεφαλοσπορίνη	
Τιαπροφενικό οξύ	
Διφαινυλδραμίνη	
Χλωροθεοφυλλίνη	
Χλωροδιαζεποξείδιο	
Υδροκορτιζόνη	
Νιμεσουλίδη	
PEG ₁ / Αλπροσταδύλη	

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

- (1) J.-M. Lehn, *Supramol. Chemistry: Concepts and Perspectives*, VCH, **1995**.
- (2) J.-M. Lehn, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1988**, 27, 89.
- (3) H.-J. Schneider, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1991**, 30, 1417.
- (4) F. Voegtle, *Supramol. Chemistry*, Wiley, **1991**.
- (5) J.-M. Lehn, *Science* **1985**, 227, 849.
- (6) W. Saenger, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1980**, 19, 344.
- (7) K. A. Connors, *Chem. Rev.*, **1997**, 97, 1325.
- (8) K. Harata, *Chem. Rev.*, **1998**, 98, 1803.
- (9) M. V. Rekharsky, Y. Inoue, *Chem. Rev.*, **1998**, 98, 1875.
- (10) W. Saenger, J. Jacob, K. Gessler, T. Steiner, D. Hoffmann, H. Sanbe, K. Koizumi, S. M. Smith, T. Takaha, *Chem. Rev.*, **1998**, 98, 1787.
- (11) J. Jacob, K. Gessler, D. Hoffman, H. Sanbe, K. Koizumi, S. M. Smith, T. Takaha, W. Saenger, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1998**, 37, 606.
- (12) J. Szejtli, *Cyclodextrin Technology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, **1988**.
- (13) R. J. Clarke, J. H. Coates, S. F. Lincoln, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1988**, 46, 205.
- (14) K. A. Martin, A. W. Czarnik, *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 35, 6781.
- (15) N. Zhong, H. Byun, R. Bittman, *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 2919.
- (16) B. Brady, N. Lynam, T. O'Sullivan, C. Ahern, R. Darcy., *Org. Synth.*, **1999**, 77, 20.
- (17) A. Ueno, F. Moriwaki, T. Osa, F. Hamada, K. Murai, *Tetrahedron*, **1987**, 43, 1571.
- (18) L. D. Melton, K. N. Slessor, *Carbohydr. Res.*, **1971**, 18, 29.
- (19) D. W. Griffiths, M. L. Bender, *Adv. Catal.*, **1973**, 54, 625.
- (20) P. R. Ashton, R. Königer, J. F. Stoddart, *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 903.
- (21) H. Parrot-Lopez, E. Leray, A. W. Coleman, *Supramol. Chem.*, **1993**, 3, 37.
- (22) H. Ikeda, M. Nakamura, N. Ise, F. Toda, A. Ueno, *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 1411.
- (23) A. Khan, P. Forgo, K. Stine, V. Souza, *Chem. Rev.*, **1988**, 98, 1977.

- (24) K. Takeo, H. Mitoh, K. Uemura, *Carbohydr. Res.*, **1989**, *187*, 203.
- (25) R. Breslow, M. F. Czarniecki, J. Emert, H. Hamaguchi, *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, *102*, 762.
- (26) A. Gadelle, J. Defaye, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1991**, *30*, 78.
- (27) N. Mourtzis, M. Paravatou, I. Mavridis, M. Roberts, K. Yannakopoulou, *Chem. Eur. J.*, **2008**, *14*, 4188.
- (28) F. Guillo, B. Hamelin, L. Jullien, J. Canceill, J.-M. Lehn, L. De Robertis, H. Driguez, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1995**, *132*, 857.
- (29) H. Parrot-Lopez, C.-C. Ling, P. Zhang, A. Baszkin, G. Albrecht, C. de Rango, A. W. Coleman, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 5479.
- (30) N. Mourtzis, K. Eliadou, C. Aggelidou, V. Sophianopoulou, I. Mavridis, K. Yannakopoulou, *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, *5*, 125
- (31) J. M. Adam, J. Bennett, A. Bom, J. K. Clark, H. Feilden, E. J. Hutchinson, R. Palin, A. Prosser, D. C. Rees, G. M. Rosair, D. Stevenson, G. J. Tarver, M.-Q. Zhang, *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 1806.
- (32) D. Duchene, *Cyclodextrins and their Industrial Uses*, Editions de Sante, Paris, **1987**.
- (33) J. Szejtli, *Cyclodextrin Technology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, **1988**.
- (34) K. Uekama, *Pharm. Int.*, **1985**, *6*, 61.
- (35) J. Szejtli, *J. Incl. Phenom. Mol. Recognit. Chem.*, **1992**, *14*, 25.
- (36) R. Challa, A. Ahura, J. Ali. R. K. Khar, **AAPS PharmSciTech.**, **2005**, *6*
- (37) W. Saenger, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1980**, *19*, 344.
- (38) M. L. Bender, M. Komiyama, *Cyclodextrin Chemistry*, Springer-Verlag, Berlin, **1978**.
- (39) *Cyclodextrins and Their Complexes*, Helena Dodziuk, Wiley-VCH, **2002**.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

