

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

**ΧΡΗΣΤΟΣ ΚΥΡΙΤΣΗΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΚΥΑΝΟ ΚΑΙ ΑΙΘΥΝΥΛΟ-ΠΥΡΑΝΟΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ: ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ
ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΙΚΗΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΤΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2013

**ΚΥΑΝΟ ΚΑΙ ΑΙΘΥΝΥΛΟ-ΠΥΡΑΝΟΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ: ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ
ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΙΚΗΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΤΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Δ. ΚΟΜΙΩΤΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ): Καθηγητής Οργανικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Α. ΤΣΟΤΙΝΗΣ: Καθηγητής Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Μ. ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ: Ερευνητής Α΄, Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών “Δημόκριτος”

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Ε. ΚΟΥΤΟΥΛΗ-ΑΡΓΥΡΟΠΟΥΛΟΥ: Καθηγήτρια Οργανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ: Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ι. ΓΑΛΛΟΣ: Καθηγητής Οργανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Κ. ΛΙΤΙΝΑΣ: Καθηγητής Οργανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Μ. ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ: Ερευνητής Α΄, Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών “Δημόκριτος”

Α. ΤΣΟΤΙΝΗΣ: Καθηγητής Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Δ. ΚΟΜΙΩΤΗΣ: Καθηγητής Οργανικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΧΡΗΣΤΟΣ ΚΥΡΙΤΣΗΣ

**ΚΥΑΝΟ ΚΑΙ ΑΙΘΥΝΥΛΟ-ΠΥΡΑΝΟΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ: ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ
ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΙΚΗΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΤΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ**

*Η παρούσα
διδακτορική διατριβή
αφιερώνεται
στη μνήμη
του πατέρα μου*



ΧΡΗΣΤΟΣ ΚΥΡΙΤΣΗΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2013

ΚΥΑΝΟ ΚΑΙ ΑΙΘΥΝΥΛΟ-ΠΥΡΑΝΟΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ: ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ
ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΙΚΗΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΤΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Αριθμός προκαταρτικών σελίδων: 14
Συνολικός αριθμός σελίδων: 226
Συνολικός αριθμός πινάκων: 6
Συνολικός αριθμός παραρτημάτων: 1
Συνολικός αριθμός βιβλιογραφικών παραπομπών: 156

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα έχουν προσελκύσει μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον λόγω των πολλά υποσχόμενων θεραπευτικών τους εφαρμογών. Η παρούσα διατριβή εστιάστηκε κυρίως στη σύνθεση νέων διακλαδισμένων C-κυανο ή C-αιθυνυλο νουκλεοζιτών, οι οποίοι διαθέτουν εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο.

Λαμβάνοντας υπόψη τα πρόσφατα ευρήματα ότι πολλοί διακλαδισμένοι C-κυανο και C-αιθυνυλο φουρανονουκλεοζίτες αποτελούν αντιικούς παράγοντες, και βασιζόμενοι στο γεγονός ότι ένας αριθμός αυτών έχει αναφερθεί ότι εμφανίζει ισχυρές και ευρέως φάσματος αντικαρκινικές ιδιότητες, θεωρήθηκε ενδιαφέρουσα η σύνθεση νέων τάξεων διακλαδισμένων πυρανονουκλεοζιτών, οι οποίοι θα φέρουν την κυανο και την αιθυνυλο ομάδα ως διακλαδισμένη αλυσίδα στον υδατανθρακικό δακτύλιο.

Αρχικά αναφέρθηκε η σύνθεση μιας νέας τάξης νουκλεοζιτικών αναλόγων τα οποία φέρουν την αιθυνυλομάδα στην 3' θέση του σακχάρου. Η παρουσία του τριπλού δεσμού στους C-αιθυνυλο-πυρανονουκλεοζίτες αποτέλεσε αφορμή για τη σύνθεση νέων δικάφαλων νουκλεοζιτών. Επιπρόσθετα, ελήφθησαν οι 3'-C-κυανο-πυρανονουκλεοζίτες ακολουθώντας μια παρόμοια σειρά αντιδράσεων όπως αυτή που χρησιμοποιήθηκε για τα C-αιθυνυλο-παράγωγα. Επίσης παρουσιάστηκε η σύνθεση των αντίστοιχων 3'-δεοξυ-3'-C-κυανο-πυρανονουκλεοζιτών. Σε μια προσπάθεια να μελετηθούν οι σχέσεις δομής δράσης στους διακλαδισμένους C-κυανο πυρανονουκλεοζίτες, επιτεύχθηκε και η σύνθεση των 4'-C-κυανο και 4'-δεοξυ-4'-C-κυανο αναλόγων. Τέλος, αναπτύχθηκε ένα απλό και αποτελεσματικό πρωτόκολλο για τη σύνθεση των 2'-C-κυανο και 2'-δεοξυ-2'-C-κυανο πυρανονουκλεοζιτών. Τα νέα 2'-υποκατεστημένα ανάλογα μετατράπηκαν εν συνεχεία στα πυρανονουκλεοζιτικά ανάλογα που έφεραν ένα σπειρανικό δακτύλιο στη 2'-θέση του σακχάρου.

Οι τελικοί νουκλεοζίτες αποτιμήθηκαν για τις αντιικές και κυτταροστατικές τους ιδιότητες χρησιμοποιώντας διάφορα ιικά στελέχη και καρκινικές κυτταρικές σειρές. Είναι αξιοσημείωτο ότι κάποια C-κυανο νουκλεοζιτικά ανάλογα, εμφάνισαν παρόμοιο φάσμα κυτταροστατικότητας με αυτό της ελεύθερης 5-φθοροουρακίλης.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιο-οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Οργανικής Χημείας, κ. Δημήτριου Κομιώτη και πραγματεύεται ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον επιστημονικό πεδίο, αυτό της σύνθεσης τροποποιημένων νουκλεοζιτικών αναλόγων.

Με την πραγματοποίηση της είναι ανάγκη να ευχαριστήσω όλα τα άτομα που συνέβαλαν ουσιαστικά σε αυτή. Πρωτίστως θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Δημήτριο Κομιώτη για την επιλογή του επιστημονικού θέματος, καθώς και για την γεμάτη ζήλο και ενθουσιασμό καθοδήγηση του όλο αυτό το χρονικό διάστημα. Από τη μεταξύ μας συνεργασία θεωρώ ότι άντλησα χρήσιμα διδάγματα για τη μετέπειτα επιστημονική και κοινωνική μου πορεία.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Ανδρέα Τσοτίνη και τον Ερευνητή Α΄ κ. Μηνά Παπαδόπουλο για τις εύστοχες υποδείξεις τους κατά τη διάρκεια συγγραφής αυτής της διατριβής. Ευχαριστώ επίσης, τον Καθηγητή κ. Ιωάννη Γάλλο, τον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Λίτινα και τον Καθηγητή κ. Παναγιώτη Μαρκουλάτο για την τιμή που μου έκαναν να συμμετάσχουν στην επταμελή εξεταστική επιτροπή. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην Καθηγήτρια κ. Ευδοξία Κουτούλη-Αργυροπούλου πέρα από τη συμμετοχή της στην επταμελή επιτροπή, για τη συνεργασία της και την πολύτιμη βοήθεια της σε θέματα φασματοσκοπίας και στερεοχημείας, η οποία στάθηκε ιδιαιτέρως καθοριστική.

Οφείλω επίσης θερμές ευχαριστίες στη φίλη μου και συνεργάτιδα για όλα αυτά τα χρόνια μεταδιδακτορική ερευνήτρια κ. Στυλιανή Μαντά για την αμέριστη συμπαράσταση, το διαρκές και ειλικρινές της ενδιαφέρον και την ακούραστη βοήθεια της κατά τη διεξαγωγή αυτής της εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους ανεξαιρέτως τους συναδέλφους στο εργαστήριο Βιο-οργανικής χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, με τους οποίους μοιραστήκαμε συγκινήσεις αλλά και απογοητεύσεις τα τελευταία αυτά χρόνια. Ειδικότερα, θερμές ευχαριστίες

οφείλω στη Νεφέλη Κουσούρη, στο Βύρωνα Γοργογιέτα και στον Τσαμπίκο Πετράκη για την ουσιαστική συνεισφορά τους στη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα τωρινά μέλη του εργαστηρίου μας, τη Βανέσα Παρμενοπούλου, το Νικόλαο Κολλάτο και τη Δήμητρα Γκαραγκούνη, οι οποίοι στάθηκαν αρωγοί στη δημιουργία ενός ειλικρινούς κλίματος συμπόρευσης και συνεργασίας. Ιδιαίτερος θα ήθελα να ευχαριστήσω τη συνάδελφο και φίλη μου Αθηνά Δημοπούλου, της οποίας η αμέριστη συμπαράσταση μέσα και έξω από το χώρο του εργαστηρίου στάθηκε εξόχως σημαντική.

Τέλος, δεν μπορώ παρά να είμαι ευγνώμων για τη στήριξη και βοήθεια που μου πρόσφερε η οικογένεια μου και ειδικότερα η μητέρα μου Ιφιγένεια και ο αδερφός μου Νικόλαος. Ένα ευχαριστώ θεωρώ πως είναι λίγο, καθώς χωρίς την πολύπλευρη βοήθειά τους, πολλά όνειρα μου δεν θα είχαν υλοποιηθεί μέχρι σήμερα.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Οι δημοσιεύσεις που προέκυψαν από την παρούσα διδακτορική διατριβή είναι οι ακόλουθες:

- Synthesis and Biological Evaluation of 3'-C-Ethynyl and 3'-C-(1,4-disubstituted-1,2,3-triazolo) Double-Headed Pyranonucleosides. Kiritsis, C.; Manta, S.; Coutouli-Argyropoulou, E.; Trakossas, S.; Balzarini, J.; Komiotis, D. *Med. Chem.* **2012**, 8, 320-329.
- Branched-chain C-cyano pyranonucleosides: Synthesis of 3'-C-cyano & 3'-C-cyano-3'-deoxy pyrimidine pyranonucleosides as novel cytotoxic agents. Kiritsis, C.; Manta, S.; Parmenopoulou, V.; Balzarini, J. Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.*, **2011**, 46, 5668-5674.
- Stereocontrolled Synthesis of 4'-C-cyano and 4'-C-cyano-4'-deoxy Pyrimidine Pyranonucleosides as Potential Chemotherapeutic Agents. Kiritsis, C.; Manta, S.; Parmenopoulou, V.; Dimopoulou, A.; Kollatos, N.; Papasotiriou, I.; Balzarini, J. Komiotis, D. *Carbohydr. Res.* **2012**, 364, 8-14.
- Stereoselective facile synthesis of 2'-spiro pyrimidine pyranonucleosides via their key intermediate 2'-C-cyano analogues. Evaluation of their bioactivity. Kiritsis, C.; Manta, S.; Dimopoulou, A.; Parmenopoulou, V.; Gkizis, P.; Balzarini, J.; Komiotis, D. *Carbohydr. Res.* **2014**, 383, 50-57.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	vii
ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	viii
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	xi
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
I.1 Νουκλεοζίτες, Νουκλεοτίδια και Νουκλεϊκά οξέα	1
I.2 Νουκλεοζιτικά ανάλογα	3
I.2.1 Αντικαρκινικά νουκλεοζιτικά ανάλογα	4
I.2.2 Αντιικά νουκλεοζιτικά ανάλογα	6
I.3 Τρόπος δράσης νουκλεοζιτικών αναλόγων	9
I.4 Τροποποιημένοι νουκλεοζίτες	11
I.5 Φουρανονουκλεοζίτες	12
I.5.1 Αιθυνυλο-φουρανονουκλεοζίτες	13
I.5.2 Κυανο-φουρανονουκλεοζίτες	15
I.5.3 Σπειρανικοί φουρανονουκλεοζίτες	17
I.6 Πυρανονουκλεοζίτες	19
I.7 Μέθοδοι σύνθεσης νουκλεοζιτικών αναλόγων	25
I.8 Στόχοι της παρούσης διατριβής	28
II. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ	31
II.1 Σύνθεση των 3'-C-αιθυνυλο πυρανονουκλεοζιτών και 3'-C-(1,4-διυποκαστημενων- 1,2,3-τριαζολο) πυρανονουκλεοζιτών με διπλή κεφαλή	31
II.1.1 Σύνθεση της 3-C-αιθυνυλο-1,2,4,6-τετρακίς-Ο-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανόζης (3)	34
II.1.2 Σχηματισμός γλυκοζιτικού δεσμού	36
II.1.3 Καθορισμός της στερεοχημείας στο ανωμερικό κέντρο	38
II.1.4 Σύνθεση των 3'-C-αιθυνυλο-β-D-αλλοπυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων της 5-φθοροουρακίλης 5α , ουρακίλης 5β , θυμίνης 5γ , κυτοσίνης 5ζ και αδενίνης 5στ	39
II.1.5 Τριαζολο πυρανονουκλεοζίτες με διπλή κεφαλή 8α-η	44
II.1.6 Αντιική και αντικαρκινική δράση των 3'-C-αιθυνυλο πυρανονουκλεοζιτών και 3'-C-(1,4-διυποκαστημενων-1,2,3-τριαζολο)πυρανονουκλεοζιτών με διπλή κεφαλή	54
II.2 Σύνθεση των 3'-C-κυανο και 3'-δεοξυ-3'-C-κυανο πυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων	56
II.2.1 Σύνθεση της 1,2,3,4,6-πεντακίς-Ο-ακετυλο-3-C-κυανο-D-γλυκοπυρανόζης (11)	58
II.2.2 Σύνθεση των 3'-C-κυανο-β-D-γλυκοπυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων της 5-φθοροουρακίλης 13α , ουρακίλης 13β , θυμίνης 13γ και	

κυτοσίνης 13δ	60
II.2.3 Σύνθεση της 3-δεοξυ-1,2,4,6-τετρακίς-Ο-ακετυλο-3- <i>C</i> -κυανο- <i>D</i> -αλλοπυρανόζης (17)	63
II.2.4 Σύνθεση των 3-δεοξυ-3'- <i>C</i> -κυανο-β- <i>D</i> -αλλοπυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων της 5-φθοροουρακίλης 19α , ουρακίλης 19β , θυμίνης 19γ και κυτοσίνης 19δ	67
II.2.5 Αντιική και αντικαρκινική δράση των 3'- <i>C</i> -κυανο και 3'-δεοξυ-3'- <i>C</i> -κυανο-πυρανονουκλεοζιτών	71
II.3 Σύνθεση των 4'- <i>C</i> -κυανο και 4'- <i>C</i> -κυανο-4'-δεοξυ-πυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων	73
II.3.1 Σύνθεση των 4'- <i>C</i> -κυανο-α- <i>D</i> -μαννοπυρανοζυλο αναλόγων της 5-φθοροουρακίλης 31α , ουρακίλης 31β και θυμίνης 31γ	75
II.3.2 Σύνθεση των 4'-δεοξυ-4'- <i>C</i> -κυανο-α- <i>D</i> -ταλοπυρανοζυλο αναλόγων της 5-φθοροουρακίλης 34α , ουρακίλης 34β και θυμίνης 34γ	81
II.3.3 Αντιική και αντικαρκινική δράση των 4'- <i>C</i> -κυανο και 4'-δεοξυ-4'- <i>C</i> -κυανο-πυρανονουκλεοζιτών	86
II.4 Σύνθεση των 2'- <i>C</i> -κυανο, 2'-δεοξυ-2'- <i>C</i> -κυανο και 2'-σπειρανικών-πυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων	88
II.4.1 Σύνθεση των 2'- <i>C</i> -κυανο-β- <i>D</i> -ταλοπυρανοζυλο αναλόγων της ουρακίλης 41α , της 5-φθοροουρακίλης 41β και 2'- <i>C</i> -κυανο-β- <i>D</i> -γαλακτοπυρανοζυλο αναλόγων της ουρακίλης 42α , και της 5-φθοροουρακίλης 42β	91
II.4.2 Σύνθεση των 2'-δεοξυ-2'- <i>C</i> -κυανο-β- <i>D</i> -ταλοπυρανοζυλο αναλόγων της ουρακίλης 44α και 5-φθοροουρακίλης 44β	95
II.4.3 Σύνθεση των 2'-σπειρανικών-β- <i>D</i> -ταλοπυρανοζυλο αναλόγων της ουρακίλης 49α και 5-φθοροουρακίλης 49β και 2'- <i>C</i> -κυανο-α- <i>D</i> -γαλακτοπυρανοζυλο ανάλογο της ουρακίλης 50α	99
II.4.4 Αντιική και αντικαρκινική δράση των 2'- <i>C</i> -κυανο, 2'-δεοξυ-2'- <i>C</i> -κυανο και 2'-σπειρανικών-πυρανονουκλεοζιτών	105
III. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	108
III.1 ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	108
III.2 Σύνθεση των 3'- <i>C</i> -αιθυνυλο και 3'- <i>C</i> -(1,4-διυποκαστημένων-1,2,3-τριαζολο) δικέφαλων πυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων	111
III.2.1 Σύνθεση της 3- <i>C</i> -αιθυνυλο-1,2,4,6-τετρακίς-Ο-ακετυλο-β- <i>D</i> -αλλοπυρανόζης (3)	111
III.2.2 Σύνθεση των 3'- <i>C</i> -αιθυνυλο-β- <i>D</i> -αλλοπυρανονουκλεοζιτών 5α-γ,ζ,στ	113
III.2.3 Σύνθεση των τριαζολο πυρανονουκλεοζιτών με διπλή κεφαλή 8α-η	122
III.3 Σύνθεση των 3'- <i>C</i> -κυανο και 3'- <i>C</i> -κυανο-3'-δεοξυπυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων.	136
III.3.1 Σύνθεση της 1,2,3,4,6-πεντα-Ο-ακετυλο-3- <i>C</i> -κυανο- <i>D</i> -	136

γλυκοπυρανόζης (11)	
III.3.2 Σύνθεση των 3'-C-κυανο-β-D-γλυκοπυρανονουκλεοζιτών 13α-δ	137
III.3.3 Σύνθεση της 3-δεοξυ-1,2,4,6-τετρακίς-O-ακετυλο-3-C-κυανο-D-αλλοπυρανόζης (17)	144
III.3.4 Σύνθεση 3'-δεοξυ-3'-C-κυανο-D-αλλοπυρανονουκλεοζιτών 19α-δ	146
III.4. Σύνθεση των 4'-C-κυανο και 4'-C-κυανο-4'-δεοξυ πυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων	153
III.4.1 Σύνθεση της 1-(4'-C-κυανο-α-D-μαννοπυρανοζυλο)-5-φθοροουρακίλης (31α)	153
III.4.2 Σύνθεση της 1-(4'-C-κυανο-α-D-μαννοπυρανοζυλο)ουρακίλης (31β)	158
III.4.3 Σύνθεση της 1-(4'-C-κυανο-α-D-μαννοπυρανοζυλο)θυμίνης (31γ)	160
III.4.4 Σύνθεση της 1-(4'-δεοξυ-4'-C-κυανο-α-D-ταλοπυρανοζυλο)-5-φθοροουρακίλης (34α)	166
III.4.5 Σύνθεση της 1-(4'-δεοξυ-4'-C-κυανο-α-D-ταλοπυρανοζυλο)ουρακίλης (34β)	168
III.4.6 Σύνθεση της 1-(4'-δεοξυ-4'-C-κυανο-α-D-ταλοπυρανοζυλο)θυμίνης (34γ)	170
III.5 Σύνθεση των 2'-C-κυανο και 2'-σπειρανικών πυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων	173
III.5.1 Σύνθεση των 2'-C-κυανο και 2'-σπειρανικών πυρανονουκλεοζιτών της ουρακίλης	173
III.5.2 Σύνθεση των 2'-C-κυανο και 2'-σπειρανικών πυρανονουκλεοζιτών της 5-φθοροουρακίλης	187
IV. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	198
V. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	201
ABSTRACT	211
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ-ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	212

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

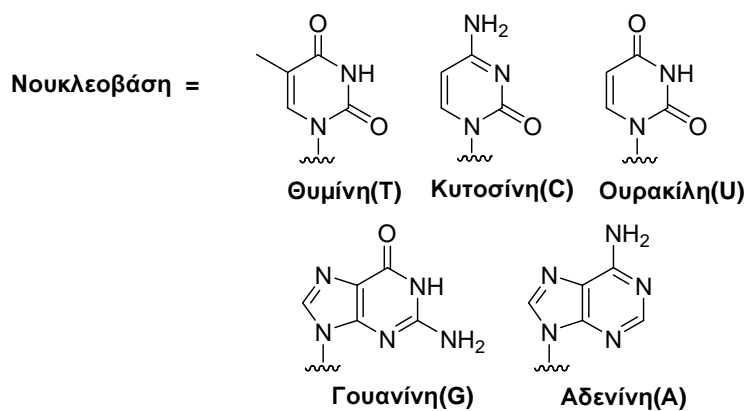
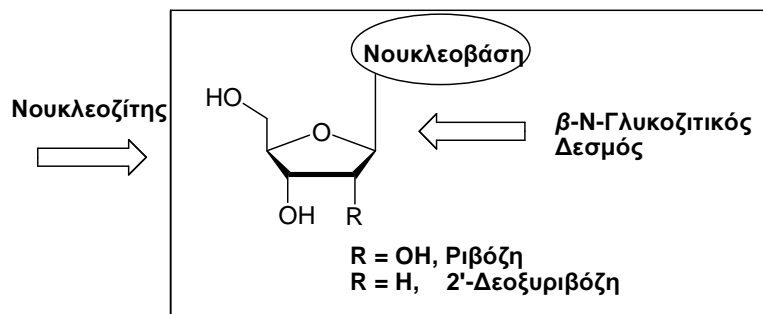
Πίνακας 1:	Συνθήκες των αντιδράσεων και αποδόσεις των προστατευμένων 3'-C-αιθυνο-νουκλεοζιτών 4α-ε .	40
Πίνακας 2:	Συνθήκες των αντιδράσεων και αποδόσεις των πυρανονουκλεοζιτών με διπλή κεφαλή 7α-δ,ζ-η και 8ε .	49
Πίνακας 3:	Ανασταλτική δράση (IC_{50} , μM) των 3'-C-αιθυνο πυρανονουκλεοζιτών 5α-γ,ζ,στ και (1,2,3-τριαζολο)νουκλεοζιτών με διπλή κεφαλή 8α-η , έναντι του πολλαπλασιασμού των κυττάρων L1210, των T-λεμφοκυττάρων CEM και των κυττάρων HeLa.	55
Πίνακας 4:	Ανασταλτική δράση (IC_{50} , μM) των 3'-C-κυανο 13α-δ και 3'-δεοξυ-3'-C-κυανο πυρανονουκλεοζιτών 19α-δ , έναντι του πολλαπλασιασμού των κυττάρων L1210, των T-λεμφοκυττάρων CEM και των κυττάρων HeLa.	72
Πίνακας 5:	Ανασταλτική δράση (IC_{50} , μM) των 4'-C-κυανο 31α-γ και 4'-δεοξυ-4'-C-κυανο 34α-γ , έναντι του πολλαπλασιασμού των κυττάρων L1210, των T-λεμφοκυττάρων CEM και των κυττάρων HeLa.	87
Πίνακας 6:	Ανασταλτική δράση (IC_{50} , μM) των 2'-C-κυανο- 41α,β , 42α,β , των 2'-δεοξυ-2'-C-κυανο 44α,β και των 2'-σπειρανικών- 47α,β , 48α , 49α,β , 50α , έναντι του πολλαπλασιασμού των κυττάρων L1210, των T-λεμφοκυττάρων CEM και των κυττάρων HeLa.	107

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

I.1 Νουκλεοζίτες, Νουκλεοτίδια και Νουκλεϊκά οξέα

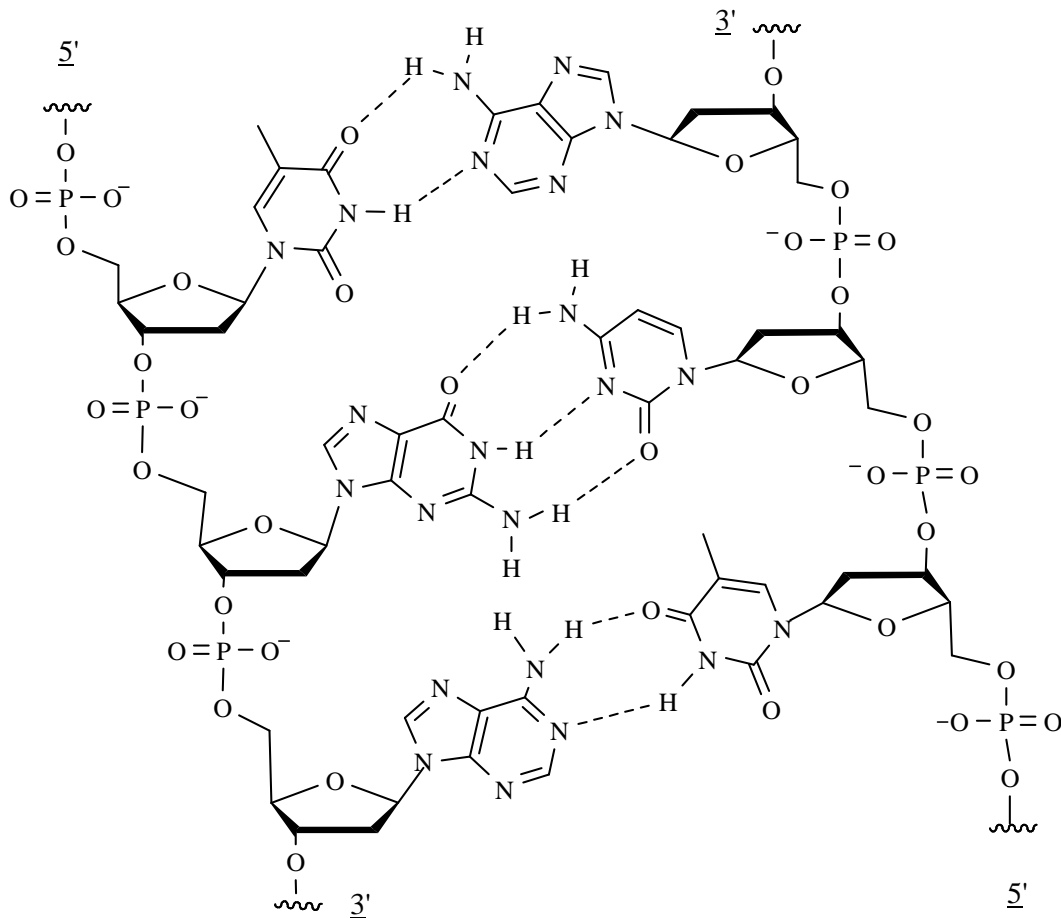
Οι νουκλεοζίτες αποτελούν θεμελιώδη συστατικά των βιολογικών συστημάτων. Η βασική δομή ενός φυσικού νουκλεοζίτη αποτελείται από δύο μέρη:

- Μια πεντόζη, η οποία είναι είτε 2'-δεοξυ-β-D-ριβοφουρανόζη είτε β-D-ριβοφουρανόζη, οπότε ο νουκλεοζίτης καλείται δεοξυριβονουκλεοζίτης ή ριβονουκλεοζίτης, αντίστοιχα (Σχήμα 1).
- Μια πουρινική (αδενίνη, γουανίνη) ή πυριμιδινική (θυμίνη, ουρακίλη, κυτοσίνη) βάση, η οποία ενώνεται με το σάκχαρο με ένα β-N-γλυκοζιτικό δεσμό μεταξύ του πρώτου αλδεϋδικού άνθρακα της πεντόζης και του N-1 ατόμου της πυριμιδίνης ή του N-9 της πουρίνης (Σχήμα 1).



Σχήμα 1

Οι νουκλεοζίτες μεταβολίζονται προς τις αντίστοιχες τριφωσφορικές τους δομές από τις κυτταρικές κινάσες και τα προκύπτοντα νουκλεοτίδια ενώνονται μεταξύ τους με 3'-5' φωσφοδιεστερικούς δεσμούς, οδηγώντας στη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων με τη βοήθεια πολυμερασών (Chu και Baker, 1993, Townsend, 1988). Αν το νουκλεϊκό οξύ περιέχει ριβόζη ως υδατάνθρακα, ονομάζεται ριβονουκλεϊνικό οξύ (Ribonucleic acid, RNA), ενώ αν περιέχει 2'-δεοξυ-ριβόζη ονομάζεται δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ (Deoxyribonucleic acid, DNA). Τα DNA και RNA έχουν όλες τις αζωτούχες βάσεις κοινές, εκτός της θυμίνης (T) που βρίσκεται μόνο στο DNA και της ουρακίλης (U) που υπάρχει στο RNA. Στο σχήμα 2 απεικονίζεται η δομή ενός τμήματος του DNA, όπου παρατηρείται η συμπληρωματικότητα που χαρακτηρίζει τις δύο αλυσίδες (κλώνους του DNA) ως προς την ακολουθία των βάσεων (A-T, G-C), ενώ παράλληλα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των νουκλεοβάσεων και συνδέουν τους δύο κλώνους.



Σχήμα 2

1.2 Νουκλεοζιτικά ανάλογα

Οι νουκλεοζίτες αναγνωρίστηκαν ως τα βασικά δομικά συστατικά του DNA και του RNA από τις πρωτοποριακές έρευνες που πραγματοποιήθηκαν στα τέλη του 19^{ου} αιώνα και στις αρχές του 20^{ου}. Το ερευνητικό ενδιαφέρον για τους νουκλεοζίτες πολλαπλασιάστηκε κατά τη δεκαετία του 1940 και αυξήθηκε κατακόρυφα τα επόμενα χρόνια, όπου συστηματικές μελέτες πάνω στη χημική σύνθεση και τις βιολογικές ιδιότητες της συγκεκριμένης κατηγορίας ενώσεων οδήγησαν σε μερικές σημαντικές δομές νουκλεοζιτικών αναλόγων με εξαιρετική βιολογική και φαρμακευτική εφαρμογή (Mikhailovulo και Miroshnikov, 2010). Από τότε ένα πλήθος αναλόγων φυσικών νουκλεοζιτών έχουν συντεθεί, λαμβάνοντας χώρα διάφορες τροποποιήσεις τόσο στο τμήμα του σακχάρου, όσο στον ετεροκυκλικό δακτύλιο της βάσης.

Σύγχρονες έρευνες έχουν καταδείξει ότι τα νουκλεοζιτικά ανάλογα μπορούν να δράσουν ως αντιμεταβολίτες, ανταγωνιζόμενοι τους φυσικούς νουκλεοζίτες και να αλληλεπιδράσουν με ενδοκυττάριους στόχους με αποτέλεσμα να προκαλέσουν σημαντική αντιική ή αντικαρκινική δράση. Χημικά τροποποιημένοι νουκλεοζίτες χρησιμοποιούνται κλινικά εδώ και σχεδόν μισό αιώνα και αποτελούν τον ακρογωνιαίο λίθο για τη θεραπευτική αντιμετώπιση πολλών ιικών μολύνσεων ή διαφόρων μορφών καρκίνου. Η συγκεκριμένη κατηγορία ενώσεων παρουσιάζει ακόμα ισχυρή δυναμική και ανάπτυξη, καθώς τα τελευταία χρόνια έχουν εγκριθεί από τη Διεύθυνση Ελέγχου Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (Food and Drug Administration, FDA) αρκετά φάρμακα που περιέχουν ως δραστική ουσία κάποιο νουκλεοζιτικό ανάλογο (Jordheim *et al.* 2013). Επιπλέον, μελέτες έχουν φωτίσει τους πιθανούς μηχανισμούς αντιικής και αντικαρκινικής τους δράσης αποδίδοντας σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τους μεταβολικούς μετασχηματισμούς τους, συμπεριλαμβανομένου της μεταβολικής ενεργοποίησης και απενεργοποίησής τους.

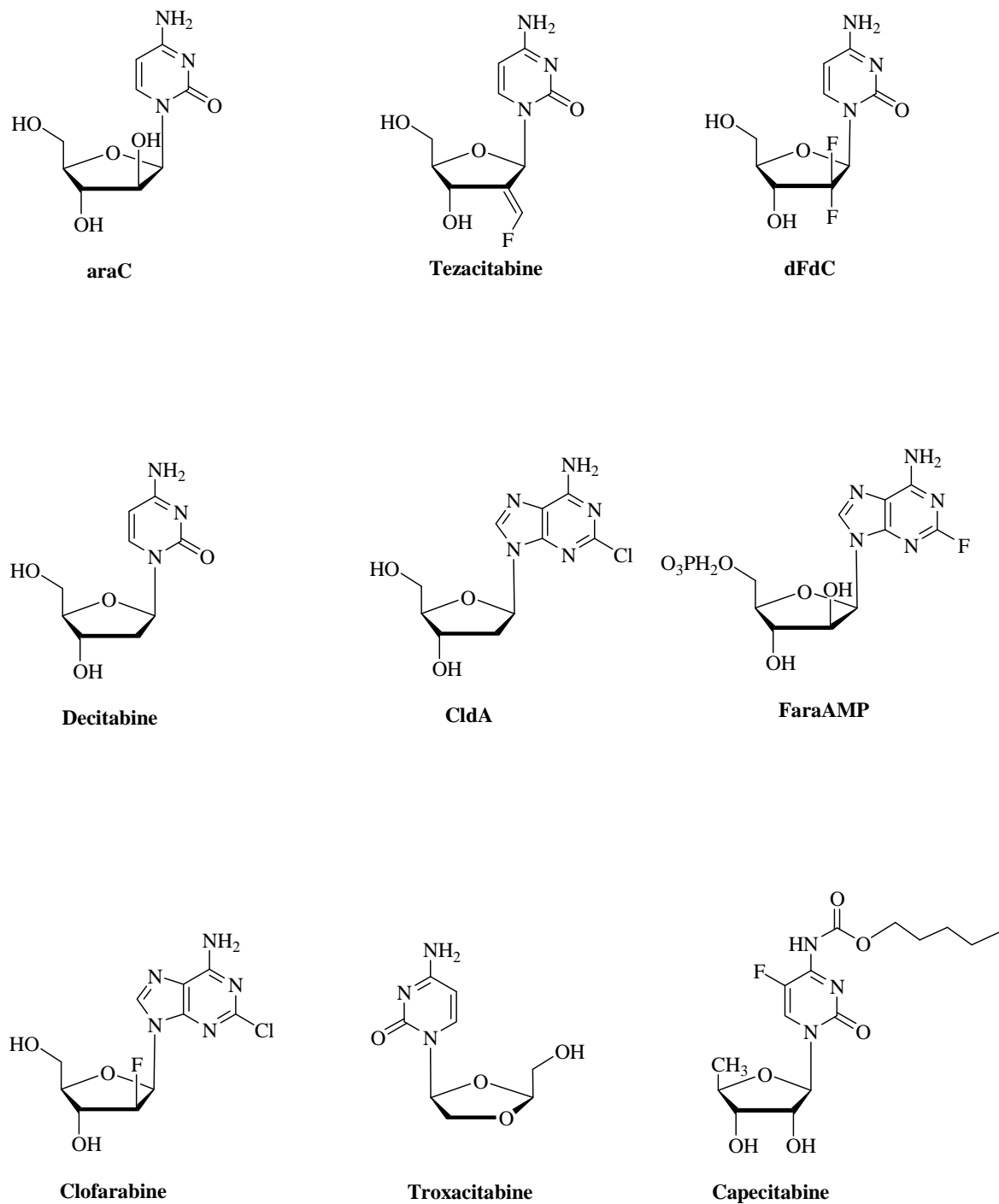
1.2.1 Αντικαρκινικά νουκλεοζιτικά ανάλογα

Η θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου στηρίζεται στις μεθόδους της χειρουργικής επέμβασης, της ακτινοθεραπείας και της χημειοθεραπείας, οι οποίες συχνά χρησιμοποιούνται συνδυαστικά. Ανάλογα με το στάδιο της ανάπτυξης του καρκίνου, η χημειοθεραπεία μπορεί να χορηγηθεί για να θεραπεύσει τον καρκίνο, για να τον εμποδίσει να εξαπλωθεί ή για να επιβραδύνει την ανάπτυξή του.

Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα περιλαμβάνουν μια ποικιλία πουρινικών και πυριμιδινικών παραγώγων, τα οποία μπορούν να είναι δραστικά έναντι τόσο αιματολογικών κακοηθειών όσο και διάφορων τύπων καρκινικών όγκων. Τα κυτταροτοξικά νουκλεοζιτικά ανάλογα αποτελούν μερικές από τις πρώτες χημειοθεραπευτικές ενώσεις που έχουν εισαχθεί για τη θεραπεία του καρκίνου (Galmarini *et al.* 2002). Οι συγκεκριμένες ενώσεις συμπεριφέρονται ως αντιμεταβολίτες και αλληλεπιδρούν με ενδοκυττάριους στόχους, προξενώντας κυτταροτοξικότητα, ενώ μπορούν ακόμη να προκαλέσουν ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων στην εφαρμοζόμενη ακτινοθεραπεία τροποποιώντας τον κυτταρικό μεταβολισμό (Pastor-Anglada *et al.* 1998). Ως εκ τούτου, ένας μεγάλος αριθμός νουκλεοζιτικών αναλόγων χρησιμοποιείται εδώ και πολλά έτη στη θεραπεία καρκινικών ασθενειών.

Στα τέλη του 2004, ο FDA ενέκρινε ένα ακόμα νουκλεοζιτή, τη Κλοφαραβίνη (Clofarabine), ως κατάλληλο για την αντιμετώπιση του παιδιατρικού καρκίνου (Zhenchuk *et al.* 2009, Majda *et al.* 2011). Η συγκεκριμένη έγκριση καταδεικνύει την αντικαρκινική εκλεκτική δράση που διαθέτουν ορισμένα νουκλεοζιτικά ανάλογα. Νουκλεοζιτικά ανάλογα όπως Κυταραβίνη (Cytarabine, araC), Τεζασιταβίνη (Tezacitabine), Γεμισιταβίνη (Gemcitabine, dFdC), Ντεσιταβίνη (Decitabine), Κλαδριβίνη (Cladribine, CldA), Φλουδαραβίνη (Fludarabine, FaraAMP) και Τροξασιταβίνη (Troxacitabine) εμφανίστηκαν ως αποτελεσματικές ενώσεις όχι μόνο έναντι της λευχαιμίας και των λεμφωμάτων, αλλά και έναντι κακοήθων όγκων, ενώ νέοι φθοροπυριμιδινικοί νουκλεοζίτες όπως η Καπεσιταμπίνη (Capecitabine) αποδείχθηκε ότι δρουν ως προφάρμακα της 5-φθοροουρακίλης επιτυγχάνοντας υψηλότερες συγκεντρώσεις της συγκεκριμένης νουκλεοβάσης

μόνο σε καρκινικούς όγκους και όχι σε υγιείς ιστούς (Galmarini *et al.* 2002, Szafraniec *et al.* 2004) (Σχήμα 3).



Σχήμα 3

Παρά την ανακάλυψη πολυπληθών αντικαρκινικών ενώσεων, υπάρχει διαρκής ανάγκη για καινοτόμα και εξελιγμένα φάρμακα. Η έλλειψη εκλεκτικότητας των ήδη χρησιμοποιούμενων ενώσεων προς τα καρκινικά κύτταρα, οδηγεί σε σοβαρές παρενέργειες, όπως μυελοτοξικότητα (κοινή για πολλούς χημειοθεραπευτικούς παράγοντες) καθώς και εξειδικευμένες φαρμακοτοξικότητες, όπως καρδιοτοξικότητα και νεφροτοξικότητα (Ojima *et al.* 2002). Έτσι προκύπτει μεγάλη ανάγκη για την ανάπτυξη νέων νουκλεοζιτικών αναλόγων, τα οποία θα αναγνωρίζουν τις εγγενείς διαφορές μεταξύ των καρκινικών και υγιών κυττάρων και θα προσφέρουν αποτελεσματικότερη θεραπεία.

1.2.2 Αντιικά νουκλεοζιτικά ανάλογα

Οι ιικές μολύνσεις παρέμεναν για μεγάλο χρονικό διάστημα ένα παγκόσμιο ιατρικό πρόβλημα λόγω της έλλειψης αποτελεσματικής θεραπείας καθώς και της απουσίας κατάλληλης στρατηγικής πρόληψης ή εμβολιασμού. Εντούτοις, οι συστηματικές μελέτες αρκετών δεκαετιών στον τομέα των νουκλεοζιτών επέφεραν σημαντικές αλλαγές στη θεραπεία των περισσότερων ιικών μολύνσεων, με τα νουκλεοζιτικά ανάλογα να αποτελούν μερικές από τις πλέον επιτυχημένες αντιικές ενώσεις που κυκλοφορούν μέχρι σήμερα.

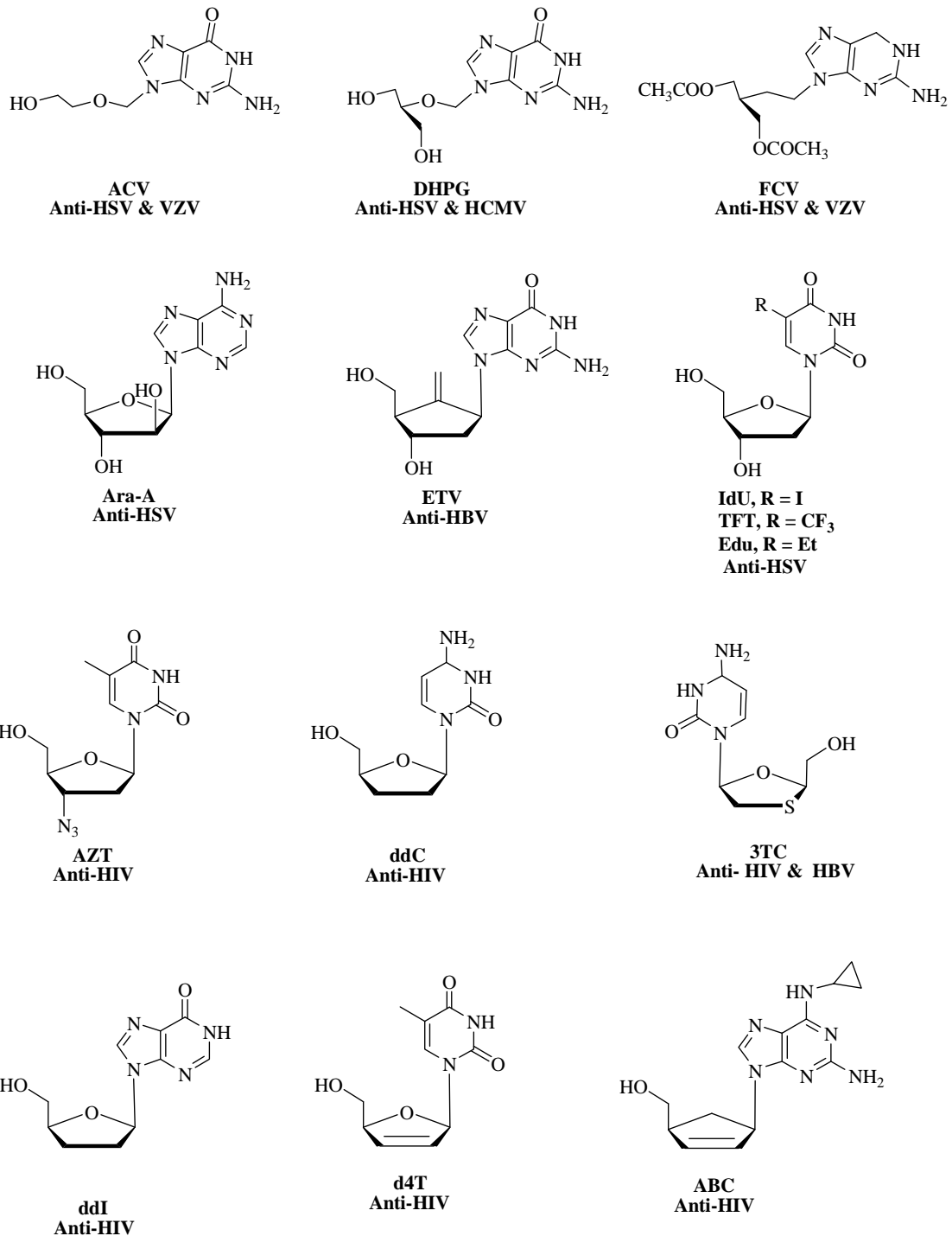
Τα αντιικά νουκλεοζιτικά ανάλογα χρησιμοποιούνται ευρέως στην αντιμετώπιση του ιού του απλού έρπητα (Herpes Simplex Virus, HSV) που περιλαμβάνει τα υποείδη HSV₁ και HSV₂, του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού (Human Cytomegalovirus, HCMV), του ιού της ανθρώπινης ανοσοποιητικής ανεπάρκειας (Human Immunodeficiency Virus, HIV) και του ιού της ηπατίτιδας (Hepatitis Virus) (De Clercq, 2005, Mathé και Gosselin, 2006, Komiotis *et al.* 2008, Manta *et al.* 2013). Η βιολογική τους δράση συχνά καθορίζεται από διάφορες τροποποιήσεις της (2-δεοξυ)-D-ριβοφουρανόζης που περιλαμβάνει αντιστροφή των διαμορφώσεων της υδροξυλομάδας, υποκαταστάσεις με διάφορες συνθετικές ομάδες, καθώς και αποσπάσεις και διασπάσεις του δακτυλίου οι οποίες οδηγούν σε διδεοξυ και σε άκυκλους νουκλεοζίτες,

αντίστοιχα. Άλλες ενδιαφέρουσες δομικές τροποποιήσεις περιλαμβάνουν την αντικατάσταση του ενδοκυκλικού οξυγόνου του σακχάρου από μια μεθυλενο-ομάδα αλλά και την επιπλέον προσθήκη ενός ετεροατόμου στο δακτύλιο του σακχάρου (Mansour και Storer, 1997).

Από το 1963, όταν ο William Prusoff εισήγαγε την 5-ιωδο-2'-δεοξουριδίνη για τη θεραπεία του απλού ιού του έρπητα του κερατοειδούς έως σήμερα, νουκλεοζιτικά ανάλογα όπως Ιδοξουριδίνη (Idoxuridine, IdU), Τριφλουριδίνη (Trifluridine, TFT), Ασεδουρίδη (Acedurid, Edu), Βιδαραβίνη (Vidarabine, Ara-A), Γκανσικλοβίρη (Ganciclovir, DHPG) και Φαμισκλοβίρη (Famciclovir, FCV) έχουν επιτυχημένα χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία ιών όπως ο HSV, ο HCMV και ο ιός του ερπηζωστήρα (varicella-zoster virus, VZV) (Σχήμα 4). Ανάμεσα στα διάφορα αντιϊικά που αναπτύχθηκαν για τη θεραπεία των ερπητοϊών, η Ακυκλοβίρη (Aciclovir, ACV) θεωρείται ως ένα από τα πλέον αποτελεσματικά λόγω της αυξημένης εκλεκτικότητας που διαθέτει αλλά και της μικρής της τοξικότητας (De Clercq και Field, 2006) (Σχήμα 4).