- (1) <http://www.ika.gr/gr/infopages/healthservices/medmat/antibiotics.pdf>
- (2) A. Schatz, E. Bugie, S. A. Waksman, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **1944**, *55*, 66.
- (3) S. A. Waksman, H. A. Lechevalier, D. A. Harris, *J. Clin. Invest.*, **1949**, *28*, 934.
- (4) H. Umezawa, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1958**, *76*, 20.

- (5) M. J. Weinstein, G. M. Luedemann, E. M. Oden, G. H. Wagman, J. P. Rosselet, J. A. Marquez, C. T. Coniglio, W. Charney, H. L. Herzog, J. Black, *J. Med. Chem.*, **1963**, 122, 463.
- (6) S. Kondo, K. Hotta, *J. Infect. Chemother.*, **1999**, 5, 1.
- (7) *Aminoglycoside Antibiotics*, ed. H. Umezawa, I. R. Hooper, Springer-Verlag, New York, Heidelberg, **1982**.
- (8) M. Hainrichson, I. Nudelman, T. Baasov, *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, 6, 227.
- (9) S. Jana, J. K. Deb, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2006**, 70, 140.
- (10) D. Banerjee, D. Stableforth, *Drugs*, **2000**, 60, 1053.
- (11) D. Pashov, S. Vangelov, L. Diakov, *Vet. Med. Nauki*, **1987**, 24, 41.
- (12) <http://medic.med.uth.tmc.edu/path/00001497.htm>
- (13) Ιατρική Μικροβιολογία, Αντωνιάδης Α., Αντωνιάδης Γρ., Λεγάκης Ν., Τσελέντης Ι., Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης.
- (14) http://sitemaker.umich.edu/mc13/ciprofloxacin_medicinal_chemistry
- (15) D. Maffeo, L. Leondiadis, I. M. Mavridis, K. Yannakopoulou, *Org. Biomol. Chem.*, **2006**, 4, 1297.
- (16) G. D. Wright, A. M. Berghuis, S. Mobashery, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1998**, 456, 27.
- (17) S. Magnet, J. S. Russel, *Chem. Rev.*, **2005**, 105, 477.
- (18) Αντωνιάδης Α., Αντωνιάδης Γρ., Λεγάκης Μ., Τσελέντης Ι., Ιατρική Μικροβιολογία, Τόμος Ι, Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης
- (19) Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής **1999**, 16(4):19, 409.
- (20) M. J. Everett and L. J. V Piddock.: ‘Mechanisms of resistance to fluoroquinolones’. p. 259. J. Kuhlmann, A. Dahlhoff. and H. J. Zeiler (eds), Quinolone antibacterials **1998**. Springer-Verlag K.G., Berlin, Germany.
- (21) K. Dyke and P. Gregory: ‘Resistance mediated by beta-lactamases’. The staphylococci in Human Disease, Crossley K.B. and Archer G.L. (eds), Churchill Livingstone, Inc., New York, 139, **1997**.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

- (1) L. Coutte, S. Alonso, N. Reveneau, E. Willery, B. Quatannens, C. Loch, F. J. Dubuisson, *J. Exp. Med.*, **2003**, 197, 735.
- (2) A. Fleer, J. Verhof *J. Invest. Surg.*, **1989**, 2, 361.
- (3) A. Imberty, Y. M. Chabre, R. Roy, *Chem. Eur. J.*, **2008**, 14, 7490.