Καθοριστική επίσης αποδείχτηκε η συμβολή των νουκλεοζιτικών αναλόγων στην καταπολέμηση της ασθένειας του AIDS (Acquired Immuno Deficiency syndrome), καθώς μετά την έγκριση της 2',3'-διδεοξυ-3'-αζιδοθυμιδίνης (AZT) μια σειρά νουκλεοζιτών όπως Ζαλσιταβίνη (Zalcitabine, ddC), Διδανοσίνη (Didanosine, ddl), Σταβουδίνη (Stavudine, d4T), Λαμβουδίνη (Lamivudine, 3TC) και Αμπκαβίρη (Abacavir, ABC) χρησιμοποιήθηκαν στη θεραπεία του HIV (Cihlara και Rayb, 2010) (Σχήμα 4). Τα συγκεκριμένα μόρια χαρακτηρίζονται ως νουκλεοζιτικοί αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors, NRTIs), έχοντας σαν μοριακό-στόχο το συγκεκριμένο ένζυμο-κλειδί της ιικής αναπαραγωγής και θα πρέπει να μετατραπούν στην τριφωσφορική τους δομή για να ασκήσουν τη βιολογική τους δράση. Μεταξύ των NRTIs, η Λαμβουδίνη και η Εντεκαβίρη (Entecavir, ETV) είναι εγκεκριμένα φάρμακα από τον FDA, τα οποία χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση της χρόνιας ιογενούς ηπατίτιδας Β (HBV). Οι συγκεκριμένες ενώσεις, παρόλο που δεν μπορούν να εξαλείψουν την μόλυνση, εμποδίζουν αποτελεσματικά την αναπαραγωγή του ιού, ελαχιστοποιώντας μ' αυτό τον τρόπο τις ηπατικές βλάβες.

Παρά τα σημαντικά αυτά επιτεύγματα, συνεχής είναι η ανάγκη ανακάλυψης νέων αντιικών νουκλεοζιδικών αναλόγων, προκειμένου να αντιμετωπιστούν διάφορα προβλήματα, όπως η μη μεταβολική τους σταθερότητα, οι τοξικές παρενέργειες, καθώς και η εμφάνιση νέων ανθεκτικών ιικών στελεχών και κατ' επέκταση νεοεμφανιζόμενων ιικών ασθενειών.



Σχήμα 4

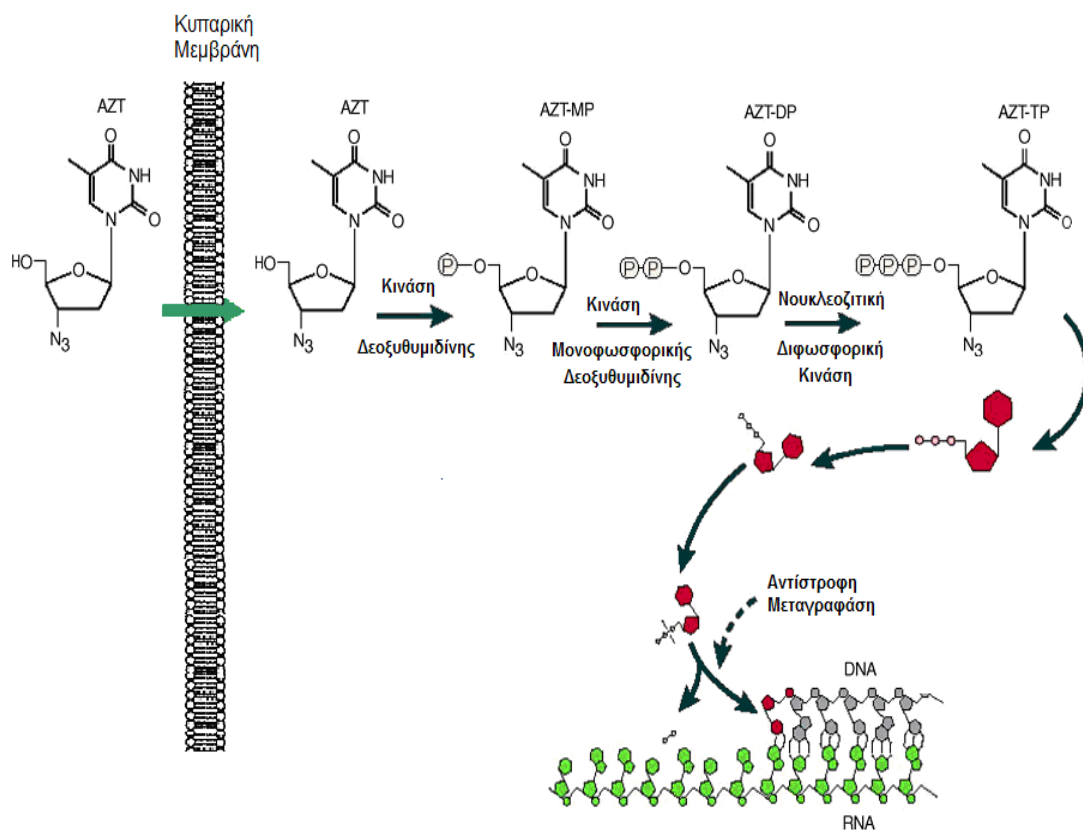
1.3 Τρόπος δράσης νουκλεοζιτικών αναλόγων

Οι φαρμακευτικές ενώσεις ασκούν την δράση τους αλληλεπιδρώντας με κάποιο μοριακό στόχο, όπως μόρια-μεταφορείς, πρωτεΐνες, ένζυμα αλλά και νουκλεϊκά οξέα, επηρεάζοντας δραστικά τη φυσιολογία της λειτουργίας των κυττάρων και του οργανισμού. Στην περίπτωση που ο μοριακός στόχος του φαρμάκου είναι ενδοκυτταρικός, είναι απαραίτητη η εισαγωγή του στο εσωτερικό του κυττάρου, ώστε να μπορέσει εν συνεχεία να δράσει. Η εκλεκτική επίδραση ενός φαρμάκου με το μοριακό του στόχο αποτελεί ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό, καθώς έτσι αποφεύγεται η παρεμβολή του σε άλλες λειτουργίες του κυττάρου και τα επακόλουθα προβλήματα τοξικότητας που πιθανόν να προκύψουν.

Έρευνες έχουν αποδείξει ότι η πλειονότητα των νουκλεοζιτικών αναλόγων που παρουσιάζουν αντιικές και/ή αντικαρκινικές ιδιότητες δεν είναι από μόνα τους ενεργά, αλλά αποκτούν τη δραστικότητα τους αφού μεταφερθούν στο κύτταρο και μεταβολιστούν από ενδοκυτταρικά ένζυμα. Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα είναι υδρόφιλα μόρια και η παθητική τους διάχυση είναι περιορισμένη, οπότε σε πολλές περιπτώσεις απαιτούνται εξειδικευμένες πρωτεΐνες-μεταφορείς για να διαπεράσουν τις πλασματικές μεμβράνες και να εισαχθούν στα κύτταρα. Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες επιδεικνύουν ένα μοτίβο έκφρασης που εξαρτάται από τον ιστό και επηρεάζει τη φαρμακολογική δράση των τροποποιημένων νουκλεοζιτών (Pastor-Anglada *et al.* 1998). Εφόσον τα ανάλογα νουκλεοζιτών εισαχθούν στο κύτταρο, φωσφορυλιώνονται προς τα τριφωσφορικά τους παράγωγα από κυτταρικά ή ιικά ένζυμα. Η πρώτη φωσφορυλίωση οδηγεί στο σχηματισμό του 5'-μονοφωσφορικού (MP) νουκλεοζίτη και πραγματοποιείται με τη βοήθεια μιας νουκλεοζιτικής κινάσης. Ακολουθεί η μετατροπή του MP-νουκλεοζίτη προς την αντίστοιχη 5'-διφωσφορική και τριφωσφορική του δομή, η οποία καταλύεται από τη νουκλεοτιδική και νουκλεοζιτική διφωσφορική κινάση, αντίστοιχα (Wagner *et al.* 2000). Στη συνέχεια, οι ενεργές τριφωσφορικές δομές των αναλόγων είτε ενσωματώνονται και τροποποιούν τα μακρομόρια του DNA και του RNA, είτε παρεμβάλλονται σε διάφορα ένζυμα που σχετίζονται με τη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων, όπως οι DNA πολυμεράσες, επάγοντας μ' αυτόν τον

τρόπο την κυτταροτοξική ή την αντιική τους δράση (Galmarini *et al.* 2002, Berdis 2008).

Ένας κοινός μηχανισμός αντιικής και αντικαρκινικής δράσης των αναλόγων των νουκλεοζιτών είναι η ενσωμάτωσή τους στην επιμηκυνόμενη αλυσίδα του DNA, προκαλώντας τη διακοπή της επιμήκυνσής της. Η συγκεκριμένη δράση παρουσιάζεται στο χαρακτηριστικό παράδειγμα του φαρμάκου AZT, όπου ο αζιδο-νουκλεοζίτης προσλαμβάνεται αρχικά από το κύτταρο, ενεργοποιείται μεταβολικά στην τριφωσφορική του δομή και στη συνέχεια δρα ως αναστολέας της αντίστροφης μεταγραφάσης τερματίζοντας την αλυσίδα του ιικού DNA μετά τη σύνδεση του σε αυτή, καθώς απουσιάζει η 3'-υδροξύλο ομάδα και δεν μπορεί να ενωθεί με την 5'-φωσφορική ομάδα του επόμενου νουκλεοτιδίου (De Clercq, 2004) (Σχήμα 5).



Σχήμα 5

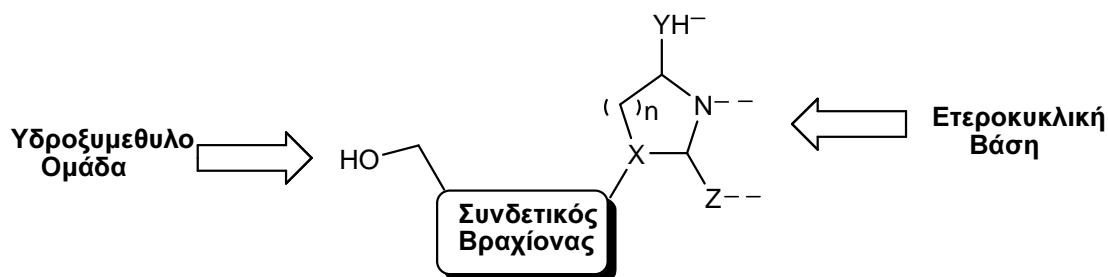
Η εκλεκτικότητα ανάμεσα στην αντιική και την κυτταροτοξική δράση των νουκλεοζιτικών αναλόγων εξαρτάται από την εξειδίκευση του υποστρώματος των τριφωσφορικών τους δομών ως προς τις ιικές και κυτταρικές πολυμεράσες (Challand και Young 1997). Εκτός των πολυμερασών, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα δρουν ως αποτελεσματικοί αντιικοί και αντικαρκινικοί παράγοντες, μέσω αναστολής και άλλων ενζύμων, όπως είναι η αφυδρογονάση της μονοφωσφορικής ινοσίνης και η συνθάση της τριφωσφορικής κυτιδίνης (De Clercq *et al.* 1991, Petrelli *et al.* 2013). Τα συγκεκριμένα ευρήματα προσφέρουν νέες ευκαιρίες θεραπευτικής δράσης, με την ανάπτυξη ενώσεων που θα στοχεύουν σε διαφορετικά ένζυμα και οι οποίες θα διαθέτουν συνεργιστική δράση με τους κλασικούς αναστολείς των πολυμερασών.

Η εντυπωσιακή πρόοδος στην κατανόηση του τρόπου δράσης των νουκλεοζιτικών αναλόγων, οδήγησε στη στοχευμένη σύνθεση παραγώγων με αποτελεσματικότερη φαρμακολογική δράση. Είναι γνωστό ότι τα νουκλεοζιτικά ανάλογα απενεργοποιούνται μέσω καταβολικών διαδικασιών, οι οποίες περιλαμβάνουν την απαμίνωση των νουκλεοζιτών της κυτοσίνης και της αδερίνης από τις αντίστοιχες απαμινάσες, αλλά και την υδρόλυση του γλυκοζιτικού τους δεσμού από τις νουκλεοζιτικές φωσφουλάσες (Langen 1975, Mikhailopulo 2007, Montgomery 1984, De Clercq 2002). Νέες γενιές νουκλεοζιτικών αναλόγων όπως Κλαδριβίνη, Χλωραφαβίνη, Φλουδαραβίνη διαθέτουν τα απαραίτητα δομικά χαρακτηριστικά, ώστε να αυξηθεί η αντίσταση στην απαμίνωση της αδενοσίνης, βελτιώνοντας σημαντικά τη δραστηριότητά τους ως αντικαρκινικά φάρμακα (Mikhailopulo και Miroshnikov, 2010).

1.4 Τροποποιημένοι Νουκλεοζίτες

Η τροποποίηση των νουκλεοζιτών έχει αναγνωριστεί σαν ένα σημαντικό ερευνητικό πεδίο για τη βελτίωση των αντιικών και αντικαρκινικών τους ιδιοτήτων. Κάθε βιολογικά ενεργός νουκλεοζίτης αποτελείται κατά κανόνα i) από μια ετεροκυκλική βάση, η οποία απαιτείται για την αναγνώριση από τα ένζυμα και το συμπληρωματικό κλώνο στη διαδικασία σύνθεσης του

νουκλεϊκού οξέος, ii) το τμήμα του σακχάρου και iii) μια υδροξυμεθυλο-ομάδα, η οποία απαιτείται για την ενεργοποίηση του αναλόγου από τις κυτταρικές κινάσες (Hernández-Reyes et al. 2012). Το τμήμα του σακχάρου μπορεί να θεωρηθεί σαν ένας συνδετικός βραχίονας (spacer) που συνδέει την ετεροκυκλική βάση με την υδροξυμεθυλο-ομάδα (Σχήμα 6). Η βιολογική δράση των νουκλεοζιτικών αναλόγων συχνά καθορίζεται από τη φύση του συνδετικού βραχίονα (το φουρανοζικό δακτύλιο στις φυσικές ενώσεις), ο οποίος ασκεί μια σημαντική επίδραση στη διαμόρφωση του μορίου και στις αλληλεπιδράσεις των ενώσεων με τις κυτταρικές κινάσες.



Βασική Δομή Νουκλεοζιτών

Σχήμα 6

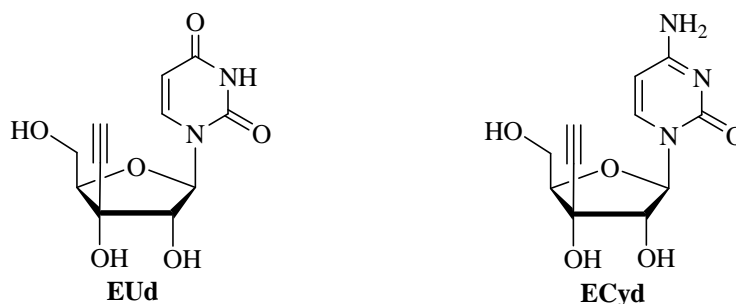
1.5 Φουρανονουκλεοζίτες

Η πλειονότητα των ερευνητικών προσπαθειών έχει εστιάσει στο σχεδιασμό και στη σύνθεση νουκλεοζιτικών αναλόγων που αποτελούνται από ένα φουρανοζικό δακτύλιο, ενωμένο με μια ετεροκυκλική βάση (πουρίνη ή πυριμιδίνη), γεγονός που αντικατοπτρίζεται και στις χημικές δομές των περισσότερων αντιικών και αντικαρκινικών νουκλεοζιτών που έχουν ανακαλυφθεί μέχρι σήμερα. Η διαμόρφωση του φουρανοζικού δακτυλίου θεωρείται ότι διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη βιολογική δράση των νουκλεοζιτών, ενώ ένα πλήθος δομικών τροποποιήσεων που έχει επιχειρηθεί οδήγησε σε βιολογικά υποσχόμενες νουκλεοζιτικές δομές. Δύο από τις πλέον ενδιαφέρουσες τάξεις φουρανονουκλεοζιτών που έχουν μελετηθεί τα τελευταία χρόνια αποτελούν οι αιθυνολο και οι κυανο-νουκλεοζίτες που αναλύονται παρακάτω.

1.5.1 Αιθυνυλο-φουρανονουκλεοζίτες

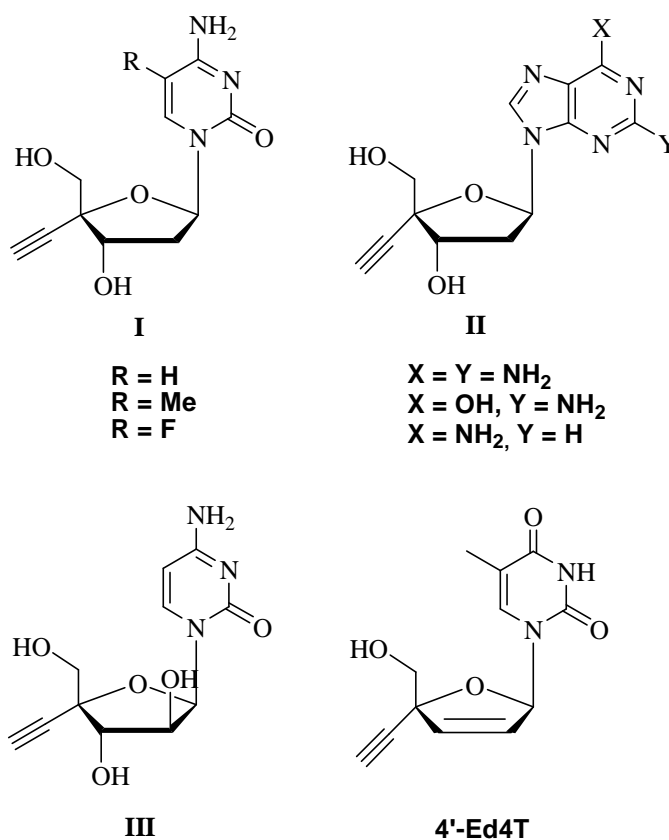
Η αιθυνυλομάδα διαθέτει μικρό μέγεθος και επίπεδη, γραμμική στερεοχημεία, λόγω του *sp* υβριδισμού της (Trachsel, 2003). Απολαμβάνει ιδιαίτερης δημοφιλίας στην οργανική σύνθεση, διότι ο τριπλός δεσμός μπορεί εύκολα να μετατραπεί σε διαφορετικές λειτουργικές ομάδες (Brandtsma, 1988). Επιχειρείται συχνά η εισαγωγή της σε μόρια φαρμακολογικού ενδιαφέροντος, καθώς έχει τη δυνατότητα να επιδράσει στη χημική τους δραστηριότητα μέσω ηλεκτρονικών φαινομένων, όπως επαγωγικά (Wermuth, 2008).

Φουρανονουκλεοζιτικά ανάλογα που φέρουν την αιθυνυλομάδα ως διακλαδισμένη αλυσίδα στο τμήμα του σακχάρου, αποτελούν ένα αρκετά ελκυστικό αντικείμενο μελέτης λόγω της σημαντικής βιολογικής τους δράσης. Ειδικότερα, τα 3'-C-αιθυνυλο-νουκλεοζιτικά ανάλογα της ουρακίλης EUd και της κυτοσίνης ECyd (Σχήμα 7), αποτελούν σημαντικούς αντικαρκινικούς παράγοντες έναντι ευρέος φάσματος κακοήθων όγκων (Hattori *et al.* 1996). Αξίζει να σημειωθεί ότι η παρουσία μιας 2',3'-cis διόλης στο μόριο τους αποδεικνύεται ως ένα απαραίτητο δομικό χαρακτηριστικό για την εμφάνιση κυτταροτοξικότητας, καθώς τα 3'-αιθυνυλο-επιμερή τους είναι βιολογικά ανενεργά (Hattori *et al.* 1998). Επιπρόσθετα, η 1-(3'-C-αιθυνυλο-β-D-ριβο-πεντοφουρανοζυλο)κυτοσίνη (ECyd), η οποία αποτελεί έναν ισχυρό αναστολέα της RNA πολυμεράσης (Kazuno *et al.* 2009), θεωρείται ως ένα ελπιδοφόρο αντικαρκινικό φάρμακο, το οποίο βρίσκεται στο στάδιο των κλινικών δοκιμών. Η συγκεκριμένη ένωση μπορεί επιπλέον να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα της ακτινοθεραπείας σε συμπαγείς καρκινικούς όγκους, επιδρώντας κατασταλτικά στους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του DNA των καρκινικών κυττάρων (Meike *et al.* 2011).



Σχήμα 7

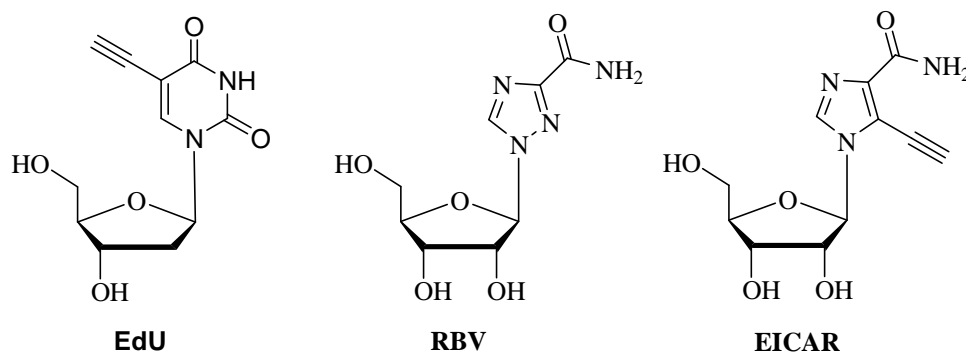
Η εισαγωγή της αιθυνυλο ομάδας στην 4' θέση του φουρανοζικού δακτυλίου, οδήγησε επίσης σε ενδιαφέροντες νουκλεοζίτες που παρουσιάζουν σημαντική αντιιική δράση. Οι πυριμιδινικοί και πουρινικοί 2'-δεοξυ νουκλεοζίτες I,II και ο αραβινο-νουκλεοζίτης της κυτοσίνης III εμφανίζουν πολύ ισχυρή αντι-HIV δράση, με ορισμένους από αυτούς να παραμένουν ενεργοί έναντι ανθεκτικών στελεχών του HIV (Ohruai *et al.* 2000) (Σχήμα 8). Σημαντικό ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει το 4'-C-αιθυνυλο παράγωγο του stavudine (4'-Ed4T), καθώς εμφανίζει καλύτερη αντι-HIV δράση από τη μητρική ένωση (Haraguchi *et al.* 2003) (Σχήμα 8).



Σχήμα 8

Η παρουσία της αιθυνυλο ομάδας στην ετεροκυκλική βάση οδήγησε επίσης σε νουκλεοζίτες με έντονο φαρμακολογικό ενδιαφέρον. Η 5-αιθυνυλο-2'-δεοξυ-ουριδίνη (EdU) (Σχήμα 9), παρουσίασε αυξημένη κυτταροτοξική δράση έναντι των καρκινικών κυτταρικών σειρών του ανθρώπινου μαστού MCF-7 και MDA-MB-231 (Meneni *et al.* 2007). Επιπλέον, το 5-αιθυνυλο-1-β-D-ριβοφουρανοζυλο-1H-ιμιδαζολο-4-καρβοξαμίδιο (EICAR) που επίσης φέρει την αιθυνυλο ομάδα στην ετεροκυκλική βάση παρουσιάζει εξαιρετικές αντιιικές

ιδιότητες. Συγκεκριμένα η αντιική του δράση εμφανίζεται από 10 έως 100 φορές μεγαλύτερη από αυτή του ribavirin (RBV) (Wu *et al.* 2005), το οποίο είναι το δραστικό συστατικό του μοναδικού φαρμάκου που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του ιού της ηπατίτιδας C. Επιπλέον της αντιικής του δράσης, το EICAR διαθέτει κυτταροτοξικές ιδιότητες, εμποδίζοντας την ανάπτυξη διαφόρων καρκινικών κυττάρων *in vitro* (Minakawa *et al.* 1991).



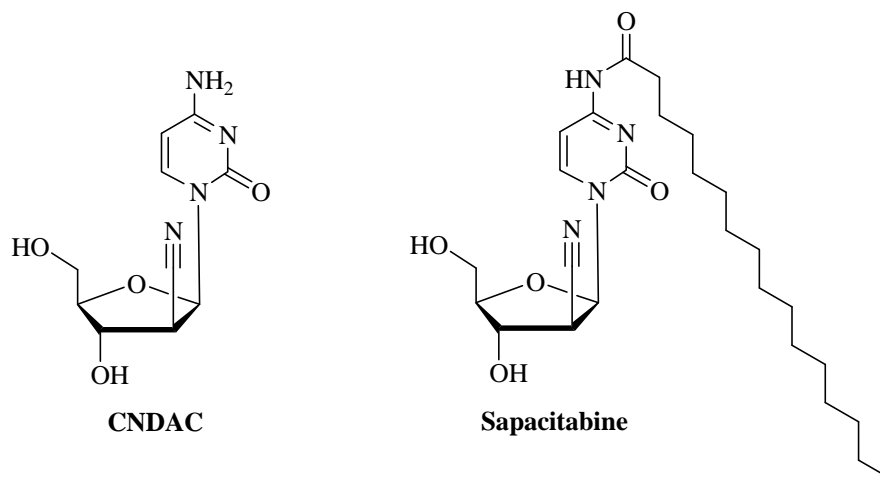
Σχήμα 9

1.5.2 Κυανο-φουρανουκλεοζίτες

Τις τελευταίες δεκαετίες ένα πλήθος νουκλεοζιτών, οι οποίοι φέρουν διακλαδώσεις στο φουρανοζικό δακτύλιο έχουν συντεθεί και αξιολογηθεί για τις αντιικές και αντικαρκινικές τους ιδιότητες (Hayakawa *et al.* 2004, Johnson *et al.* 1995, McCarthy *et al.* 1991, Takenuki *et al.* 1988). Από τις διάφορες τροποποιήσεις που έχουν κατά καιρούς ερευνηθεί, η εισαγωγή της κυανο-ομάδας στο μόριο ενός νουκλεοζίτη παρουσιάζει έντονο ενδιαφέρον λόγω του μικρού μεγέθους και της μεγάλης ηλεκτραρνητικότητας που διαθέτει. Πράγματι, η κυανο-ομάδα αποτελεί μια ξεχωριστή λειτουργική ομάδα λόγω του βραχέως, πολωμένου τριπλού δεσμού (Le Questel *et al.* 2000), ενώ η γραμμική, ραβδόμορφη γεωμετρία της με κυλινδρική διάμετρο 3.6 Å για το π-σύστημα (Fleming *et al.* 2010), προκαλεί ελάχιστες στερεοχημικές παρεμποδίσεις κατά μήκος του άξονα. Επίσης, η κυανο-ομάδα λόγω της ηλεκτραρνητικότητάς της μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις στη χημική δραστηριότητα ενός μορίου, ενώ είναι γνωστό ότι έχει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με διάφορα αμινοξέα (Laurence *et al.* 2009).

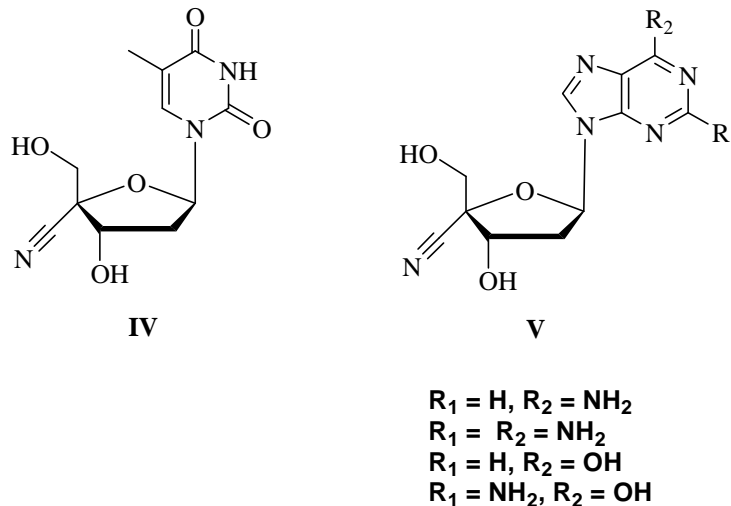
Η συγκεκριμένη ομάδα είναι επίσης αρκετά ανθεκτική και στην πλειονότητα των περιπτώσεων δεν μεταβολίζεται απευθείας, ενώ το νιτρίλιο στα περισσότερα φάρμακα που συνδέεται, περνάει από τον οργανισμό αμετάβλητο (Boyd *et al.* 2009, Ziemniak *et al.* 1984).

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της κατηγορίας ενώσεων αποτελεί η 2'-C-κυανο-2'-δεοξυ-1-β-D-αραβινοφουρανοσυλοκυτοσίνη (CNDAC), που προέκυψε με αντικατάσταση της 2'-υδροξυλομάδας του γνωστού αντιμεταβολίτη Ara-C από την κυανο ομάδα και αποτελεί ένα σημαντικό αντικαρκινικό παράγοντα έναντι ευρέος φάσματος κακοήθων όγκων, όπως αυτού του πνεύμονα και του στομάχου (Σχήμα 10) (Azuma *et al.* 1993). Το CNDAC διαθέτει ένα μοναδικό μηχανισμό βιολογικής δράσης καθώς μετά την ενσωμάτωση του στο DNA, προκαλεί ρήγματα της μονής έλικας του DNA, τα οποία μετατρέπονται σε σπασίματα της διπλής έλικας, όταν τα κύτταρα περνάνε από τη δεύτερη S φάση του κυτταρικού κύκλου (Liu *et al.* 2012). Τόσο ο ενεργός μεταβολίτης CDNAC, όσο και το στοματικά βιοδιαθέσιμο προφάρμακο Σαπασιταμπίνη (Sapacitabine) (Σχήμα 10), βρίσκονται αυτή την περίοδο σε κλινικές δοκιμές για τη θεραπεία ασθενών με αιματολογικές κακοήθειες και/ή για την αντιμετώπιση συμπαγών όγκων.



Σχήμα 10

Αξιοσημείωτη είναι επίσης η αντιική δράση ορισμένων φουρανονουκλεοζιτών που φέρουν ως διακλάδωση την κυανο-ομάδα στην 4'-θέση του σακχάρου. Τα 4'-κυανο νουκλεοζιτικά ανάλογα της θυμιδίνης **IV** και διαφόρων πουρινών **V**, εμφανίζουν έντονη αντι-HIV δράση (Σχήμα 11), ενώ επιπλέον οι πουρινικοί νουκλεοζίτες **V** παρουσιάζουν αυξημένο ενδιαφέρον καθώς παραμένουν ενεργοί έναντι ανθεκτικών στελεχών του ιού HIV (O-Yang *et al.* 1992, Kohgo *et al.* 2003). Αξίζει τέλος να σημειωθεί ότι η σύνθεση των 4'-υποκατεστημένων νουκλεοζιτών πραγματοποιείται τροποποιώντας ήδη συντεθειμένους νουκλεοζίτες, καθώς αποδείχτηκε ότι τα 4'-C-κυανο-υποκατεστημένα κυανασάκχαρα διαθέτουν μικρή δραστικότητα στις αντιδράσεις γλυκοζυλίωσης με τις κατάλληλες νουκλεοβάσεις.



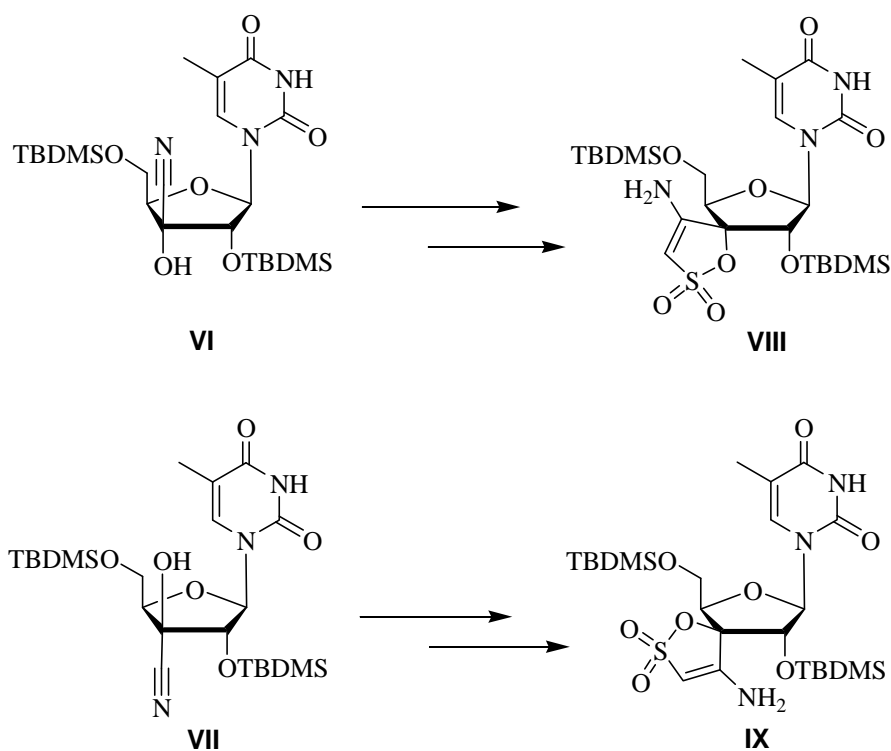
Σχήμα 11

1.5.3 Σπειρανικοί φουρανονουκλεοζίτες

Μία ασυνήθιστη κατηγορία νουκλεοζιτών αποτελούν οι σπειρανικοί φουρανονουκλεοζίτες, οι οποίοι διαθέτουν δύο δακτυλίους στο τμήμα του σακχάρου, ενωμένους μέσω ενός ατόμου άνθρακα. Το ενδιαφέρον για τη συγκεκριμένη κατηγορία προέκυψε μετά την απομόνωση του Hydantocidin από φυσική πηγή, ενός ψευδονουκλεοζίτη με ζιζανιοκτόνο δράση που έφερε ένα σπειρανικό κυκλικό δακτύλιο στο ανωμερικό κέντρο. Από τότε ένα πλήθος αναλόγων που φέρουν το σπειρανικό δακτύλιο σε διάφορες θέσεις του

σακχάρου έχει συντεθεί, με ορισμένα απ' αυτά να παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες αντιικές ιδιότητες (Tronchet *et al.* 2000, Maity *et al.* 2008).

Μια ενδιαφέρουσα ομάδα σπειρανικών ενώσεων αποτελούν οι TSAO νουκλεοζίτες, οι οποίοι έχουν ως πρόδρομες ενώσεις τα σάκχαρα κυανυδρινών και διαθέτουν αξιοσημείωτη δράση έναντι του ιού HIV-1. Απαραίτητη προϋπόθεση για τη βιολογική τους δράση αποτελεί η παρουσία της λιπόφιλης *tert*-βουτυλο-διμεθυλοσιλυλομάδας και του σπειρανικού δακτυλίου του 4-αμινο-1,2-οξαθειολο-2,2-διοξειδίου στο φουρανοζικό δακτύλιο. Δύο από τους πρώτους νουκλεοζίτες που συντέθηκαν, αποτελούν τα ανάλογα **VIII** και **IX** (Σχήμα 12), τα οποία προέρχονται από τις κυανυδρίνες **VI** και **VII**, αντίστοιχα (Camarasa *et al.* 1992). Αξίζει να τονιστεί ότι οι TSAO νουκλεοζίτες παρουσιάζουν μεγάλη εκλεκτικότητα στον ιό HIV-1 λόγω της ειδικής αλληλεπίδρασής τους με την p51 υπομονάδα του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης. Ως εκ τούτου παρά τους περιορισμούς στη χρησιμοποίησή τους ως κλινικά αντι-ρετροϊκά φάρμακα, τα ιδιαίτερα αυτά μόρια αποδείχτηκαν πολύτιμα εργαλεία στη μελέτη της αντιγραφής και αναστολής του συγκεκριμένου ενζύμου (Camarasa *et al.* 2004).

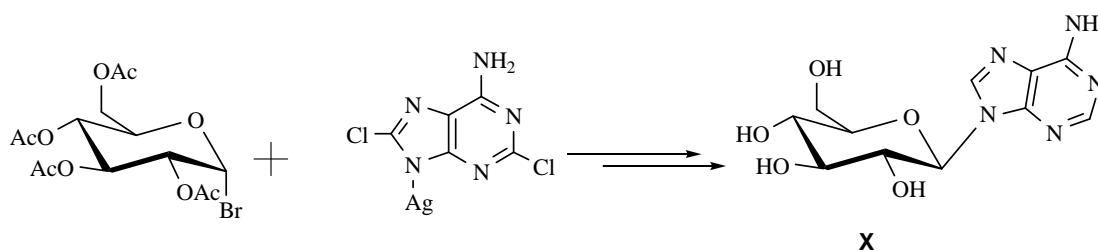


Σχήμα 12

1.6 Πυρανονουκλεοζίτες

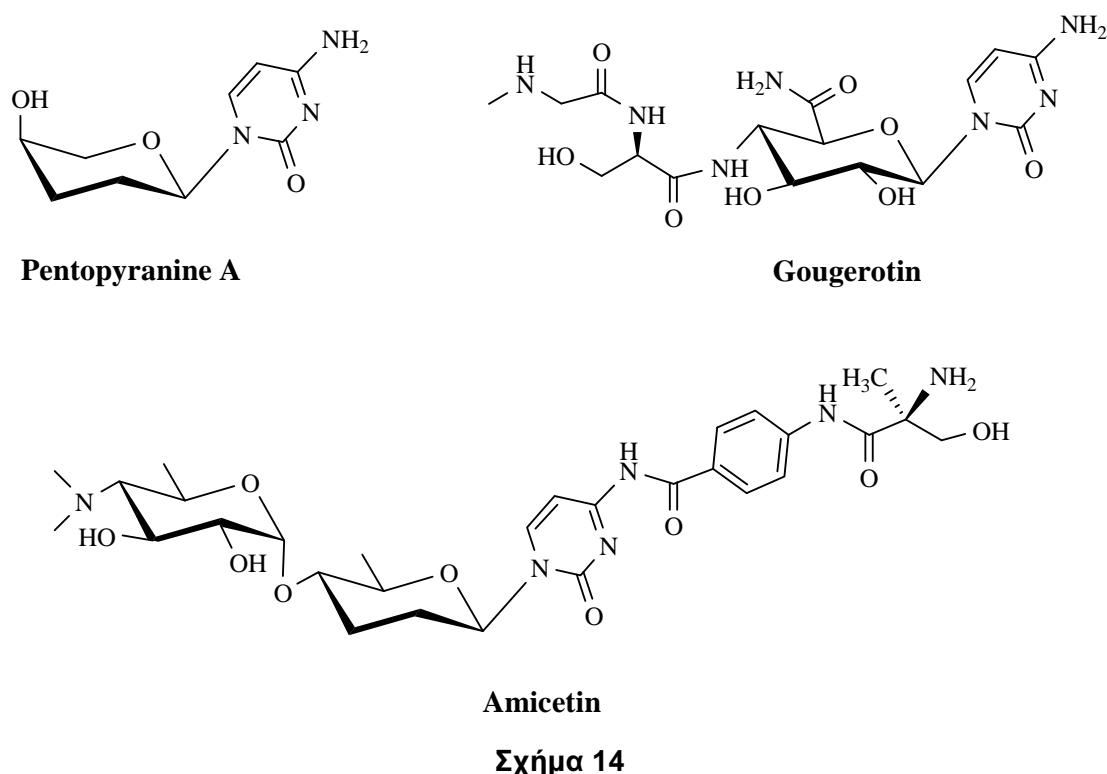
Τις τελευταίες δεκαετίες, ο αριθμός των συνθεθειμένων νουκλεοζιτών με τροποποιημένο πενταμελή υδατανθρακικό δακτύλιο έχει αυξηθεί σχεδόν εκθετικά, σε άμεση απόκριση της επιτακτικής ανάγκης για νέους θεραπευτικούς παράγοντες. Παρόλη όμως την ευρεία και αρκετά επιτυχημένη χρησιμοποίηση αντιικών και αντικαρκινικών φαρμάκων με δραστική ουσία κάποιο φουρανονουκλεοζιτικό ανάλογο, προβλήματα στις θεραπείες όπως οι τοξικές παρενέργειες αλλά και η εμφάνιση νέων ανθεκτικότερων ιικών στελεχών και όγκων, έστρεψαν το ερευνητικό ενδιαφέρον σε νέες και πολλές φορές πρωτότυπες κατηγορίες νουκλεοζιτών. Υπό το πρίσμα αυτό, τα πυρανονουκλεοζιτικά ανάλογα έχουν προταθεί σαν μια εναλλακτική και συγχρόνως ενδιαφέρουσα κατηγορία νουκλεοζιτών που παρουσιάζει έντονο βιολογικό ενδιαφέρον.

Αξίζει να σημειωθεί ότι ο πρώτος νουκλεοζίτης που συντέθηκε ποτέ χημικά ήτανε ένα πυρανονουκλεοζιτικό ανάλογο. Η συγκεκριμένη σύνθεση επιτεύχθηκε το 1914 από τους Fischer και Helferich, όπου συμπύκνωση του 2,3,4,6-τετρακίς-Ο-ακετυλο-α-D-γλυκοπυρανοζυλοβρωμιδίου με το άλας του αργύρου της 2,8-διχλωροαδενίνης, ακολουθούμενη από αφυδραλογόνωση και αποπροστασία οδήγησε στο σχηματισμό της *N*⁹-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)αδενίνης **X**, της οποίας η δομή καθορίστηκε με σαφήνεια 24 χρόνια αργότερα από τους J.M. Gulland και L.F. Story (Σχήμα 13).



Σχήμα 13

Το ερευνητικό ενδιαφέρον για τις συγκεκριμένες ενώσεις αυξήθηκε σημαντικά μετά την ανακάλυψη ότι πολλά φυσικά αντιβιοτικά αποτελούνται από νουκλεοζίτες που φέρουν πυρανοζικούς δακτυλίους στο γλυκοζιτικό τους τμήμα (Watanabe et al. 1974, Antonakis 1989). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η 1-(2',3'-διδεοξυ- α -L-γλυκεροπεντοπυρανοζυλο)κυτοσίνη ή αλλιώς γνωστή ως πεντοπυρανή A (pentopyranine A), η αμισετίνη (amicetin) καθώς και η γουγεροτίνη (gougerotin) (Σχήμα 14), η οποία παρουσιάζει επιπλέον ενδιαφέρουσες αντιικές και αντικαρκινικές ιδιότητες.



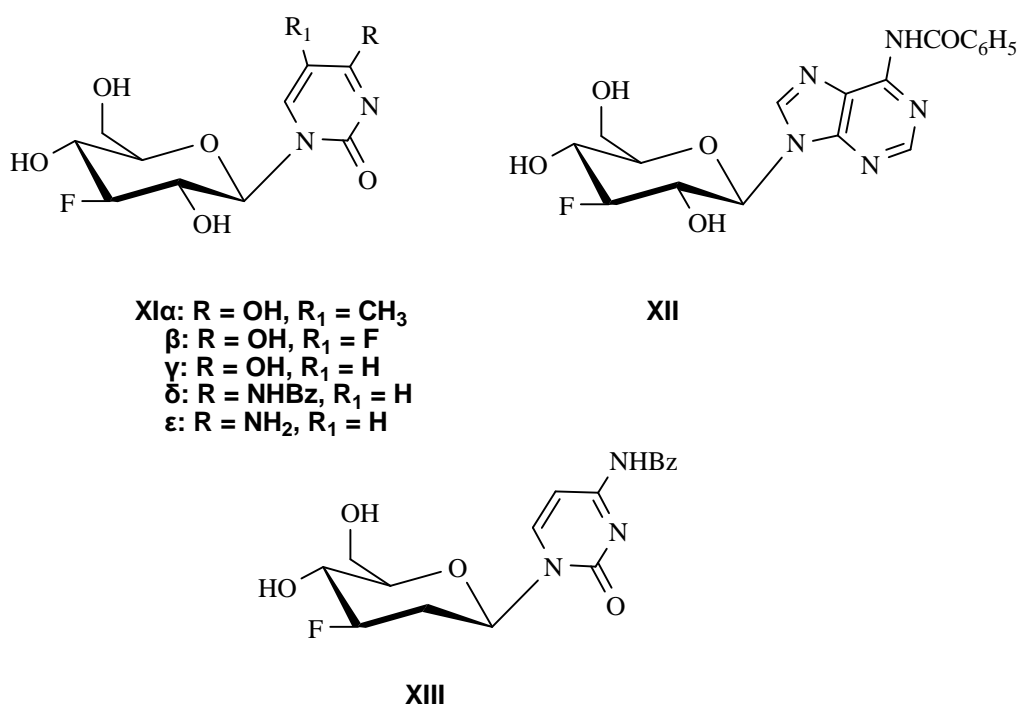
Πρόσφατα ανανεωμένο ενδιαφέρον έχει εκδηλωθεί για τα νουκλεοζιτικά ανάλογα με εξαμελείς υδατανθρακικούς δακτυλίους, μετά τη διαπίστωση ότι διαθέτουν αυξημένη σταθερότητα λόγω της αντίστασης στην υδρόλυση του γλυκοζιτικού τους δεσμού, η οποία αποτελεί και το συνηθισμένο μονοπάτι αποικοδόμησής τους (Nair και Buenger, 1990). Πλήθος πυρανονουκλεοζιτών έχει συντεθεί με στόχο να αναπτυχθούν νέες ενώσεις με αντιικές (Verheggen *et al.* 1993, Verheggen *et al.* 1995, Maurinsh *et al.* 1997, Ostrowski *et al.* 1998), αντικαρκινικές (Dimopoulou *et al.* 2013, Mane *et al.* 2011, Manta *et al.*

2012), αντιβιοτικές (Haouz *et al.* 2003, Stauffer *et al.* 2009) και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Spanou *et al.* 2007, Spanou *et al.* 2011).

Συστηματικές δομικές τροποποιήσεις του εξαμελούς υδατανθρακικού δακτυλίου οδήγησαν στην ανάπτυξη νέων τάξεων κετο, εξωμεθυλενο, φθορο και δεοξυ-πυρανονουκλεοζιτών, οι οποίοι διαθέτουν σημαντική βιολογική δράση (Tsoukala *et al.* 2012, Tsirkone *et al.* 2010, Manta *et al.* 2014). Πυρανονουκλεοζίτες αυτών των κατηγοριών είναι γνωστό ότι παρεμποδίζουν τη σύνθεση του DNA, του RNA και ότι αντιδρούν με τις σουλφυδρυλο-ομάδες των κυτταρικών πρωτεϊνών και ενζύμων (Aujard *et al.* 1978, Halmos *et al.* 1983). Ο μηχανισμός της δράσης τους συχνά περιλαμβάνει την ικανότητά τους να λειτουργούν σαν δέκτες σε μια αντίδραση προσθήκης τύπου Michael, ενώ ενδιαφέρον παρουσιάζει και η διαπίστωση ότι πολλά νουκλεοζιτικά ανάλογα της 5-φθοροουρακίλης δρουν ως προφάρμακα της 5-φθοροουρακίλης έχοντας σαν κύριο μοριακό στόχο της κυτταροστατικής τους δράσης τη συνθάση του θυμιδυλικού (Tzioumaki *et al.* 2009, Tzioumaki *et al.* 2011). Δύο από τις σημαντικότερες κατηγορίες πυρανονουκλεοζιτών που έχουν μελετηθεί ενδελεχώς για τη βιολογική τους δραστηριότητα είναι οι φθορο και δεοξυ-πυρανονουκλεοζίτες.

Η εισαγωγή του ηλεκτραρνητικού ατόμου φθορίου στη 3'-θέση ενός πυρανοζικού δακτυλίου, οδήγησε σε μια νέα σειρά φθοριωμένων πυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων **XIα-δ** και **XII** (Σχήμα 15), οι οποίοι επέδειξαν σημαντική δράση σε μοριακό επίπεδο ως αναστολείς του ενζύμου της πολυ(A)-εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης (PARN), ένα σημαντικό ένζυμο-κλειδί στην αποικοδόμηση του mRNA μέσω της βράχυνσης της πολυ(A) ουράς του (Balatsos *et al.* 2009, Balatsos *et al.* 2012). Κινητικά πειράματα απέδειξαν ότι οι 3'-φθορογλυκοπυρανονουκλεοζίτες αναστέλλουν το ένζυμο της PARN σε χαμηλές συγκεντρώσεις, με τον νουκλεοζίτη της ουρακίλης **XIγ** να αποτελεί τον πλέον αποτελεσματικό αναστολέα. Οι ενώσεις που εξετάστηκαν και αναστέλλουν αποτελεσματικά το ένζυμο της PARN, μπορούν πιθανότατα να έχουν φαρμακευτικές εφαρμογές στη ρύθμιση της αποικοδόμησης του mRNA, κυρίως σε περιπτώσεις από-ρυθμιζόμενων (καρκινικών) κυτταρικών σειρών (Balatsos *et al.* 2012).