- (4) I. Ofek, D. L. Hasty, R. J. Doyle, *Bacterial Adhesion to Animal Cells and Tissues*, ASM Press, Washington, **2003**.
- (5) J. P. Nataro, P. S. Cohen, H. L. T. Mobley, J. N. Weiser. pp. 476, ASM Press, Washington, **2005**.
- (6) Klemm, *EMBO J.*, **1986**, 5, 1389.
- (7) D. L. Gally, J. A. Bogan, B. I. Eisenstein, I. C. Blomfield, *J. Bacteriol.*, **1993**, 175, 6186.
- (8) J. Goldhar, *Methods Enzymol.*, **1995**, 253, 43.
- (9) V. Horejsi, J. Kocourek, *Biochim. Biophys. Acta*, **1978**, 538, 299.
- (10) N. Sharon, *Biochim. Biophys. Acta*, **2006**, 1760, 527.
- (11) B. Madison, I. Ofek, S. Clegg, S. N. Abraham, *Infect. Immun.*, **1994**, 62, 843.
- (12) I. Ofek, D. L. Hasty, S. N. Abraham, N. Sharon, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **2000**, 485, 183.
- (13) M. A. Schembri, K. Kjaergaard, E. V. Sokurenko, P. Klemm, *J. Infect. Dis.*, 1, **2001**, S28–S31.
- (14) J. D. Schilling, M. A. Mulvey, S. J. Hultgren, *J. Infect. Dis.*, 183 (Suppl. 1), **2001**, S36–S40.
- (15) C. S. Hung, J. Bouckaert, D. Hung, J. Pinkner, C. Widberg, A. DeFusco, C. G. Auguste, R. Strouse, S. Langermann, G. Waksman, S. J. Hultgren, *Mol. Microbiol.*, **2002**, 44, 903.
- (16) D. Choudhury, A. Thompson, V. Stojanoff, S. Langermann, J. Pinkner, S. J. Hultgren, S. D. Knight, *Science*, **1999**, 285, 1061.
- (17) I. Kahane, I. Ofek, *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 408, Plenum Press, New York, **1996**, p. 288.
- (18) D. Zopf, S. Roth, *Lancet*, **1996**, 347, 1017.
- (19) K. A. Karlsson, *Mol. Microbiol.*, **1998**, 29, 1.
- (20) N. Sharon, I. Ofek, *Glycoconj. J.*, **2000**, 17, 659.
- (21) C. G. Kelly, J. S. Younson, *Expert Opin. Investig. Drugs*, **2000**, 9, 1711.
- (22) I. Ofek, D. L. Hasty, N. Sharon, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **2003**, 38, 181.
- (23) I. Idanpaan-Heikkila, P. M. Simon, D. Zopf, T. Vullo, P. Cahill, K. Sokol, E. Tuomanen, *J. Infect. Dis.*, **1997**, 176, 704.
- (24) J. V. Mysore, T. Wigginton, P. M. Simon, D. Zopf, L. M. Heman-Ackah, A. Dubois, *Gastroenterology*, **1999**, 117, 1316.

- (25) P. Ukkonen, K. Varis, M. Jernfors, E. Herva, J. Jokinen, E. Ruokokoski, D. Zopf, T. Kilpi, *Lancet*, **2000**, 356, 1398.
- (26) F. Parente, C. Cucino, A. Anderloni, G. Grandinetti, G.B. Porro, *Helicobacter*, **2003**, 8, 252.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