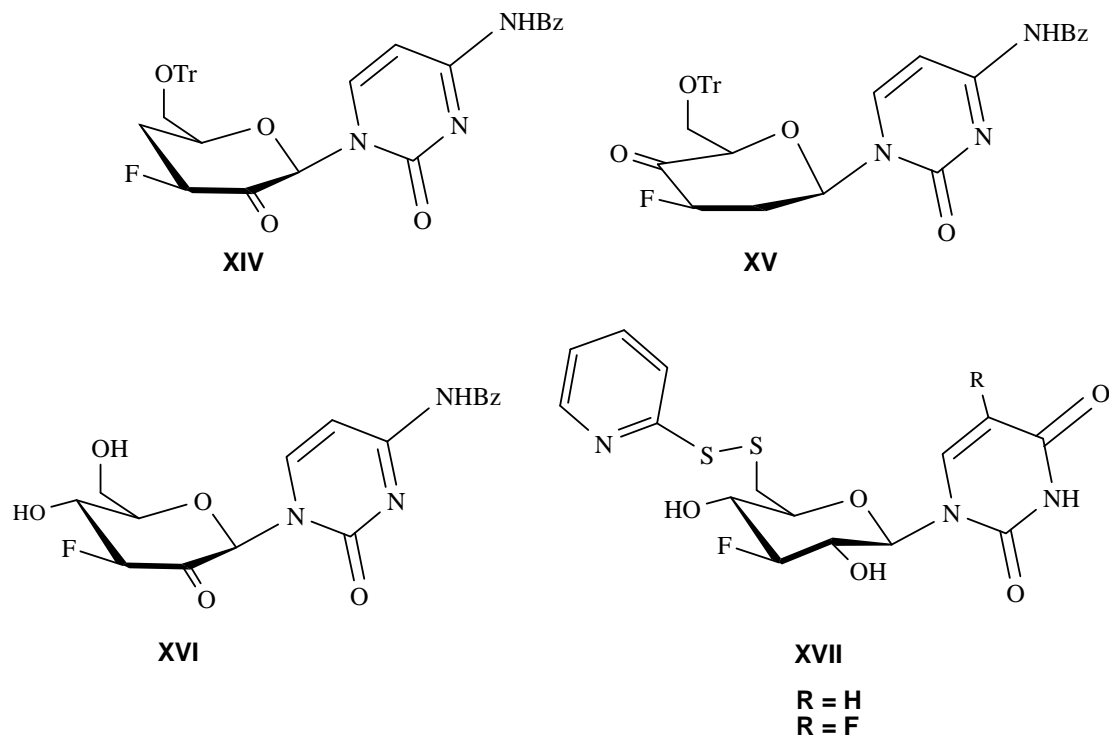
Οι 3'-φθοριωμένοι πυριμιδινικοί πυρανονουκλεοζίτες (ενώσεις **XIβ-ε**, **XIII**, Σχήμα 15) επιδεικνύουν επίσης σημαντική δράση ως ανταγωνιστικοί αναστολείς της φωσφορυλάσης του μυϊκού γλυκογόνου (GP) (Tsirkone *et al.* 2010). Οι συγκεκριμένες μελέτες είναι αρκετά σημαντικές καθώς η GP είναι ένα ένζυμο με κεντρικό ρόλο στον καταβολισμό του γλυκογόνου και θεωρείται ένας αρκετά υποσχόμενος μοριακός στόχος για το σχεδιασμό αναστολέων που θα επιτρέψουν το βελτιωμένο γλυκαιμικό έλεγχο στο διαβήτη τύπου 2.



Σχήμα 15

Η εισαγωγή του φθορίου σε συνδυασμό με κάποια επιπλέον δομική τροποποίηση του εξαμελούς δακτυλίου οδήγησε σε νέες πρωτότυπες σειρές νουκλεοζιτικών αναλόγων, οι οποίες παρουσιάζουν έντονο βιολογικό ενδιαφέρον. Συγκεκριμένα, αποδείχθηκε ότι 3'-φθοριωμένοι κετοπυρανονουκλεοζίτες της *N*⁴-βενζοϋλοκυτοσίνης μπορούν να θεωρηθούν ελπιδοφόρες για την ανάπτυξη αντι-εντεροϊικών φαρμάκων (ενώσεις **XIV- XVI**, σχήμα 16), ενώ παρουσίασαν σημαντική κυτταροτοξική δράση έναντι διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών και ειδικότερα έναντι των ανθρώπινων γαστρικών καρκινικών κυττάρων (AGS) (Manta *et al.* 2009). Επιπλέον, φθοροπυρανονουκλεοζίτες, οι οποίοι διαθέτουν μία θειοπυριδινυλική ομάδα στη 6'-θέση του σακχάρου παρουσίασαν

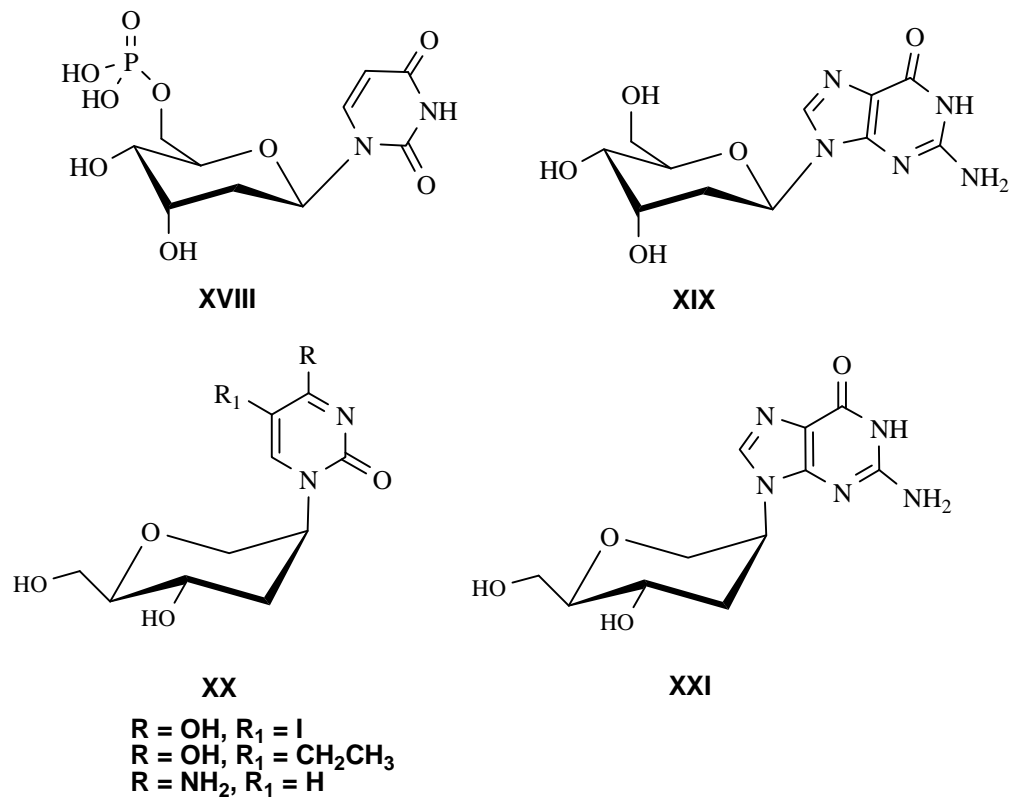
αντιπολλαπλασιαστικές ιδιότητες έναντι λευχαιμικών κυττάρων ποντικού (L1210) καθώς και των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του τραχήλου (HeLa) (Ενώσεις **XVII**, σχήμα 16) (Tsoukala *et al.* 2010).



Σχήμα 16

Τέλος, η αντικατάσταση ενός υδροξυλίου από ένα άτομο υδρογόνου σε μία ή και περισσότερες θέσεις του σακχάρου, οδήγησε σε δεοξυπυρανονουκλεοζιτικά ανάλογα που εμφάνισαν σημαντική βιολογική δράση. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε πουρινικούς και πυριμιδινικούς 2'-δεοξυπυρανονουκλεοζίτες απέδειξαν ότι το μονοφωσφορυλιωμένο ανάλογο της ουρακίλης **XVIII** και το ανάλογο της γουανίνης **XIX** διαθέτουν ενδιαφέρουσες αντιικές και αντικαρκινικές ιδιότητες, αντίστοιχα (Nord *et al.* 1987) (Σχήμα 17). Μία ακόμη διαπίστωση που αυξάνει το ενδιαφέρον για τους δεοξυ-νουκλεοζίτες, αποτελεί το γεγονός ότι ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία περιέχουν διδεοξυ-β-D-ερυθρο-εξοπυρανονουκλεοζίτες, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια (Augustyns *et al.* 1994). Μια άλλη ασυνήθιστη κατηγορία δεοξυπυρανονουκλεοζιτών αποτελούν οι 1,5-ανυδροεξιτολο-νουκλεοζίτες, οι οποίοι μπορούν να θεωρηθούν ως 2'-

δεοξυ-φουρανουκλεοζιτικά ανάλογα με διευρυμένο δακτύλιο, όπου μια μεθυλενο-ομάδα εισέρχεται μεταξύ του οξυγόνου του δακτυλίου και του ατόμου του άνθρακα που ενώνεται με την ετεροκυκλική βάση (Verheggen *et al.* 1993, Verheggen *et al.* 1995) (Ενώσεις **XX**, **XXI**, σχήμα 17). Ένα επιπλέον ενδιαφέρον δομικό τους χαρακτηριστικό αποτελεί ο αξονικός προσανατολισμός της νουκλεοβάσης, που είναι αρκετά ασυνήθιστος στα πυρανονουκλεοζιτικά ανάλογα. Οι συγκεκριμένες ενώσεις προσέλκυσαν το ερευνητικό ενδιαφέρον καθώς αποδείχτηκαν αποτελεσματικοί αναστολείς του ιού απλού έρπητα τύπου 1 και τύπου 2, του κυτταρομεγαλοϊού καθώς και του ιού έρπητα ζωστήρα.

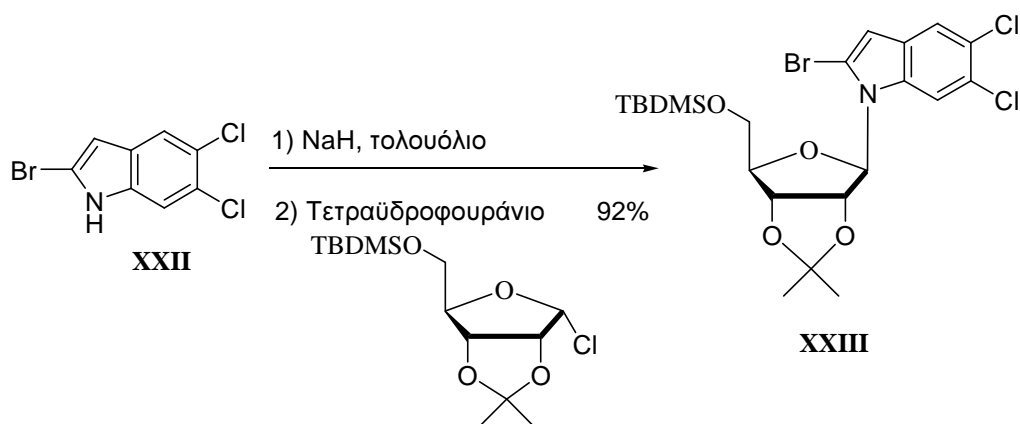


Σχήμα 17

1.7 Μέθοδοι σύνθεσης νουκλεοζιτικών αναλόγων

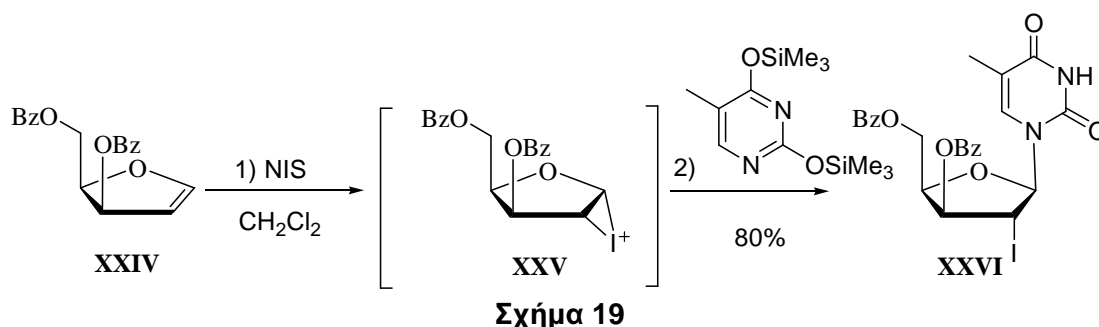
Η σύνθεση των νουκλεοζιτικών αναλόγων βασίζεται κατά κανόνα στη σύζευξη μιας πυρηνόφιλης πυριμιδινικής, πουρινικής ή άλλης ετεροκυκλικής βάσης με ένα ηλεκτρονιόφιλο σάκχαρο μέσω του σχηματισμού ενός *N*-γλυκοζιτικού δεσμού (Vorbrüggen και Ruh-Pohlenz 2000, Vorbrüggen και Ruh-Pohlenz 2001). Οι σημαντικότερες συνθετικές μέθοδοι που εφαρμόζονται για τη νουκλεοζιτική σύνθεση, περιλαμβάνουν: α) τη χρήση μεταλλικών αλάτων, β) την ηλεκτρονιόφιλη προσθήκη σε μια γλυκάλη (glycal), γ) την αντίδραση Mitsunobu, και δ) τη μέθοδο Vorbrüggen.

Οι πρώτες συνθέσεις νουκλεοζιτικών αναλόγων επιτεύχθηκαν μέσω της σύζευξης αλάτων Ag ή Hg(II) ετεροκυκλικών βάσεων και αλογονωμένων σακχάρων (Fischer και Helferich 1914, Davoll *et al.* 1948, Davoll και Lowy 1951). Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται μέσω μιας πυρηνόφιλης υποκατάστασης (Nucleophilic Substitution) τύπου S_N2 , του αλογόνου (χλωρίου ή βρωμίου) ενός σακχάρου από το μεταλλικό άλας της νουκλεοβάσης. Αργότερα, η αντικατάσταση των βαρέων μετάλλων από άλατα του νατρίου παρουσίασε σημαντικά πλεονεκτήματα, όσον αφορά το κόστος και την τοξικότητα των αντιδραστηρίων (Kazimierczuk *et al.* 1984). Στο σχήμα 18 απεικονίζεται η σύνθεση ενός υποκατεστημένου ινδολικού νουκλεοζιτικού αναλόγου **XXIII**, όπου η ετεροκυκλική βάση **XXII** σχηματίζει “*in situ*” το άλας του νατρίου στο πρώτο στάδιο της αντίδρασης (Chen *et al.* 2000).

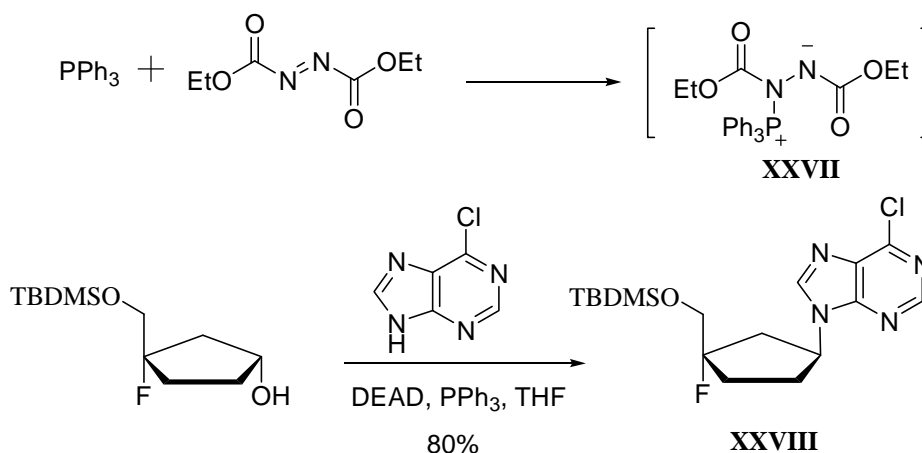


Σχήμα 18

Μια άλλη στρατηγική που χρησιμοποιείται λιγότερο συχνά εν συγκρίσει με τις υπόλοιπες μεθόδους, είναι η ηλεκτρονιόφιλη προσθήκη σε μια γλυκάλη. Αρχικά πραγματοποιείται η ενεργοποίηση μιας γλυκάλης παρουσία ενός ηλεκτρονιόφιλου αντιδραστήριου όπως NIS (*N*-ιωδοσοουκινιμίδιο), I₂, PhSeCl (φαινυλο-χλωριουχο-σελήνιο), και ακολουθεί η πυρηνόφιλη προσβολή μιας σιλυλιωμένης βάσης στο σάκχαρο, οδηγώντας σε πολλές περιπτώσεις σε μείγματα α:β νουκλεοζιτικών ανωμερών (Kassou και Castillon 1997, Diaz *et al.* 1997, Dong και Paquette 2006). Η ηλεκτρονιόφιλη προσθήκη μπορεί να λάβει χώρα επίσης εκλεκτικά σε μία όψη του υδατανθρακικού δακτυλίου, όπως φαίνεται στο παράδειγμα σύνθεσης του νουκλεοζιτικού αναλόγου της θυμίνης **XXVI**, όπου αντίδραση της γλυκάλης **XXIV** με *N*-ιωδοσοουκινιμίδιο οδηγεί στο σχηματισμό του α-ιωδο κατιόντος **XXV** κατά το πρώτο στάδιο της αντίδρασης, λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης της πάνω όψης του υδατανθρακικού δακτυλίου (Σχήμα 19) (Robles *et al.* 1997).

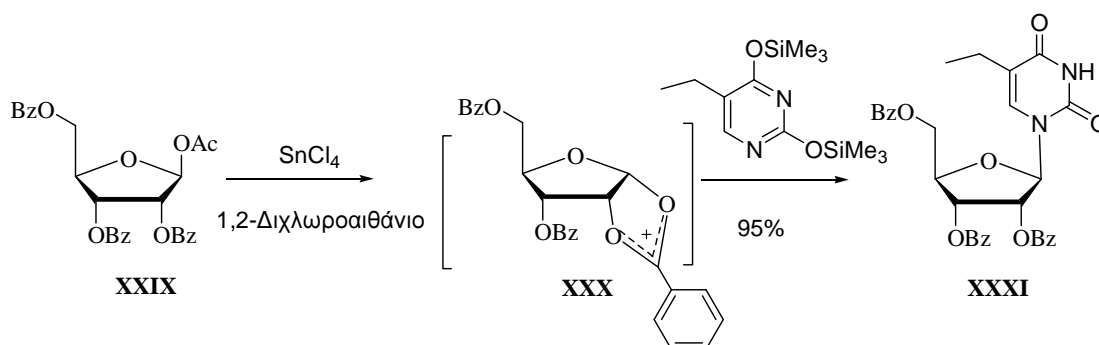


Η αντίδραση Mitsunobu απολαμβάνει επίσης σημαντικής δημοφιλίας ιδιαίτερα στη σύνθεση άκυκλων και καρβοκυκλικών νουκλεοζιτών (Paju *et al.* 2010), επιτρέποντας τη σύζευξη μιας ετεροκυκλικής βάσης με ένα σάκχαρο το οποίο φέρει μια υδροξυλομάδα (Kumara Swamy *et al.* 2009). Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης σχηματίζεται αρχικά *in situ* η βεταΐνη **XXVII** από τον διαιθυλοαζωδικαρβοξυλικό εστέρα (DEAD) και την τριφαινυλοφωσφίνη (PPh₃) (Σχήμα 20). Η βεταΐνη αποπρωτονιώνει τη νουκλεοβάση, ενώ η υδροξυλομάδα του σακχάρου μετατρέπεται σε παράγωγο της PPh₃ και εν συνεχεία υφίσταται πυρηνόφιλη υποκατάσταση τύπου S_N2 από την αποπρωτονιωμένη νουκλεοβάση. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτού του τύπου των αντιδράσεων φαίνεται στο σχήμα 20 της σύνθεσης του 4'-φθοροκαρβοκυκλικού νουκλεοζίτη **XXVIII** (Chong και Chu 2000).



Σχήμα 20

Η πλέον όμως καθιερωμένη μεθοδολογία που εφαρμόζεται στη νουκλεοζιτική σύνθεση είναι η μέθοδος Vorbrüggen, η οποία πραγματοποιείται μέσω της σύζευξης ενός σακχάρου με μια αποχωρούσα ομάδα στον ανωμερικό άνθρακα και μιας σιλυλιωμένης νουκλεοβάσης, υπό την παρουσία ενός Friedel-Crafts καταλύτη όπως SnCl_4 και $\text{Me}_3\text{SiSO}_3\text{CF}_3$ (Vorbrüggen και Ruh-Pohlenz 2000). Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται κατά κανόνα με προβλεπόμενη στεreoχημεία και σε ήπιες συνθήκες, ενώ η επιλογή των ακετυλιωμένων σακχάρων προσφέρει εύκολα προσβάσιμα υποστρώματα, με αυξημένη σταθερότητα εν συγκρίσει με τα αντίστοιχα αλογονωμένα σάκχαρα. Ένα από τα πρώτα παραδείγματα αντίδρασης Vorbrüggen φαίνεται στο παρακάτω σχηματισμό του νουκλεοζίτη της 5-αιθυλο-ουρακίλης **XXXI** (Σχήμα 21) (Niedballa και Vorbruggen 1970). Η διαμεσολάβηση του καρβοκατιόντος **XXX** που σχηματίζεται “in situ” κατά την ενεργοποίηση του σακχάρου **XXIX** από τον καταλύτη SnCl_4 , υποχρεώνει την πυρηνόφιλη βάση να προσβάλλει το κατιόν από την αντίθετη πλευρά του δακτυλίου.



Σχήμα 21

1.8 Στόχοι της παρούσης διατριβής

Όπως έχει αναφερθεί, οι τροποποιημένοι νουκλεοζίτες αποτελούν ορισμένα από τα πλέον επιτυχημένα αντιικά και αντικαρκινικά φάρμακα που έχουν αναπτυχθεί μέχρι σήμερα. Πλήθος ενώσεων της συγκεκριμένης κατηγορίας με διαφορετικά και κάποιες φορές ασυνήθιστα δομικά χαρακτηριστικά έχει ήδη συντεθεί, ενώ ανάλογά τους κρίνονται αρκετά ελπιδοφόρα για διάφορες θεραπείες, ευρισκόμενα στο στάδιο των κλινικών δοκιμών. Παρόλα τα σημαντικά αυτά επιτεύγματα, υπάρχει η διαρκής ανάγκη για το σχεδιασμό και τη μελέτη νέων νουκλεοζιτικών αναλόγων με απώτερο σκοπό την ανακάλυψη δραστικότερων αλλά και αποτελεσματικότερων θεραπευτικών ενώσεων.

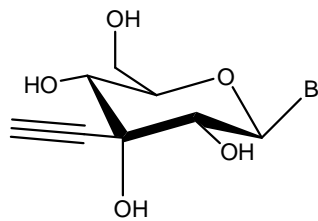
Ο σχεδιασμός των μορίων, τα οποία συντέθηκαν στα πλαίσια της συγκεκριμένης διατριβής, βασίστηκε στα παρακάτω δεδομένα:

- Οι νουκλεοζίτες, οι οποίοι φέρουν την αιθυλομάδα ως διακλαδισμένη αλυσίδα στο τμήμα της φουρανόζης εμφανίζουν έντονο φαρμακολογικό ενδιαφέρον.
- Η προσθήκη της ηλεκτραρνητικής κυανο-ομάδας σε ένα μόριο φουρανονουκλεοζίτη μπορεί να του προσδώσει ενδιαφέρουσες αντιικές ή/και αντικαρκινικές ιδιότητες.
- Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα με εξαμελείς υδατανθρακικούς δακτυλίους παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών ιδιοτήτων, ενώ μια ιδιαίτερως ενδιαφέρουσα υποκατηγορία τους αποτελούν οι δεοξυ-πυρανονουκλεοζίτες.

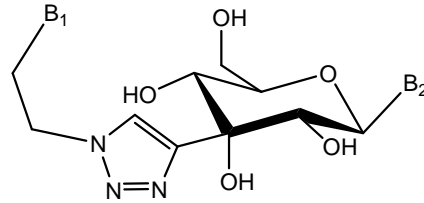
Με βάση τα ανωτέρω, η παρούσα διατριβή εστιάστηκε στο σχεδιασμό, τη σύνθεση και τη βιολογική αποτίμηση νέων νουκλεοζιτικών αναλόγων με εξαμελείς υδατανθρακικούς δακτυλίους που φέρουν διακλαδισμένη την αιθυλο- ή την κυανο-ομάδα. Στην πορεία της έρευνας και καθώς διαπιστώθηκε η κυτταροστατικότητα των κυανο-αναλόγων, αποφασίστηκε η μεταφορά της κυανο ομάδας σε άλλες θέσεις του σακχάρου για να διερευνηθεί εάν και κατά πόσο μεταβάλλεται η βιολογική τους δράση.

Πιο αναλυτικά-συγκεκριμένα οι ενώσεις που συντέθηκαν απεικονίζονται παρακάτω:

- 3'-C-Αιθυνολο πυρανονουκλεοζίτες **5α-γ,ζ,στ**, στους οποίους η παρουσία του τριπλού δεσμού αποτέλεσε μια εξαιρετική αφετηρία για την περαιτέρω σύνθεση νέων 1,2,3-τριαζολο-πυρανονουκλεοζιτών με διπλή κεφαλή, **8α-η** (Σχήμα 22).



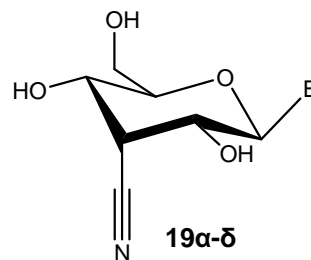
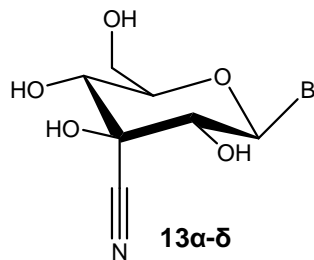
5α: B = 5-φθοροουρακίλη
β: B = ουρακίλη
γ: B = θυμίνη
ζ: B = κυτοσίνη
στ: B = αδερίνη



8α: B₁ = αδερίνη, B₂ = ουρακίλη
β: B₁ = αδερίνη, B₂ = θυμίνη
γ: B₁ = αδερίνη, B₂ = κυτοσίνη
δ: B₁ = αδερίνη, B₂ = αδερίνη
ε: B₁ = αδερίνη, B₂ = 5-φθοροουρακίλη
ζ: B₁ = 5-φθοροουρακίλη, B₂ = 5-φθοροουρακίλη
στ: B₁ = 5-φθοροουρακίλη, B₂ = ουρακίλη
η: B₁ = θυμίνη, B₂ = ουρακίλη

Σχήμα 22

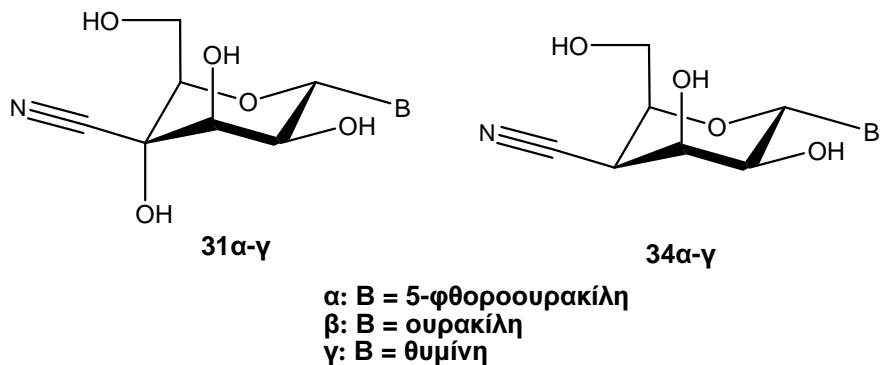
- 3'-C-Κυανο και 3'-C-κυανο-3'-δεοξυπυρανονουκλεοζίτες, **13α-δ** και **19α-δ**, αντίστοιχα (Σχήμα 23).



α: B = 5-φθοροουρακίλη
β: B = ουρακίλη
γ: B = θυμίνη
δ: B = κυτοσίνη

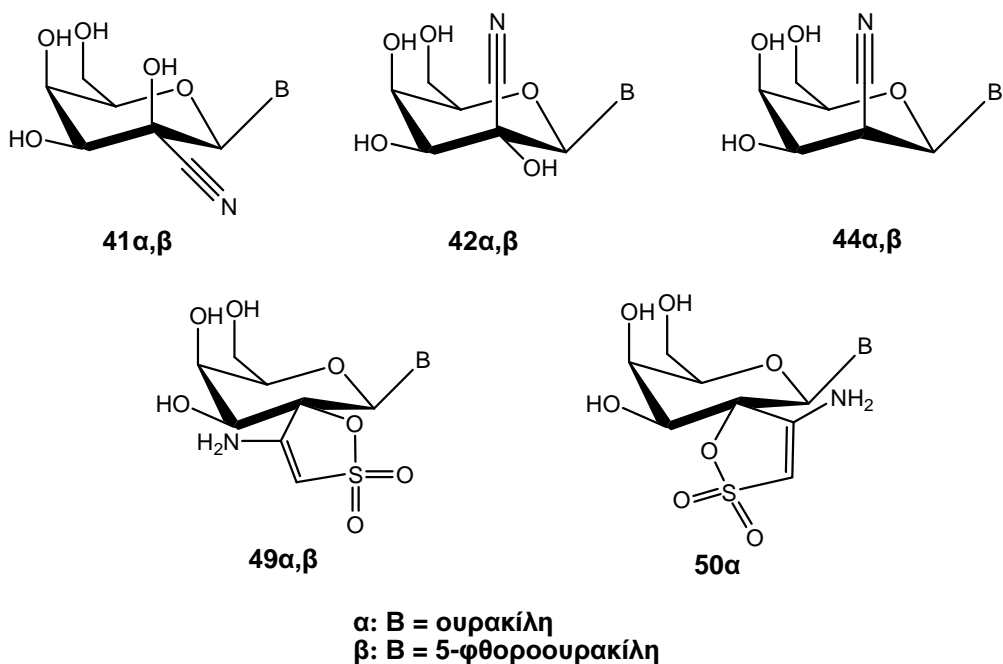
Σχήμα 23

- 4'-C-Κυανο και 4'-C-κυανο-4'-δεοξυπυρανονουκλεοζίτες, **31α-γ** και **34α-γ**, αντίστοιχα (Σχήμα 24).



Σχήμα 24

- 2'-C-Κυανο **41α,β**, **42α,β** και 2'-C-κυανο-2'-δεοξυ πυρανονουκλεοζίτες **44α,β** (Σχήμα 25). Δεδομένου ότι οι ληφθείσες κυανουδρίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συνθετικά ενδιάμεσα για την παραλαβή διαφόρων σπειρανικών παραγώγων με ενδεχόμενο βιολογικό ενδιαφέρον, συντέθηκαν και οι 2'-σπειρανικοί νουκελοζίτες **49α,β** και **50α** (Σχήμα 25).



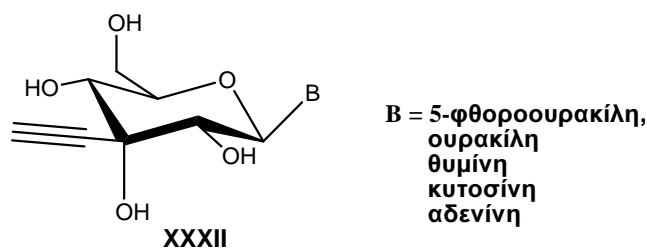
Σχήμα 25

II. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

II.1 Σύνθεση των 3'-C-αιθυλο πυρανονουκλεοζιτών και 3'-C-(1,4-διυποκαστημενων-1,2,3-τριαζολο)πυρανονουκλεοζιτών με διπλή κεφαλή

Όπως προαναφέρθηκε, η προσθήκη της αιθυλομάδας σε ένα μόριο φουρανονουκλεοζίτη μπορεί να του προσδώσει ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες. Πολλοί αιθυλο-νουκλεοζίτες έχουν μελετηθεί εκτενώς για την εύρεση αποτελεσματικών και χημικά σταθερών αντιικών και αντικαρκινικών μέσων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτής της κατηγορίας ενώσεων αποτελούν τα 3'-C-αιθυλο-β-D-ριβο-πεντοφουρανοζυλο ανάλογα της ουρακίλης (EUd) και της κυτοσίνης (ECyd) (Σχήμα 7), τα οποία διαθέτουν σημαντική αντικαρκινική δράση. Το 3'-C-αιθυλο-νουκλεοζιτικό ανάλογο της κυτοσίνης (ECyd) βρίσκεται πλέον στο στάδιο των κλινικών δοκιμών και θεωρείται ως ένα εν δυνάμει αντικαρκινικό φάρμακο (Hattori *et al.* 1996, Kazuno *et al.* 2009).

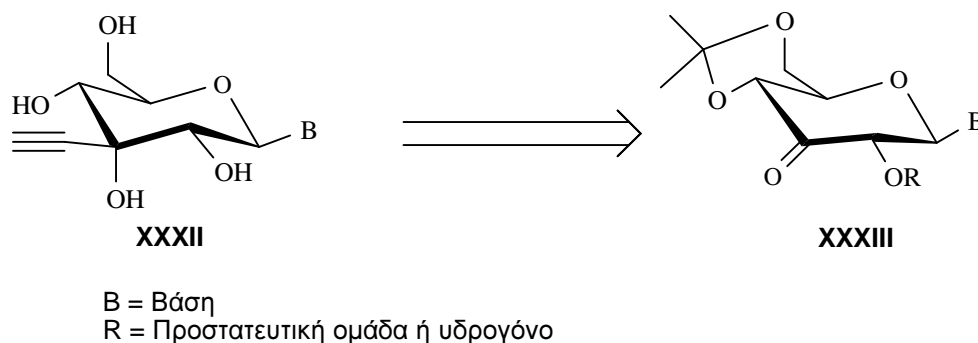
Λαμβάνοντας υπόψη τις αξιοσημείωτες βιολογικές ιδιότητες των ανωτέρω αιθυλο-φουρανονουκλεοζιτών, σε συνδυασμό με την έλλειψη αιθυλο-πυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων, συντέθηκε και αποτιμήθηκε βιολογικά μία νέα τάξη πυρανονουκλεοζιτών που φέρουν την αιθυλομάδα στην 3'-θέση του σακχάρου, ενώ διαθέτουν ως ετεροκυκλικές βάσεις την 5-φθοροουρακίλη, ουρακίλη, θυμίνη, κυτοσίνη και την αδενίνη. Πιο αναλυτικά συγκεκριμένα οι ενώσεις που συντέθηκαν έχουν τον παρακάτω γενικό τύπο (Ενώσεις XXXII, σχήμα 26):



Σχήμα 26

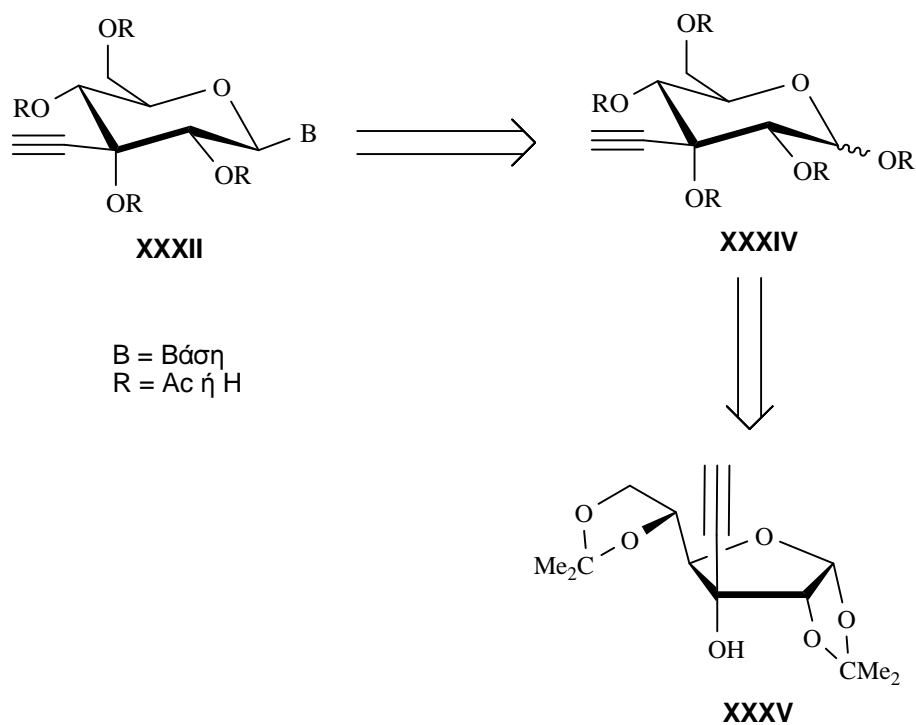
Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι οι δύο κύριες συνθετικές στρατηγικές για το σχηματισμό νουκλεοζιτικών αναλόγων με δομικές μετατροπές στο τμήμα του σακχάρου περιλαμβάνουν: i) την τροποποίηση του υδατανθρακικού δακτυλίου ενός νουκλεοζίτη που έχει ήδη συντεθεί ii) τη σύζευξη ενός κατάλληλα τροποποιημένου σακχάρου με την επιθυμητή νουκλεοβάση.

Με βάση τον πρώτο συνθετικό σχεδιασμό, η ρετροσυνθετική προσέγγιση για την παρασκευή των επιθυμητών 3'-C-αιθυνο-πυρανονουκλεοζιτικών παραγώγων **XXXII**, έχει ως πρόδρομες ενώσεις τα αντίστοιχα 3'-κετοπυρανονουκλεοζιτικά ανάλογα **XXXIII** (Σχήμα 27). Μια τέτοια όμως διαδικασία δεν είναι εφικτή, αφενώς λόγω της αδυναμίας μεμονωμένης προστασίας της 2'-υδροξυλομάδας και αφετέρου λόγω του γεγονότος ότι τα 3'-κετονουκλεοζιτικά ανάλογα χαρακτηρίζονται ως ασταθείς ενώσεις, καταλήγοντας συχνά σε προϊόντα αποικοδόμησης (Chirakul και Sigurdsson 2003, Liu *et al.* 2007).



Σχήμα 27

Ως εκ τούτου, επιλέχθηκε η σύνθεση του 3-C-αιθυνο-σακχάρου και η εν συνεχεία συμπύκνωση του με την κατάλληλη νουκλεοβάση, ώστε να σχηματιστούν οι επιθυμητοί 3'-C-αιθυνο-πυρανονουκλεοζίτες. Σημαντικό πλεονέκτημα αυτής της στρατηγικής είναι ότι με την παρασκευή του συγκεκριμένου τροποποιημένου υποστρώματος δίνεται η δυνατότητα παραλαβής πολλών τελικών προϊόντων με ποικιλία νουκλεοβάσεων στο ανωμερικό τμήμα του σακχάρου. Η ρετροσυνθετική πορεία που ακολουθήθηκε για την παρασκευή των 1-(3'-C-αιθυνο-β-D-αλλοπυρανοζυλο)νουκλεοζιτών, περιγράφεται στο παρακάτω σχήμα 28:

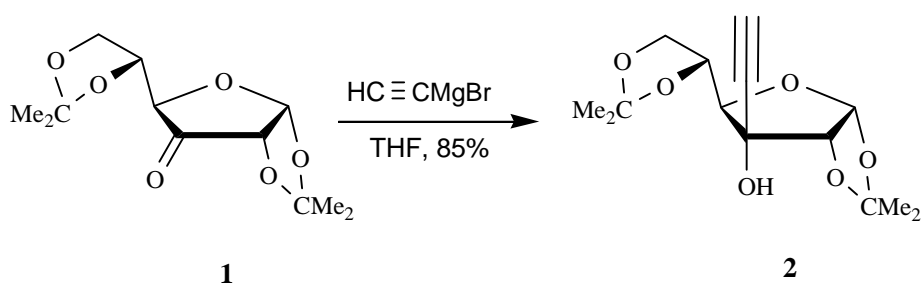


Σχήμα 28

Όπως υποδεικνύεται παραπάνω, το 3-αιθυλο-σάκχαρο **XXXIV** αποτελεί το κατάλληλο τροποποιημένο υπόστρωμα, το οποίο θα οδηγήσει στους επιθυμητούς νουκλεοζίτες **XXXII** και μπορεί να συντεθεί από το αντίστοιχο 3-αιθυλο-φουρανοσάκχαρο **XXXV**. Αξίζει να τονιστεί, ότι το σάκχαρο **XXXV** με βάση τον παραπάνω σχεδιασμό πρέπει να διαθέτει την αιθυλομάδα στην πάνω β-όψη του υδατανθρακικού δακτυλίου, ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή β-στεreoχημεία της αιθυλομάδας στα μόρια-στόχους **XXXII**.

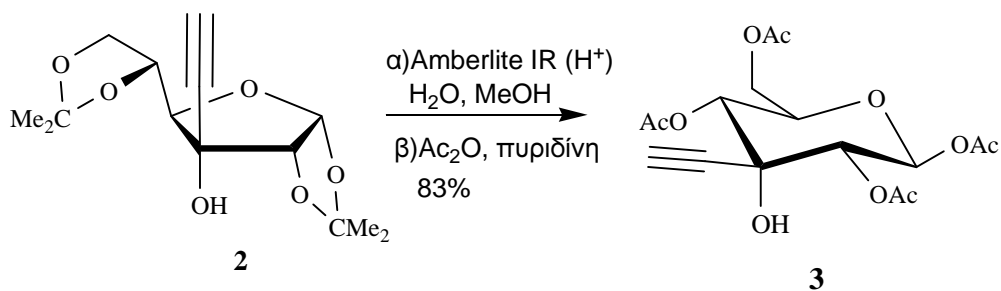
II.1.1 Σύνθεση της 3-C-αιθυνο-1,2,4,6-τετρακίς-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανόζης (3)

Η συνθετική πορεία περιλαμβάνει αρχικά την αντίδραση της γνωστής φουρανόζης **1** (Elhalabi *et al.* 2004) με το αντιδραστήριο Grignard $\text{HC}\equiv\text{CMgBr}$ σε διαλύτη τετραϋδροφουράνιο (THF), οπότε και λαμβάνεται αποκλειστικά η 3-C-αιθυνο-1,2:5,6-δισ-O-ισοπροπυλιδανο-α-D-αλλοφουρανόζη (**2**), με πολύ καλή απόδοση (85%) (Kakinuma *et al.* 1992) (Σχήμα 29). Η δομή της αρχικής κετόνης εξασφαλίζει τον απόλυτο στερεοχημικό έλεγχο της αντίδρασης, καθώς η πυρηνόφιλη προσβολή της αιθυνομάδας στην κετονομάδα γίνεται από την πάνω (β όψη) του μορίου, λόγω της στερεοχημικής παρεμπόδισης του ογκώδους 1,2-O-ισοπροπυλιδανο-υποκαταστάτη.



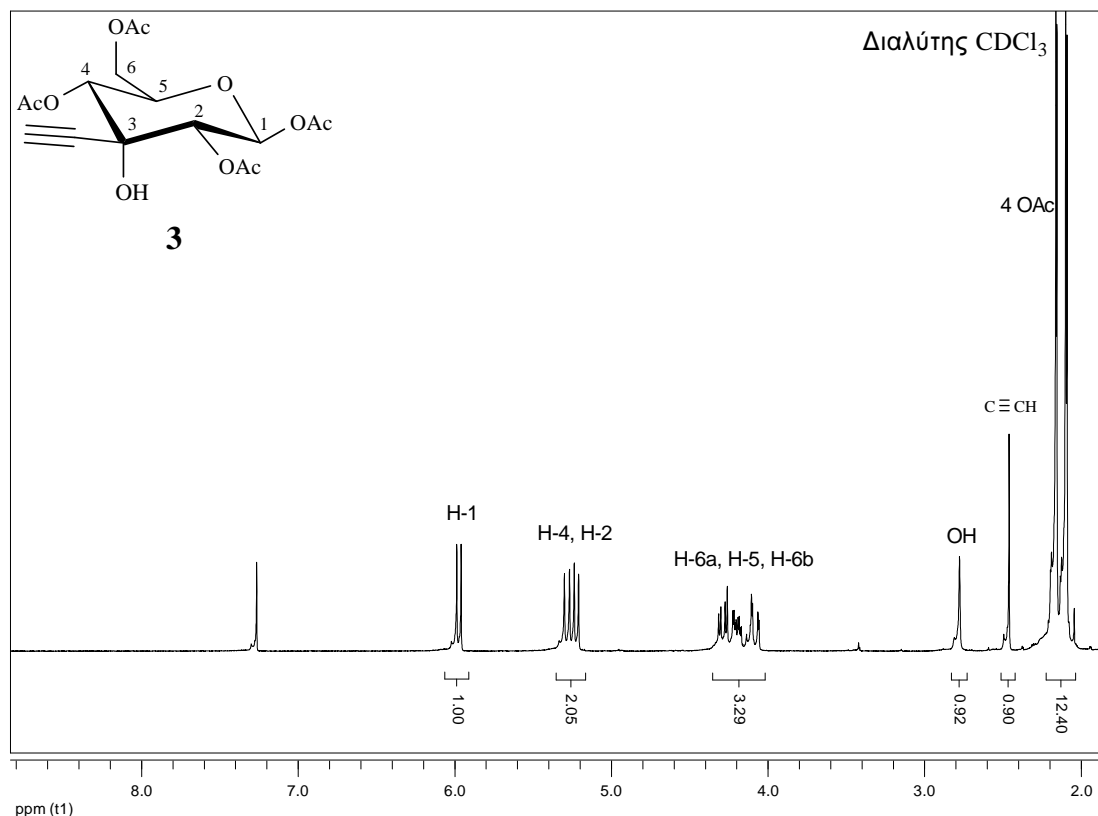
Σχήμα 29

Ακολουθεί η υδρόλυση των δύο ακετονιδίων του αιθυνο-σακχάρου **2**, με την επίδραση υδατικού διαλύματος όξινης ρητίνης IR-120 H^+ , οπότε και λαμβάνεται η θερμοδυναμικά σταθερή πυρανόζη. Με απευθείας ακετυλίωση της σχηματιζόμενης πυρανόζης υπό την επίδραση οξικού ανυδρίτη (Ac_2O) σε πυριδίνη για μία ώρα, λαμβάνεται η επιθυμητή 3-C-αιθυνο-1,2,4,6-τετρακίς-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανόζη (**3**) (Σχήμα 30).



Σχήμα 30

Το φάσμα ^1H NMR του 3-C-αιθινυλο-σακχάρου **3**, απεικονίζεται στο σχήμα 31. Από την εξέταση του συγκεκριμένου φάσματος παρατηρείται μία διπλή κορυφή στα 5.99 ppm, η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-1 του δακτυλίου του σακχάρου με σταθερά σύζευξης $J_{1,2} = 8.3$ Hz, υποδηλώνοντας ότι λαμβάνεται αποκλειστικά το β -ανωμερές, καθώς η συγκεκριμένη μεγάλη σταθερά σύζευξης είναι χαρακτηριστική μιας αξονικής σχέσης ανάμεσα στα γειτονικά πρωτόνια H-1 και H-2. Ακολουθεί το σήμα πρωτονίου H-4 ως μια διπλή κορυφή στα 5.29 ppm με σταθερά σύζευξης $J_{4,5} = 9.9$ Hz και η κορυφή του πρωτονίου H-2 ως μια επίσης διπλή κορυφή στα 5.23 ppm. Στη συνέχεια, εμφανίζεται το σήμα του πρωτονίου H-6a ως μια διπλή διπλών κορυφή με σταθερές σύζευξης $J_{6a,6b} = 12.3$ και $J_{5,6a} = 4.2$ Hz, ενώ στα 4.25 ppm διακρίνεται μία διπλή διπλών-διπλών κορυφή με σταθερά σύζευξης $J_{5,6b} = 2.0$ Hz, η οποία αντιστοιχεί στο σήμα του πρωτονίου H-5. Το σήμα που ακολουθεί και διακρίνεται ως διπλή διπλών κορυφή στα 4.09 ppm, αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-6b, ενώ το σήμα του πρωτονίου της ελεύθερης υδροξυλομάδας, εμφανίζεται ως απλή κορυφή στα 2.76 ppm. Επίσης, χαρακτηριστική είναι η κορυφή που προσδιορίζει το πρωτόνιο της αιθινυλομάδας, η οποία εμφανίζεται στα 2.47 ppm ως απλή. Τέλος, από τη μελέτη του συγκεκριμένου φάσματος παρατηρείται η παρουσία τεσσάρων ακετυλο ομάδων –αντί των πέντε που υπήρχε δυνατότητα να σχηματιστούν– υποδεικνύοντας ότι το τριτοταγές υδροξύλιο στη θέση 3 του σακχάρου δεν έχει ακετυλιωθεί (Hassner *et al.* 1978).



Σχήμα 31

Αφού έχει επιτευχθεί η σύνθεση του ακετυλιωμένου αιθυνυλοσακχάρου **3**, που αποτελεί κομβικό προϊόν για τη λήψη των επιθυμητών αιθυνυλο-αλλοπυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων, το επόμενο βήμα της συνθετικής πορείας περιλαμβάνει τη σύζευξη του αιθυνυλοσακχάρου **3** με τις αντίστοιχες ετεροκυκλικές βάσεις 5-φθοροουρακίλη, ουρακίλη, θυμίνη, *N*⁴-βενζοϋλοκυτοσίνη και *N*⁶-βενζοϋλοαδενίνη.

II.1.2 Σχηματισμός γλυκοζιτικού δεσμού

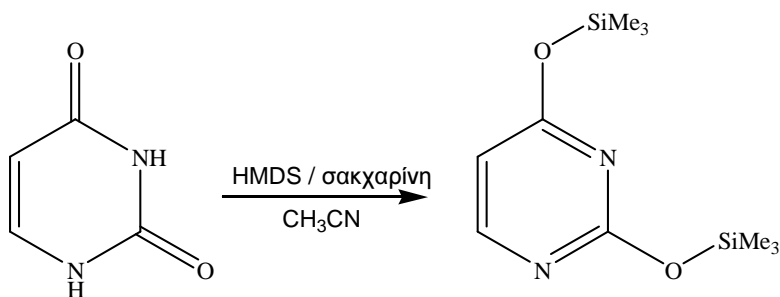
Αποτελεί γεγονός ότι κατά το σχηματισμό του γλυκοζιτικού δεσμού στη θέση του ανωμερικού άνθρακα του σακχάρου, προκύπτουν 2 σημαντικά ζητήματα:

- Η *regio*-εκλεκτικότητα υποκατάστασης της νουκλεοβάσης.
- Η αναλογία του σχηματισμού των α : β νουκλεοζιτικών ανωμερών.

Για το σχηματισμό του γλυκοζιτικού δεσμού στους αιθυνυλο νουκλεοζίτες –αλλά και στους υπόλοιπους νουκλεοζίτες της συγκεκριμένης διατριβής– εφαρμόστηκε η σιλυλο-τροποποιημένη αντίδραση των Hilbert-

Johnson, γνωστή και ως μέθοδος Vorbrüggen (Vorbrüggen και Hofle, 1981). Όπως αναφέρθηκε, η αντίδραση σιλυλιωμένων ετεροκυκλικών βάσεων με ακετυλιωμένα σάκχαρα παρουσία Friedel-Crafts καταλυτών όπως τετραχλωριούχου κασσιτέρου (SnCl_4) ή τριφθορομεθανοσουλφονικού τριμεθυλοσιλυλεστέρα ($\text{Me}_3\text{SiSO}_3\text{CF}_3$), έχει γίνει η πρότυπη συνθετική μέθοδος για το σχηματισμό πυριμιδικών, πουρινικών ή και άλλων νουκλεοζιτών, με τη διαδικασία να δίνει κατά κανόνα μια προβλεπόμενη στερεοχημεία, όπως παρατηρείται και παρακάτω.

Η διαδικασία περιλαμβάνει αρχικά τη σιλυλίωση των νουκλεοβάσεων, η οποία αυξάνει τον πυρηνόφιλο χαρακτήρα των μορίων και τις καθιστά πιο διαλυτές σε οργανικούς διαλύτες. Η σιλυλίωση επιτυγχάνεται με την αντίδραση της επιθυμητής νουκλεοβάσης με εξαμεθυλοδισιλαζάνιο (HMDS) σε διαλύτη ακετονιτρίλιο παρουσία καταλυτικής ποσότητας σακχαρίνης, όπως φαίνεται στο χαρακτηριστικό παράδειγμα της ουρακίλης (Σχήμα 32). Η νουκλεοβάση στη συνέχεια θα αντιδράσει με το πλέον πυρηνόφιλο N-άτομο της, στη συγκεκριμένη περίπτωση με το N-1 για τις πυριμιδίνες (5-φθοροουρακίλη, ουρακίλη, θυμίνη, N⁴-βενζοϋλοκυτοσίνη) και με το N-9 για την N⁶-βενζοϋλοαδενίνη.



Σχήμα 32

Κατά τη διάρκεια σχηματισμού των πυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων λαμβάνουν χώρα ταυτόχρονα οι εξής δυο διαδικασίες:

- Σχηματισμός του ηλεκτρονιόφιλου κατιόντος του σακχάρου.
- Αντίδραση του ηλεκτρονιόφιλου κατιόντος του σακχάρου με την σιλυλιωμένη βάση προς το σχηματισμό του νουκλεοζίτη.

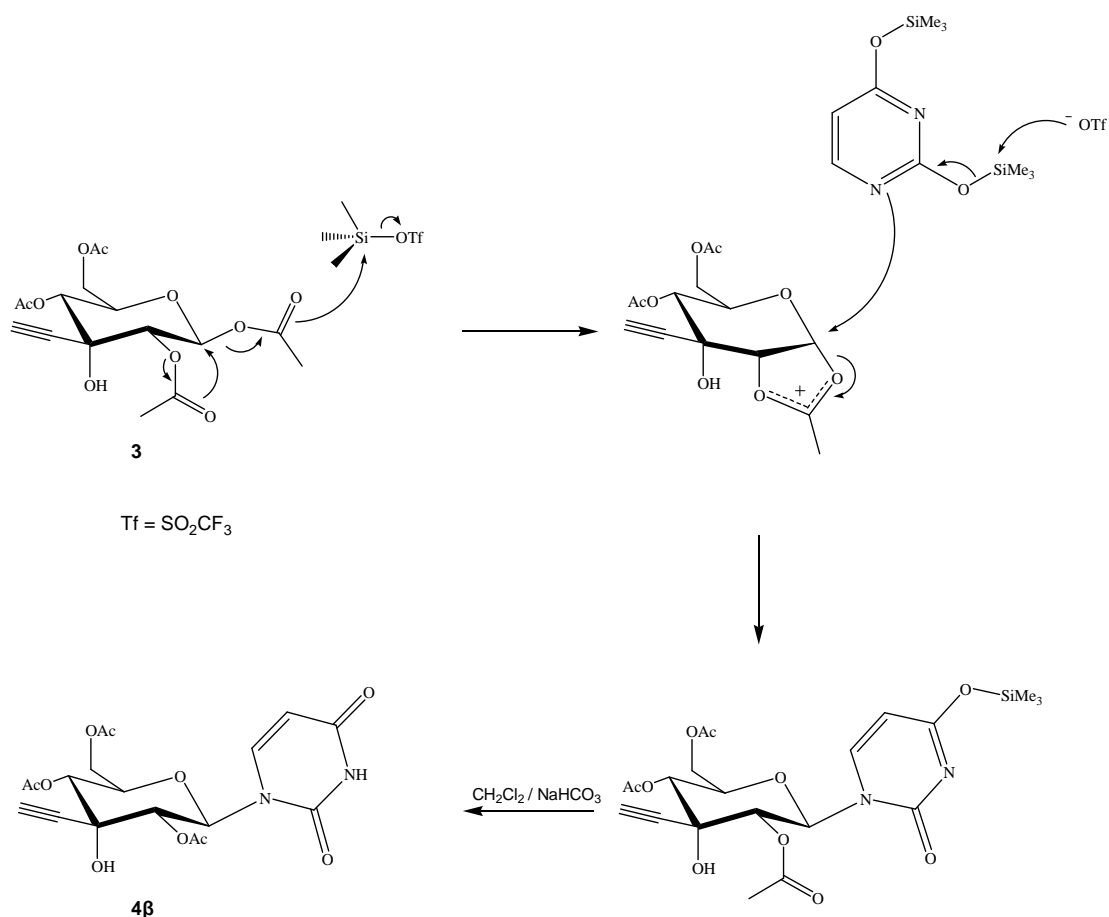
Αναλυτικότερα το $\text{Me}_3\text{SiSO}_3\text{CF}_3$, ένα οξύ κατά Lewis, ενεργοποιεί το ακετυλιωμένο σάκχαρο **3**, προκαλώντας τον εκτοπισμό της ακετυλομάδας

από τον ανωμερικό άνθρακα (Σχήμα 33). Στη συνέχεια, δημιουργείται ένα δικυκλικό κατιονικό ενδιάμεσο με τη συμμετοχή του καρβονυλικού οξυγόνου της ακετυλομάδας στη 2 θέση του σακχάρου. Το σχηματιζόμενο ηλεκτρονιόφιλο κατιόν του σακχάρου υφίσταται στη συνέχεια πυρηνόφιλη προσβολή από την σιλυλιωμένη βάση, όπου το ανιόν CF_3SO_3^- βοηθάει στην αποσιλυλίωση της. Ο νουκλεοζίτης στη συνέχεια κατεργάζεται με CH_2Cl_2 και κορεσμένο διάλυμα NaHCO_3 και λαμβάνεται έπειτα από χρωματογραφία στήλης το τελικό προϊόν, όπως φαίνεται και στο χαρακτηριστικό παράδειγμα του νουκλεοζίτη **4β** (Σχήμα 33).

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί ότι κατά τη διάρκεια της αντίδρασης λαμβάνει χώρα μια ανταγωνιστική διαδικασία, η οποία είναι ο σχηματισμός σ-συμπλόκων μεταξύ της σιλυλιωμένης βάσης και του Friedel-Crafts καταλύτη οδηγώντας σε αδρανοποίηση τη νουκλεοβάση. Με τη χρησιμοποίηση ωστόσο του $\text{Me}_3\text{SiSO}_3\text{CF}_3$ που είναι ασθενέστερο οξύ κατά Lewis από το SnCl_4 (ως εκ τούτου σχηματίζει λιγότερα σ-σύμπλοκα), αλλά και ενός πολικού απρωτικού διαλύτη όπως το ακετονιτρίλιο που προάγει την αντίδραση του κατιόντος του σακχάρου με την πυρηνόφιλη βάση, οδηγούμαστε σε περιορισμό της ανεπιθύμητης αυτής αντίδρασης με σημαντικά πλεονεκτήματα όσον αφορά την απόδοση και το χρόνο σχηματισμού των νουκλεοζιτών (Vorbrüggen *et al.* 1981).

II.1.3 Καθορισμός της στερεοχημείας στο ανωμερικό κέντρο

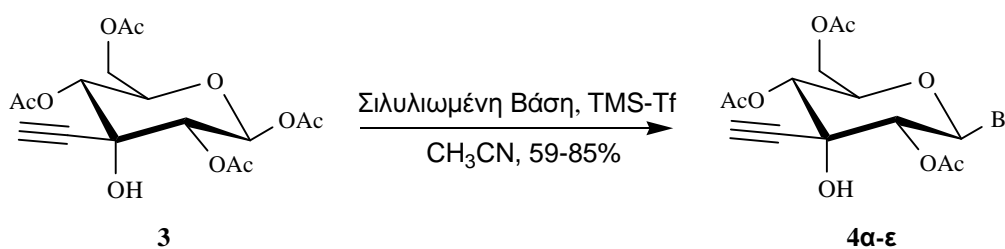
Όσον αφορά τη στερεοχημεία στο ανωμερικό κέντρο του νουκλεοζίτη, έχει αποδειχτεί ότι εξαρτάται σημαντικά από τη φύση και τη στερεοχημική διαμόρφωση της C-2' ομάδας. Είναι γνωστό ότι η ακετυλο ομάδα στον C-2 του σακχάρου οδηγεί στην προσβολή της νουκλεοβάσης στο σχηματιζόμενο δικυκλικό ενδιάμεσο από την αντίθετη πλευρά του δακτυλίου. Δημιουργείται δηλαδή μια *trans*-σχέση μεταξύ των δυο ομάδων στους άνθρακες C-1' και C-2' του νουκλεοζίτη, γνωστή και ως 1,2 *trans*-κανόνας του Baker (Blackburn και Gait, 1990).



Σχήμα 33

II.1.4 Σύνθεση των 3'-C-αιθυνολο-β-D-αλλοπυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων της 5-φθοροουρακίλης 5α, ουρακίλης 5β, θυμίνης 5γ, κυτοσίνης 5ζ και αδενίνης 5στ

Η σύζευξη της 3-C-αιθυνολο-1,2,4,6-τετρακίς-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανόζης **3** με τις σιλυλιωμένες βάσεις 5-φθοροουρακίλη, ουρακίλη, θυμίνη, *N*⁴-βενζοϋλοκυτοσίνη και *N*⁶-βενζοϋλοαδενίνη σε διαλύτη CH₃CN, παρουσία του Me₃SiOSO₂CF₃, οδηγεί στους προστατευμένους νουκλεοζίτες **4α-ε** (Σχήμα 34). Στα φάσματα ¹H NMR των ενώσεων **4α-ε** εμφανίζονται - όπως ήταν αναμενόμενο- μεγάλες σταθερές σύζευξης μεταξύ των πρωτονίων H-1' και H-2', υποδεικνύοντας έναν αξονικό προσανατολισμό για τα δύο αυτά πρωτόνια, με την ετεροκυκλική βάση να καταλαμβάνει την ισημερινή θέση του σακχάρου.



B = α: 5-φθοροουρακίλη, β: ουρακίλη, γ: θυμίνη,
 δ: N⁴-βενζοϋλοκυτοσίνη, ε: N⁶-βενζοϋλοαδενίνη

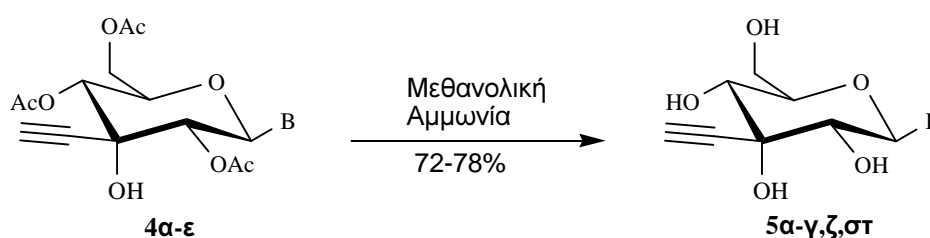
Σχήμα 34

Οι συνθήκες των αντιδράσεων και οι αποδόσεις των προστατευμένων 3'-C-αιθυνολο-νουκλεοζιτών **4α-ε** μετά την απομόνωση τους με χρωματογραφική στήλη, δίνονται στον πίνακα 1. Τα καλύτερα αποτελέσματα επιτυγχάνονται με τις πυριμιδινικές βάσεις της 5-φθοροουρακίλης και της ουρακίλης (προϊόντα **4α** και **4β**), ενώ η απόδοση του πουρινικού αναλόγου **4ε** είναι η μικρότερη.

Πίνακας 1

<u>Προϊόν</u>	<u>Χρόνος</u> (h)	<u>Θερμοκρασία</u> (⁰ C)	<u>Απόδοση</u>
 4α	1	90	85%
 4β	1	80	82%
 4γ	1.5	110	72%
 4δ	2	120	68%
 4ε	4	100	59%

Το τελικό στάδιο της συνθετικής πορείας περιλαμβάνει την αποπροστασία των ενώσεων **4α-ε** με κατεργασία τους με μεθανολική αμμωνία (Neilson και Werstiuk 1971), οπότε και λαμβάνονται οι επιθυμητοί 3'-C-αιθυνο-β-D-αλλοπυρανοζυλο νουκλεοζίτες **5α-γ,ζ,στ** σε καλές αποδόσεις (72-78%) (Σχήμα 35).

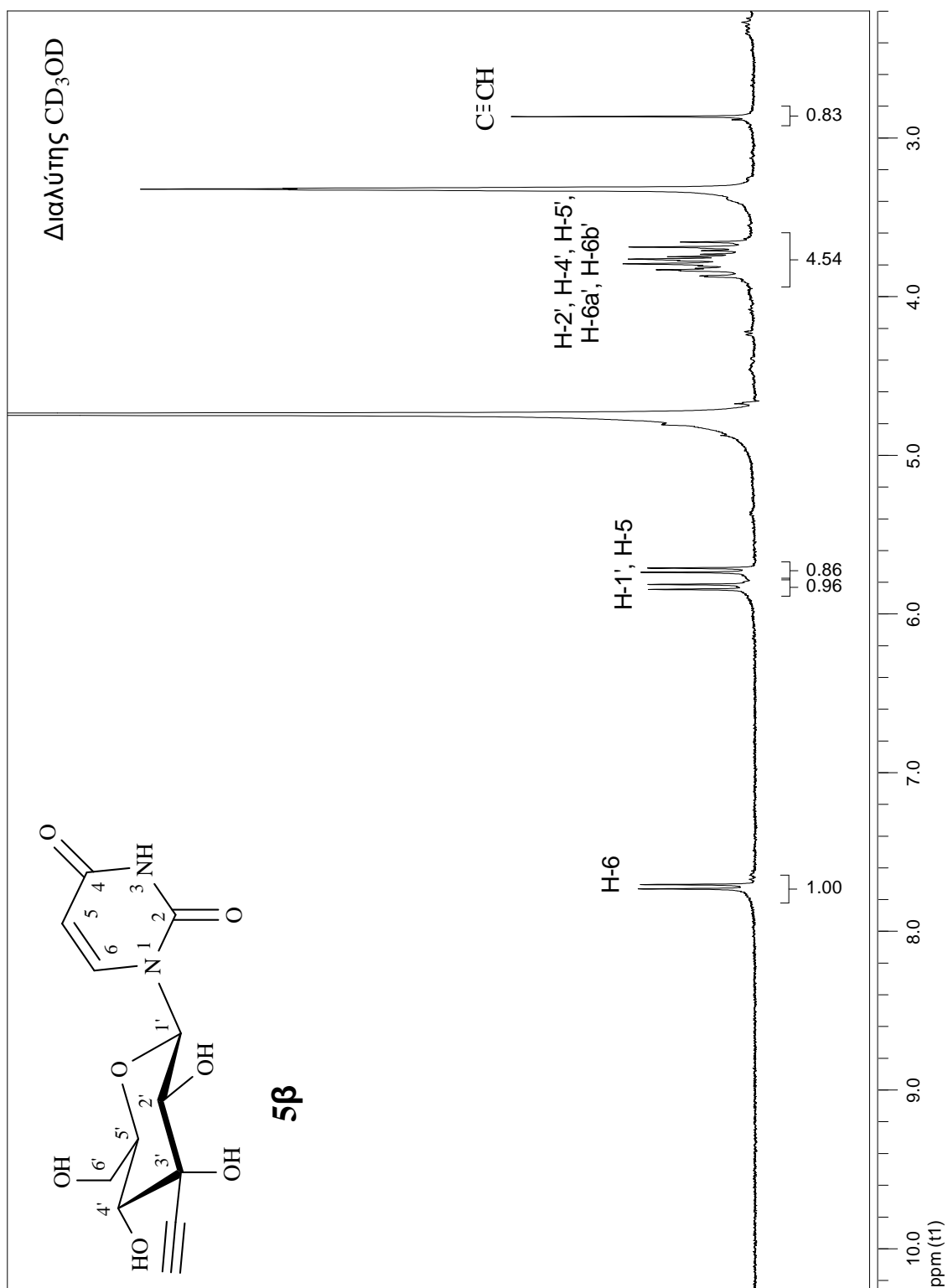


B = α: 5-φθοροουρακίλη, β: ουρακίλη, γ: θυμίνη,
ζ: κυτοσίνη, στ: αδερίνη

Σχήμα 35

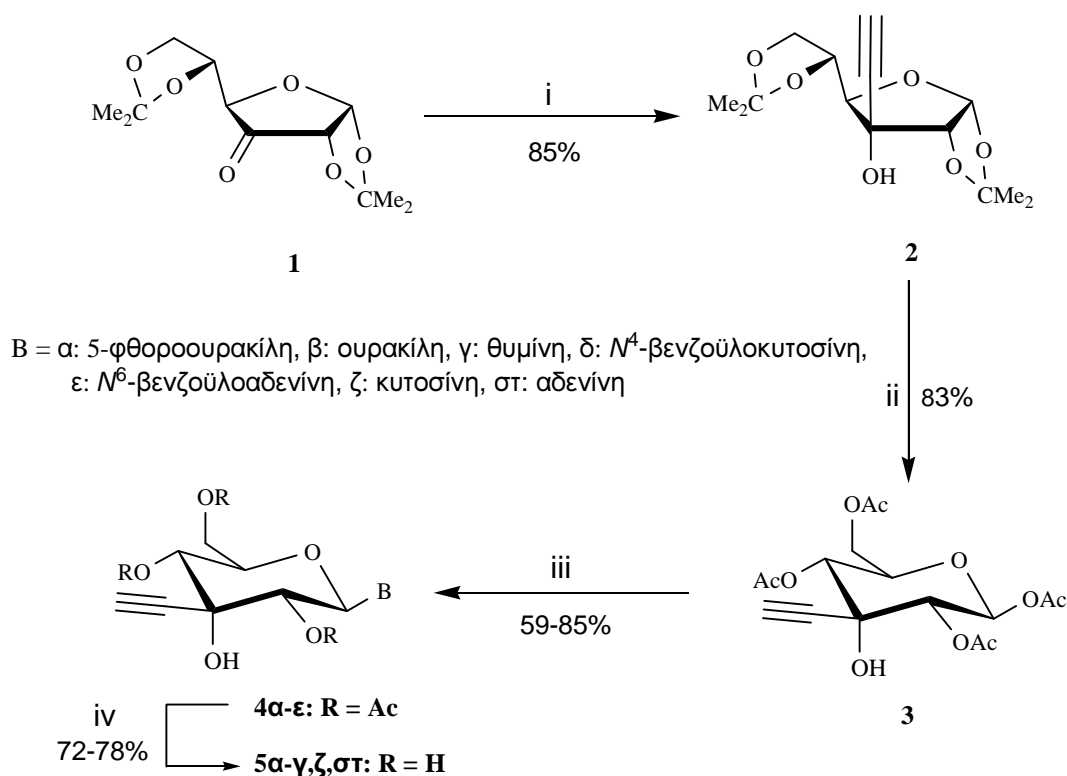
Στο σχήμα 36, παρατίθεται ενδεικτικά το φάσμα ^1H NMR του νουκλεοζίτη της ουρακίλης **5β**. Στο συγκεκριμένο φάσμα εμφανίζεται μία διπλή κορυφή με μεγάλη τιμή σταθεράς σύζευξης $J_{1',2'} = 9.3$ Hz στα 5.82 ppm, η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-1' του σακχάρου. Επίσης, από τη μελέτη του φάσματος προκύπτουν δύο χαρακτηριστικές διπλές κορυφές στα 7.71 και 5.72 ppm, οι οποίες εμφανίζουν την ίδια σταθερά σύζευξης $J_{5,6} = 8.1$ Hz, και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-6 και H-5 της ουρακίλης, αντίστοιχα. Ακολουθούν τα σήματα πρωτονίων των H-2', H-4', H-5', H-6a' και H-6b' του σακχάρου σαν μια πολλαπλή κορυφή στην περιοχή 3.86-3.65 ppm. Χαρακτηριστική είναι η απλή κορυφή του πρωτονίου της αιθυνομάδας, η οποία εμφανίζεται στα 2.85 ppm. Σημειώνεται ότι τόσο τα πρωτόνια των ελεύθερων υδροξυλίων του σακχάρου όσο και το αμινικό πρωτόνιο της ετεροκυκλικής βάσης δεν εμφανίζονται στο φάσμα λόγω της ταχείας ανταλλαγής που λαμβάνει χώρα μεταξύ αυτών και του διαλύτη (μεθανόλη- d_4).

Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί ότι στα φάσματα υπερύθρου των ενώσεων **5** εμφανίζονται χαρακτηριστικές κορυφές απορρόφησης στα 2115-2130 cm^{-1} , οι οποίες αντιστοιχούν στην αιθυνομάδα.



Σχήμα 36

Ολόκληρη η γενική πορεία για τη σύνθεση των 3'-C-αιθυνο-β-D-αλλοπυρανονουκλεοζιτών φαίνεται στο σχήμα 37 που ακολουθεί:

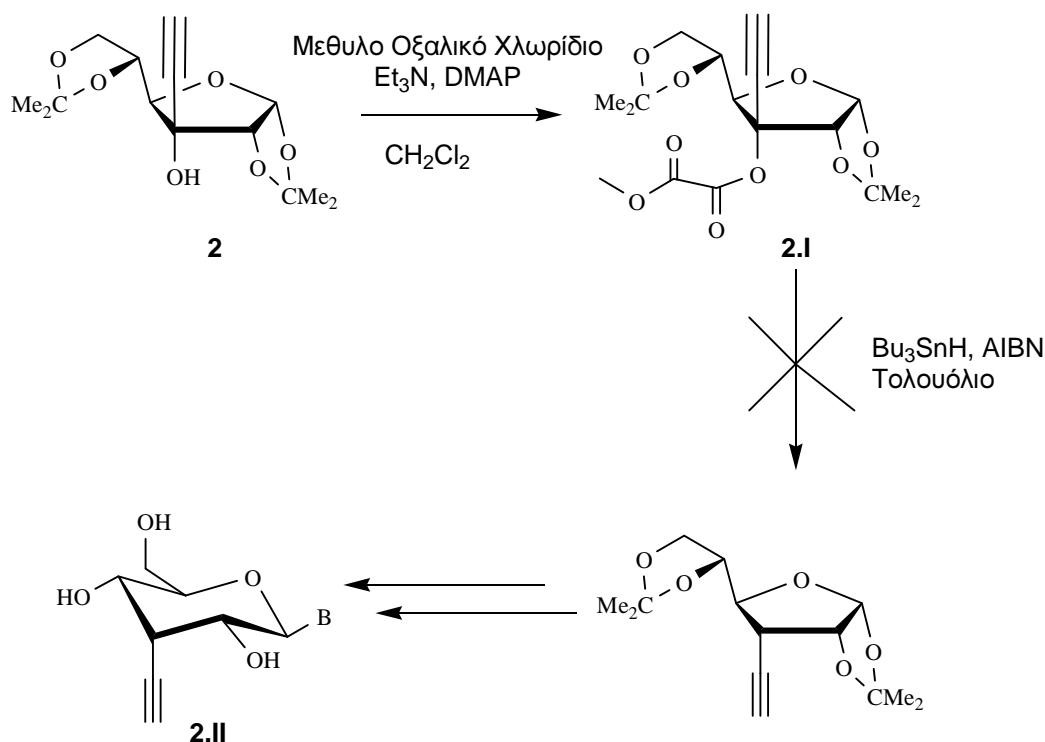


i) $\text{HC}\equiv\text{CMgBr}$, THF; ii) α) Amberlite IR (H^+), H_2O , MeOH, β) Ac_2O , πυριδίνη;

iii) Σιλυλιωμένη Βάση, CH_3CN ; iv) Μεθανολική Αμμωνία.

Σχήμα 37

Με στόχο να διερευνηθεί η σχέση δομής-δράσης στις ενώσεις αυτού του τύπου, επιχειρήθηκε η σύνθεση μιας νέας τάξης νουκλεοζιτών, των 3'-C-αιθυνο-3'-δεοξυ πυρανονουκλεοζιτών **2.II** (Σχήμα 38). Είναι αξιοσημείωτο ότι παρόλο που η αλκοόλη **2** μετατράπηκε εύκολα στο μεθυλοξαλικό εστέρα **2.I**, όλες οι προσπάθειες αναγωγής του τελευταίου σε διάφορες πειραματικές συνθήκες οδήγησαν αποκλειστικά σε προϊόντα αποικοδόμησης. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην προφανή υπόθεση ότι η παρουσία της αιθυνο ομάδας επιδρά με έναν αδιευκρίνιστο τρόπο στη δραστικότητα της επίπεδης ενδιάμεσης ρίζας που δημιουργείται μετά την προσθήκη του αζωδισ-ισοβουτυρονιτριλίου (AIBN), αποτρέποντας την αναγωγή του αντιδρώντος.



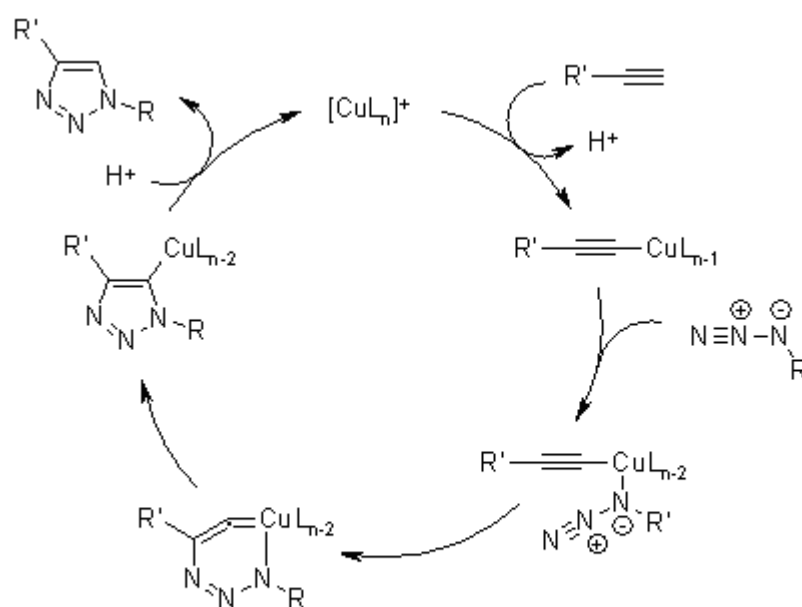
Σχήμα 38

II.1.5 Τριαζολο πυρανονουκλεοζίτες με διπλή κεφαλή 8α-η

Ο όρος της “click” χημείας εισήχθη από τον Barry K. Sharpless και τους συνεργάτες του το 2001 για να περιγράψουν κάποιες χημικές αντιδράσεις οι οποίες χαρακτηρίζονται από στερεοειδικότητα (stereospecificity), υψηλές αποδόσεις, έλλειψη ή ελάχιστη δημιουργία παραπροϊόντων, χωρίς επιπλέον να επηρεάζονται από το είδος των λειτουργικών ομάδων των μορίων με τα οποία συνδέονται. Από τις διάφορες αντιδράσεις της Click Χημείας, η αντίδραση κυκλοπροσθήκης αζιδίων-αλκυνίων που καταλύεται από χαλκό (I) [Cu-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (CuAAC)] κατέχει δεσπόζουσα θέση στη διεθνή βιβλιογραφία. Ως εκ τούτου, η παρουσία του τριπλού δεσμού στους νεοσυντιθέμενους 3'-C-αιθινυλο πυρανονουκλεοζίτες, θεωρήθηκε ως εξαιρετική ευκαιρία για τη σύνθεση νέων 1,2,3-τριαζολο νουκλεοζιτών με δυο νουκλεοβάσεις (δικέφαλων) μέσω αντιδράσεων CuAAC με άζιδο πουρίνες ή πυριμιδίνες.

Τα τελευταία χρόνια, οι νουκλεοζίτες με διπλή κεφαλή αποτελούν ένα αρκετά ενδιαφέρον αντικείμενο καθώς χρησιμοποιούνται σαν δομικές μονάδες στη σύνθεση ολιγονουκλεοτιδίων, με πιθανές διαγνωστικές και θεραπευτικές εφαρμογές (Wu *et al.* 2005, Umamoto *et al.* 2009). Θα πρέπει να τονιστεί ότι ο σχηματιζόμενος τριαζολικός δακτύλιος στα νέα δικάφαλα πυρανονουκλεοζιτικά ανάλογα που σχεδιάστηκαν θεωρείται ένα επιθυμητό δομικό χαρακτηριστικό, καθώς οι 1,2,3-τριαζολικές ενώσεις έχουν τη δυνατότητα να συμμετέχουν ενεργά σε δεσμούς υδρογόνου και σε αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου, ενώ τα παράγωγά τους παρουσιάζουν έντονο φαρμακολογικό ενδιαφέρον (Ferreira *et al.* 2010, Li *et al.* 2006).

Η μετατροπή των οργανικών αζιδίων και ακραίων αλκυνίων αποκλειστικά στα επιθυμητά 1,4-υποκατεστημένα 1,2,3-τριαζόλια μέσω αντιδράσεων CuAAC, απαιτεί την καταλυτική συμμετοχή του χαλκού. Ο προτεινόμενος αρχικά καταλυτικός κύκλος για την αντίδραση με βάση θεωρητικούς υπολογισμούς DFT (Density functional theory), περιγράφεται στο σχήμα 39 που ακολουθεί (Himo *et al.* 2005):



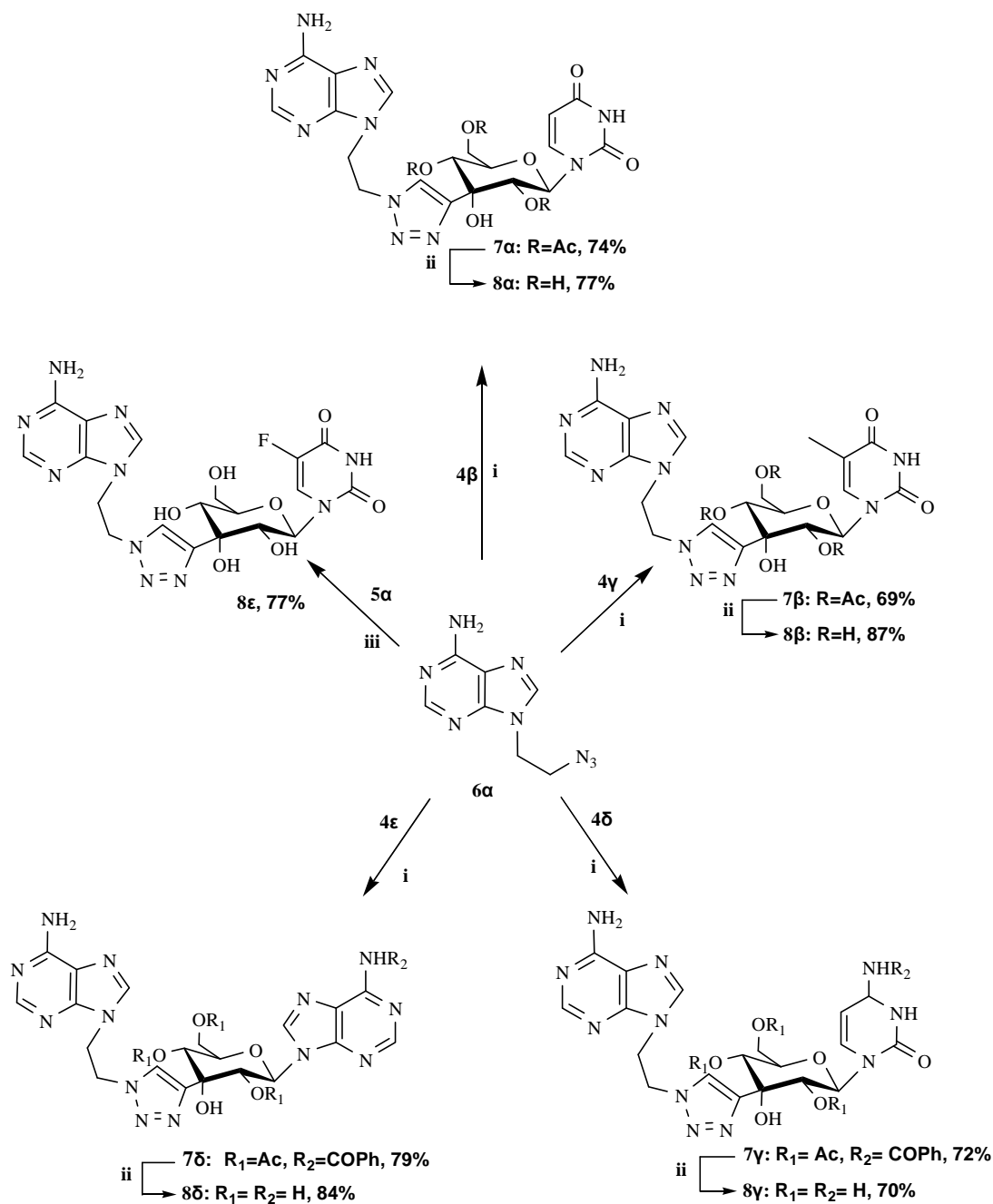
Σχήμα 39

Αρχικά έχουμε τη συναρμογή του Cu(I) με το αλκύνιο, η οποία είναι ελαφρώς ενδόθερμη σε CH_3CN αλλά εξώθερμη στο νερό, γεγονός που

έρχεται σε συμφωνία με πειραματικές παρατηρήσεις ότι η αντίδραση προχωράει γρηγορότερα σε υδατικά συστήματα. Στη συνέχεια, το αζίδιο διώχνει άλλο έναν υποκαταστάτη (ligand) και ενώνεται με το χαλκό. Ακολουθεί ο σχηματισμός του πρώτου C–N δεσμού μέσω ενός ασυνήθιστου εξαμελούς κυκλικού ενδιάμεσου με τη συμμετοχή του χαλκού. Κατόπιν, ευνοείται ενεργειακά ο σχηματισμός του τριαζολικού παραγώγου του χαλκού και εν συνεχεία λαμβάνεται το τελικό προϊόν μέσω μιας πρωτονίωσης, κλείνοντας παράλληλα τον καταλυτικό κύκλο. Θεωρητικοί υπολογισμοί DFT υπέδειξαν την αυξημένη πιθανότητα όχι ένα αλλά δύο άτομα χαλκού να απαιτούνται κατά την καταλυτική διαδικασία, ώστε να σχηματιστεί ο καινούργιος τριαζολικός δακτύλιος (Ahluquist *et al.* 2007). Πράγματι, μια πολύ πρόσφατη έρευνα απέδειξε πειραματικά τη διαμεσολάβηση δύο ατόμων χαλκού στο ενεργό ενδιάμεσο σύμπλοκο, τα οποία παρουσιάζουν ισοδύναμους ρόλους κατά τη διάρκεια των σταδίων κυκλοπροσθήκης (Worrell *et al.* 2013).

Οι 3'-C-αιθυλο αλλοπυρανονουκλεοζίτες και συγκεκριμένα οι ενώσεις **4α-ε** και **5α** αποτέλεσαν ενώσεις-κλειδιά για τη λήψη των επιθυμητών 1,2,3-τριάζολο δικέφαλων νουκλεοζιτικών αναλόγων **8α-η**. Σημειώνεται ότι οι αζιδο-αιθυλο-νουκλεοβάσεις **6α-γ** που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις κυκλοποίησης CuAAC, παραχωρήθηκαν από την Καθηγήτρια του τμήματος Χημείας του Παν. Θεσσαλονίκης, κ. Κουτούλη στα πλαίσια συνεργασίας μας.

Αναλυτικότερα, αντίδραση CuAAC μεταξύ της αζιδοαιθυλο-αδενίνης **6α** και των C-αιθυλο πυρανονουκλεοζιτών **4β-ε**, παρουσία καταλυτικών ποσοτήτων CuSO₄·5H₂O και ασκορβικού νατρίου σε διαλύτη THF/H₂O (1:1), οδήγησε στο σχηματισμό των προστατευμένων τριάζολο δικέφαλων νουκλεοζιτικών αναλόγων **7α-δ**, αντίστοιχα. Ακολουθεί η πλήρης αποπροστασία των ενώσεων **7α-δ**, με τη χρήση μεθανολικής αμμωνίας, με αποτέλεσμα τη λήψη των ενώσεων **8α-δ**, αντίστοιχα (Σχήμα 40). Στην περίπτωση του δικέφαλου νουκλεοζίτη **8ε** ακολουθήθηκε μια τροποποιημένη πειραματική πορεία. Αντίδραση του μη προστατευμένου νουκλεοζίτη **5α** με το αζίδιο **6α** παρουσία σύρματος χαλκού, σε διαλύτη CH₃CN /H₂O (9:1) και εν συνεχεία με κατεργασία του συμπυκνώματος της αντίδρασης με μεθανόλη παρελήφθη το προϊόν **8ε** (Σχήμα 40).

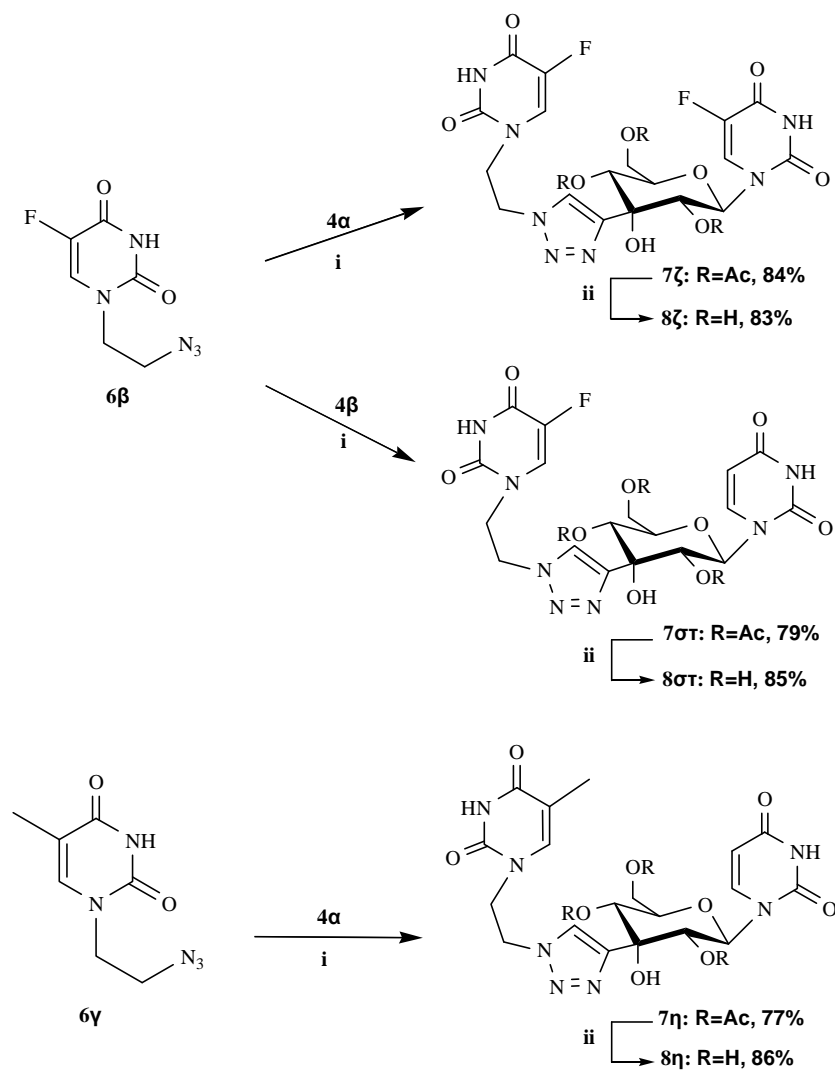


i) THF, H₂O, CuSO₄·5H₂O, Ασκορβικό Νάτριο; ii) Μεθανολική Αμμωνία; iii) CH₃CN, H₂O, Σύρμα χαλκού

Σχήμα 40

Στη συνέχεια, αντίδραση CuAAC μεταξύ της αζιδοαιθυλο 5-φθοροουρακίλης **6β** με τους C-αιθυλο πυρανοουκλεοζίτες **4α** και **4β**, αλλά και της αζιδοαιθυλο θυμίνης **6γ** με το αιθυλο ανάλογο της ουρακίλης **4β** οδήγησε στο σχηματισμό των προστατευμένων τριαζολο δικάφαλων

νουκλεοζιτικών αναλόγων **7ζ,στ,η**, αντίστοιχα (Σχήμα 41). Επακόλουθη απακετυλίωση των ενώσεων **7ζ,στ,η**, ολοκλήρωσε τη συνθετική διαδικασία με τη λήψη των τελικών ενώσεων **8ζ,στ,η**, αντίστοιχα, με πολύ καλές αποδόσεις (83-86%).



i) THF, H₂O, CuSO₄·5H₂O, Ασκορβικό Νάτριο; ii) Μεθανολική Αμμωνία

Σχήμα 41

Στον πίνακα 2 που ακολουθεί παρατίθενται συγκεντρωτικά οι αποδόσεις αλλά και οι συνθήκες των αντιδράσεων click χημείας που εφαρμόστηκαν για τη σύνθεση των πυρανονουκλεοζιτών με διπλή κεφαλή **7α-δ,ζ-η** και **8ε**. Οι αποδόσεις των αντιδράσεων μετά την απομόνωση των προϊόντων είναι πολύ καλές (69-84%), ενώ βέβαια οι πραγματικές αποδόσεις είναι κατά πολύ μεγαλύτερες, καθώς σε όλες τις περιπτώσεις η μετατροπή προς τους τριαζολικούς νουκλεοζίτες ήταν ποσοτική χωρίς να παρατηρείται σχηματισμός παραπροϊόντων. Επίσης, παρατηρούμε ότι για τη σύνθεση του αποπροστατευμένου νουκλεοζίτη **8ε**, απαιτήθηκε ο περισσότερος πειραματικός χρόνος, καθώς ακολουθήθηκε –όπως αναφέρθηκε- μια διαφοροποιημένη πειραματική διαδικασία από τους υπολοίπους.