- (1) N. Mourtzis, K. Eliadou, C. Aggelidou, V. Sophianopoulou, M. I. Mavridis, K. Yannakopoulou, *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, 5, 125.
- (2) N. Mourtzis, M. Paravatou, I. M. Mavridis, M. L. Roberts, K. Yannakopoulou, *Chem. Eur. J.*, **2008**, 14, 4188.
- (3) J. M. Adam, D. J. Bennett, A. Bom, J. K. Clark, H. Feilden, E. J. Hutchinson, R. Palin, A. Prosser, D. C. Rees, G. M. Rosair, D. Stevenson, G. J. Tarver, M-Q Zhang, *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 1806.
- (4) P. R. Ashton, R. Königer, J. F. Stoddart, *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 903.
- (5) D. Vizitiu, C. S. Walkinshaw, B. I. Gorin, G. R. J. Thacher, *Org. Chem.*, **1997**, 62, 8760.
- (6) A. Gadelle, J. Defaye, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1991**, 30, 78.
- (7) K. Feichtinger Zapf Ch., H. L. Sings., M. Goodman *J. Org. Chem.*, **1998**, 63, 3804.
- (8) A. D. Fulton, R. A. Pease, F. J. Stoddart, *Isr. J. Chem.*, **2000**, 40, 325.
- (9) B. Brady, N. Lynam, T. O'Sullivan, C. Ahern, R. Darcy, *Org. Synth.* **2000**, 77, 220.
- (10) T. Furuike, S. Aiba, S-I Nishimura, *Tetrahedron*, **2000**, 56, 9909.
- (11) T. Furuike, R. Sadamoto, K. Niikura, K. Monde, N. Sakairi, S-I. Nishimure, *Tetrahedron*, **2005**, 61, 1737.
- (12) D. A. Fulton, J. F. Stoddart, *Org. Lett.*, **2000**, 2, 1113.
- (13) E. J. F. Franssen, R. W. Jansen, M. Vaalburg, D. K. F. Meijer. *Biochem. Pharmacol.*, **1993**, 45, 1215.
- (14) K. Koizumi, Y. Okada, N. Nakanishi, T. Tanimoto, Y. Takagi, M. Ishikawa, H. Ishigami, K. Hara, H. Hashimoto, *J. Carbohydr. Chem.*, **1991**, 110, 477.
- (15) R. Heck, F. Dumarcay, A. Marsura, *Chem. Eur. J.*, **2002**, 8, 11, 2438.
- (16) T. Kraus, M. Buděšínský, J. Závada, *Eur. J. Org. Chem.*, **2000**, 3133.

- (17) D. Maffeo, M. Lampropoulou, Y. G. Lazarou, G. Fardis, I. M. Mavridis, H. Pratsinis, D. Kletsas, D. A. I. Mavridou, E. Urso, K. Yannakopoulou, submitted
- (18) J. Boger, R. J. Corcoan, J. M. Lehn, *Helv. Chim. Acta*, **1978**, *61*, 2190.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

- (1) John McMurry, Organic Chemistry, 5th Edition
- (2) Levi Fugedi The Organic Chemistry of Sugars
- (3) Morrison Organic Chemistry 4th Edition
- (4) Juaristi E., Cuevas G., *Tetrahedron*, **1992**, *48*, 24, 5019.
- (5) G. R. J Thacher, The Anomeric Effect And Related Stereoelectronic Effects
- (6) R. U. Lemieux. et al., *Can. J. Chem.*, **1969**, *47*, 4427.
- (7) J. Dahmén, T. Frejd, G. Gronmerg, T. Lave, G. Magnusson, G. Noori, *Carbohydr. Res.*, **1983**, *116*, 303.
- (8) A. Y. Chernyak, G. V. M. Sharma, L. O. Kononov, P. R. Krishna, A. B. Levinsky, N. K. Kochetkov, *Carbohydr. Res.*, **1992**, *223*, 303.
- (9) O. Blixt, K. Allin, L. Pereira, A. Datta, J. C. Paulson, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 5739.
- (10) J. Tvaroska T. Bleha Anomeric & Exo-Anomeric Effects in Carbohydrate Chemistry, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1983**, 4745.
- (11) J. F Stoddart., Stereochemistry of Carbohydrates, Wiley Interscience, New York, **1971**, 1.
- (12) *Russian Chemical Reviews*, **1971**, *40*, 4.
- (13) L. Ermolenko, N. A. Sasaki, *J. Org. Chem.*, **2006**, *71*, 693.
- (14) W. Hayes, H. M. I. Osborn, S. D. Osborne, R. A. Rastall, B. Romagnoli, *Tetrahedron*, **2003**, *59*, 7983.
- (15) T. Hasegawa, T. Fujisawa, M. Numata, T. Matsumoto, M. Umeda, R. Karinaga, M. Mizu, K. Koumoto, T. Kimura, S. Okumura, K. Sakurai, S. Shinkai, *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, *2*, 3091.
- (16) T. K. Lindhorst, S. Kötter, U. Krallmann-Wenzel, St. Ehlers, *J. Chem. Soc., Perkin Trans., 1*, **2001**, 823.
- (17) M. Izumi, S. Okumura, H. Yuasa, H. Hashimoto, *J. Carbohydr. Chem.*, **2003**, *22*, 5, 317.