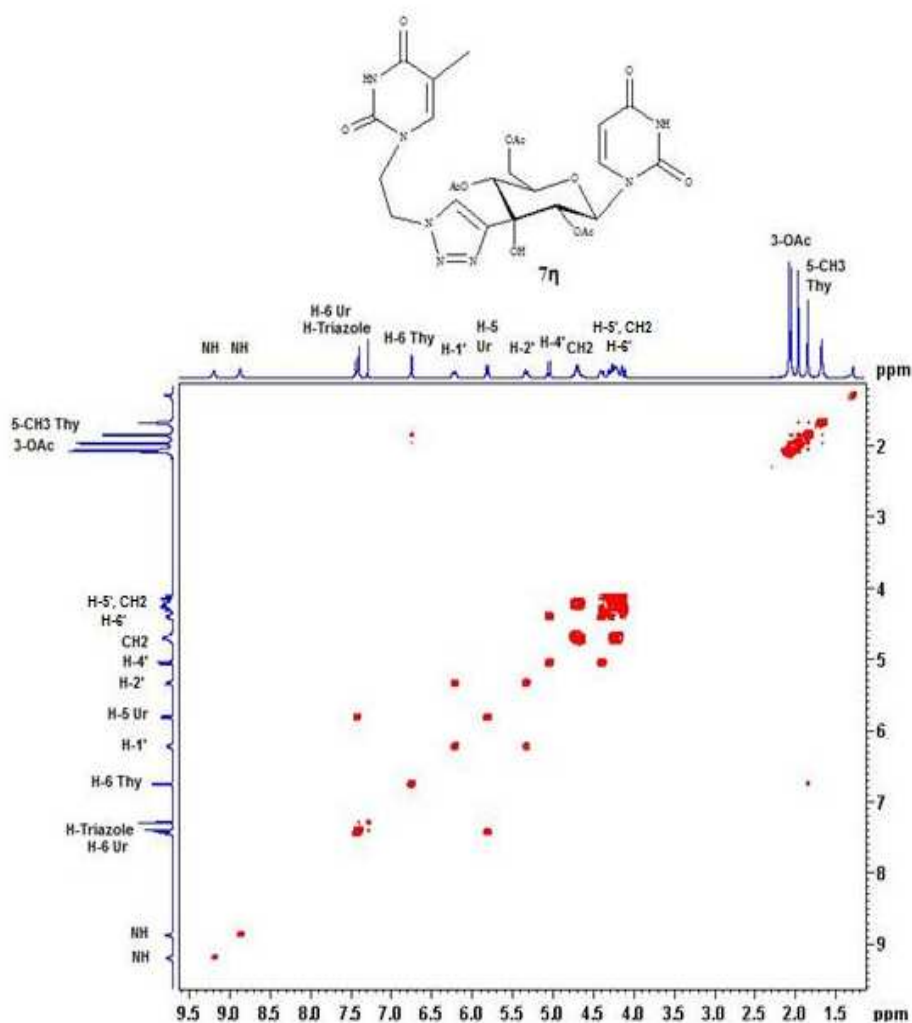
Πίνακας 2

<u>Αζίδιο</u>	<u>Αλκύνιο</u>	<u>Προϊόν</u>	<u>Συνθήκες Αντίδρασης</u>	<u>Απόδοση</u>
6α	4β	7α	Reflux, 6 h	74%
6α	4γ	7β	Reflux, 4 h	69%
6α	4δ	7γ	Reflux, 6 h	72%
6α	4ε	7δ	Reflux, 4 h	79%
6α	5α	8ε	35°C, 9.5 h	77%
6β	4α	7ζ	Reflux, 3.5 h	84%
6β	4β	7στ	Reflux, 3.0 h	79%
6γ	4α	7η	Reflux, 2.5 h	77%

Η ταυτοποίηση των τριαζολικών παραγώγων έγινε με βάση τα φασματοσκοπικά τους δεδομένα, ενώ ιδιαίτερα κατατοπιστικές για τον χαρακτηρισμό των προϊόντων αποδεικνύονται οι χημικές μετατοπίσεις του τριαζολικού δακτυλίου. Συγκεκριμένα, στα φάσματα ^1H NMR το πρωτόνιο του τριαζολικού δακτυλίου εμφανίζεται σε τιμές δ 8.01-7.10 ppm στην αρωματική περιοχή, ενώ η πλέον χαρακτηριστική κορυφή στα φάσματα ^{13}C NMR είναι

αυτή του CH-τριαζολικού άνθρακα, η οποία παρατηρείται σε πολύ στενό εύρος (δ 124.5-125.0 ppm). Σε κάποια φάσματα ^1H NMR, οι κορυφές εμφανίστηκαν αρκετά διευρυμένες και αυτό οδήγησε στη λήψη τους σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες (45-55 °C). Ο χαρακτηρισμός των ληφθέντων προϊόντων σαν 1,4-regio ισομερή έγινε μέσω σύγκρισης των χημικών τους μετατοπίσεων με ανάλογες 4-υποκατεστημένες τριαζολο- ενώσεις (Trakossas *et al.* 2011). Η απόδοση πρωτονίων επιβεβαιώθηκε τις περισσότερες φορές με πειράματα H,H-COSY, ενώ όσον αφορά τους άνθρακες υποστηρίχθηκε με πειράματα DEPT. Πρέπει να τονιστεί ότι όλες οι αντιδράσεις CuAAC οδήγησαν στο σχηματισμό ενός μόνο regio ισομερούς από τα δύο πιθανά (σχηματισμός μόνο του 1,4-regio-ισομερούς) (Rostovtsev *et al.* 2002).

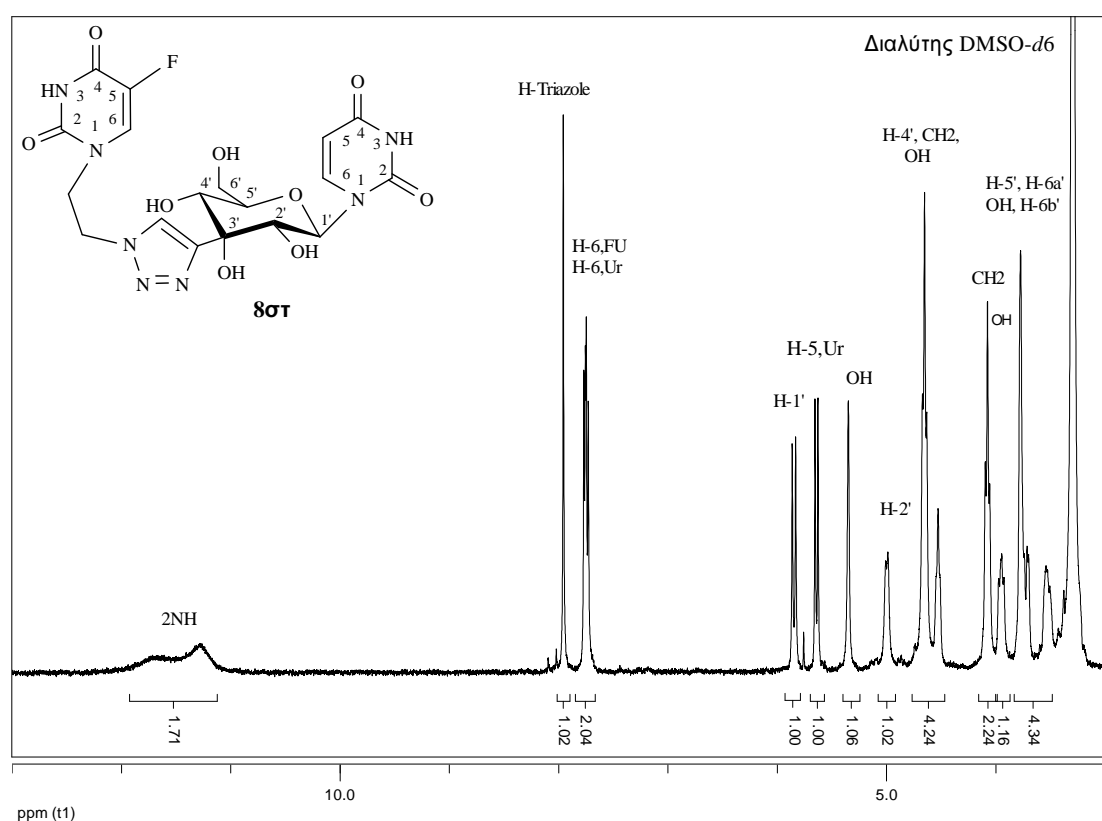
Στο σχήμα 42 δίνεται το χαρακτηριστικό φάσμα H,H-COSY του προστατευμένου δικέφαλου νουκλεοζίτη **7η**, όπου παρατηρούνται αρχικά οι απλές κορυφές των δύο αμινομάδων των νουκλεοβάσεων στα 9.18 και 8.88 ppm, οι οποίες –όπως και αναμένεται– δεν συσχετίζονται με κάποιο άλλο πρωτόνιο. Ακολουθεί το σήμα πρωτονίου του H-6 της ουρακίλης στα 7.45 ppm, και το οποίο συσχετίζεται με το H-5 της ουρακίλης στα 5.79 ppm. Το τριαζολικό πρωτόνιο εμφανίζεται στα 7.44 ppm, χωρίς να παρατηρείται σήμα COSY με κάποιο άλλο πρωτόνιο. Το σήμα πρωτονίου του H-6 της θυμίνης στα 6.75 ppm, συσχετίζεται με την 5-CH₃ ομάδα της θυμίνης στα 1.82 ppm. Ακολουθεί το σήμα πρωτονίου του H-1' του σακχάρου στα 6.21 ppm, και το οποίο αλληλεπιδρά στο COSY με το H-2' στα 5.36 ppm. Στην περιοχή 4.92-4.04 ppm παρατηρούνται τα υπόλοιπα υδρογόνα του σακχάρου, των δύο μεθυλενικών ομάδων καθώς και οι μεταξύ τους συσχετισμοί. Τέλος, στην περιοχή 2.1-1.95 φαίνονται τα τρία μεθύλια των ακετυλο-ομάδων του σακχάρου.



Σχήμα 42

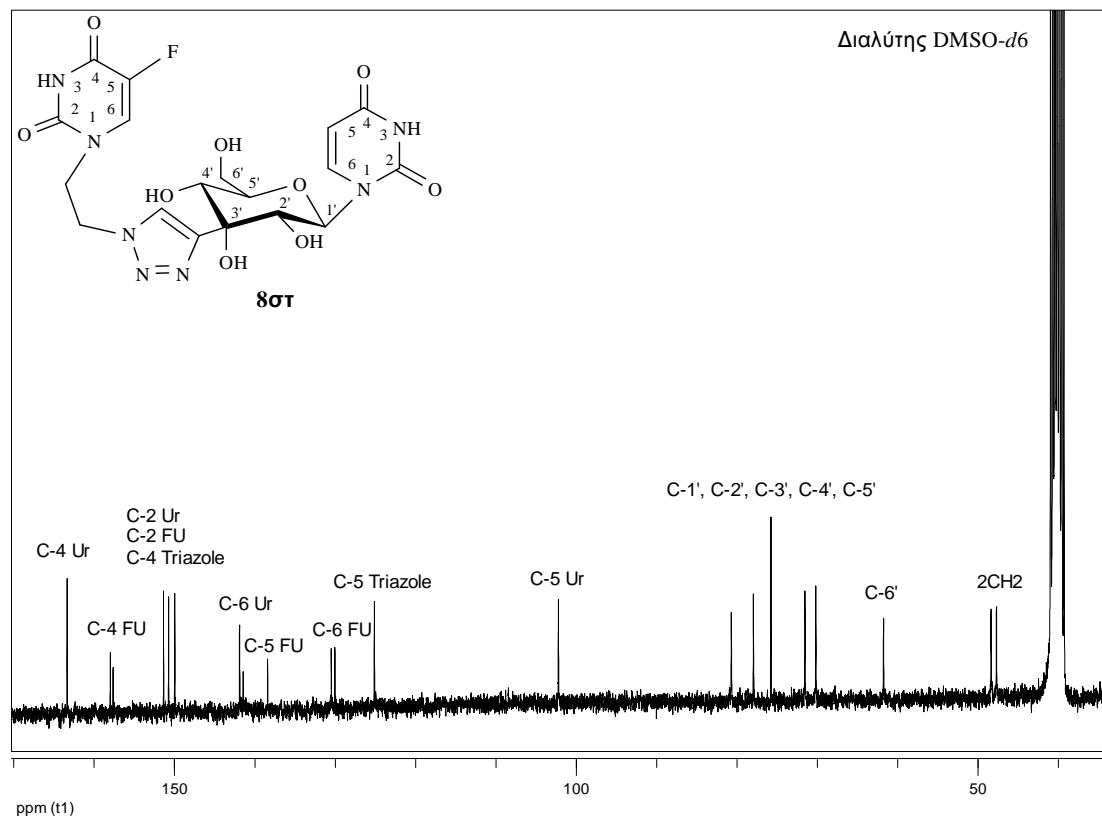
Στο σχήμα 43, παρατίθεται ενδεικτικά το φάσμα ^1H NMR του δικέφαλου νουκλεοζίτη **8στ**. Από τη μελέτη του, προκύπτουν αρχικά οι ευρείες κορυφές των αμινομάδων των δυο νουκλεοβάσεων στα 11.75 αλλά και 11.25 ppm αντίστοιχα, ενώ χαρακτηριστική είναι η απλή κορυφή που προσδιορίζει το πρωτόνιο της τριαζολικής ομάδας, η οποία εμφανίζεται στα 8.01 ppm. Ακολουθούν τα σήματα πρωτονίων του H-6 της 5-φθοροουρακίλης στα 7.75 ppm και του H-6 της ουρακίλης στα 7.73 ppm, ως διπλές κορυφές με σταθερές σύζευξης $J_{\text{H},6\text{F}} = 6.6$ Hz και $J_{5,6} = 8.1$ Hz, αντίστοιχα. Όπως φαίνεται, το σήμα του πρωτονίου H-1' εμφανίζεται ως μία διπλή κορυφή στα 5.84 ppm με σταθερά σύζευξης $J_{1',2'} = 9.5$ Hz, ενώ η διπλή κορυφή στα 5.63 ppm αντιστοιχεί στο σήμα του πρωτονίου H-5 της ουρακίλης. Επίσης, από τη

μελέτη του φάσματος προκύπτει μια απλή κορυφή στα 5.34 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο ενός ελεύθερου υδροξυλίου του σακχάρου και μια διπλή κορυφή στα 4.97 ppm, η οποία προσδιορίζει το πρωτόνιο H-2'. Ακολουθούν τα σήματα τεσσάρων πρωτονίων των H-4', CH₂ και OH σαν μια πολλαπλή κορυφή στην περιοχή 4.73-4.47 ppm. Χαρακτηριστική είναι η τριπλή κορυφή που προσδιορίζει το πρωτόνιο της CH₂-ομάδας, η οποία εμφανίζεται στα 4.06 ppm με σταθερά σύζευξης $J = 5.6$ Hz, ενώ ακολουθεί το σήμα του πρωτονίου μιας τριπλής κορυφής στα 3.93 ppm με σταθερά σύζευξης $J = 6.2$ Hz, που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο ενός ελεύθερου υδροξυλίου του σακχάρου. Τέλος, διακρίνονται τα σήματα των πρωτονίων H-5', H-6a', H-6b' και OH του υδατανθρακικού δακτυλίου ως πολλαπλές κορυφές στα 3.82-3.42 ppm .



Σχήμα 43

Εξετάζοντας επίσης ενδεικτικά το φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ του δικέφαλου νουκλεοζίτη **8στ** στο σχήμα 44, προκύπτει ότι η κορυφή στα 163.3 ppm αντιστοιχεί στον καρβονυλικό άνθρακα C-4 της ουρακίλης, ενώ ακολουθεί το σήμα του άνθρακα C-4 της 5-φθορουρακίλης στα 157.8 ppm σαν μια διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης $J_{\text{C-4,F}} = 25 \text{ Hz}$. Οι κορυφές στα 151.3, 150.7 και 149.9 ppm αντιστοιχούν στους άνθρακες C-2 της ουρακίλης, C-2 της 5-φθορουρακίλης και C-4 του τριαζολίου, αντίστοιχα. Ακολουθεί το σήμα του άνθρακα C-6 της ουρακίλης στα 141.8 ppm, και τα σήματα των ανθράκων C-5 και C-6 της 5-φθορουρακίλης ως διπλές κορυφές στα 139.9 ppm με σταθερά σύζευξης $J_{\text{C-5,F}} = 230 \text{ Hz}$ και στα 130.2 ppm με σταθερά σύζευξης $J_{\text{C-6,F}} = 34 \text{ Hz}$, αντίστοιχα. Χαρακτηριστική είναι η απορρόφηση του άνθρακα C-5 του τριαζολικού δακτυλίου στα 125.0 ppm, ενώ η κορυφή στα 102.1 ppm, αντιστοιχεί στον άνθρακα C-5 της ουρακίλης. Ακολουθούν 6 κορυφές στην περιοχή 80.6-61.5 ppm, που αποδίδονται στους 6 άνθρακες του υδατανθρακικού δακτυλίου, ενώ οι δυο μεθυλενικοί άνθρακες ($-\text{CH}_2-$) συντονίζονται στα 48.2 και 47.5 ppm.



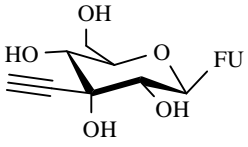
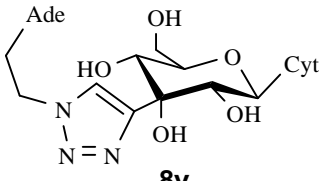
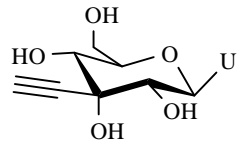
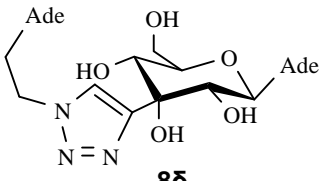
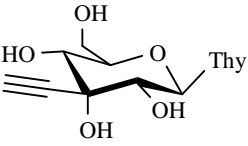
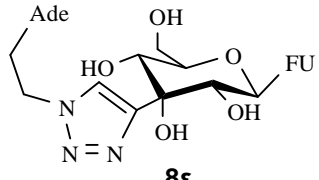
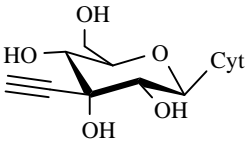
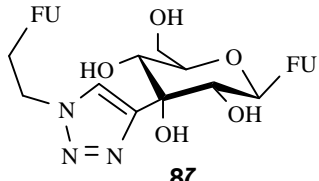
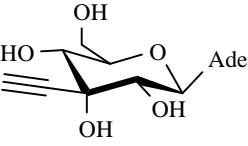
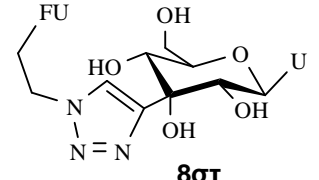
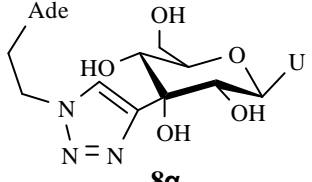
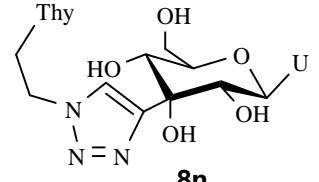
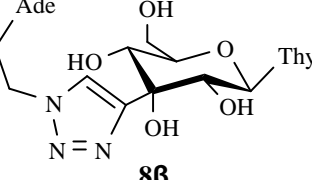
Σχήμα 44

II.1.6 Αντιική και αντικαρκινική δράση των 3'-C-αιθυλο πυρανονουκλεοζιτών και 3'-C-(1,4-διυποκαστημενων-1,2,3-τριαζολο)πυρανονουκλεοζιτών με διπλή κεφαλή

Οι νεοσυντιθέμενοι 3'-C-αιθυλο πυρανονουκλεοζίτες **5α-γ,ζ,στ** και (1,2,3-τριαζολο)νουκλεοζίτες με διπλή κεφαλή **8α-η** αποτιμήθηκαν ως προς την αντιική και αντικαρκινική τους δράση. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Ιολογίας και Χημειοθεραπείας του Ινστιτούτου Ιατρικής Έρευνας Rega στο Βέλγιο.

Οι νέες ενώσεις εξετάστηκαν για την ανασταλτική τους δράση έναντι του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων λευχαιμίας (L1210), των ανθρώπινων T-λεμφοκυττάρων (CEM), καθώς επίσης και των ανθρώπινων τραχηλικών καρκινικών κυττάρων (HeLa). Κανένα από τα μόρια δεν εμφάνισε αξιόλογη κυτταροστατική δράση, υπήρξαν ωστόσο τρεις νουκλεοζίτες με διπλή κεφαλή, οι **8α**, **8γ** και **8ε**, οι οποίοι εμφάνισαν μια μέτρια κυτταροστατική δράση έναντι των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του τραχήλου (HeLa) και μπορούν να αποτελέσουν οδηγούς για την σύνθεση ανάλογων ενώσεων με βελτιωμένες κυτταροστατικές ιδιότητες (Πίνακας 3). Για την εκτίμηση της κυτταροστατικής δράσης χρησιμοποιήθηκε η παράμετρος IC₅₀, η οποία αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του προϊόντος που απαιτείται για την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης κατά 50%. Τα τελικά προϊόντα αποτιμήθηκαν επίσης ως προς την αντιική τους δράση έναντι μιας πληθώρας τόσο DNA όσο και RNA ιών, δεν ανέστειλαν όμως τους ιούς ακόμα και όταν χρησιμοποιήθηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις (100-200 μM).

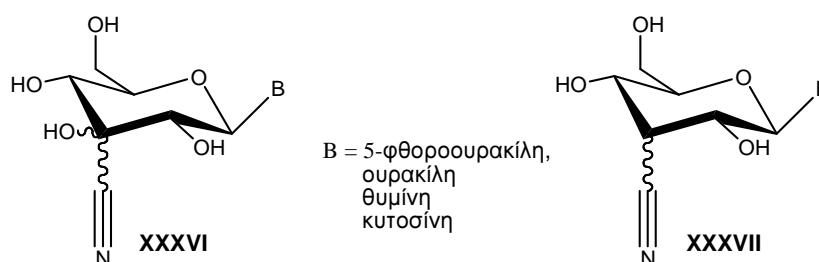
Πίνακας 3. Ανασταλτική δράση των ενώσεων **5α-γ,ζ,στ** και **8α-η** έναντι του πολλαπλασιασμού των κυττάρων L1210, CEM και HeLa.

Προϊόν	IC ₅₀ (μM)			Προϊόν	IC ₅₀ (μM)		
	L1210	CEM	HeLa		L1210	CEM	HeLa
 5α	> 200	> 200	> 200	 8γ	> 200	> 200	115 ± 7
 5β	> 200	> 200	> 200	 8δ	> 250	> 250	> 250
 5γ	> 200	> 200	> 200	 8ε	129 ± 94	> 250	94 ± 43
 5ζ	> 200	> 200	> 200	 8ζ	> 250	> 250	182 ± 95
 5στ	> 250	> 250	244 ± 9	 8στ	> 250	> 250	≥ 250
 8α	> 200	> 200	89 ± 1	 8η	> 200	> 200	> 200
 8β	188 ± 22	> 250	≥ 250				

II.2 Σύνθεση των 3'-C-κυανο και 3'-δεοξυ-3'-C-κυανο πυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων

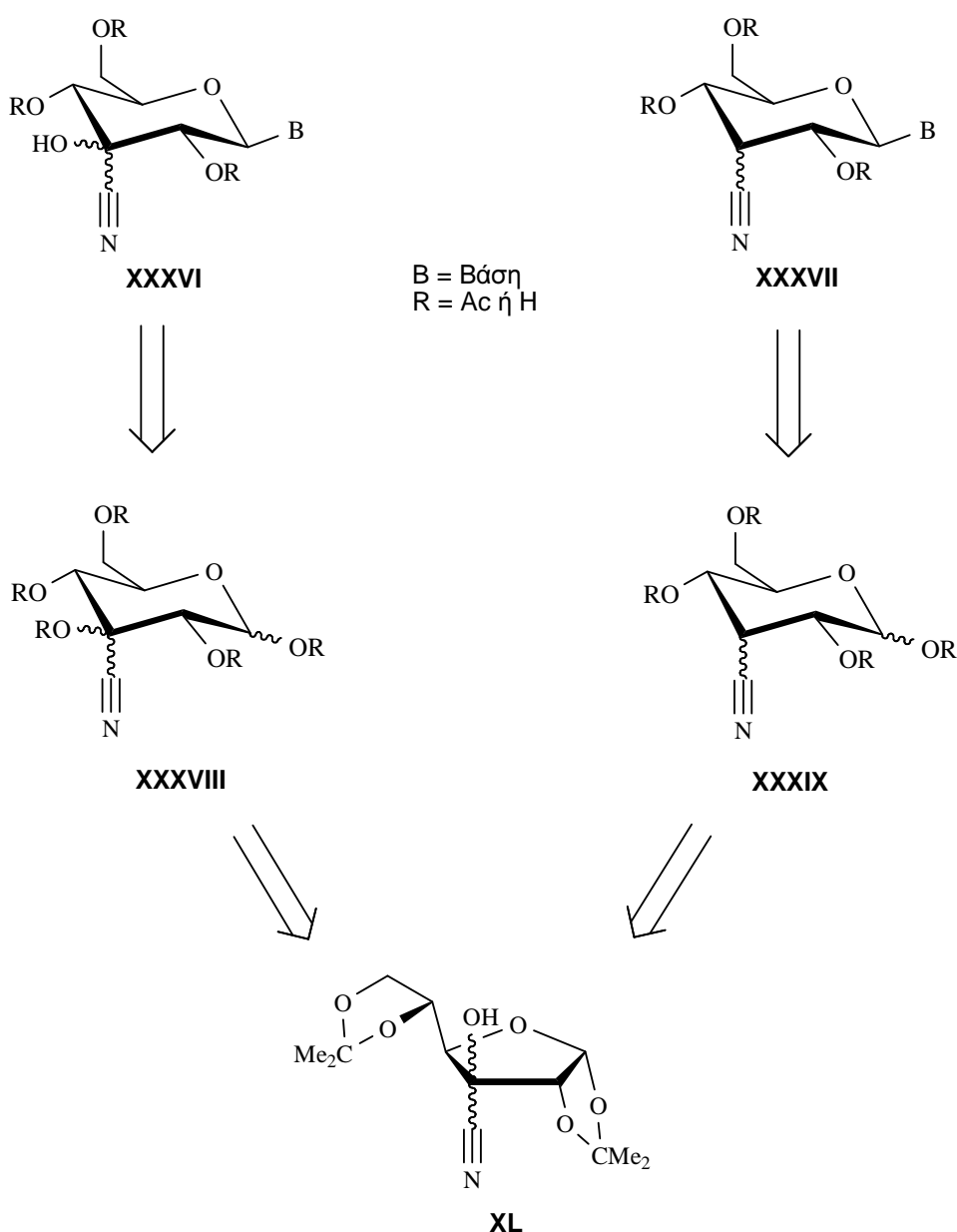
Αποτελεί γεγονός ότι η τροποποίηση του υδατανθρακικού δακτυλίου ενός νουκλεοζίτη μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικές μεταβολές στο φάσμα των βιολογικών του ιδιοτήτων. Υπό το πρίσμα αυτό, η εισαγωγή της κυανο ομάδας στο τμήμα του σακχάρου ενός νουκλεοζιτικού αναλόγου θεωρείται μια εξαιρετική στρατηγική για την ανακάλυψη νέων υποψήφιων φαρμάκων. Πράγματι -όπως έχει ήδη αναφερθεί- ένας σημαντικός αριθμός κυανοφουρανονουκλεοζιτών έχει επιδείξει ενδιαφέρουσες αντιιικές και αντικαρκινικές ιδιότητες, ενώ η θεραπευτική τους ικανότητα αποδίδεται σε σημαντικό βαθμό στο μικρό μέγεθος και στη μεγάλη ηλεκτραρνητικότητα της κυανο ομάδας.

Επιπρόσθετα, πρόσφατες έρευνες απέδειξαν ότι νέες τάξεις ασυνήθιστων 3'-φθορο πυρανονουκλεοζιτών μπορούν να θεωρηθούν ελπιδοφόρες για την ανάπτυξη αντι-εντεροϊικών φαρμάκων, ενώ παρουσίασαν αξιοσημείωτη κυτταροτοξική δράση έναντι διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών (Manta *et al.* 2007, Manta *et al.* 2008, Tsoukala *et al.* 2010). Με βάση τα ανωτέρω, κρίθηκε ενδιαφέρουσα η επέκταση των μελετών προς τη σύνθεση νέων μορίων στα οποία το άτομο του φθορίου θα αντικατασταθεί από την επίσης ηλεκτραρνητική κυανο ομάδα. Ως εκ τούτου αποφασίστηκε, ο σχεδιασμός, η σύνθεση και η βιολογική αποτίμηση νέων 3'-C-κυανο και 3'-δεοξυ-3'-C-κυανο πυρανονουκλεοζιτών, οι οποίοι θα φέρουν ως ετεροκυκλικές βάσεις τη 5-φθοροουρακίλη, την ουρακίλη, τη θυμίνη και την κυτοσίνη (Ενώσεις **XXXVI**, **XXXVII**, σχήμα 45). Πρέπει να αναφερθεί ότι η στερεοχημεία της κυανο ομάδας δεν είχε κάποια σημασία στο σχεδιασμό, σε αντίθεση με τη σύνθεση των αιθυλο πυρανονουκλεοζιτών, όπου ο επιθυμητός σχεδιασμός προέβλεπε τη β-στερεοχημεία της αιθυλομάδας στα μόρια-στόχους.



Σχήμα 45

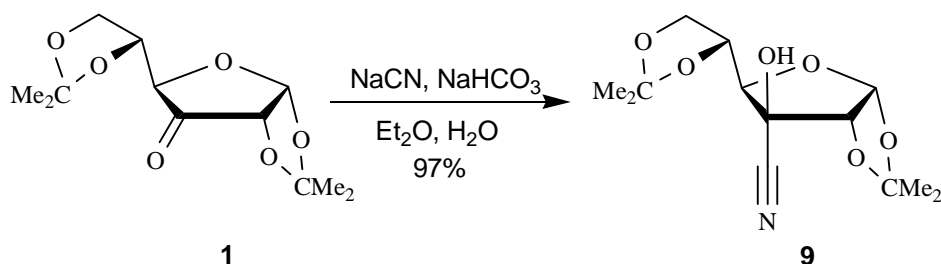
Εφαρμόζοντας μια ανάλογη ρετροσυνθετική προσέγγιση με αυτή των 3'-C-αιθυλο πυρανονουκλεοζιτών, οι 3'-C-κυανο- νουκλεοζίτες **XXXVI** και οι 3'-δεοξυ-3'-C-κυανο- νουκλεοζίτες **XXXVII** μπορούν να προκύψουν από τη συμπύκνωση της 3-C-κυανο πυρανόζης **XXXVIII** και της 3-δεοξυ-3-C-κυανο πυρανόζης **XXXIX**, αντίστοιχα, με την κατάλληλη νουκλεοβάση (Σχήμα 46). Επιπλέον, τα κυανο-σάκχαρα **XXXVIII** και **XXXIX** μπορούν να προέλθουν από τη φουρανο-κυανουδρίνη **XL**, μέσω μιας απλής συνθετικής διαδικασίας.



Σχήμα 46

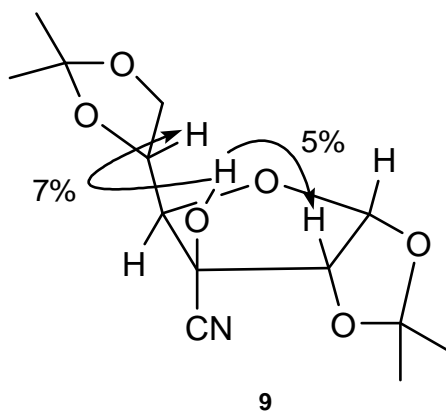
II.2.1 Σύνθεση της 1,2,3,4,6-πεντακίς-Ο-ακετυλο-3-ϸ-κυανο-Ϣ-γλυκοπυρανόζης (11)

Στο αρχικό στάδιο της συνθετικής πορείας πραγματοποιείται μια τυπική πυρηνόφιλη προσβολή της καρβονυλομάδας της γνωστής φουρανόζης **1** από το ανιόν του κυανίου, μέσω μιας εύκολης κατεργασίας του αντιδρώντος με κυανιούχο νάτριο (NaCN) και όξινο ανθρακικό νάτριο (NaHCO₃) σε σύστημα δύο φάσεων H₂O και διαιθυλαιθέρα (Et₂O) (Σχήμα 47). Ενώ σε αντιδράσεις ανάλογου τύπου ο σχηματισμός της κυανυδρίνης είναι αντιστρεπτός, επικρατώντας μια ισορροπία μεταξύ της αρχικής κετόνης και του κυανιούχου προϊόντος (Nagendrappa, 2008), στην αντίδραση του συγκεκριμένου υποστρώματος ευνοήθηκε πλήρως η σύνθεση της θερμοδυναμικά σταθερότερης γλυκο-κυανυδρίνης **9** (Bourgeois 1975, Rosenthal και Cliff 1976), με μια πρακτικά ποσοτική απόδοση (97%).



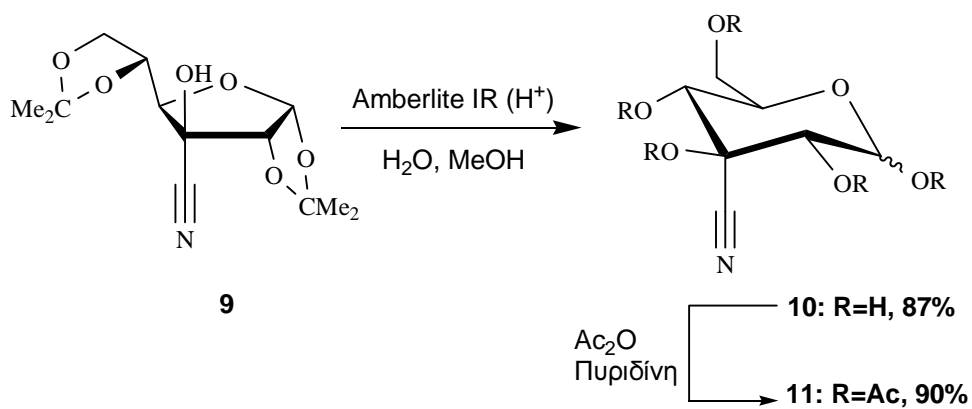
Σχήμα 47

Η δομή του κυανο-σακχάρου **9**, αν και έρχεται σε αντίθεση με την αναμενόμενη πυρηνόφιλη προσβολή της κυανο-ομάδας από την λιγότερο στερεοχημικά παρεμποδισμένη (πάνω) όψη του υδατανθρακικού δακτυλίου, είναι γνωστή -όπως αναφέρθηκε- βιβλιογραφικά και επιπλέον επιβεβαιώθηκε στη μελέτη αυτή με πειράματα NOE (Nuclear Overhauser Effect). Όπως απεικονίζεται στο σχήμα 48, η μεγάλη αύξηση της έντασης του H-2 και του H-5 του σακχάρου κατά 5% και 7% αντίστοιχα, κατά τον κορεσμό της ελεύθερης υδροξυλομάδας, αποδεικνύει ότι τα τρία αυτά πρωτόνια βρίσκονται στην ίδια πλευρά του φουρανοζικού δακτυλίου.



Σχήμα 48

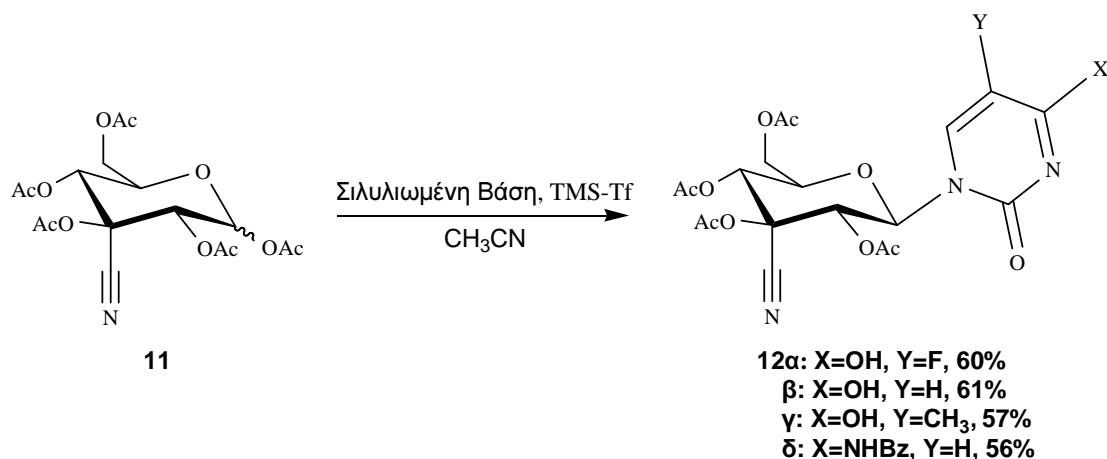
Ακολουθεί η κατεργασία του προϊόντος **9** σε θερμό υδατικό διάλυμα της ρητίνης Amberlite IR-120 (H^+), οπότε και λαμβάνεται η θερμοδυναμικά σταθερή πυρανόζη **10**. Εν συνεχεία, ακετυλίωση παρουσία Ac_2O σε πυριδίνη οδηγεί στο κυανο σάκχαρο **11**, το οποίο αποτελεί ένωση-κλειδί για τη λήψη των επιθυμητών κυανο-γλυκοπυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων (Σχήμα 49).



Σχήμα 49

II.2.2 Σύνθεση των 3'-C-κυανο-β-D-γλυκοπυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων της 5-φθοροουρακίλης 13α, ουρακίλης 13β, θυμίνης 13γ και κυτοσίνης 13δ

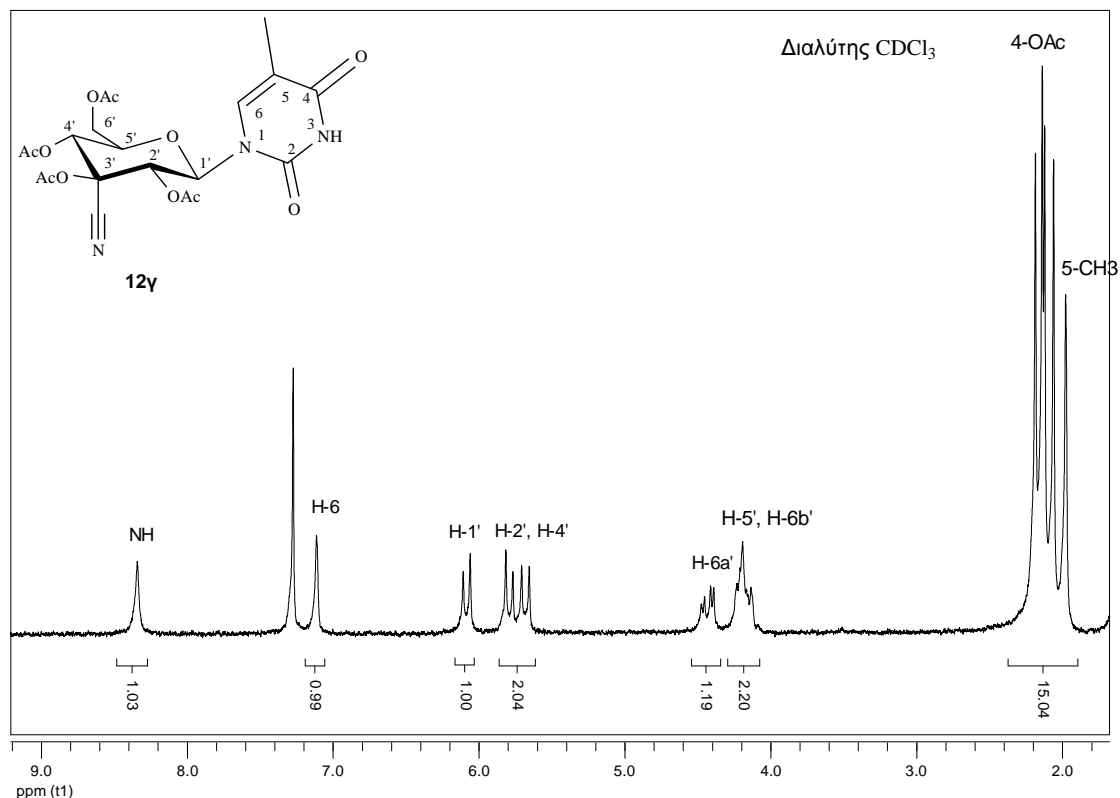
Έχοντας εξασφαλίσει την πρόσβαση στο ακετυλιωμένο κυανο-σάκχαρο **11**, απομένει η εισαγωγή των ετεροκυκλικών βάσεων, ώστε να ολοκληρωθεί η σύνθεση των τροποποιημένων νουκλεοζιτών. Πράγματι, σύζευξη της ακετυλιωμένης 3-C-κυανο-D-γλυκοπυρανόζης **11** με τις σιλυλιωμένες βάσεις 5-φθοροουρακίλη, ουρακίλη, θυμίνη και N⁴-βενζοϋλοκυτοσίνη σε διαλύτη CH₃CN, παρουσία του Me₃SiOSO₂CF₃, οδηγεί στο σχηματισμό των 1-(2',3',4',6'-τετρακίς-O-ακετυλο-3'-C-κυανο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)πυριμιδινικών νουκλεοζιτών **12α-δ**, αντίστοιχα (Σχήμα 50). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι συνθήκες θερμοκρασίας των νουκλεοζιτικών συνθέσεων **12α-δ**, ήτανε όμοιες με αυτές που εφαρμόστηκαν στα αντίστοιχα 3'-C-αιθυνοπυρανονουκλεοζιτικά ανάλογα.



Σχήμα 50

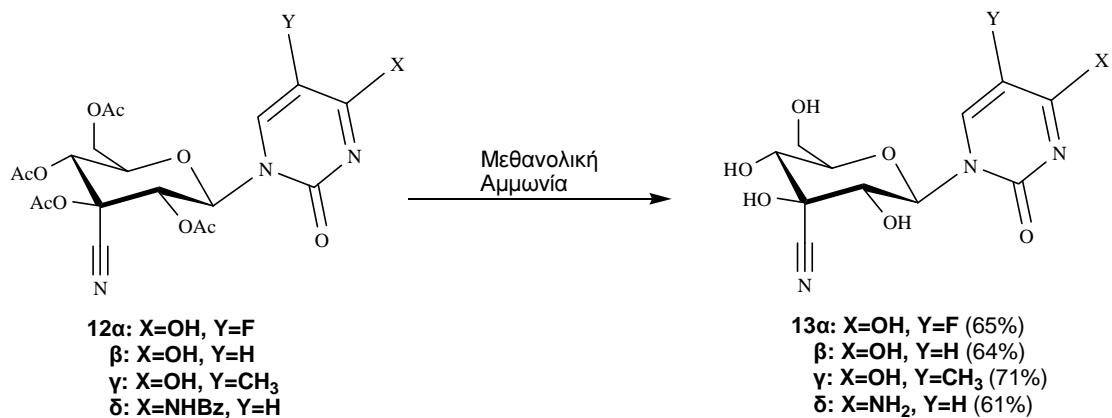
Στα φάσματα ¹H NMR των ενώσεων **12α-δ** εμφανίζονται μεγάλες σταθερές σύζευξης μεταξύ των πρωτονίων H-1' και H-2', (*J*_{1',2'} = 9.4 - 9.6 Hz) χαρακτηριστικές της αξονικής θέσης που καταλαμβάνουν τα δυο πρωτόνια και των ισημερινά προσανατολισμένων νουκλεοβάσεων. Στο σχήμα 51 παρατίθεται ενδεικτικά το φάσμα της 1-(2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλο-3'-C-κυανο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)θυμίνης (**12γ**). Από τη μελέτη του προκύπτει

αρχικά η χαρακτηριστική κορυφή της αμινομάδας της θυμίνης στα 8.34 ppm, ενώ ακολουθεί το σήμα πρωτονίου του H-6 της ετεροκυκλικής βάσης στα 7.01 ppm ως μια απλή κορυφή. Το σήμα του πρωτονίου H-1' εμφανίζεται ως μία διπλή κορυφή στα 6.08 ppm με σταθερά σύζευξης $J_{1',2'} = 9.6$ Hz, ενώ η διπλή κορυφή στα 5.80 ppm αντιστοιχεί στο σήμα του πρωτονίου H-2'. Η διπλή κορυφή που προσδιορίζει το πρωτόνιο της H-4' εμφανίζεται στα 5.67 ppm με σταθερά σύζευξης $J_{4',5'} = 10.2$ Hz, ενώ ακολουθούν τα σήματα των πρωτονίων του H-6a' σαν μια τετραπλή κορυφή στα 4.42 ppm με σταθερές σύζευξης $J_{5',6a'} = 4.5$ Hz, $J_{6a',6b'} = 12.8$ Hz και των H-5', H-6b' σαν μια πολλαπλή κορυφή στην περιοχή 4.23-4.13 ppm. Τέλος, διακρίνονται τα σήματα των πρωτονίων των τεσσάρων ακετυλομάδων του υδατανθρακικού δακτυλίου και του μεθυλίου της θυμίνης στα 2.18, 2.14, 2.12, 2.07 και 1.97 ppm, αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η παρουσία τεσσάρων ακετυλομάδων στο φάσμα του νουκλεοζίτη υποδηλώνει την ύπαρξη ακετυλίου στην ισημερινή 3'-θέση του υδατανθρακικού δακτυλίου, σε αντίθεση με ό,τι παρατηρήθηκε κατά την συνθετική πορεία των 3'-C-αιθινυλο πυρανονουκλεοζιτών, όπου εφαρμόζοντας τις ίδιες πειραματικές συνθήκες ακετυλίωσης το αντίστοιχο αξονικό τριτοταγές υδροξύλιο του σακχάρου παρέμεινε ελεύθερο. Το γεγονός αυτό πιθανώς να συνδέεται με το ότι οι αξονικοί υποκαταστάτες σε μια πυρανόζη είναι περισσότερο παρεμποδισμένοι (1,3-διαξονικές αλληλεπιδράσεις) και άρα λιγότερο δραστικοί σε πολλές μετατροπές όπως στις αντιδράσεις εστεροποίησης, ενώ ευνοείται σε αυτή τη συνθετική πορεία η ακετυλίωση του τριτοταγούς υδροξυλίου του κυανোসακχάρου καθώς επικρατεί σ' αυτό η ισημερινή διαμόρφωση (Eliel *et al.* 1994).



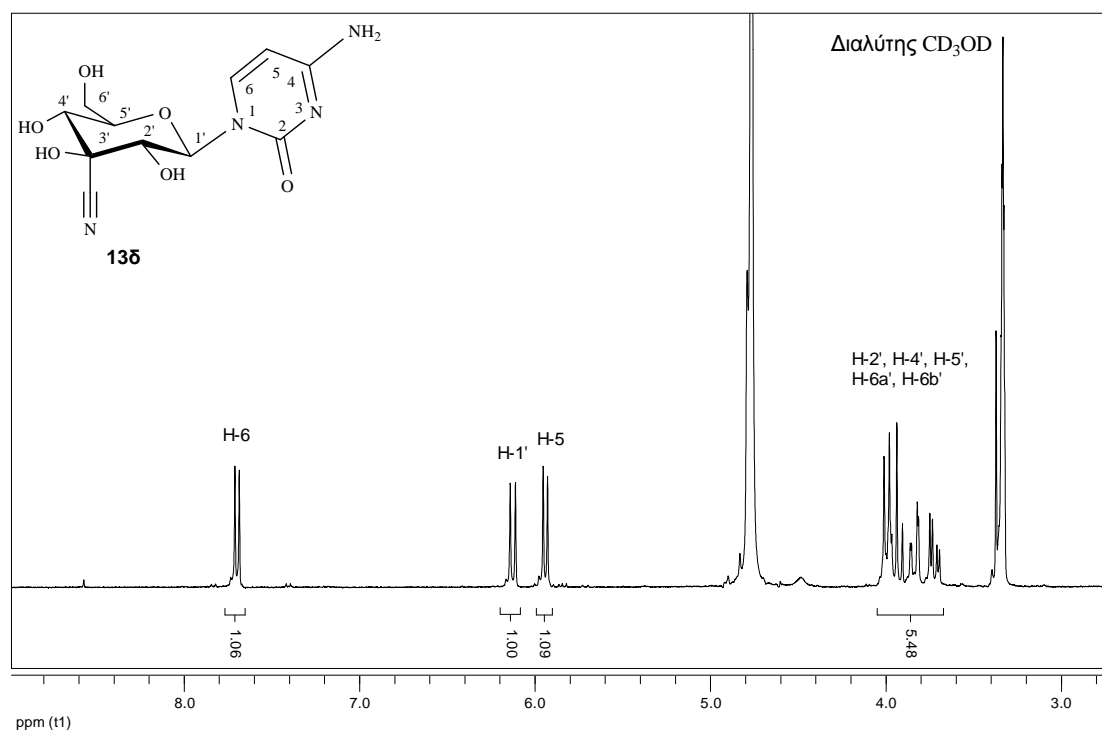
Σχήμα 51

Η συνθετική πορεία ολοκληρώνεται με την αποπροστασία των ενώσεων **12α-δ** με κατεργασία τους με μεθανολική αμμωνία, οπότε και λαμβάνονται οι επιθυμητοί 1-(3'-C-κυανο-β-D-γλυκοκυρανοζυλο) νουκλεοζίτες **13α-δ**, αντίστοιχα (Σχήμα 52).