- (18) V. Ladmiral, G. Mantovani, G. J. Clarkson, S. Cauet, J. L. Irwin, D. M. Haddleton, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 4823.
- (19) J. Ni, S. Singh, L Wang, *Bioconjugate Chem.*, **2003**, *14*, 232.
- (20) A. Pater, T. K. Lindhorst, *Eur. J. Org. Chem.*, **2002**, 79.
- (21) R. Roy, J. M. Kim, *Tetrahedron*, **2003**, *59*, 3881.
- (22) M. D. Disney, P. H. Seeberger, *Chem. Biol.*, **2004**, *11*, 1701.
- (23) L. A. Andersson, G. T. Dolphin, J. Kihlberg, L. Baltzer, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **2000**, 459, 464.
- (24) L. Andersson, G. Stenhagen, L. Baltzer, *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 1366.
- (25) P. R. Ashton, S. E. Boyd, C. L. Brown, S. A. Nepogodiev, E. W. Meijer, H. W. I. Peerlings, J. F. Stoddart, *Chem. Eur. J.*, **1997**, *3*, 974.
- (26) M. Elofsson, B. Walse, J. Kihlberg, *Tetrahedron Lett.*, **1991**, *32*, 51, 7613.
- (27) M. Elofsson, S. Roy, B. Walse, J. Kihlberg, *Carbohydr. Res.*, **1993**, *246*, 89.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

- (1) F. Attioui, A. Al-Omar, E. Leray, H. Parrot-Lopez, C. Finance, R. Bonaly, *Biol. Cell.*, **1994**, *82*, 161.
- (2) N. Sharon, *Biochim. Biophys. Acta*, **2006**, *1760*, 527.
- (3) A. Vargas-Berenguel, F. Ortega-Caballero, J. M. Casas-Solvas, *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, **2007**, *4*, 1.
- (4) Florence Sallas, Kenichi Niikura, Shin-Ichiro Nishimura, *Chem. Commun.*, **2004**, 596.
- (5) L. De Robertis, C. Lancelon-Pin, H. Driguez, F. Attioui, R. Bonaly, A. Marsura, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1994**, *4*, 1127.
- (6) R. Kassab, C. Felix, H. Parrot-Lopez, R. Bonaly, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 7555.
- (7) V. Lainé, A. Coste-Sarguet, A. Gadelle, J. Defaye, B. F. Perly, F. Djedaïni-Pilard, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1995**, 1479.
- (8) D. A. Fulton, A. R. Pease, J. F. Stoddart, *Isr. J. Chem.*, **2000**, *40*, 325.
- (9) E. J. F. Franssen, R. W. Jansen, M. Vaalburg, D. K. F. Meijer, *Biochem. Pharmacol.*, **1993**, *45*, 1215.
- (10) T. Furuike, S. Aiba, S-I Nishimura, *Tetrahedron*, **2000**, *56*, 9909.
- (11) T. Furuike, R. Sadamoto, K. Niikura, K. Monde, N. Sakairi, S-I. Nishimura, *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 1737.

- (12) D. A. Fulton, J. F. Stoddart, *Org. Lett.*, **2000**, 2, 1113.
- (13) Y. Nishi, N. Yamane, T. Tanimoto, *Carbohydr. Res.*, **2007**, 342, 2173.
- (14) K. Koizumi, Y. Okada, N. Nakanishi, T. Tanimoto, Y. Takagi, M. Ishikawa, H. Ishigami, K. Hara, H. Hashimoto, *J. Carbohydr. Chem.*, **1991**, 110, 477.
- (15) R. R. Schmidt, B. Wegmann, K.-H. Jung, *Liebigs Ann. Chem.*, **1991**, 121.
- (16) L. De Robertis, C. Lancelon-Pin, H. Driguez, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1994**, 4, 1127.
- (17) V. Laini, A. Coste-Sarguet, A. Gabelle, J. Defaye, B. Perly, F. Djedaini-Pillard, *J. Chem Soc. Perkin. Trans. 2*, **1995**, 1479.
- (18) T. Furuike, S Aiba, *Chem. Lett.*, **1999**, 69.
- (19) T. Furuike, R. Sadamoto, K. Niikura, K. Monde, Sakairi, S. I. Nishimura, *Tetrahedron*, **2005**, 61, 1737.
- (20) J. J. García-López, F. Hernández-Mateo, J. Isac-García, J. Kim, R. Roy, F. Santoyo-Gonzalez, A. Vargas-Berenguel, *J. Org. Chem.*, **1998**, 64, 522.
- (21) J. J. García-López, F. Santoyo-González, A. Vargas-Berenguel, J. J. Giménez-Martínez, *Chem. Eur. J.*, **1999**, 5, 1775.
- (22) F. Ortega-Caballero, J. J. Giménez-Martínez, L. García-Fuentes, E. Ortiz-Salmerón, F. Santoyo-González, A. Vargas-Berenguel, *J. Org. Chem.*, **2001**, 66, 7785.
- (23) A. Vargas-Berenguel, F. Ortega-Caballero, F. Santoyo-González, J. J. Giménez-Martínez, L. García-Fuentes, E. Ortiz-Salmerón, *Chem. Eur. J.*, **2002**, 8, 812.
- (24) D. A. Fulton, A. R. Pease, J. F. Stoddart, *Isr. J. Chem.*, **2000**, 40, 325.
- (25) C. Ortiz Mellet, J. M. Benito, J. M. García Fernández, H. Law, K. Chmurski, J., Defaye, M. L. O'Sullivan, H. N. Caro, *Chem. Eur. J.*, **1998**, 4, 2523.
- (26) I. Baussane, J. M. Benito, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, J. Defaye, *ChemBiochem.*, **2001**, 10, 777.
- (27) M. W. J. Beulen, J. Bügler, M. R. de Jong, B. Lammerink, J. Huskens, H. Schönherr, G. J. Vancso, B. A. Boukamp, H. Wieder, A. Offenhäuser, W. Knoll, F. C. J. M. van Veggel, D. N. Reinhoudt, *Chem. Eur. J.*, **2000**, 6, 7, 1176.
- (28) P. R. Ashton, R. Königer, J. F. Stoddart, *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 903.
- (29) P. R. Ashton, R. Königer, J. F. Stoddart, *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 903.
- (30) E. Valeur, M. Bradley, *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, 38, 606.

- (31) C. Carpenter, S. A. Nepogodiev, *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**
- (32) N. Mourtzis, M. Paravatou, I. M. Mavridis, M. L. Roberts, K. Yannakopoulou, *Chem. Eur. J.*, **2008**, *14*, 4188.
- (33) M. Morpurgo, E. A. Bayer, M. Wilchek, *J. Biophys. Methods*, **1999**, *38*, 17.
- (34) M. Izumi, S. Okumura, H. Yuasa, H. Hashimoto, *J. Carbohydr. Chem.*, **2003**, *22*, 5, 317.
- (35) Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals R. P. Haugland, 6th edition

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

- (1) Michael I. Page, Andrew P. Laws, *Chem. Commun.*, 1998, 1609.
- (2) D. Maffeo, L. Leondiadis, I. Mavridis, K. Yannakopoulou., *Org. Biomol.Chem.*, **2006**, *4*, 1297.
- (3) A. D. Deshpande, K. G. Baheti, N. R. Chatterjee., *Current Science*, **2004**, *87*, 12, 1684.
- (4) M. I. Page., *Acc. Chem. Res.*, **1984**, *17*, 144.
- (5) F. Malouin, L. E. Bryan., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1986**, *30*, 1.
- (6) Dougherty., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1980**, *18*, 730.
- (7) D. J. Payne., *J. Med. Microbiol.*, **1993**, *39*, 93.
- (8) K. Bush, G. A. Jacoby, A. A. Modeiros., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1995**, *39*, 1211.
- (9) H. Aki, T. Niiya, Y. Iwase, Y. Kawasaki, K. Kumai, T. Kimura., *Thermochim. Acta*, **2004**, *416*, 87.
- (10) Aki, T. Niiya, Y. Iwase, M. Goto, T. Kimura., *J. Them. Anal. Calorim.*, **2004**, *77*, 423.
- (11) Th. Höfler, G. Wenz, *J. Incl. Phenom. Molec. Recogn. Chem.*, **1996**, *25*, 81.
- (12) A. Rontoyianni, I. M. Mavridis, E. Hadjoudis, A. J. M. Duisenberg, *Carbohydr. Res.*, **1994**, *252*, 19.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

- (1) http://users.uoi.gr/mprodrom/teaching_presentation/SPR_QCM.pdf
- (2) H. Ochiai, E. Huang, L.-X. Wang, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 13790.
- (3) M. Zavali, P.S. Petrou, S.E. Kakabakos, M. Kitsara, I. Raptis, K. Beltsios and K. Misiakos, *Micro & Nano Letters*, **2006**, *1*, 2 94.