Σχήμα 52

Εξετάζοντας το χαρακτηριστικό φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της 1-(3'-C-κυανο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)κυτοσίνης (**13δ**) προκύπτει ότι η διπλή κορυφή που εμφανίζεται στα 7.70 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-6 της κυτοσίνης με σταθερά σύζευξης $J_{5,6} = 7.5 \text{ Hz}$ (Σχήμα 53). Χαρακτηριστική είναι επίσης η κορυφή που αναφέρεται στο πρωτόνιο H-1', η οποία εμφανίζεται στα 6.12 ppm, ως διπλή με σταθερά σύζευξης $J_{1',2'} = 9.0 \text{ Hz}$, ενώ ακολουθεί το σήμα πρωτονίου H-5 της ετεροκυκλικής βάσης στα 5.94 ppm. Τέλος, πολλαπλές κορυφές παρουσιάζονται στα 4.00-3.69 ppm, οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-2', H-4', H-5' και H-6' του σακχάρου.



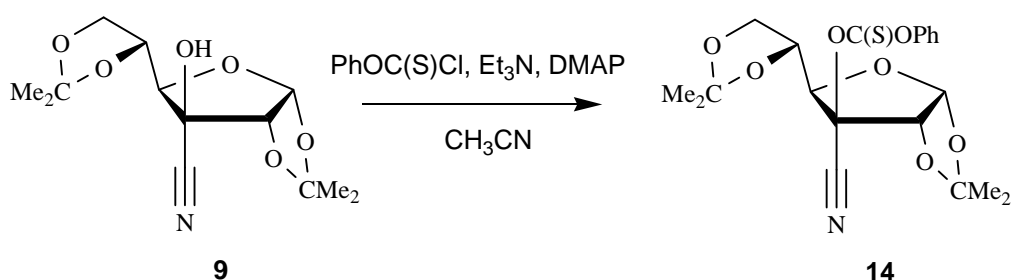
Σχήμα 53

II.2.3 Σύνθεση της 3-δεοξυ-1,2,4,6-τετρακίς-O-ακετυλο-3-C-κυανο-D-αλλοπυρανόζης (17)

Έχοντας εξασφαλίσει τον έναν από τους δύο τελικούς στόχους με την προηγούμενη πορεία, το συνθετικό πλάνο επεκτάθηκε προκειμένου να παραληφθούν τα αντίστοιχα 3'-δεοξυ-3'-C-κυανο πυρανονουκλεοζιτικά

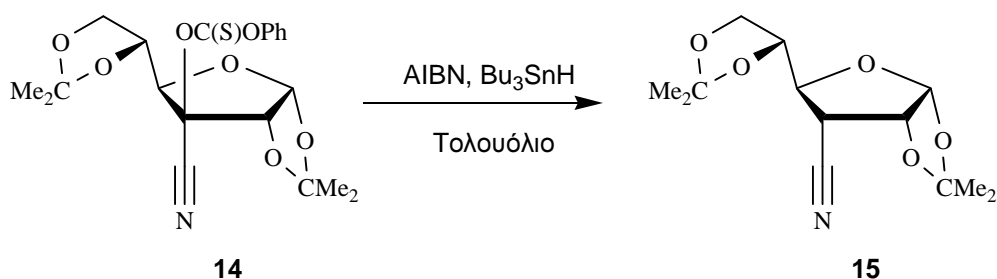
ανάλογα. Εκμεταλλευόμενοι τη διαθεσιμότητα της κυανυδρίνης **9**, παρασκευάστηκε το κατάλληλο 3-δεοξυ-3-*C*-κυανο φουρανοσάκχαρο μέσω μιας αντίδρασης αποξυγόνωσης τύπου Barton-McCombie (Barton and McCombie 1975), κατά την οποία το υδροξύλιο στη 3 θέση του σακχάρου αντικαθίσταται από ένα υδρογόνο.

Αρχικά, η αλκοόλη μετατρέπεται στο 3'-*O*-φαινοξυθειοκαρβονυλο-παράγωγο **14** με την επίδραση φαινοξυθειοκαρβονυλοχλωριδίου (PhOC(S)Cl), παρουσία τριαιθυλαμίνης (Et₃N) και 4-διμεθυλαμινοπυριδίνης (DMAP) σε διαλύτη CH₃CN (Azuma *et al.* 1993) (Σχήμα 54).



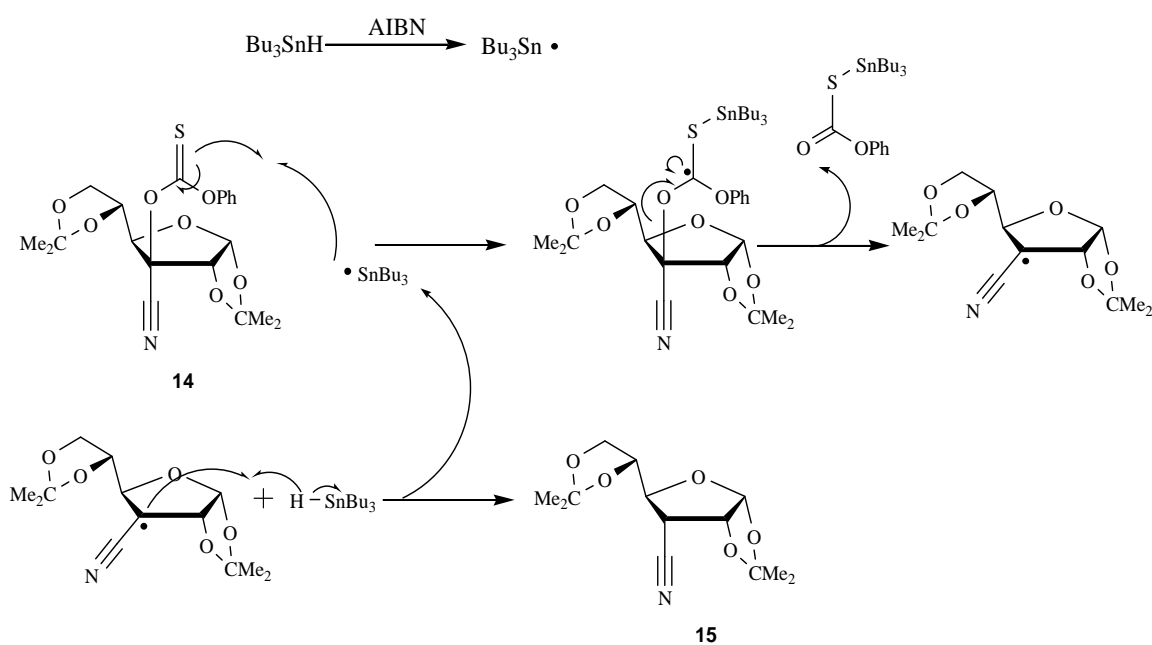
Σχήμα 54

Το σχηματιζόμενο θειοκαρβόνυλο παράγωγο **14** αποδείχτηκε αρκετά ασταθές κατά τη διάρκεια απομόνωσης με χρωματογραφική στήλη, οπότε το ακατέργαστο προϊόν ανάγεται απευθείας παρουσία του υδριδίου του τριβουτυλοκασιτέρου (Bu₃SnH), καθώς και αζωδισ-ισοβουτυρονιτριλίου (AIBN) σε διαλύτη τολουόλιο στους 100 °C, οπότε και λαμβάνεται η 3-δεοξυ-3-*C*-κυανο-1,2:5,6-δισ-*O*-ισοπροπυλιδανο- α -*D*-αλλοφουρανόζη **15** σε 76% απόδοση από την ένωση **9**, ύστερα από τη σχάση του δεσμού C³-O³ σε μία αλυσιδωτή αντίδραση ελευθέρων ριζών (Σχήμα 55).



Σχήμα 55

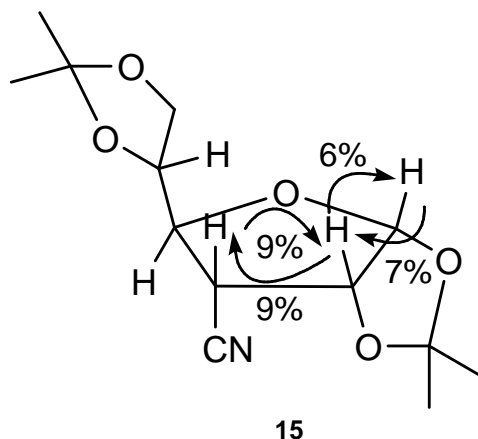
Στο σημείο αυτό, αξίζει να σχολιαστεί πιο αναλυτικά ο μηχανισμός της παραπάνω αντίδρασης, που είναι και η αντίδραση κλειδί της συγκεκριμένης συνθετικής πορείας. Καταρχήν, μετά το στάδιο έναρξης της αντίδρασης ελευθέρων ριζών, η σχηματιζόμενη ρίζα του τριβουτυλοκασσιτέρου προσβάλλει το θείο της θειοκαρβονυλομάδας του παραγώγου **14**, οδηγώντας στη διάσπαση του μορίου και στο σχηματισμό μιας αλκυλικής ρίζας. Η αλκυλική ρίζα στη συνέχεια αποσπά μια ρίζα υδρογόνου από το υδρίδιο του τριβουτυλοκασσιτέρου δημιουργώντας το επιθυμητό προϊόν **15**, ενώ δημιουργείται μια νέα ρίζα τριβουτυλοκασσιτέρου έτοιμη για το επόμενο στάδιο διάδοσης της αλυσιδωτής αντίδρασης (Σχήμα 56). Αξίζει να σημειωθεί ότι η κινητήριος δύναμη της συγκεκριμένης αντίδρασης ελευθέρων ριζών είναι ο σχηματισμός των πολύ σταθερών δεσμών θείου-κασσιτέρου.



Σχήμα 56

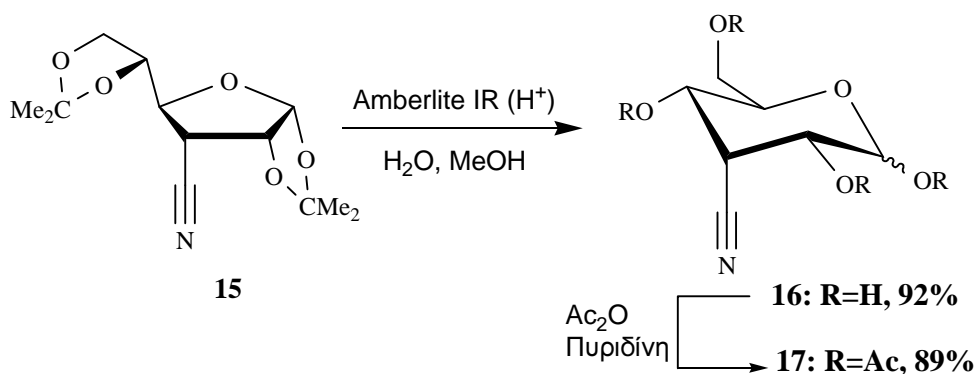
Όσον αφορά τη δομή του 3-δεοξυ-3-*C*-κυανο-σακχάρου **15**, ο προσανατολισμός της κυανο ομάδας είναι εμφανής από τις μετρήσεις NOE που φαίνονται στο παρακάτω σχήμα 57. Οι αμοιβαίες αυξήσεις της έντασης που παρατηρούνται μεταξύ του H-2 και των H-1 και H-3, δείχνουν ότι και τα τρία αυτά πρωτόνια βρίσκονται στην ίδια β όψη του φουρανοζικού δακτυλίου. Ο στερεοχημικός έλεγχος στις αντιδράσεις του συγκεκριμένου υποστρώματος

προέρχεται από την παρουσία της ογκώδους 1,2-*O*-ισοπροπυλιδENO ομάδας, η οποία οδηγεί το άτομο του υδρογόνου του τριβουτυλοκασιτέρου να εισέρχεται από την λιγότερο παρεμποδισμένη πάνω όψη του επίπεδου ριζικού ενδιαμέσου.



15
Σχήμα 57

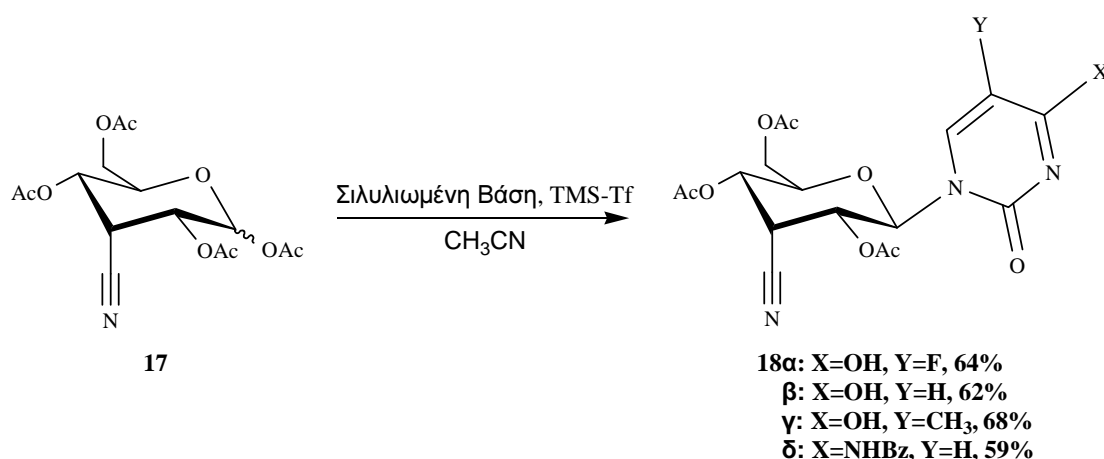
Έχοντας εξασφαλίσει την πρόσβαση στο κυανο σάκχαρο **15** ακολουθεί η υδρόλυση του σε θερμό υδατικό διάλυμα όξινης ρητίνης IR-120 (H^+), οπότε και λαμβάνεται η πυρανόζη **16**. Ακολουθεί ακετυλίωση της ένωσης **16** παρουσία Ac_2O σε πυριδίνη, οπότε και λαμβάνεται η επιθυμητή 3-δεοξυ-1,2,4,6-τετρακίς-*O*-ακετυλο-3-*C*-κυανο-*D*-αλλοπυρανόζη (**17**) (Σχήμα 58).



Σχήμα 58

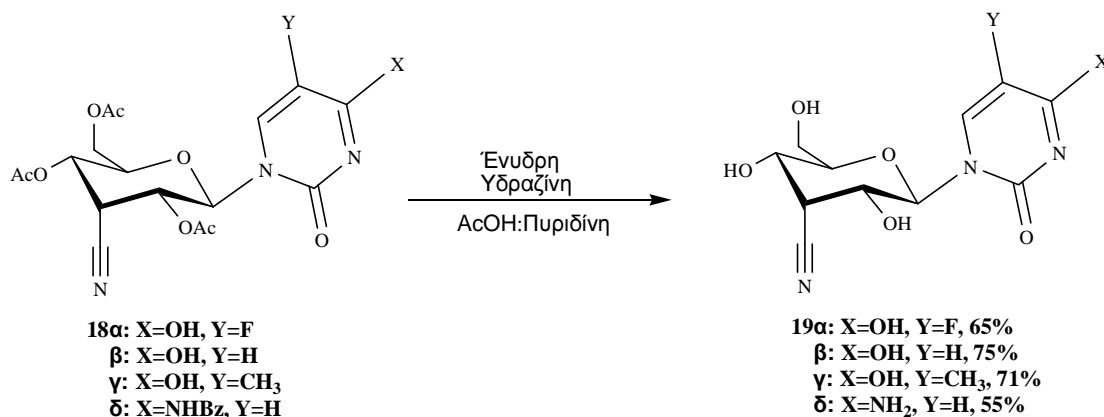
II.2.4 Σύνθεση των 3-δεοξυ-3'-C-κυανο-β-D-αλλοπυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων της 5-φθοροουρακίλης 19α, ουρακίλης 19β, θυμίνης 19γ και κυτοσίνης 19δ

Η σύζευξη της 1,2,4,6-τετρακίς-Ο-ακετυλο-3-δεοξυ-3-*C*-κυανο-β-D-αλλοπυρανόζης (17) με τις σιλυλιωμένες βάσεις 5-φθοροουρακίλη, ουρακίλη, θυμίνη και *N*⁴-βενζοϋλοκυτοσίνη σε διαλύτη CH₃CN, παρουσία του Me₃SiOSO₂CF₃, οδηγεί στους προστατευμένους κυανο νουκλεοζίτες 18α-δ, αντίστοιχα (Σχήμα 59). Τα δεδομένα που προέκυψαν από τα φάσματα ¹H NMR των νέων νουκλεοζιτών ($J_{1',2'} = 9.4-9.7$ Hz, $J_{2',3'} = 5.0-5.2$ Hz) κατέδειξαν την αναμενόμενη β διαμόρφωση του σακχάρου και τον αξονικό προσανατολισμό της κυανο ομάδας.



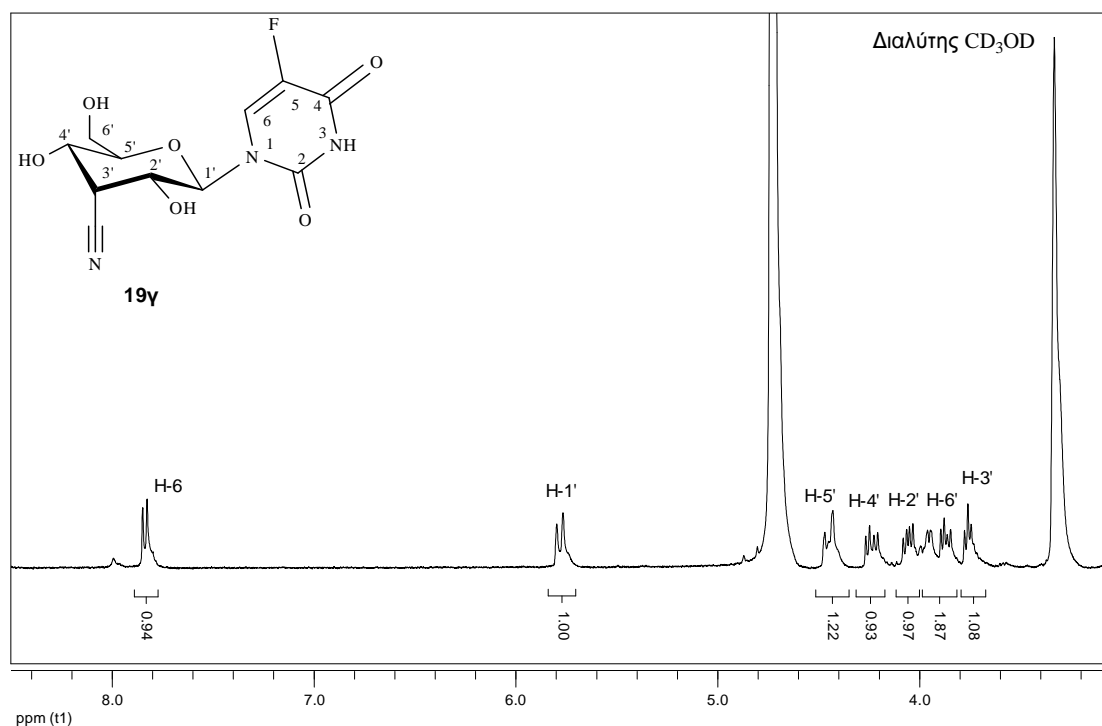
Σχήμα 59

Τέλος, ακολουθεί η αποπροστασία των 3'-δεοξυ-3'-*C*-κυανο πυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων 18α-δ με επίδραση ένυδρης υδραζίνης σε διάλυμα οξικού οξέος:πυριδίνης (AcOH:pyridine), οπότε και απομονώνονται τα τελικά προϊόντα 19α-δ, αντίστοιχα, με αποδόσεις που κυμαίνονται από 55 έως 75% (Σχήμα 60). Προσπάθειες πλήρους αποπροστασίας με μεθανολική αμμωνία, οδήγησε σε πολύπλοκα μείγματα, τα οποία πιθανώς να οφείλονται σε αντιδράσεις β-απόσπασης, λόγω του όξινου υδρογόνου H-3' και της παρουσίας δυο αποχωρουσών ομάδων (OAc) στις 2'- και 4'- θέσεις του πυρανοζικού δακτυλίου (Zhu *et al.* 2003).



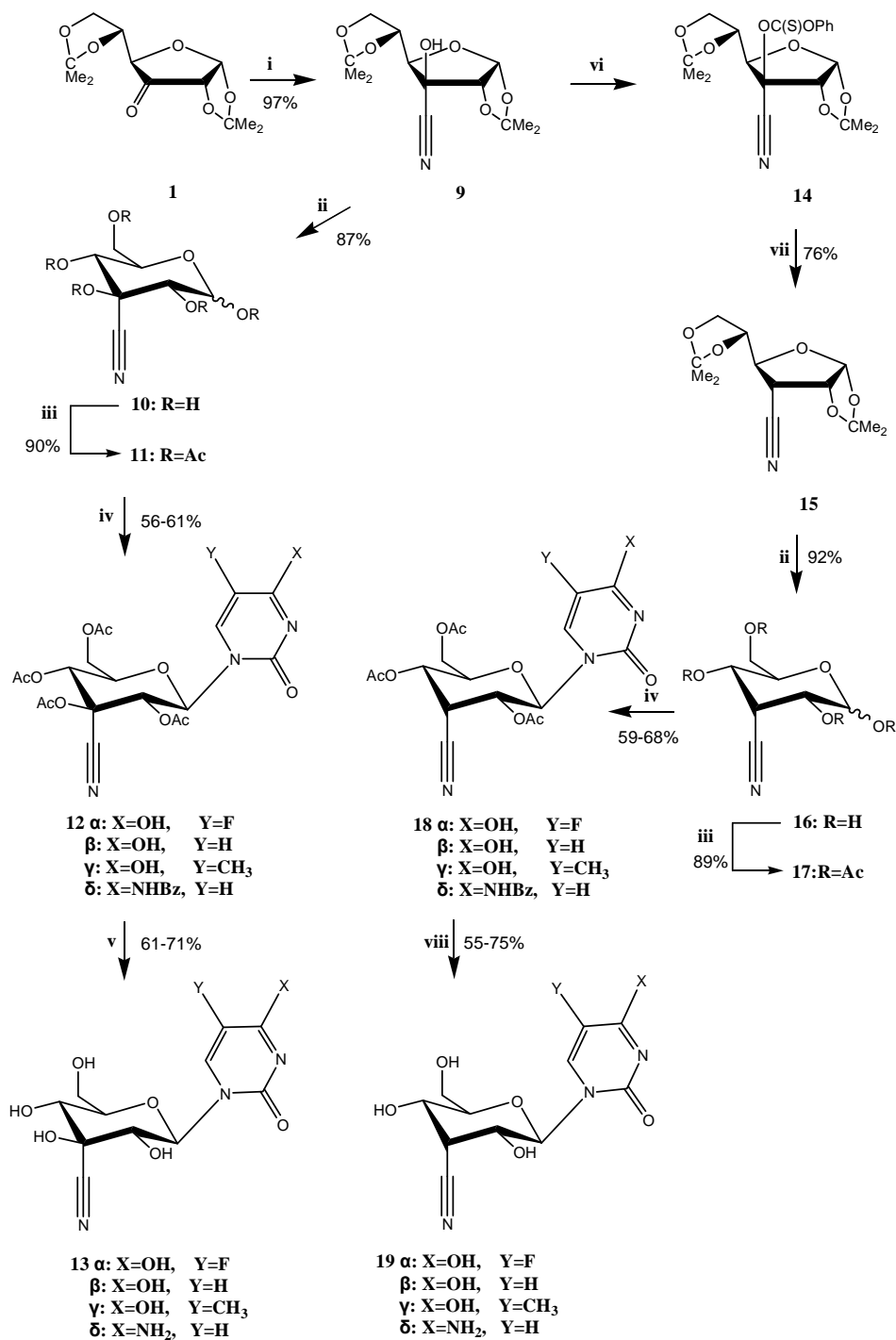
Σχήμα 60

Στο σχήμα 61, παρατίθεται ενδεικτικά το φάσμα ¹H NMR της 1-(3'-δεοξυ-3'-C-κυανο-β-D-αλλοπυρανοζυλο)-5-φθοροουρακίλης (**19α**). Από τη μελέτη του φάσματος προκύπτει ότι η διπλή κορυφή που εμφανίζεται στα 7.80 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-6 της ετεροκυκλικής βάσης με σταθερά σύζευξης $J_{6,F5} = 6.5$ Hz, ενώ ακολουθεί το σήμα πρωτονίου του H-1' στα 5.78 ppm με σταθερά σύζευξης $J_{1',2'} = 9.2$ Hz. Το σήμα του πρωτονίου H-5' εμφανίζεται ως μία πολλαπλή κορυφή στα 4.46-4.42 ppm, ενώ η διπλή διπλών κορυφή στα 4.23 ppm αντιστοιχεί στο σήμα του πρωτονίου H-4' με σταθερές σύζευξης $J_{3',4'} = 5.6$ Hz και $J_{4',5'} = 12.1$ Hz. Η διπλή διπλών κορυφή που προσδιορίζει το πρωτόνιο H-2' εμφανίζεται στα 4.05 ppm με σταθερά σύζευξης $J_{2',3'} = 5.1$ Hz, ενώ ακολουθούν τα σήματα των πρωτονίων H-6' σαν μια πολλαπλή κορυφή στην περιοχή 3.95-3.84 ppm. Τέλος, διακρίνεται το χαρακτηριστικό σήμα του πρωτονίου H-3' ως μια τριπλή κορυφή.



Σχήμα 61

Φέρνοντας εις πέρας και τη δεύτερη συνθετική πορεία, μπορούμε να παραθέσουμε στο παρακάτω Σχήμα 62 ολόκληρη τη γενική πορεία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση των 3'-C-κυανο-β-D-γλυκοπυρανονουκλεοζιτών **13α-δ** αλλά και των 3'-C-κυανο-β-D-αλλοπυρανονουκλεοζιτών **19α-δ**.



(i) NaCN, NaHCO₃, Et₂O, H₂O; (ii) Amberlite IR (H⁺), H₂O, MeOH; (iii) Ac₂O, Πυριδίνη; (iv) Σιλυλωμένη Βάση, TMS-Tf, CH₃CN; (v) Μεθανολική Αμμωνία; (vi) PhOC(S)Cl, Et₃N, DMAP, CH₃CN; (vii) AIBN, Bu₃SnH, Τολουόλιο; (viii) Ένυδρη Υδραζίνη, AcOH:Πυριδίνη

Σχήμα 62

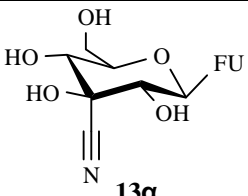
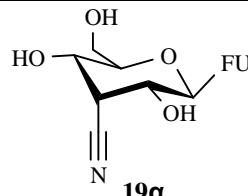
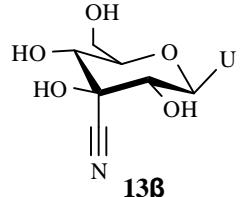
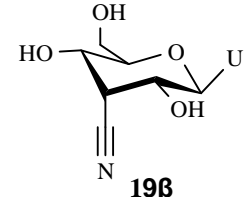
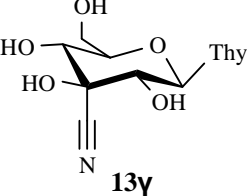
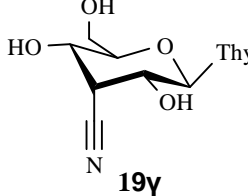
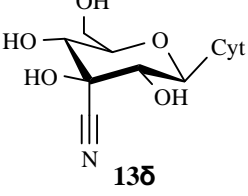
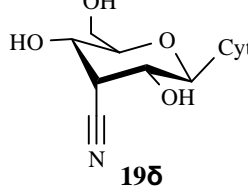
II.2.5 Αντιική και αντικαρκινική δράση των 3'-C-κυανο και 3'-δεοξυ-3'-C-κυανο-πυρανονουκλεοζιτών

Οι νεοσυντιθέμενοι 3'-C-κυανο-γλυκοπυρανονουκλεοζίτες **13α-δ** και 3'-δεοξυ-3'-C-κυανο-αλλοπυρανονουκλεοζίτες **19α-δ** αποτιμήθηκαν ως προς την αντιική και αντικαρκινική τους δράση. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Ιολογίας και Χημειοθεραπείας του Ινστιτούτου Ιατρικής Έρευνας Rega, στο Βέλγιο.

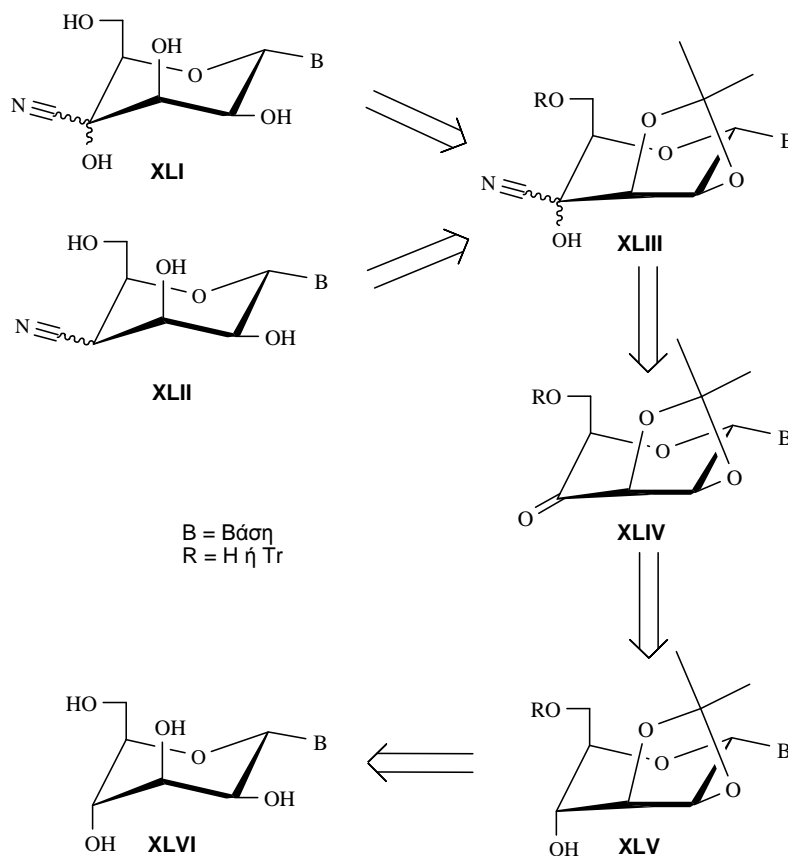
Συγκεκριμένα, οι τελικές ενώσεις αξιολογήθηκαν για την κυτταροστατική τους δράση έναντι του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων λευχαιμίας (L1210), των ανθρώπινων T-λεμφοκυττάρων (CEM), καθώς επίσης και των ανθρώπινων τραχηλικών καρκινικών κυττάρων (HeLa) (Πίνακας 4). Οι νέοι νουκλεοζίτες εμφάνισαν ελάχιστη έως καθόλου αντιπολλαπλασιαστική δράση, εκτός του 3'-C-κυανο πυρανονουκλεοζίτη της 5-φθοροουρακίλης **13α** (1.9 - 32 μM) που παρουσίασε αξιόλογη κυτταροστατική δράση έναντι και των τριών κυτταρικών σειρών, παρόμοια με αυτή της ελεύθερης βάσης 5-φθοροουρακίλη (0.49 - 18 μM). Χρήζει περαιτέρω διερεύνησης αν η συγκεκριμένη ανασταλτική δράση του κυανο αναλόγου **13α** οφείλεται σε ολόκληρο το μόριο ή ενδεχομένως η ένωση λειτουργεί ως προφάρμακο της 5-φθοροουρακίλης, η οποία αποσπάται είτε ως ελεύθερη βάση με τη βοήθεια φωσφορολυτικών ενζύμων ή/και απελευθερώνεται αυθόρμητα. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τους παραπάνω ελέγχους παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα και συγκρίνονται με αυτά της 5-FU.

Τα τελικά προϊόντα αποτιμήθηκαν επίσης για την αντιική τους δράση έναντι μιας πληθώρας τόσο DNA όσο και RNA ιών, χωρίς ωστόσο να παρουσιάσουν ικανοποιητικά αποτελέσματα ακόμη και σε υψηλές συγκέντρωσεις (100 μM).

Πίνακας 4. Ανασταλτική δράση των ενώσεων **13α-δ** και **19α-δ** έναντι του πολλαπλασιασμού των κυττάρων L1210, CEM και HeLa.

Προϊόν	IC ₅₀ (μM)			Προϊόν	IC ₅₀ (μM)		
	L1210	CEM	HeLa		L1210	CEM	HeLa
 13α	1.9 ± 0.0	32 ± 9.6	4.5 ± 1.2	 19α	550 ± 10	> 500	819 ± 44
 13β	417 ± 376	> 500	> 500	 19β	> 500	> 500	811 ± 40
 13γ	539 ± 85	> 500	> 500	 19γ	> 750	> 750	> 750
 13δ	147 ± 14	> 500	377 ± 0	 19δ	> 750	> 750	> 750
F-Uracil	0.49 ± 0.13	18 ± 5	0.54 ± 0.12				

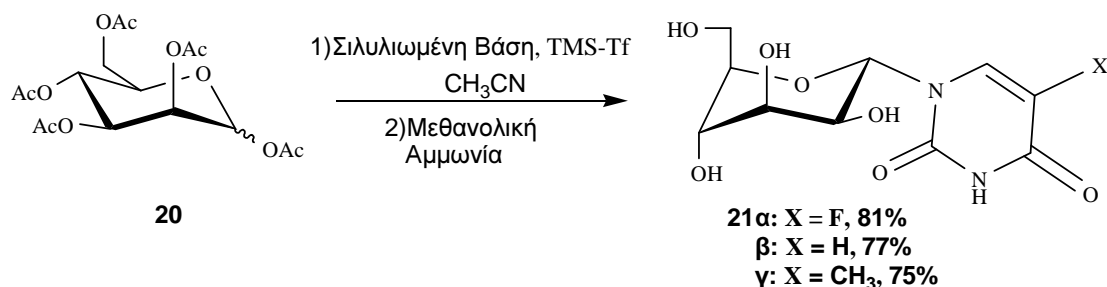
Με βάση τη ρετροσυνθετική προσέγγιση που παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα 64, εφόσον τα μόρια-στόχοι **XLI**, **XLII** έχουν ελεύθερα υδροξύλια στις θέσεις 2', 3' και 6', θα πρέπει οι πρόδρομες ενώσεις τους να διαθέτουν ομάδες προστασίας, οι οποίες θα απομακρυνθούν τελευταίες. Συνεπώς το κατάλληλο υπόστρωμα που θα μας οδηγήσει στα τελικά προϊόντα είναι ο προστατευμένη κυανουδρίνη **XLIII**, η οποία μπορεί να προέλθει από τον κετοπυρανονουκλεοζίτη **XLIV** μετά από μια πυρηνόφιλη προσθήκη. Σύμφωνα επίσης με τη προτεινόμενη μεθοδολογία, ο κετοπυρανονουκλεοζίτης **XLIV** μπορεί εύκολα να προκύψει από τον μερικώς προστατευμένο πυρανονουκλεοζίτη **XLV**, ενώ ο αρχικός μαννοπυρανονουκλεοζίτης **XLVI** παρέχει τη δυνατότητα σχηματισμού του πυρανονουκλεοζίτη **XLV** μετά από δύο διαδοχικές αντιδράσεις προστασίας. Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν επιλέχτηκε η μεθοδολογία σύνθεσης του τροποποιημένου σακχάρου και η εν συνεχεία συμπύκνωση του με τη νουκλεοβάση, καθώς η παρουσία μιας δραστικής υδροξυλομάδας στην 1 θέση του δακτυλίου, θα καθιστούσε προβληματική την εκλεκτική προστασία των 2,3-υδροξυλομάδων.



Σχήμα 64

II.3.1 Σύνθεση των 4'-C-κυανο-α-D-μαννοπυρανοζυλο αναλόγων της 5-φθοροουρακίλης 31α, ουρακίλης 31β και θυμίνης 31γ

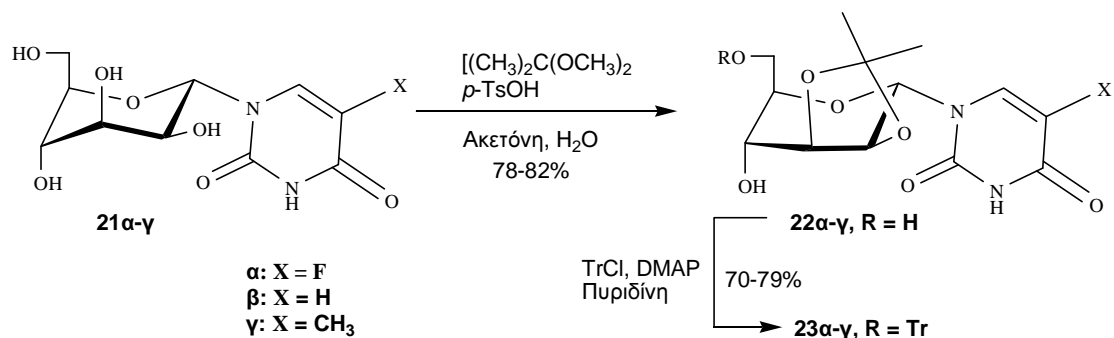
Οι α-πυρανονουκλεοζίτες της 5-φθοροουρακίλης **21α**, της ουρακίλης **21β** και της θυμίνης **21γ** (Σχήμα 65), συντέθηκαν με συμπύκνωση της ακετυλιωμένης μαννόζης **20** με την κατάλληλη νουκλεοβάση και εν συνεχεία απακετυλίωση των προστατευμένων νουκλεοζιτών με μεθανολική αμμωνία. Τα φάσματα ^1H NMR των νουκλεοζιτών **21α-γ**, εμφανίζουν μια μεγάλη σταθερά σύζευξης μεταξύ των γειτονικών πρωτονίων H-1' και H-2', υποδεικνύοντας τον αξονικό προσανατολισμό των δύο υδρογόνων, με την ετεροκυκλική βάση να λαμβάνει την ισημερινή θέση στο τμήμα του σακχάρου. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα έρχονται σε συμφωνία με την υιοθέτηση των α-ανωμερικών νουκλεοζιτών μιας $^1\text{C}_4$ διαμόρφωσης. Η παρουσία μιας ισημερινά προσανατολισμένης νουκλεοβάσης σε μια $^1\text{C}_4$ διαμόρφωση ευνοείται, παρόλο την ύπαρξη τριών αξονικών υποκαταστατών στις θέσεις 3',4' και 5' του δακτυλίου, γεγονός που πιθανώς να συνδέεται με το μεγάλο μέγεθος της ετεροκυκλικής βάσης (Rico-Gómez *et al.* 2008, Onodera *et al.* 1966).



Σχήμα 65

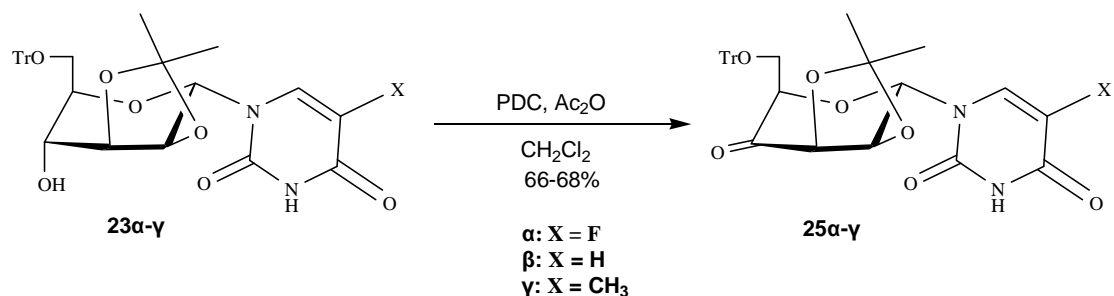
Στο επόμενο βήμα της συνθετικής πορείας προστατεύονται εκλεκτικά τα 2',3' *cis* υδροξύλια των ενώσεων **21α-γ**, με την επίδραση 2,2-διμεθοξυπροπανίου $[(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{OCH}_3)_2]$ και καταλυτικής ποσότητας π-τολουολοσουλφονικού οξέος (*p*-TsOH) σε διαλύτη ακετόνη. Η αντίδραση πραγματοποιείται με τον σχηματισμό δύο ακετονιδίων στις 2',3'- και 4',6'-θέσεις του σακχάρου (Vanheusden *et al.* 2004), ενώ ακολουθεί πολύωρη υδρόλυση με αποτέλεσμα τη λήψη των επιθυμητών 2',3'-ισοπροπυλιδικο παραγώγων **22α-γ**. Στη συνέχεια, εκλεκτική τριτυλίωση των νουκλεοζιτών

22α-γ μέσω κατεργασίας τους με τριφαινυλομεθυλοχλωρίδιο (TrCl) σε πυριδίνη, παρουσία καταλυτικής ποσότητας DMAP, οδηγεί στη σύνθεση των νουκλεοζιτικών αναλόγων **23α-γ**, αντίστοιχα (Σχήμα 66).



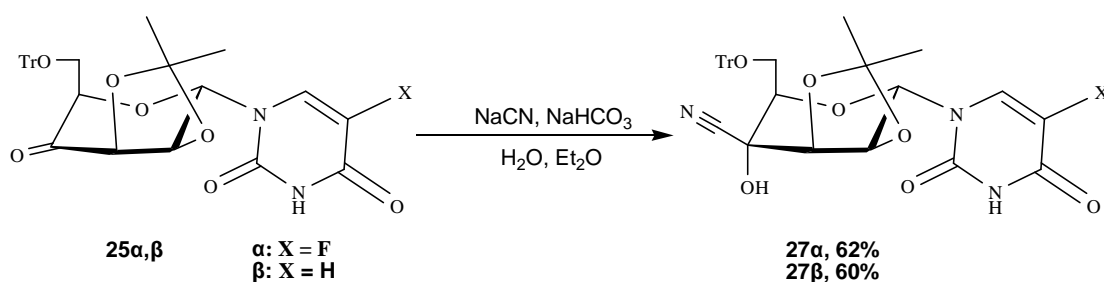
Σχήμα 66

Στο επόμενο στάδιο, πραγματοποιείται οξείδωση των μερικώς προστατευμένων νουκλεοζιτικών αναλόγων **23α-γ**, παρουσία διχρωμικής πυριδίνης (PDC) και Ac_2O σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο, οπότε και σχηματίζονται τα 4'-κετο ανάλογα **25α-γ**, αντίστοιχα (Herscovici και Antonakis, 1980) (Σχήμα 67). Από τη μελέτη των φασμάτων $^1H\text{-NMR}$ των ενώσεων **25α-γ**, χαρακτηριστικό είναι το σήμα πρωτονίου H-3' στα 4.74-4.65 ppm ως μια διπλή κορυφή λόγω της σύζευξης του με το H-2', επιβεβαιώνοντας την απουσία του σήματος πρωτονίου στη 4'-θέση του υδατανθρακικού δακτυλίου.



Σχήμα 67

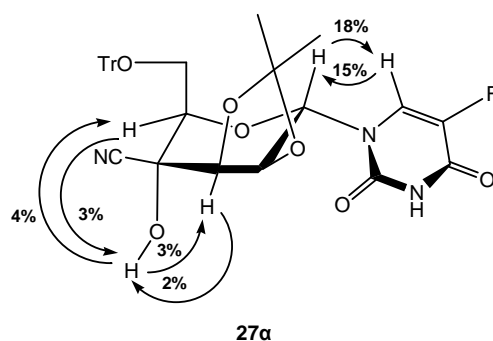
Μετά από την επιτυχή παρασκευή των 4'-κετοπυρανονουκλεοζιτών **25α-γ**, ενώσεων-κλειδιών στη συνθετική μας πορεία, η τελευταία συνεχίστηκε με τις αντιδράσεις σύνθεσης των αντίστοιχων κυανυδρινών. Συγκεκριμένα, κατεργασία των **25α,β** με NaCN και NaHCO₃ σε σύστημα δύο φάσεων H₂O και Et₂O, ευνόησε την πυρηνόφιλη προσβολή του κυανιούχου ανιόντος (NC⁻) στην ισημερινή θέση της πυρανόζης, λαμβάνοντας τους κυανο νουκλεοζίτες **27α,β**, αντίστοιχα, ως τα μοναδικά σταθερά προϊόντα (Σχήμα 68). Η σταθερότητα των σχηματιζόμενων κυανυδρινών **27α,β**, πιθανώς να οφείλεται στα δύο *trans* διαξονικά προσανατολισμένα άτομα οξυγόνου στις θέσεις C-3' και C-4' του υδατανθρακικού δακτυλίου (Lagrange *et al.* 1980). Αξίζει ν' αναφερθεί ότι η ισημερινή προσέγγιση του NC⁻ δυσχεραίνεται από τη στερεοχημεία του μορίου, όπου οι 2',3' ισοπροπυλιδενο και 6'-τριτυλο ομάδες παρεμποδίζουν σημαντικά την πάνω όψη του δακτυλίου, απαιτώντας μεγάλους χρόνους αντίδρασης (3 ημέρες) για να πετύχουμε ικανοποιητικές αποδόσεις (60-62%). Αντιθέτως, ενώ στερεοχημικά ευνοείται η αξονική προσέγγιση του NC⁻ στην προστατευμένη κετόνη, δεν παραλαμβάνεται η αντίστοιχη κυανυδρίνη από το μείγμα της αντίδρασης. Το γεγονός αυτό πιθανώς να συνδέεται με την αντιστρεπτότητα που παρουσιάζουν οι αντιδράσεις αυτού του τύπου (Nagendrappa, 2008), μετατοπίζοντας την αντίδραση αξονικής προσβολής του NC⁻ στο συγκεκριμένο υπόστρωμα προς τον επανασχηματισμό της αρχικής κετόνης.



Σχήμα 68

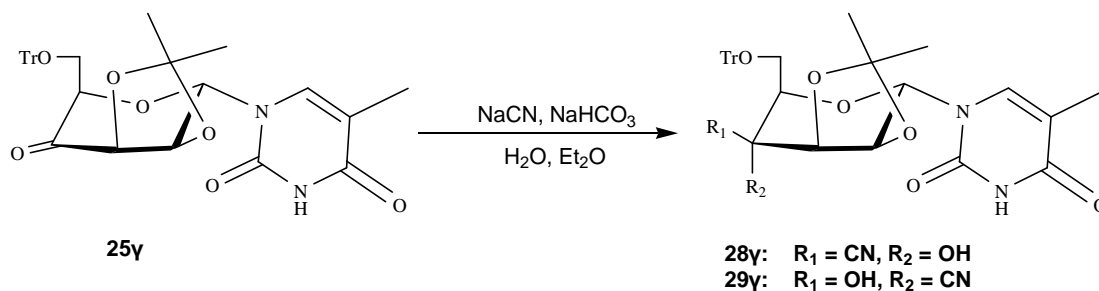
Η απόδοση της στερεοχημείας των νέων νουκλεοζιτών βασίστηκε σε πειράματα NOE (Σχήμα 69). Όπως απεικονίζεται στο παράδειγμα της ένωσης **27α** η αύξηση της έντασης του υδροξυλίου κατά 3% και 2% με την ακτινοβολήση των H-5' και H-3', αντίστοιχα, αποδεικνύει ότι το υδροξύλιο

βρίσκεται στην κάτω πλευρά του υδατανθρακικού δακτυλίου. Σε άμεση συμφωνία, κορεσμός της ελεύθερης υδροξυλομάδας οδηγεί στην αύξηση της έντασης του H-5' κατά 4% και του H-3' κατά 3%. Ο προσανατολισμός της ετεροκυκλικής βάσης στην ανωμερική θέση του σακχάρου καθορίστηκε επίσης με πειράματα NOE, που φανέρωσαν την εγγύτητα μεταξύ του H-1' και του H-6 της 5-φθορουρακίλης.



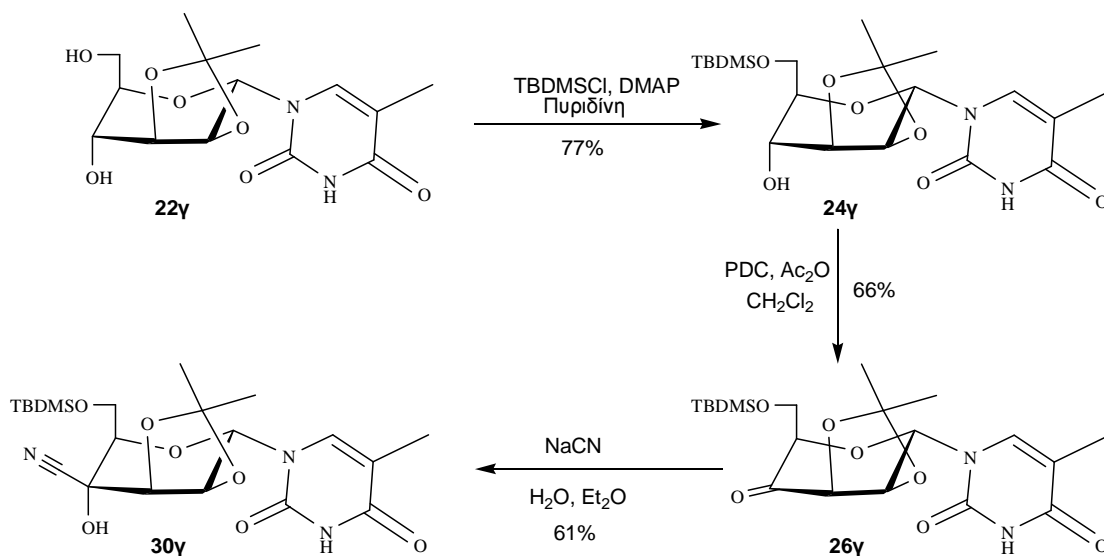
Σχήμα 69

Σε αντίθεση με τις προηγούμενες αντιδράσεις που ήτανе απόλυτα εκλεκτικές όσον αφορά τη στερεοχημεία τους, η αντίδραση του NC^- στον νουκλεοζίτη της θυμίνης **25γ** υπό τις ίδιες πειραματικές συνθήκες οδήγησε σε ένα μείγμα δύο 4'-ισομερών **28γ** και **29γ** (περίπου 1:1 αναλογίας) (Σχήμα 70), το οποίο ήταν αδύνατον να διαχωριστεί χρωματογραφικά. Με βάση τα προηγούμενα, είναι πιθανόν η παρουσία της μεθυλικής ομάδας στην ετεροκυκλική βάση να τροποποιεί τη διαμόρφωση της ετεροκυκλικής βάσης στο μόριο, διευκολύνοντας πιθανώς τον αξονικό προσανατολισμό της C-4' κυανο ομάδας. Αλλαγές στις συνθήκες της αντίδρασης όπως μεταβολή της θερμοκρασίας ή επιλογή άλλου διαλύτη δεν διαφοροποίησαν σημαντικά την αναλογία των δύο ισομερών.



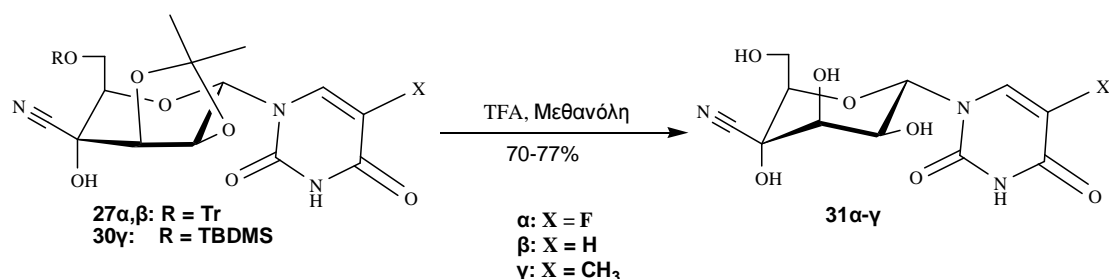
Σχήμα 70

Μετά τις προηγούμενες αποτυχημένες προσπάθειες ώστε να ευνοηθεί ο σχηματισμός του ενός από τα δύο ισομερή και με άμεση επιδίωξη τη βελτίωση της στερεοεκλεκτικότητας, εξετάστηκε η επίδραση του υποκαταστάτη της 6'-θέσης του υδατανθρακικού δακτυλίου στο στερεοχημικό αποτέλεσμα της αντίδρασης. Βασιζόμενοι στην παραδοχή ότι η τριτυλο- (τριφαινυλομεθυλο-) ομάδα είναι οπωσδήποτε ογκωδέστερη από την *tert*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο- ομάδα, επιλέχτηκε η τελευταία για την προστασία της ελεύθερης υδροξυλομάδας στον C-6'. Συνεπώς, αντίδραση του αναλόγου της θυμίνης **22γ** με *tert*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-χλωρίδιο (TBDMSCl) και εν συνεχεία οξείδωση της σχηματιζόμενης αλκοόλης **24γ** οδήγησε στη λήψη του 4'-κετο νουκλεοζίτη **26γ** (Σχήμα 71). Η συνθετική πορεία συνεχίζεται με επίδραση του NaCN σε υδάτινο αιθέρα της ένωσης **26γ**, οπότε και σχηματίζεται η κυανυδρίνη **30γ** ως το μοναδικό προϊόν της αντίδρασης. Με βάση το συγκεκριμένο αποτέλεσμα μπορεί να υποστηριχτεί ότι η παρουσία της *tert*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-ομάδας στον C-6' ασκεί σημαντικό στερεοχημικό έλεγχο στην αντίδραση διευκολύνοντας πιθανώς τον ισημερινό προσανατολισμό της C-4' κυανο ομάδας μέσω διαφοροποιημένων ή/και μειωμένων στερεοχημικών παρεμποδίσεων. Η στερεοχημική δομή της ένωσης έχει επίσης εξακριβωθεί με βάση μετρήσεις NOE και είναι ανάλογη με τις προηγούμενες συντεθειμένες κυανυδρίνες αυτής της σειράς προϊόντων.



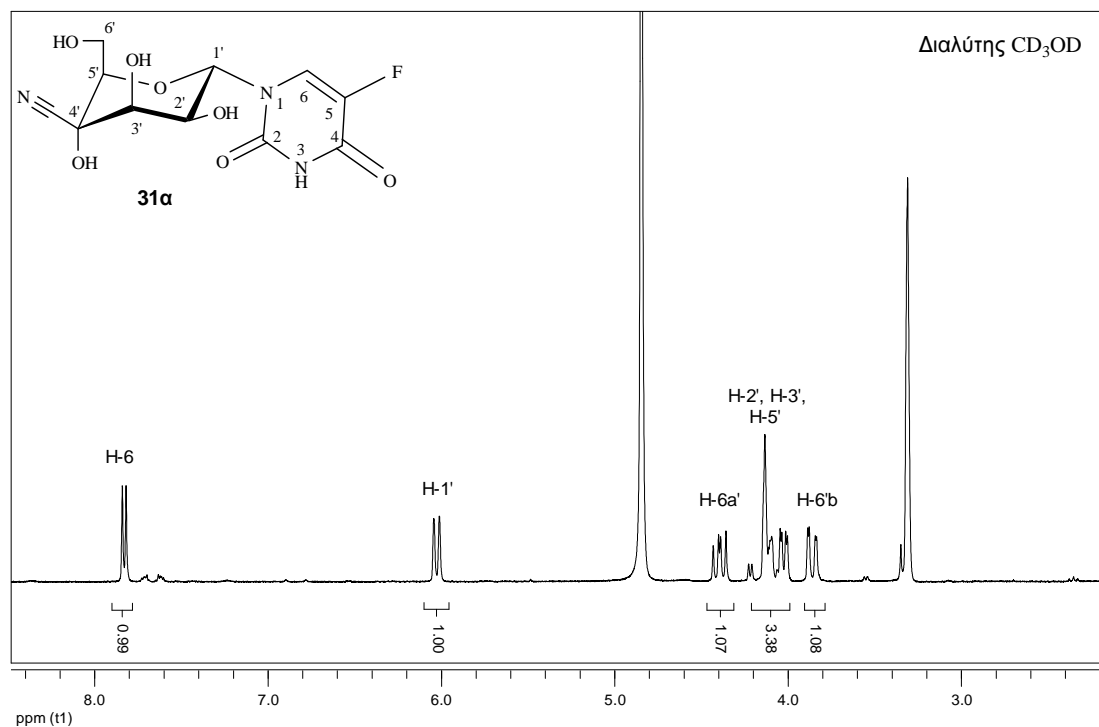
Σχήμα 71

Στο τελικό βήμα της συνθετικής πορείας πραγματοποιείται η πλήρης αποπροστασία των νουκλεοζιτών **27α,β** και **30γ**, παρουσία τριφθοροξικού οξέος 90% σε μεθανόλη, οπότε και σχηματίζονται οι επιθυμητοί νουκλεοζίτες **31α-γ**, αντίστοιχα (Σχήμα 72).



Σχήμα 72

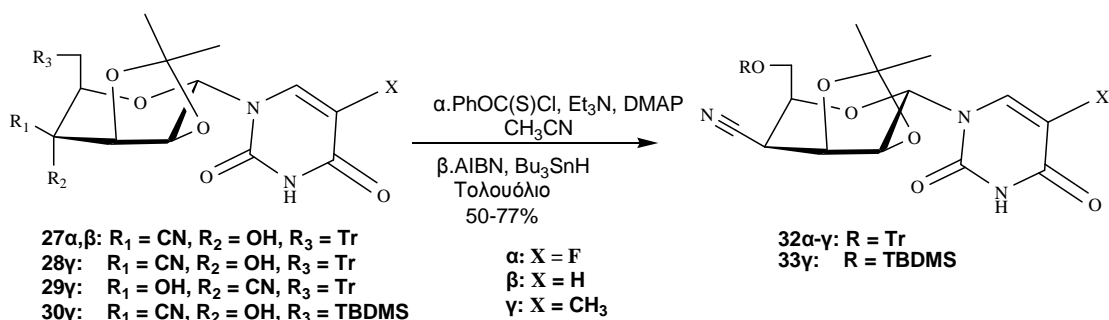
Στο παρακάτω σχήμα 73 παρατίθεται ενδεικτικά το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της 1-(4'-C-κυανο- α -D-μαννοπυρανοζυλο)5-φθοροουρακίλης (**31α**). Από την μελέτη του προκύπτει ότι η διπλή κορυφή που εμφανίζονται στα 7.83 ppm με σταθερά σύζευξης $J_{6, \text{F}5} = 6.5$ Hz αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-6 της 5-φθοροουρακίλης, ενώ χαρακτηριστική είναι η κορυφή που αναφέρεται στο πρωτόνιο H-1', η οποία εμφανίζεται στα 6.02 ως διπλή με σταθερά σύζευξης $J_{1', 2'} = 9.5$ Hz. Η διπλή διπλών κορυφή που προσδιορίζει το πρωτόνιο της H-6a' εμφανίζεται στα 4.39 ppm με σταθερές σύζευξης $J_{5', 6a'} = 9.3$ Hz και $J_{6a', 6b'} = 12.8$ Hz, ενώ ακολουθούν τα σήματα πρωτονίου των H-2', H-3' και H-5' σαν μια πολλαπλή κορυφή στην περιοχή 4.22-3.99 ppm. Τέλος, διακρίνεται το σήμα του πρωτονίου της H-6b' ως μια διπλή διπλών κορυφή με σταθερά σύζευξης $J_{5', 6b'} = 2.6$ Hz.



Σχήμα 73

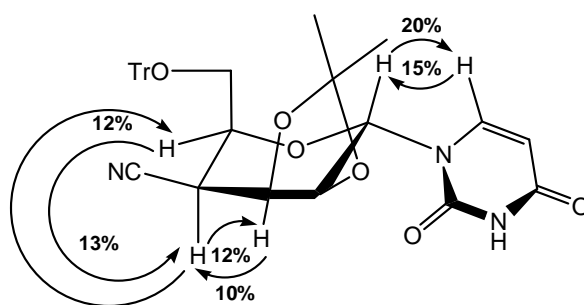
II.3.2 Σύνθεση των 4'-δεοξυ-4'-C-κυανο-α-D-ταλοπυρανοζυλο αναλόγων της 5-φθοροουρακίλης **34α**, ουρακίλης **34β** και θυμίνης **34γ**

Μετά από την επιτυχημένη σύνθεση των 4'-C-κυανο-μαννοπυρανονουκλεοζιτών, η συνθετική πορεία συνεχίστηκε με την παρασκευή των αντίστοιχων 4'-δεοξυ-4'-C-κυανο-νουκλεοζιτικών αναλόγων. Με αφετηρία τις προστατευμένες κυανυδρίνες **27α,β** και **30γ**, παρασκευάστηκαν αρχικά τα αντίστοιχα φαινοξυθειοκαρβονυλο-παράγωγα τους με επίδραση του PhOC(S)Cl, παρουσία Et₃N και DMAP σε CH₃CN και εν συνεχεία χωρίς απομόνωση ανάχθηκαν με τη βοήθεια του Bu₃SnH και του AIBN σε διαλύτη τολουόλιο, οπότε και σχηματίστηκαν τα 4'-δεοξυ- παράγωγα **32α,β** και **33γ**, αντίστοιχα (Σχήμα 74). Με την ίδια πειραματική διαδικασία, η αντίδραση αναγωγής ελευθέρων ριζών του μείγματος των 4'-επιμερών **28γ** και **29γ** προχώρησε με απόλυτη στερεοεκλεκτικότητα λαμβάνοντας το ανάλογο της θυμίνης **32γ** ως το μοναδικό προϊόν (Σχήμα 74).



Σχήμα 74

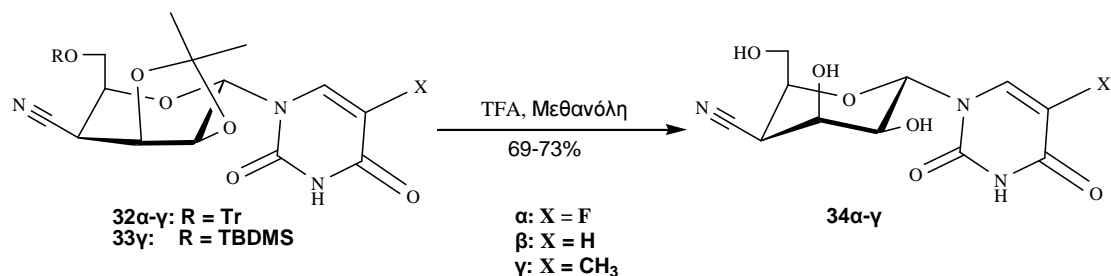
Η στεreoχημεία των 4'-δεοξυ νουκλεοζιτών καθορίστηκε επίσης με πειράματα NOE. Όπως φαίνεται στο παράδειγμα της ένωσης **32β**, ακτινοβολήση του H-4' οδήγησε στην αύξηση των εντάσεων του H-3' κατά 12% και του H-5', κατά 12% επίσης (Σχήμα 75). Ομοίως, κορεσμός των H-3' και H-5' προκαλεί αύξηση των εντάσεων του H-4' κατά 10% και 13%, αντίστοιχα. Τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν ότι τα τρία αυτά πρωτόνια βρίσκονται στην ίδια κάτω όψη του πυρανοζικού δακτυλίου, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με το μηχανισμό της αντίδρασης αναγωγής, κατά την οποία το άτομο του υδρογόνου εισέρχεται από την λιγότερο παρεμποδισμένη α-όψη της ενδιάμεσης ρίζας, αντίθετα προς την ογκώδη 2',3'-Ο-ισοπροπυλιδENO ομάδα.



32β

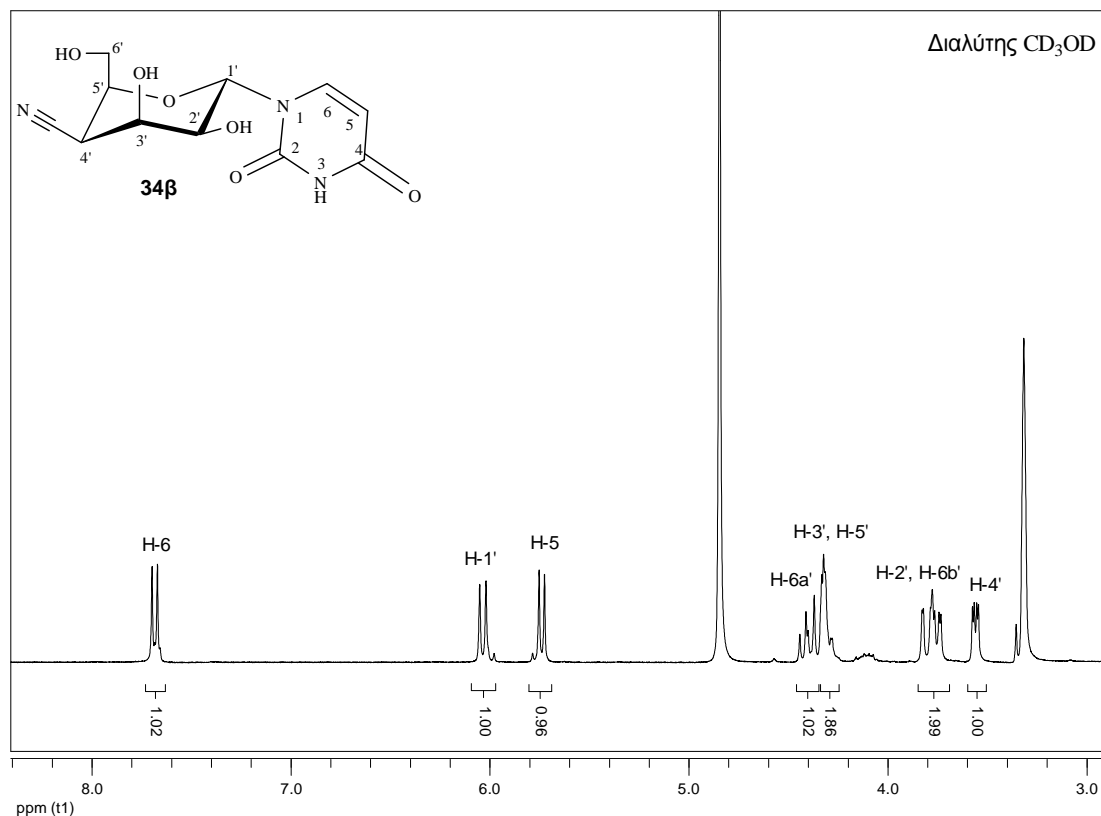
Σχήμα 75

Στο τελικό βήμα της συνθετικής πορείας, οι ενώσεις **32α,β** και **32γ** ή **33γ** μετατράπηκαν στα αποπροστατευμένα παράγωγα τους **34α-γ**, αντίστοιχα, μέσω της κατεργασία τους με τριφθοροξικό οξύ 90% σε μεθανόλη (Σχήμα 76).



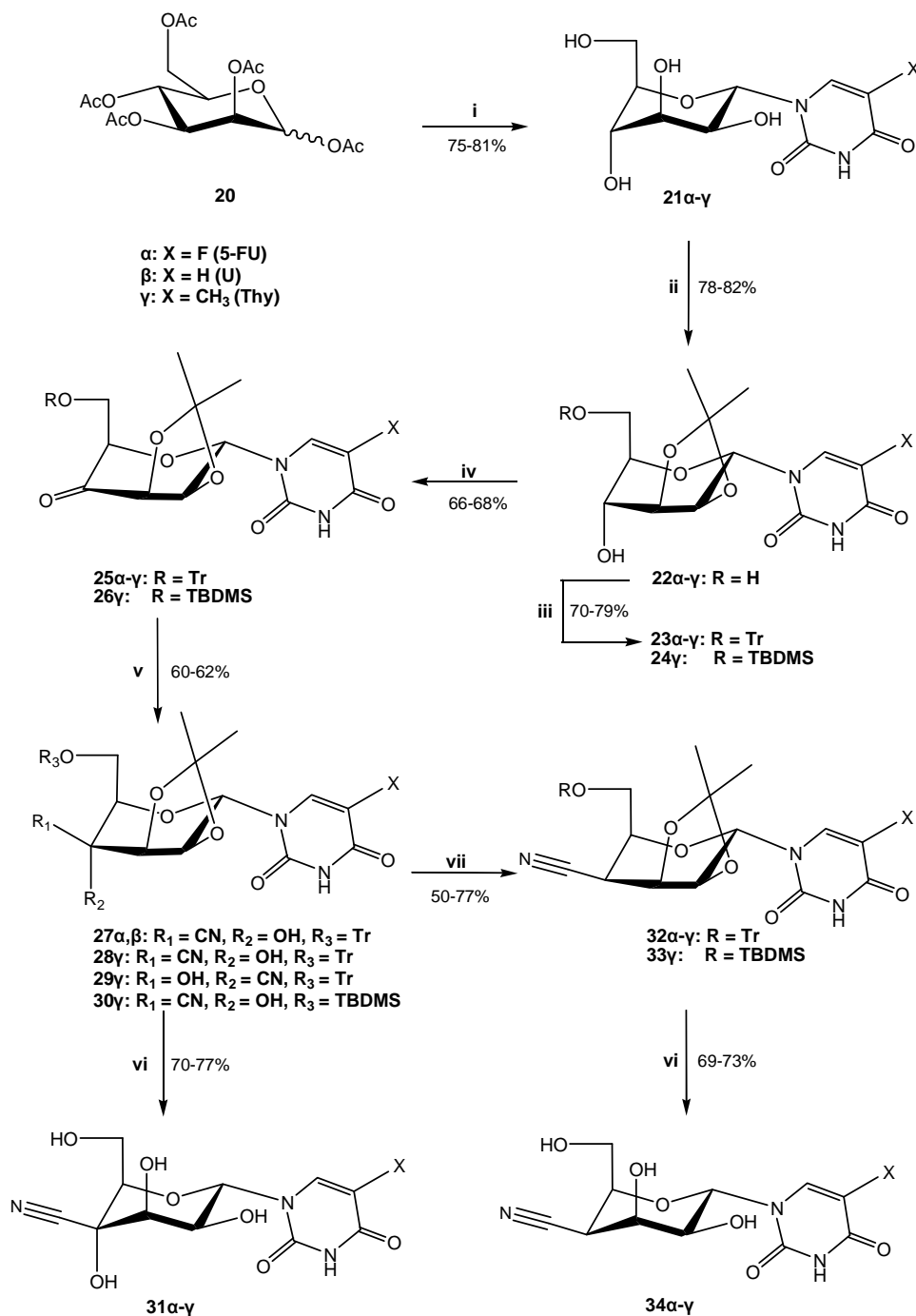
Σχήμα 76

Το φάσμα ^1H NMR του 4'-C-κυανο νουκλεοζίτη **34β**, απεικονίζεται ενδεικτικά στο σχήμα 77. Από την εξέταση του συγκεκριμένου φάσματος παρατηρείται μία χαρακτηριστική διπλή κορυφή με υψηλή τιμή σταθεράς σύζευξης $J_{1',2'} = 9.5$ Hz στα 6.03 ppm, η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-1' του σακχάρου. Επίσης, από τη μελέτη του φάσματος προκύπτουν δύο χαρακτηριστικές διπλές κορυφές στα 7.67 και 5.73 ppm, οι οποίες εμφανίζουν την ίδια σταθερά σύζευξης $J_{5,6} = 8.1$ Hz, και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-6 και H-5 της ουρακίλης, αντίστοιχα. Ακολουθεί το σήμα πρωτονίου του H-6a' ως μια διπλή διπλών κορυφή στα 4.39 ppm με σταθερές σύζευξης $J_{5',6a'} = 9.2$ και $J_{6a',6b'} = 12.4$ Hz και το σήμα πρωτονίου των H-3' και H-5' ως μια πολλαπλή κορυφή στα 4.33-4.27 ppm. Στη συνέχεια, εμφανίζονται τα σήματα των πρωτονίων H-2' και H-6b' ως μια πολλαπλή κορυφή στα 3.82-3.73 ppm, ενώ τέλος χαρακτηριστική είναι η κορυφή που προσδιορίζει το πρωτόνιο του H-4', η οποία εμφανίζεται στα 3.55 ppm ως μια διπλή διπλών με σταθερές σύζευξης $J_{3',4'} = 6.4$ και $J_{4',5'} = 2.6$ Hz.



Σχήμα 77

Ολοκληρώνοντας και τη δεύτερη συνθετική πορεία, στο παρακάτω σχήμα 78 παραθέτουμε ολόκληρη τη γενική πορεία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση των 4'-C-κυανο- α -D-μαννοπυρανονουκλεοζιτών **31α-γ** και των 4'-δεοξυ-4'-C-κυανο- α -D-ταλοπυρανονουκλεοζιτών **34α-γ**.



(i) Σιλυλιωμένη Βάση, TMS-Tf, CH₃CN; Μεθανολική Αμμωνία; (ii) [(CH₃)₂C(OCH₃)₂, *p*-TsOH, Ακετόνη, H₂O; (iii) TrCl ή TBDMS, DMAP, Πυριδίνη; (iv) PDC, Ac₂O, CH₂Cl₂; (v)(α) (R = Tr) H₂O, Et₂O, NaHCO₃, NaCN, (β) (R = TBDMS) H₂O, Et₂O, NaCN; (vi) TFA 90% σε Μεθανόλη; (vii) PhOC(S)Cl, Et₃N, DMAP, CH₃CN; AIBN, Bu₃SnH, Τολουόλιο.

Σχήμα 78

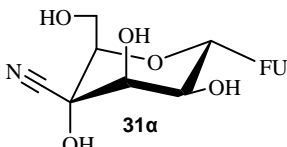
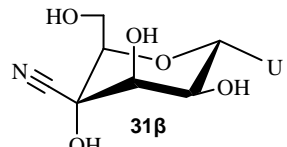
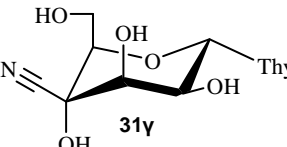
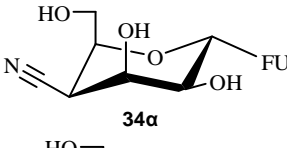
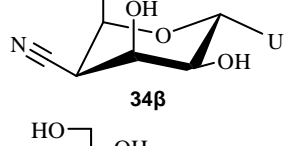
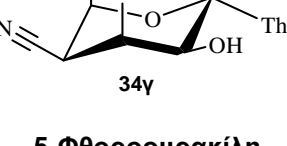
II.3.3 Αντιική και αντικαρκινική δράση των 4'-C-κυανο και 4'-δεοξυ-4'-C-κυανο-πυρανονουκλεοζιτών

Οι νεοσυντιθέμενοι 4'-C-κυανο μαννοπυρανονουκλεοζίτες **31α-γ** και 4'-δεοξυ-4'-C-κυανο ταλοπυρανονουκλεοζίτες **34α-γ** εξετάστηκαν για τη πιθανή αντιική και αντικαρκινική τους δράση σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Ιολογίας και Χημειοθεραπείας του Ινστιτούτου Ιατρικής Έρευνας Rega στο Βέλγιο.

Αρχικά, οι ενώσεις αξιολογήθηκαν για την κυτταροστατική τους δράση έναντι του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων λευχαιμίας (L1210), των ανθρώπινων T-λεμφοκυττάρων (CEM), καθώς επίσης και των ανθρώπινων τραχηλικών καρκινικών κυττάρων (HeLa). Τα 4'-κυανο-(4'-δεοξυ) ανάλογα της ουρακίλης (**31β**, **34β**) και της θυμίνης (**31γ**, **34γ**) δεν εμπόδισαν παρά ελάχιστα τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, έχοντας κατά κανόνα IC50s μεγαλύτερα ή γύρω στα 200 μM (Πίνακας 5). Σε αντίθεση, τα 4'-κυανο-(4'-δεοξυ) ανάλογα της 5-φθοροουρακίλης (**31α**, **34α**) παρουσίασαν αξιοσημείωτη κυτταροστατική δράση εμποδίζοντας τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων L1210 και HeLa σε τιμές IC50s που κυμαινόταν από 2.6 έως 4.1 μM, ενώ η ανασταλτική τους δράση στα κύτταρα CEM ήταν ελαφρώς μικρότερη. Όπως παρατηρείται και στον παρακάτω πίνακα, το κυτταροστατικό προφίλ των ενώσεων **31α** και **34α** είναι παρόμοιο με αυτό της 5-φθοροουρακίλης. Επιπλέον, οι συγκεκριμένες ενώσεις διατήρησαν την κυτταροστατικότητα τους, όταν αξιολογήθηκαν έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών L1210 και HeLa, οι οποίες χαρακτηρίζονταν από ανεπάρκεια του ενζύμου της κινάσης της θυμιδίνης. Τα συγκεκριμένα ευρήματα υποδηλώνουν ότι η κυτταροστατική δράση των νέων κυανο νουκλεοζιτών δεν απαιτεί τη φωσφορυλίωση τους από την κινάση της θυμιδίνης (όπως η 5-φθορο-2'-δεοξουριδίνη) και γι' αυτό πιθανότατα να λειτουργούν ως προφάρμακα της 5-φθοροουρακίλης, τα οποία θα πρέπει να μετατραπούν πρώτα στην ελεύθερη βάση πριν την περαιτέρω μεταβολική τους ενεργοποίηση. Εν προκειμένω, τα 4'-C-κυανο- και 4'-δεοξυ-4'-C-κυανο- νουκλεοζιτικά ανάλογα συμπεριφέρονται με παρόμοιο τρόπο με τα προηγούμενα συντεθειμένα 3'-C-κυανο- και 3'-δεοξυ-3'-C-κυανο- παράγωγα της 5-φθοροουρακίλης. Τέλος, οι

νέοι πυρανονουκλεοζίτες **31α-γ** και **34α-γ** δεν παρουσίασαν ανιικη δράση έναντι μίας σειράς DNA και RNA ιών.

Πίνακας 5. Ανασταλτική δράση των ενώσεων **31α-γ** και **34α-γ** έναντι του πολλαπλασιασμού των κυττάρων L1210, CEM και HeLa.

<u>Προϊόν</u>	L1210	CEM	HeLa	L1210/TK⁻	HeLa/TK⁻
 31α	3.0 ± 0.9	57 ± 7	3.2 ± 0.0	2.6 ± 0.7	0.81 ± 0.10
 31β	> 500	> 500	494 ± 8	>500	>500
 31γ	> 500	> 500	433 ± 94	>500	≥500
 34α	4.1 ± 0.6	18 ± 6	2.6 ± 0.9	4.6 ± 1.5	0.49 ± 0.02
 34β	210 ± 16	221 ± 8	195 ± 21	227 ± 6	205 ± 8
 34γ	262 ± 12	332 ± 64	188 ± 4	266 ± 17	214 ± 18
5-Φθοροουρακίλη	0.38 ± 0.17	18 ± 5	0.54 ± 0.12	0.32 ± 0.31	0.23 ± 0.01
5-Φθορο-dUrd	0.0011 ± 0.0002	0.022 ± 0.006	0.050 ± 0.011	3.0 ± 0.1	1.4 ± 0.4

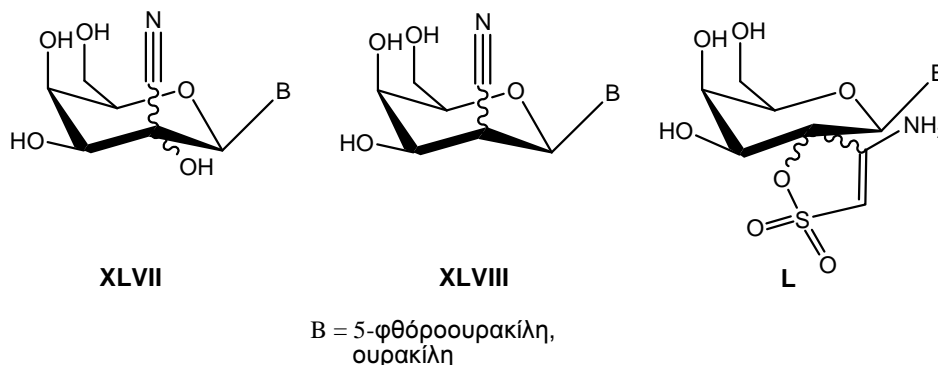
II.4 Σύνθεση των 2'-C-κυανο, 2'-δεοξυ-2'-C-κυανο και 2'-σπειρανικών-πυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων

Σημαντικά ερευνητικά αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν προηγουμένως απέδειξαν ότι η εισαγωγή μιας κυανο- ομάδας στις 3' και 4' θέσεις ενός πυρανοζικού δακτυλίου οδήγησε στη σύνθεση ορισμένων νέων ασυνήθιστων πυρανονουκλεοζιτών, οι οποίοι επέδειξαν αξιοσημείωτη αντι-πολλαπλασιαστική δράση έναντι διάφορων καρκινικών κυτταρικών σειρών. Ειδικότερα, από τις μελέτες επί των νέων κυανο-πυρανονουκλεοζιτών, προκύπτει ότι τα 3'-C- και 4'-C-κυανο-πυρανονουκλεοζιτικά ανάλογα της 5-φθοροουρακίλης (5-FU) πιθανότατα δρουν ως προφάρμακα της ελεύθερης 5-FU, παρουσιάζοντας παρόμοιο κυτταροστατικό προφίλ με αυτή.

Από την άλλη πλευρά, όπως έχει ήδη αναφερθεί μια αξιοπρόσεκτη κατηγορία βιολογικά ενεργών νουκλεοζιτών είναι οι σπειρανικοί νουκλεοζίτες, οι οποίοι διαθέτουν έναν επιπλέον δακτύλιο στο τμήμα του σακχάρου. Από τα διάφορα ανάλογά τους ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλούν οι λεγόμενοι TSAO νουκλεοζίτες, οι οποίοι παρουσιάζουν ισχυρή δράση έναντι του ιού HIV-1 και έχουν ως πρόδρομες ενώσεις τις κατάλληλες κυανυδρίνες (Camarasa *et al.* 2005).

Με βάση τις προηγούμενες ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις και σε μια προσπάθεια να εξαχθούν χρήσιμα συμπεράσματα για τις σχέσεις χημικής δομής-βιοδραστικότητας των κυανο-πυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων θεωρήθηκε σκόπιμη η επέκταση των ερευνών προς τη σύνθεση νέων 2'-C-κυανο- και 2'-δεοξυ-2'-C-κυανο- πυρανονουκλεοζιτών, οι οποίοι θα φέρουν ως ετεροκυκλικές βάσεις τη 5-φθοροουρακίλη και την ουρακίλη. Λαμβάνοντας επιπλέον υπόψιν το μεγάλο βιολογικό ενδιαφέρον που παρουσιάζουν οι σπειρανικοί νουκλεοζίτες, αποφασίστηκε η αξιοποίηση των 2'-C-κυανο-πυρανονουκλεοζιτών ως χρήσιμα ενδιάμεσα για την παρασκευή νέων 2'-σπειρανικών αναλόγων που θα φέρουν τον 4-αμινο-1,2-οξαθειολο-2,2-διοξειδο- δακτύλιο στη 2'- θέση του σακχάρου.

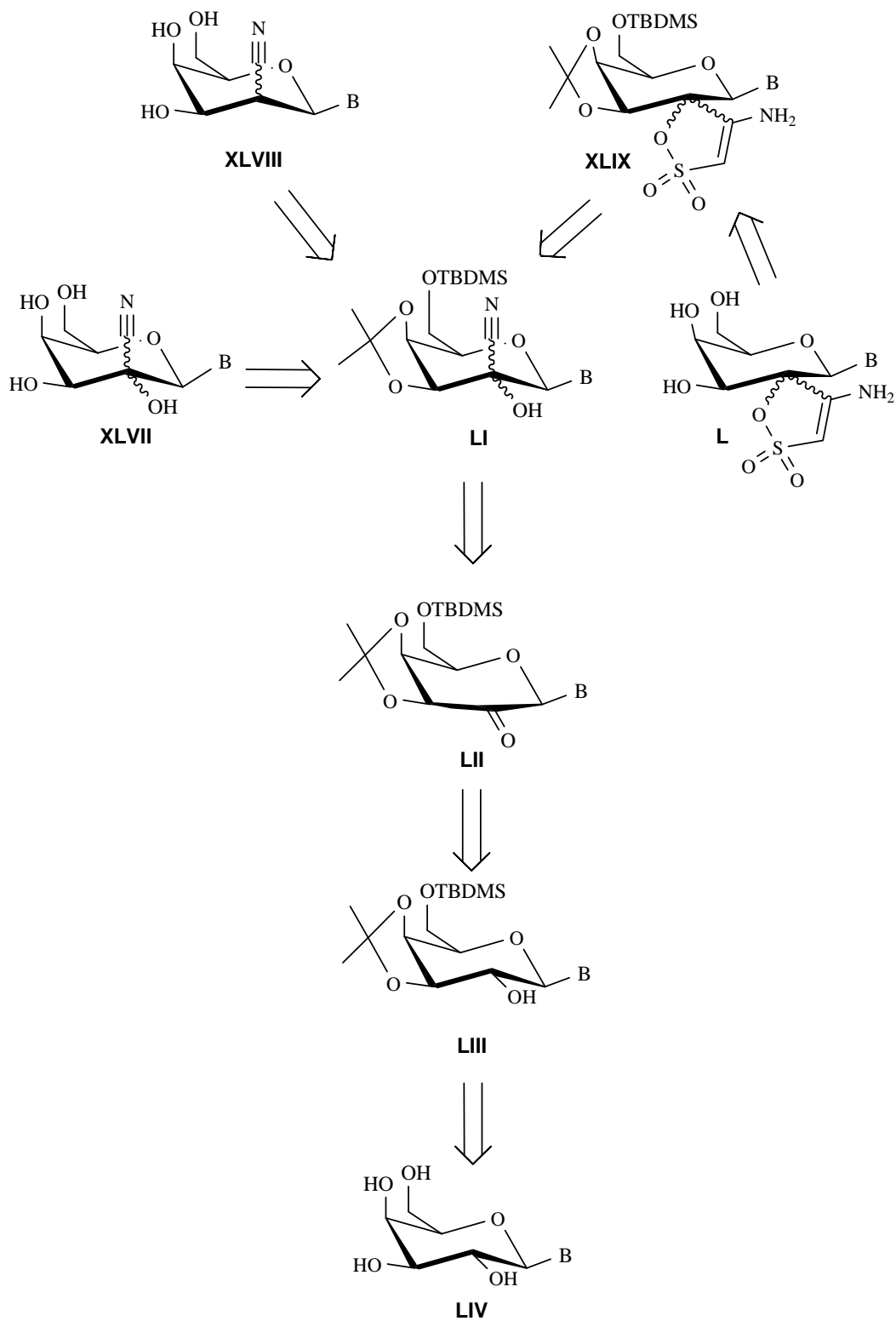
Η δομή των μορίων **XLVII**, **XLVIII** και **L** που στόχευσε η συνθετική μας πορεία απεικονίζεται στο σχήμα 79. Το στερεοχημικό αποτέλεσμα των αντιδράσεων σχηματισμού των 2'-C-κυανο-πυρανονουκλεοζιτών δεν μπορεί να προβλεφθεί με ακρίβεια και όπως αποδείχτηκε στη σύνθεση των προηγούμενων κυανο-πυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων ο πειραματισμός είναι πάντοτε η πλέον ενδεδειγμένη απάντηση.



Σχήμα 79

Εφαρμόζοντας μια ανάλογη ρετροσυνθετική προσέγγιση με αυτή των 4'-C-κυανο-πυρανονουκλεοζιτών, τόσο οι 2'-C-κυανο(2'-δεοξυ)νουκλεοζίτες **XLVII**, **XLVIII** όσο και τα 2'-σπειρανικά ανάλογα τους **XLIX**, **L** θα μπορούσαν να προκύψουν από την ίδια προστατευμένη κυανυδρίνη **LI**, ενώ το ανάλογο **LI** μπορεί να προέλθει από τον κετοπυρανονουκλεοζίτη **LII** μετά από μια πυρηνόφιλη προσθήκη (Σχήμα 80). Ο μερικώς προστατευμένος πυρανονουκλεοζίτης **LIII** παρέχει τη δυνατότητα σχηματισμού του κετοπυρανονουκλεοζίτη **LII**, ενώ σύμφωνα με τη προτεινόμενη μεθοδολογία, το κατάλληλο υπόστρωμα που θα μας οδηγήσει στον πυρανονουκλεοζίτη **LIII** (μετά από αντιδράσεις προστασίας), είναι ο γαλακτοπυρανονουκλεοζίτης **LIV**. Συμπερασματικά, με τη συγκεκριμένη ρετροσυνθετική προσέγγιση χρησιμοποιώντας δύο αρχικά υποστρώματα τύπου **LIV** με τις αντίστοιχες νουκλεοβάσεις της 5-φθοροουρακίλης και της ουρακίλης δίνεται η δυνατότητα να παρασκευαστούν όλα τα τελικά μόρια στόχοι. Αξίζει να τονιστεί ότι η επιλογή της TBDMS-ομάδας για την προστασία του πρωτοταγούς υδροξυλίου, έγινε με βάση το σχεδιασμό να αποτιμηθούν βιολογικά και οι προστατευμένοι 6'-TBDMS σπειρανικοί νουκλεοζίτες **XLIX**, καθώς η συγκεκριμένη προστατευτική ομάδα θεωρείται βασικό δομικό χαρακτηριστικό

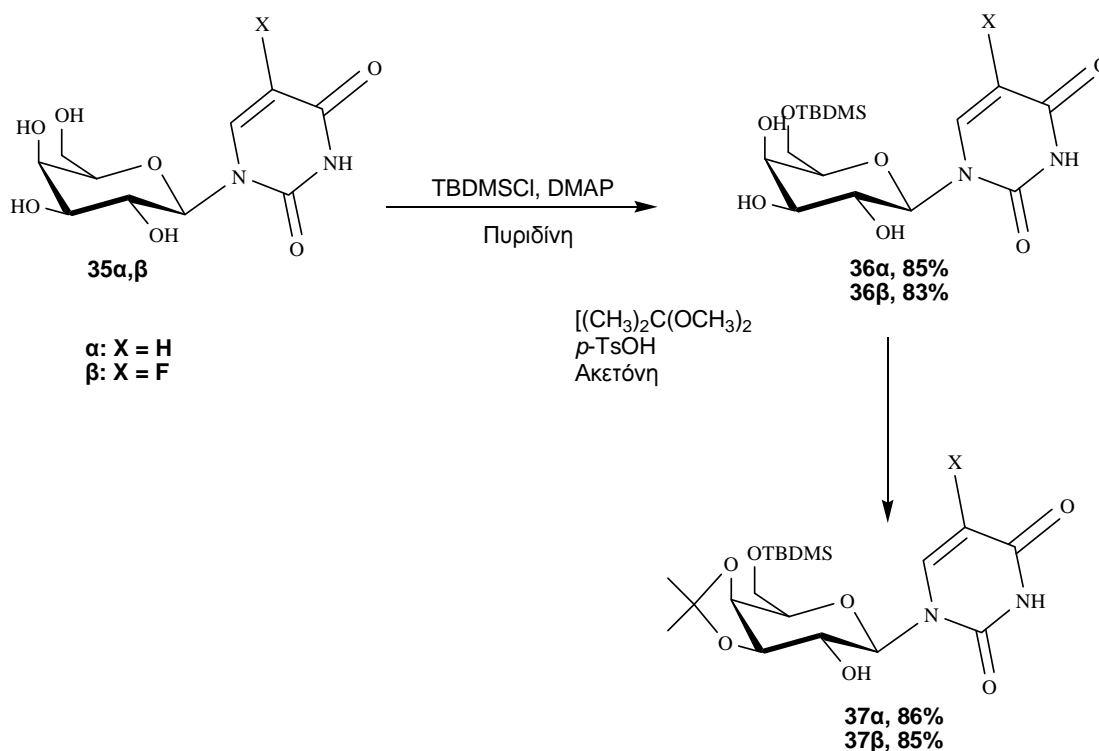
για την εμφάνιση βιολογικής δράσης σε μόρια αυτού του τύπου (Camarasa *et al.* 2005).



Σχήμα 80

II.4.1 Σύνθεση των 2'-C-κυανο-β-D-ταλοπυρανοζυλο αναλόγων της ουρακίλης 41α, της 5-φθοροουρακίλης 41β και 2'-C-κυανο-β-D-γαλακτοπυρανοζυλο αναλόγων της ουρακίλης 42α, και της 5-φθοροουρακίλης 42β

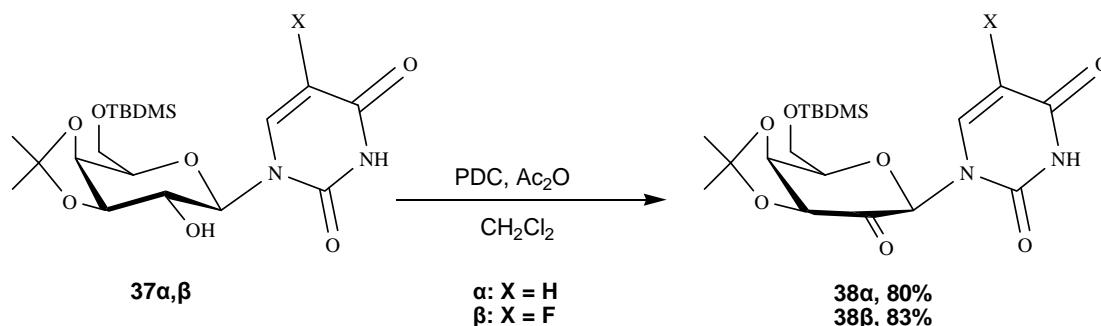
Η συνθετική πορεία περιλαμβάνει αρχικά την εκλεκτική προστασία του πρωτοταγούς υδροξυλίου των γνωστών γαλακτοπυρανονουκλεοζιτών **35α,β** (Kondo και Goto, 1971, Haeckel *et al.* 1996) κατόπιν κατεργασίας τους με TBDMSCl παρουσία πυριδίνης και DMAP. Εν συνεχεία ακολουθεί προστασία των δύο *cis* 3',4'- υδροξυλίων των ενώσεων **36α,β** με την επίδραση 2,2-διμεθοξυ-προπανίου, καταλυτικής ποσότητας *p*-τολουολοσουλφονικού οξέος σε διαλύτη ακετόνη, οπότε και σχηματίζονται οι νουκλεοζίτες **37α,β** (Σχήμα 81), αντίστοιχα.