- (4) G. Hester, H. Kaku, I. J. Goldstein, C. S. Wright, *Nat. Struct. Biol.* **1995**, *6*, 437.
- (5) www.rcsb.org
- (6) D. Sudakevitz, A. Imberty, N. Gilboa-Garber, *J. Biochem.*, **2002**, *132*, 353.
- (7) D. Sudakevitz, N. Kostlánová, G. Blatman-Jan, E. P. Mitchell, B. Lerrer, M. Wimmerová, D. J. Katcoff, A. Imberty, N. Gilboa-Garber, *Mol Microbiol.* **2004**, *52*, 3, 691.
- (8) K. Zinger-Yosovich, D. Sudakevitz, A. Imberty, N. C. Garber, N. Gilboa-Garber, *Microbiology*, **2006**, *152*, 457.
- (9) L. Buts , M. H. Dao-Thi, R. Loris, L. Wyns, M. Etzler, T. Hamelryck, *J. Mol. Biol.* **2001**, *309*, 1, 193.
- (10) E. A. Smith, W. D. Thomas, L. L. Kiessling, R. M. Corn, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 6140.
- (11) M. Brinkley, *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*, 2.
- (12) P. R Banks, D. M. Paquette, *Bioconjugate Chem.* **1995**, *6*, 447.
- (13) <http://www.aua.gr/fasseas/optika%20mikroskopio.htm>
- (14) K. A. Karlsson, *Biochem. Soc. Trans.*, **1999**, *27*, 471.
- (15) K. A. Karlsson, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **2001**, *491*, 431.
- (16) M. D. Disney, J. Zheng, T. M. Swager, P. H. Seeberger, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 13343.
- (17) S. L. Harris, P. A. Spears, E. A. Havell, T. S. Hamrick, J. R. Horton, P. E. Orndorff, *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 4099.
- (18) R. C. Willis, *Modern Drug Discovery*, **2004**, 36.
- (19) D. Sudakevitz, N. Kostlánová, G. Blatman-Jan, E. P. Mitchell, B. Lerrer, M. Wimmerová, D. J. Katcoff, A. Imberty, N. Gilboa-Garber, *Mol Microbiol.* **2004**, *52*, 3, 691.
- (20) K. Zinger-Yosovich, D. Sudakevitz, A. Imberty, N. C. Garber, N. Gilboa-Garber, *Microbiology*, **2006**, *152*, 457.
- (21) <http://www.bpi.gr/photos/home/files/Ralstonia%20solanacearum.pdf>
- (22) C. M. Rocha-de-Souza, R. Hirata-Jr, A. L. Mattos-Guaraldi, A. C. Freitas-Almeida, A. F. Andrade, *Brazilian J. Microbiol.* **2008**, *39*, 214.
- (23) www.keel.org.gr/presentation_epid/presentation-Argiropoulou.ppt
- (24) F. Ascencio, W. Martinez-Arias, M. J. Romero, T. Wadström *Immunology and Medical Microbiology*, **1998**, *20*, 219.

- (25) M. Morpurgo, E. A. Bayer, M. Wilchek, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **1999**, 38, 17.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

- (1) D. Vizitiu, C. S. Walkinshaw, B. I. Gorin, G. R. J. Thacher, *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 8760.
- (2) A. Gadelle, J. Defaye, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1991**, 30, 78.
- (3) J. M. Adam, D. J. Bennett, A. Bom, J. K. Clark, H. Feilden, E. J. Hutchinson, R. Palin, A. Prosser, D. C. Rees, G. M. Rosair, D. Stevenson, G. J. Tarver, M-Q Zhang, *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 1806.
- (4) J. Boger, R. J. Corcoan, J. M. Lehn, *Helv. Chim. Acta*, **1978**, 61, 2190.
- (5) A. D. Fulton, R. A. Pease, F. J. Stoddart, *Israel Journal of Chemistry*, **2000**, 40, 325.
- (6) D. Maffeo, M. Lampropoulou, Y. G. Lazarou, G. Fardis, I. M. Mavridis, H. Pratsinis, D. Kletsas, D. A. I. Mavridou, E. Urso, K. Yannakopoulou, *submitted*
- (7) N. Mourtzis, K. Eliadou, C. Aggelidou, V. Sophianopoulou, M. I. Mavridis, K. Yannakopoulou, *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, 5, 125.
- (8) K. Feichtinger, H. L. Zapf, M. Goodman, *J. Org. Chem.*, **1998**, 63, 3804.
- (9) N. Mourtzis, M. Paravatou, I. M. Mavridis, M. L. Roberts, K. Yannakopoulou, *Chem. Eur. J.*, **2008**, 14, 4188.
- (10) B. Brady, N. Lynam, T. O'Sullivan, C. Ahern, R. Darcy, *Org. Synth.* **2000**, 77, 220.
- (11) R. Heck, F. Dumarcay, A. Marsura, *Chem. Eur. J.*, **2002**, 8, 11, 2438.
- (12) L. Ermolenko, N. A. Sasaki, *J. Org. Chem.*, **2006**, 71, 693.
- (13) W. Hayes, H. M. I. Osborn, S. D. Osborne, R. A. Rastall, B. Romagnoli, *Tetrahedron*, **2003**, 59, 7983.
- (14) T. K. Lindhorst, S. Kötter, U. Krallmann-Wenzel, S. Ehlers, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **2001**, 823.
- (15) M. Izumi, S. Okumura, H. Yuasa, H. Hashimoto, *J. Carbohydr. Chem.*, **2003**, 22, 5, 317.
- (16) J. Ni, S. Singh, L. Wang, *Bioconjugate Chem.*, **2003**, 14, 232.
- (17) A. Pater, T. K. Lindhorst, *Eur. J. Org. Chem.*, **2002**, 79.

- (18) L. A. Andersson, G. T. Dolphin, J. Kihlberg, L. Baltzer, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **2000**, 459, 464.
- (19) L. Andersson, G. Stenhagen, L. Baltzer, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 1366.
- (20) P. R. Ashton, S. E. Boyd, C. L. Brown, S. A. Nepogodiev, E. W. Meijer, H. W. I. Peerlings, J. F. Stoddart, *Chem. Eur. J.*, **1997**, 3, 974.
- (21) M. Elofsson, B. Walse, J. Kihlberg, *Tetrahedron Lett.*, **1991**, 32, 51, 7613.
- (22) M. Elofsson, S. Roy, B. Walse, J. Kihlberg, *Carbohydr. Res.*, **1993**, 246, 89.
- (23) R. Roy, J. M. Kim, *Tetrahedron*, **2003**, 59, 3881.
- (24) M. D. Disney, P. H. Seeberger, *Chem. Biol.*, **2004**, 11, 1701.
- (25) O. Blixt, K. Allin, L. Pereira, A. Datta, J. C. Paulson, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 5739.
- (26) Τα πειράματα έγιναν στο Νομαρχιακό Γενικό Νοσοκομείο Πατησίων υπό την επίβλεψη του κ. Κυριαζόπουλου, σε συνεργασία με την κ. Φωτεινή Ορφανού (Φαρμακευτικό Τμήμα Πανεπιστημίου Αθηνών).
- (27) Τα σκευάσματα έγιναν από την κ. Φωτεινή Ορφανού στο Φαρμακευτικό Τμήμα του Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη της κ. Αντωνιάδου-Βυζά.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

- (1) E. A. Couladouros, V. I. Moutsos, M. Lampropoulou, J. L. Little, J. A. Hyatt, *J. Org. Chem.*, **2007**, 72, 6735.
- (2) R. A. Parker, B. C. Pearce, R. W. Clark, D. A. Gordan, J. J. K. Wright, *J. Biol. Chem.*, 1993, 268, 11230.
- (3) A Theriault, J-T Chao, Q. Wang, A. Gapor, K. Adeli, *Clinic Biochem.*, **1999** 32, 309.
- (4) S. Hiroaki., A. Yioshio, H. Takuji, N. Hiroyuki, *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **2000** 73, 259.
- (5) R. Chenevert, G. Courchesne, *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43, 7971.