Σχήμα 81

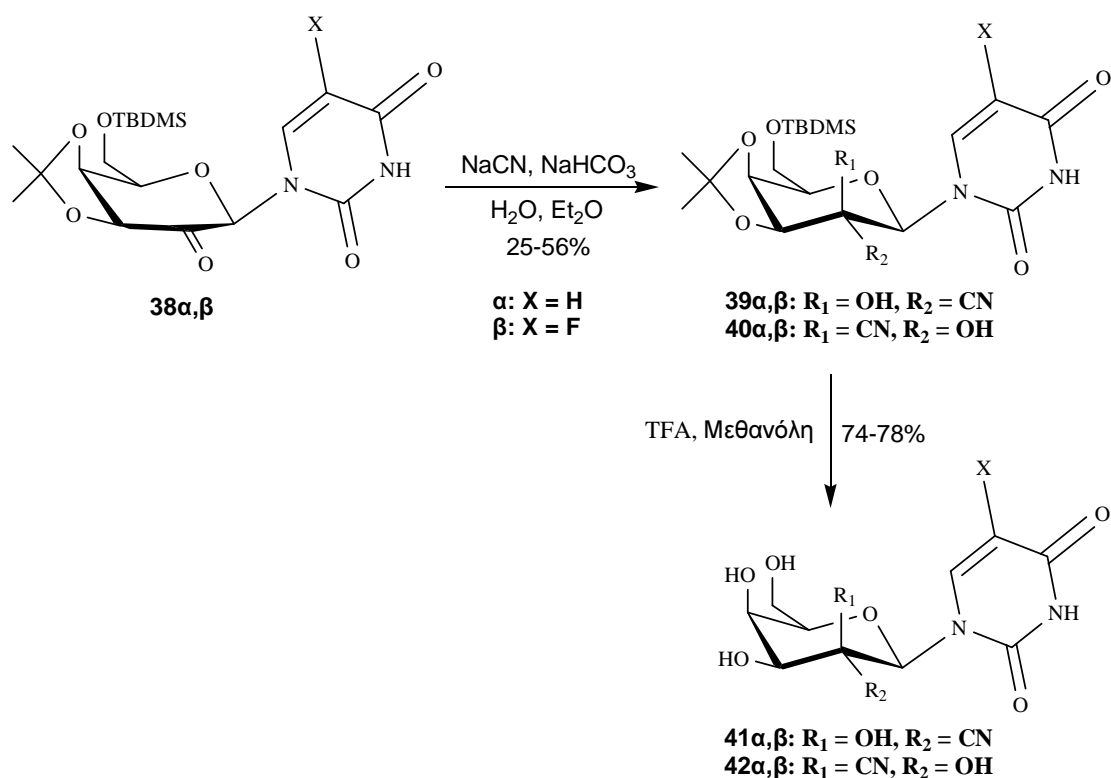
Ακολουθεί οξείδωση του ελεύθερου υδροξυλίου των μερικώς προστατευμένων νουκλεοζιτικών αναλόγων **37α,β**, η οποία οδηγεί στη λήψη των 2'-κετοπυρανονουκλεοζιτών **38α,β** με πολύ καλές αποδόσεις (80 και 83%, αντίστοιχα) (Σχήμα 82). Στα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ των ενώσεων **38α,β**,

χαρακτηριστικό είναι το σήμα πρωτονίου H-1' στα 6.21 και 6.15 ppm, αντίστοιχα, ως μια απλή κορυφή, επιβεβαιώνοντας την απουσία πρωτονίου στη 2'-θέση του υδατανθρακικού δακτυλίου.



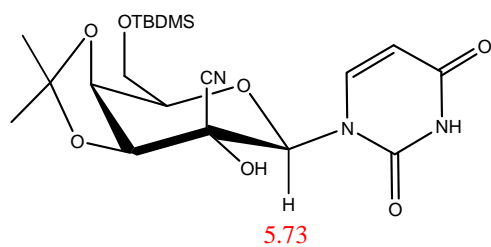
Σχήμα 82

Σε αντίθεση με τις προηγούμενες συνθέσεις των 3'-C- και 4'-C-κυανο-πυρανονουκλεοζιτών που είχαν υψηλή στερεοεκλεκτικότητα και έδωσαν μόνο το ένα ισομερές, η αντίδραση των 2'-κετοπυρανονουκλεοζιτών **38α,β** με το NaCN είχε μικρότερη στερεοεκλεκτικότητα, οδηγώντας σε ένα χρωματογραφικά διαχωρίσιμο μείγμα των 2'-κυανυδρινών **39α,β** και **40α,β**, αντίστοιχα, σε αναλογία περίπου 1:2 (**39α**:28%, **39β**:25%, **40α**:52%, **40β**:56%). Η σύνθεση ολοκληρώνεται με την αποπροστασία των αναλόγων **39α,β** και **40α,β**, παρουσία τριφθοροξικού οξέος, οπότε και παραλαμβάνονται οι επιθυμητοί 2'-C-κυανο-νουκλεοζίτες **41α,β** και **42α,β**, αντίστοιχα, σε καλές αποδόσεις (74-79 %) (Σχήμα 83).

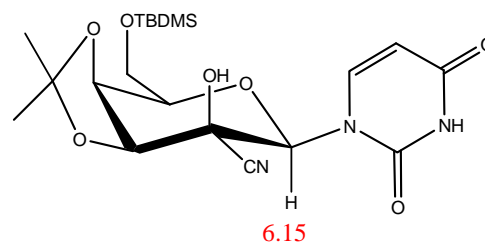


Σχήμα 83

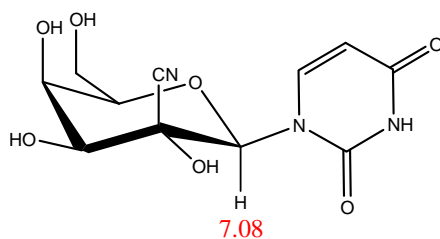
Η διάκριση μεταξύ των ισομερών κυανυδρινών γίνεται με βάση την επίδραση της κυανο-ομάδας στις χημικές μετατοπίσεις του H-1', καθώς σε όλα τα ζεύγη των ισομερών παρατηρείται μια διαφορά $\Delta\delta = 0.31-0.58$. Η κυανο-ομάδα προκαλεί παραμαγνητικές μετατοπίσεις στους γειτονικούς πυρήνες, ενώ η επίδραση αυτή μειώνεται με την απόσταση και είναι μεγάλη εφόσον τα πρωτόνια είναι ορθογώνια ως προς τον δεσμό CN. (Abraham και Reid, 2000, Martin και Nance, 2002, Rouillard *et al.* 1980). Ως εκ τούτου, στα ισομερή με τις μεγαλύτερες χημικές μετατοπίσεις αποδίδονται οι δομές **39α,β** και **41α,β** στις οποίες το H-1' βρίσκεται πλησιέστερα στην κυανο ομάδα και περίπου σε ορθογώνια θέση και στα ισομερή με τις μικρότερες χημικές μετατοπίσεις οι δομές **40α,β** και **42α,β** στις οποίες η κυανο-ομάδα είναι πιο απομακρυσμένη από το H-1' (Σχήμα 84). Οι προτεινόμενες δομές στην περίπτωση των ισομερών **39β** και **40β** επιβεβαιώνονται και με μετρήσεις NOE. Στο ισομερές **40β** παρατηρείται αμοιβαία θετικό NOE μεταξύ του OH και του H-1', ενώ δεν παρατηρείται στο ισομερές **39β**.



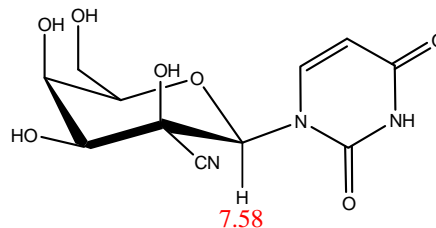
40α



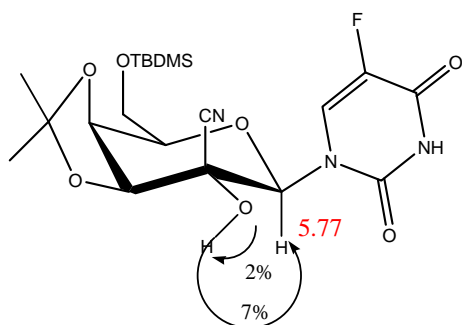
39α



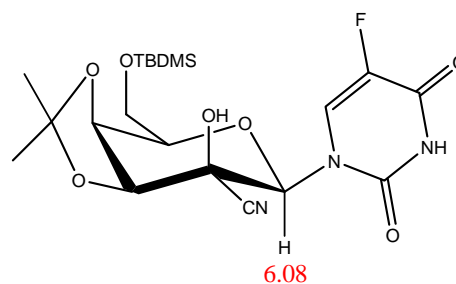
42α



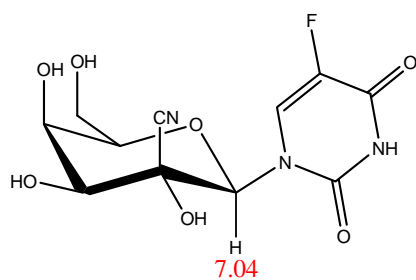
41α



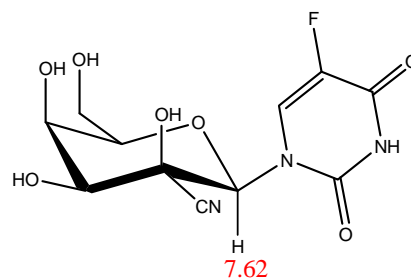
40β



39β



42β

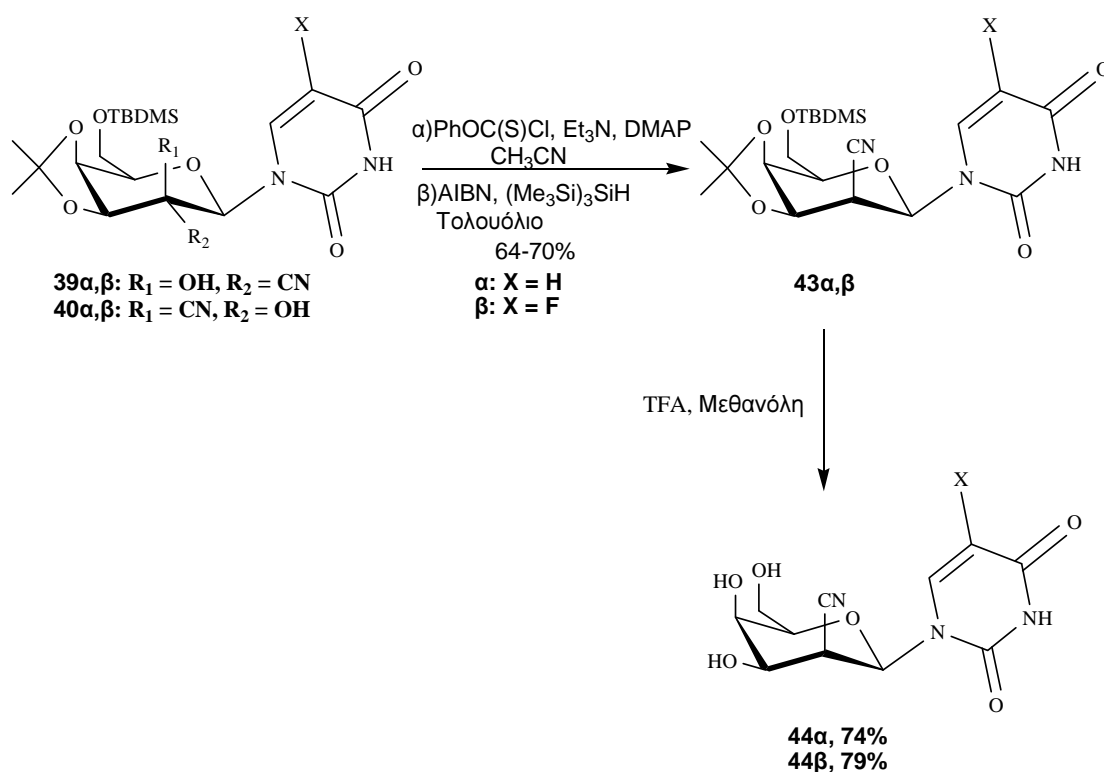


41β

Σχήμα 84

II.4.2 Σύνθεση των 2'-δεοξυ-2'-C-κυανο-β-D-ταλοπυρανοζυλο αναλόγων της ουρακίλης 44α και 5-φθοροουρακίλης 44β

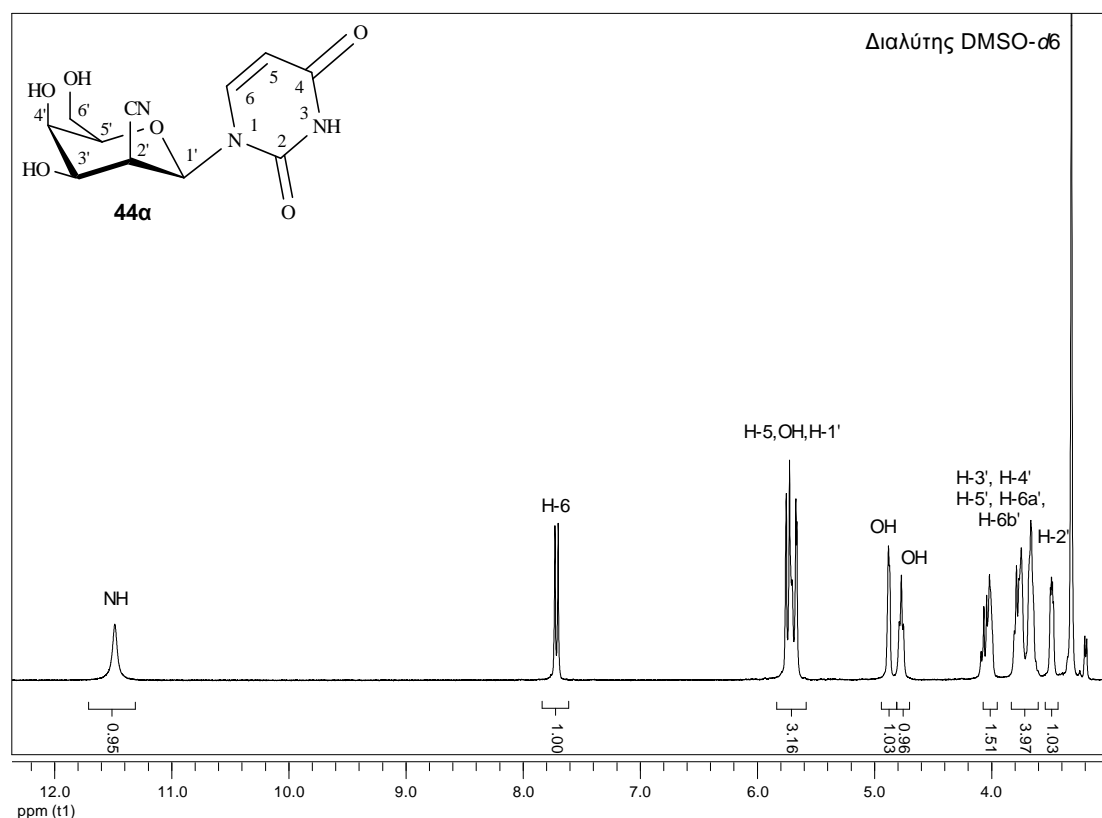
Μετά την επιτυχημένη σύνθεση των 2'-C-κυανο- ενώσεων **41α,β** και **42α,β**, και με στόχο να μελετηθούν εκτενέστερα οι σχέσεις δομής-δράσης στις ενώσεις αυτού του τύπου παρασκευάστηκαν τα αντίστοιχα 2'-δεοξυ παράγωγα **44α,β** (Σχήμα 85). Η σύνθεση επιτεύχθηκε εφαρμόζοντας το γνωστό μοτίβο της φαινοξυθειοκαρβονυλίωσης των κυανουδρινών **39α,β** και **40α,β**, ακολουθούμενης από αναγωγή με την επίδραση τρις(τριμεθυλοσιλυλο)σίλανο υδριδίου [(Me₃Si)₃SiH] (Chatgililoglu και Lalevée, 2012), οπότε και σχηματίζονται οι 2'-δεοξυ-2'-C-κυανο-πυρανονουκλεοζίτες **43α,β**, αντίστοιχα. Σε κάθε περίπτωση παρατηρήθηκε ο σχηματισμός ενός κοινού προϊόντος, γεγονός που καταδεικνύει ότι η αντίδραση αναγωγής είναι απόλυτα εκλεκτική όσον αφορά τη στερεοχημεία της. Στο τελικό βήμα, κατεργασία των προστατευμένων προϊόντων **43α,β**, με τριφθοροξικό οξύ οδήγησε στη λήψη των επιθυμητών νουκλεοζιτών **44α,β**, αντίστοιχα.



Σχήμα 85

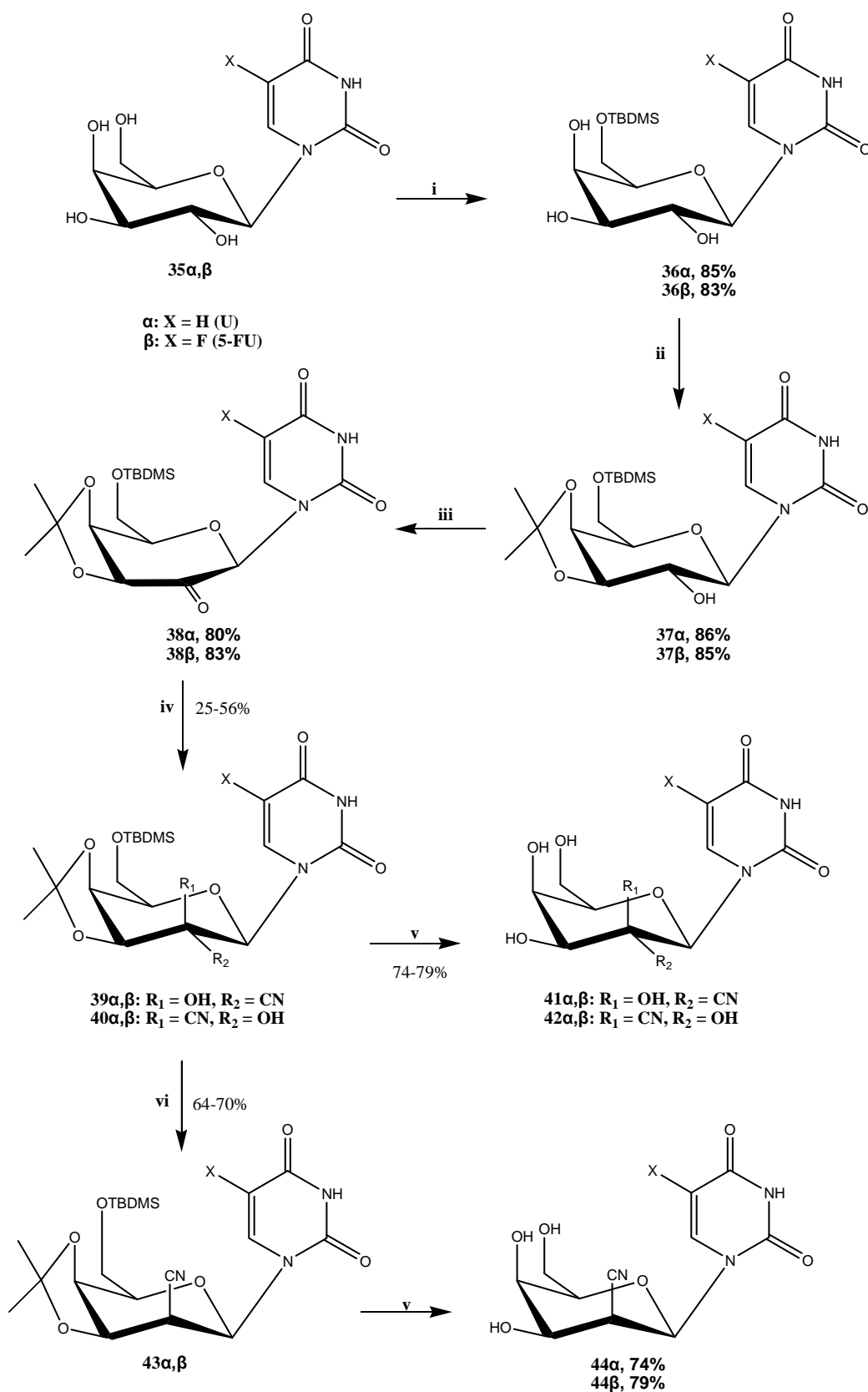
Η απόδοση της στεreoχημείας στη 2'-θέση του σακχάρου των ενώσεων **43α,β**, και **44α,β**, έγινε με βάση τα φασματοσκοπικά δεδομένα ^1H NMR των νουκλεοζιτών **44α,β**, ($J_{1',2'} = 2.7$ Hz και $J_{1',2'} = 1.7$ Hz, αντιστοίχως), τα οποία είναι χαρακτηριστικά μιας αξονικής-ισημερινής θέσης των γειτονικών πρωτονίων H-1' και H-2' και ως εκ τούτου μιας αξονικά προσανατολισμένης κυανο-ομάδας. Η συγκεκριμένη στεreoχημεία υποδηλώνει ότι κατά την αντίδραση αναγωγής η προσβολή του υδρογόνου γίνεται από τη λιγότερο παρεμποδισμένη πλευρά της ενδιάμεσης ρίζας, ένα στεreoχημικό αποτέλεσμα το οποίο εμφανίστηκε επίσης στις προηγούμενες στερεοεκλεκτικές συνθέσεις των 3'-δεοξυ-3'-C- και 4'-δεοξυ-4'-C- κυανοπυρανονουκλεοζιτών.

Στο σχήμα 86 εμφανίζεται το χαρακτηριστικό φάσμα ^1H -NMR της 1-(2'-δεοξυ-2'-C-κυανο-β-D-ταλοπυρανοζυλο)ουρακίλης (**44α**) από τη μελέτη του οποίου διαπιστώνεται ότι η απλή ευρεία κορυφή στα 11.48 ppm αντιστοιχεί στην αμινομάδα της ετεροκυκλικής βάσης, ενώ η διπλή κορυφή που εμφανίζεται στα 7.70 ppm με σταθερά σύζευξης $J_{5,6} = 8.2$ Hz, αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-6 της ουρακίλης. Ακολουθούν τα σήματα πρωτονίων του H-5 της νουκλεοβάσης και ενός υδροξυλίου του σακχάρου σαν μια πολλαπλή κορυφή στα 5.74-5.69 ppm, ενώ χαρακτηριστική είναι η διπλή κορυφή που αναφέρεται στο πρωτόνιο H-1', η οποία εμφανίζεται στα 5.66 ppm. Στη συνέχεια εμφανίζονται τα σήματα των πρωτονίων των δυο υδροξυλίων του σακχάρου σαν μια διπλή στα 4.86 ppm και σαν μια τριπλή κορυφή στα 4.76 ppm, με σταθερές σύζευξης $J = 2.8$ και $J = 5.3$ Hz, αντίστοιχα. Τέλος, πολλαπλές κορυφές παρουσιάζονται στα 4.01-3.65 ppm, οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-3', H-4', H-5' και H-6' ενώ χαρακτηριστική είναι η διπλή διπλών κορυφή που αναφέρεται στο πρωτόνιο H-2', η οποία εμφανίζεται στα 3.47 ppm με σταθερά σύζευξης $J_{2',3'} = 5.3$ Hz.



Σχήμα 86

Ολοκληρώνοντας και τη δεύτερη συνθετική πορεία, στο σχήμα 87 παρατίθεται ολόκληρη η γενική πορεία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση των 2'-C-κυανο-β-D-ταλοπυρανονουκλεοζιτών **41α,β**, των 2'-C-κυανο-β-D-γαλακτοπυρανονουκλεοζιτών **42α,β** αλλά και των 2'-δεοξυ-2'-C-κυανο-β-D-ταλοπυρανονουκλεοζιτών **44α,β**.

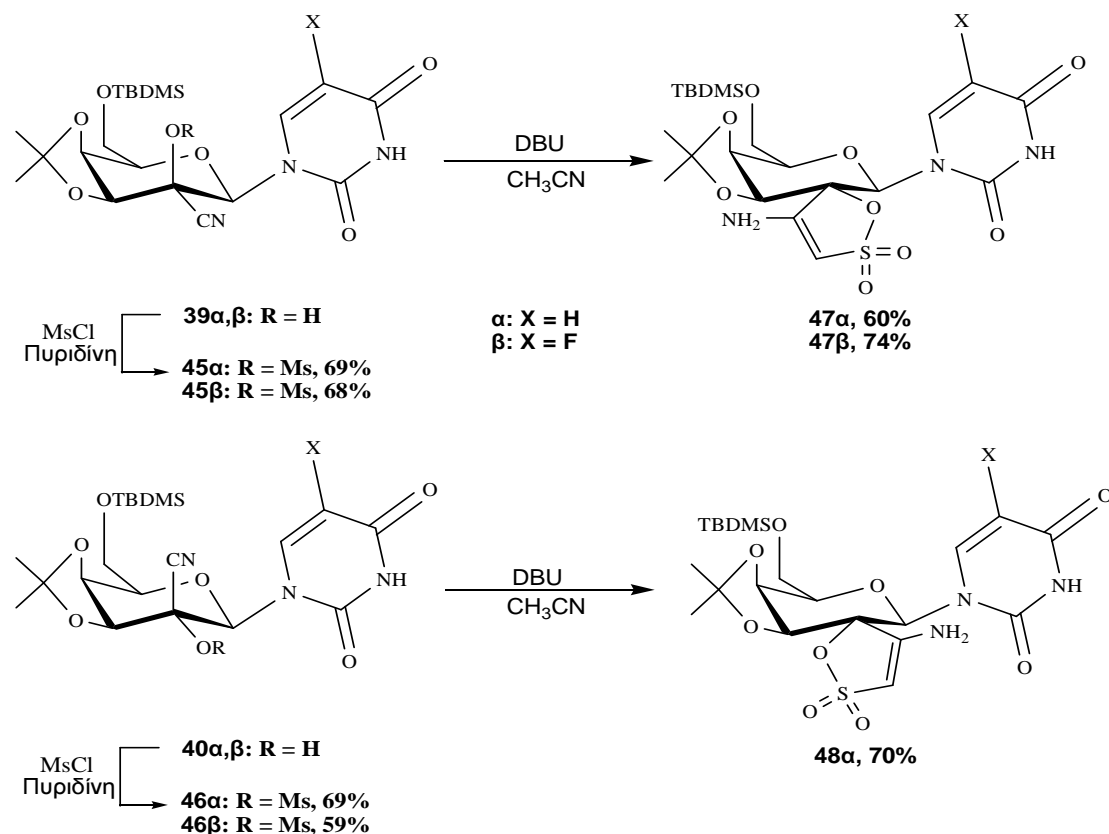


(i) TBDMSCl, DMAP, Πυριδίνη, ; (ii) [(CH₃)₂C(OCH₃)₂, *p*-TsOH, Ακετόνη;
 (iii) PDC, Ac₂O, CH₂Cl₂; (iv) NaCN, NaHCO₃, H₂O, Et₂O; (v) TFA, Μεθανόλη
 (vi) PhOC(S)Cl, Et₃N, DMAP, CH₃CN; AIBN, (Me₃Si)₃SiH, Τολουόλιο

Σχήμα 87

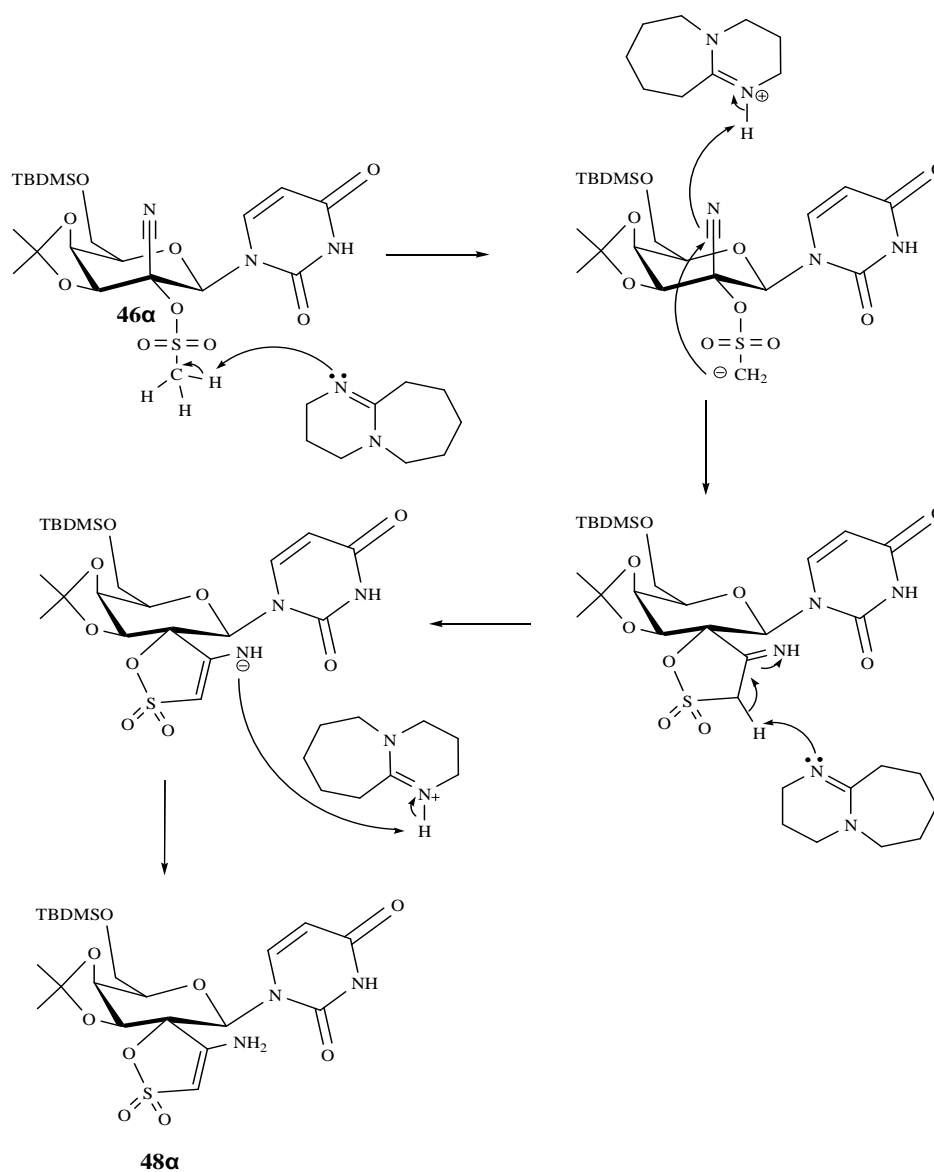
II.4.3 Σύνθεση των 2'-σπειρανικών β-D-ταλοπυρανοζυλο αναλόγων της ουρακίλης 49α και 5-φθοροουρακίλης 49β και του 2'-σπειρανικού β-D-γαλακτοπυρανοζυλο αναλόγου της ουρακίλης 50α

Έχοντας εξασφαλίσει την πρόσβαση στους 2'-C-κυανοπυρανονουκλεοζίτες, η διαδικασία επεκτάθηκε για την παρασκευή των επόμενων συνθετικών στόχων που θα έφεραν τον δακτύλιο του 4-αμινο-1,2-οξαθειολο-2,2-διοξειδίου στη 2'-θέση του σακχάρου. Αντίδραση των κυανοδρινών **39α,β** και **40α,β** με μεσυλο-χλωρίδιο παρουσία πυριδίνης έδωσε τα αντίστοιχα κυανομεσυλο-παράγωγα **45α,β** και **46α,β**. Στη συνέχεια, κατεργασία των αναλόγων **45α,β** και **46α** με 1,8-διαζαδικυκλο[5.4.0]ενδεκ-7-ένιο (DBU) σε διαλύτη ακετονιτρίλιο οδήγησε στο σχηματισμό των 2'-σπειρανικών αναλόγων **47α,β** και **48α**, με αποδόσεις που κυμαίνονταν από 60 έως 74% (Σχήμα 88). Δυστυχώς σε αντίθεση με τα προηγούμενα ανάλογα, αντίδραση του μεσυλο-γαλακτοπυρανονουκλεοζίτη της φθοροουρακίλης **46β** με DBU ή με ανθρακικό καίσιο (CsCO_3) δεν έδωσε τα επιθυμητά αποτελέσματα, καταλήγοντας σε ένα αδιευκρίνιστο μίγμα παραπροϊόντων.



Σχήμα 88

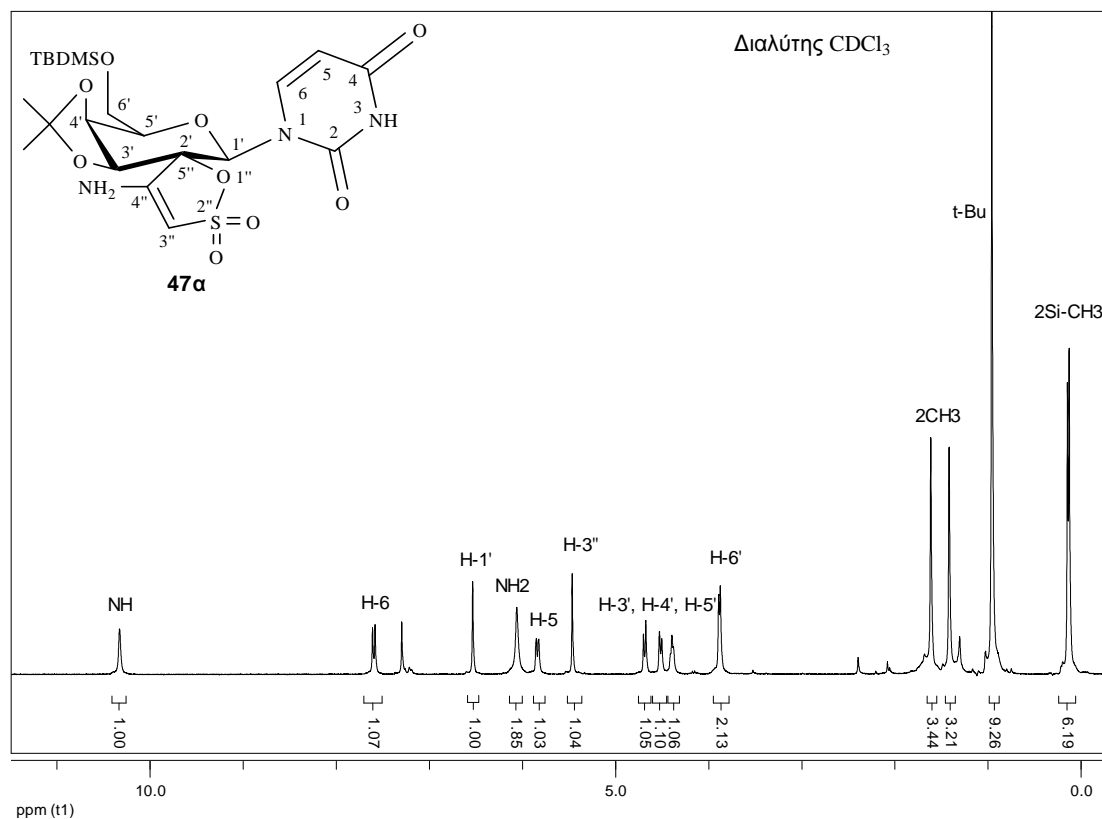
Ο προτεινόμενος μηχανισμός σχηματισμού των προϊόντων **47α,β** και **48α**, περιλαμβάνει την απόσπαση ενός πρωτονίου από τη μεσυλο-ομάδα υπό την επίδραση της ισχυρής βάσης DBU, ακολουθώντας μια πυρηνόφιλη προσβολή του δημιουργημένου καρβανιόντος στον ηλεκτροθετικό άνθρακα της κυανο-ομάδας (Perez-Perez *et al.* 1991, Velázquez *et al.* 1994) (Σχήμα 89). Στη συνέχεια η αρχικά σχηματιζόμενη ιμίνη μετατρέπεται στην ταυτομερή της εναμίνη, μέσω της αποπρωτονίωσης της 3'' θέσης του σπειρανικού-δακτυλίου από το DBU. Στο παράδειγμα του παρακάτω σχήματος, φαίνεται ο μηχανισμός της αντίδρασης κυκλοποίησης του μεσυλο-παραγώγου **46α** προς τον αντίστοιχο 2'-σπειρανικο-νουκλεοζίτη **48α**.



Σχήμα 89

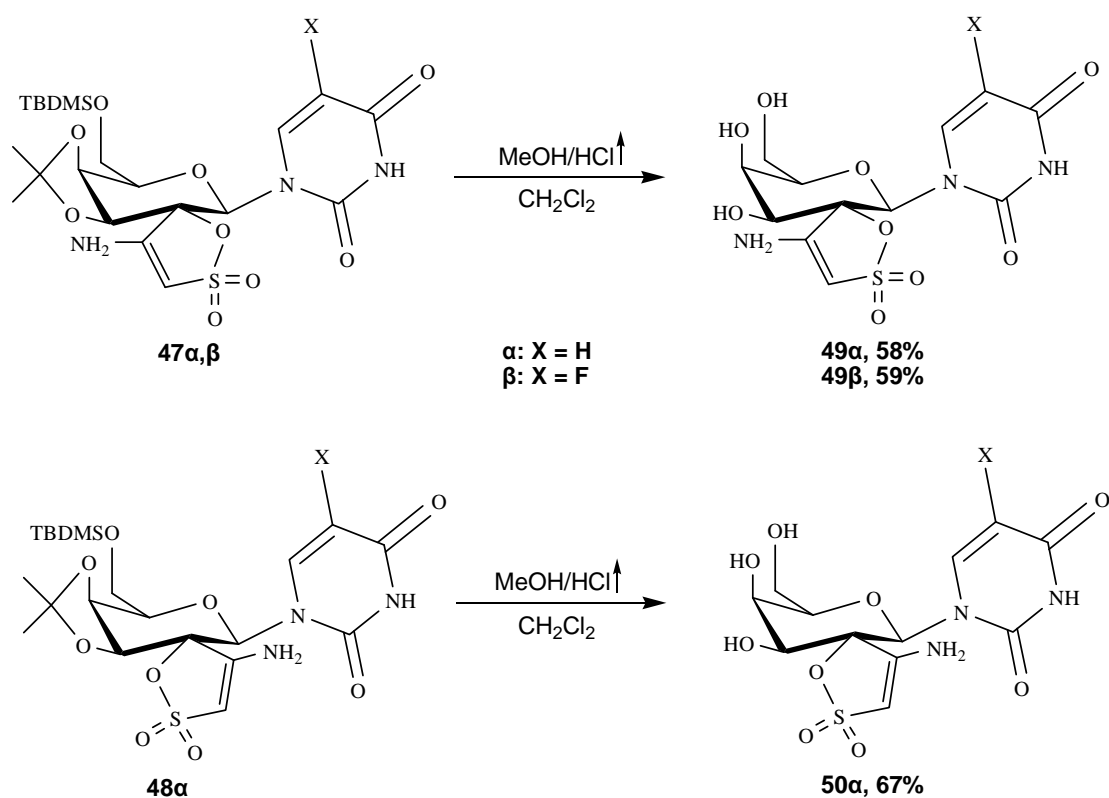
Πρέπει να τονιστεί ότι ο σχηματισμός του σπειρανικού αμινοξαθειολικού δακτυλίου στους νουκλεοζίτες **47α,β** και **48α** είναι εμφανής στα φάσματα ^1H NMR με την απουσία του χαρακτηριστικού σήματος της απλής κορυφής της μεσυλο-ομάδας στα 3.28-3.24 ppm και της αντ' αυτού εμφάνισης δυο νέων απλών κορυφών της σπειρανικής-ομάδας που αντιστοιχούν στα σήματα της $4''\text{-NH}_2$ στα 6.02-5.35 ppm και του H-3'' στα 6.04-5.43 ppm. Σε άμεση επιβεβαίωση της επιτυχούς ενδομοριακής κυκλοποίησης, τα φάσματα IR των ενώσεων **47α,β** και **48α**, εμφάνισαν χαρακτηριστικές απορροφήσεις στα 3320–3455 cm^{-1} , που αντιστοιχούν στη δόνηση τάσεως της πρωτοταγούς αμινο-ομάδας.

Στο σχήμα 90 παρατίθεται ενδεικτικά το φάσμα ^1H NMR του νουκλεοζίτη της [1-(6'-O-*tert*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-3',4'-O-ισοπροπυλιδενο-β-D-ταλοπυρανοζυλο) ουρακίλης] -2'-σπειρανικού-5''-(4''-αμινο-1'',2''-οξαθειολο-2'',2''-διοξειδίου) (**47α**). Από τη μελέτη του παρατηρείται αρχικά η απλή ευρεία κορυφή της αμινομάδας της νουκλεοβάσης στα 10.29 ppm, ενώ χαρακτηριστική είναι η κορυφή που προσδιορίζει το πρωτόνιο του H-6 της ουρακίλης, η οποία εμφανίζεται στα 7.56 ppm σαν μια διπλή με σταθερά σύζευξης $J_{5',6'} = 8.2$ Hz. Το σήμα του πρωτονίου H-1' εμφανίζεται ως μία απλή κορυφή στα 6.49 ppm, ενώ η απλή κορυφή στα 6.02 ppm αντιστοιχεί στην πρωτοταγή αμινο-ομάδα 4''-NH₂ του σπειρανικού δακτυλίου. Η διπλή κορυφή στα 5.79 ppm αντιστοιχεί στο σήμα του πρωτονίου H-5 της ουρακίλης, ενώ ακολουθούν τα σήματα πρωτονίων του H-3'' της σπειρανικής-ομάδας στα 5.43 ppm σαν μια απλή κορυφή και του H-3' του σακχάρου στα 4.65 ppm, σαν μια διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης $J_{3',4'} = 7.5$ Hz. Επίσης, από τη μελέτη του φάσματος προκύπτει μια διπλή κορυφή στα 4.48 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του H-4' και μια τριπλή κορυφή στα 4.35 ppm, η οποία προσδιορίζει το πρωτόνιο H-5' του σακχάρου με σταθερά σύζευξης $J_{5',6a'} = J_{5',6b'} = 4.4$ Hz. Χαρακτηριστική είναι επίσης η διπλή κορυφή που προσδιορίζει τα πρωτόνια της H-6', η οποία εμφανίζεται στα 3.84 ppm. Στο φάσμα, διακρίνονται τέλος τα σήματα των μεθυλίων της ισοπροπυλιδενο-ομάδας σαν δυο απλές κορυφές στα 1.57 και 1.37 ppm, ενώ ακολουθούν τα σήματα της *tert*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-ομάδας σαν τρεις απλές κορυφές στα 0.92, 0.10 και 0.08 ppm, αντίστοιχα.



Σχήμα 90

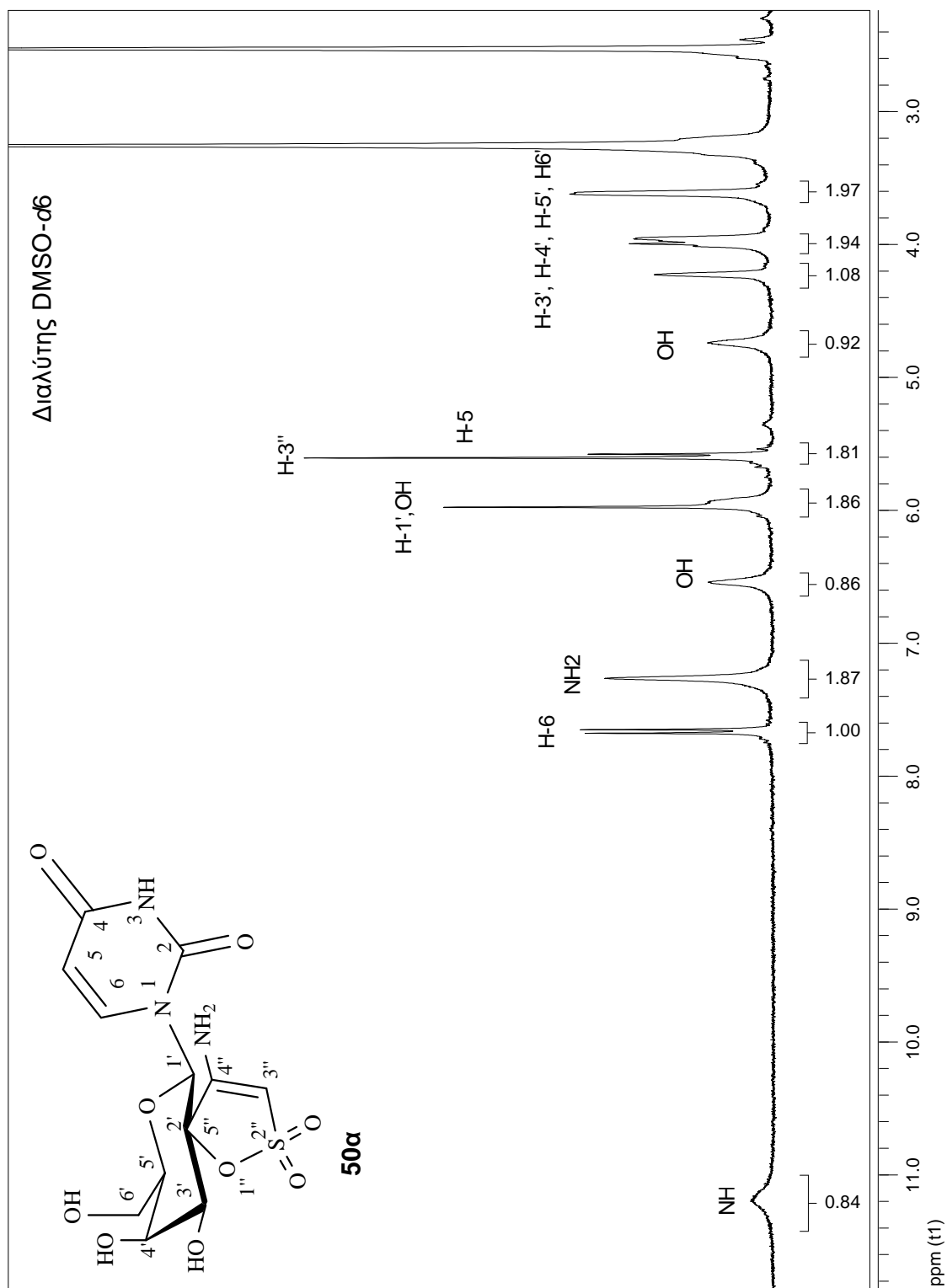
Στο τελικό στάδιο της συνθετικής πορείας πραγματοποιήθηκε η αποπροστασία των σπειρανικών- αναλόγων **47α,β** και **48α**, προς το σχηματισμό των επιθυμητών νουκλεοζιτών **49α,β** και **50α**, αντίστοιχα (Σχήμα 91). Η απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων επιτυγχάνεται με την εφαρμογή ήπιων όξινων συνθηκών με την παρουσία ακετυλο-χλωριδίου σε μεθανόλη, οπότε και σχηματίζεται αέριο HCl “in situ” (Khan και Mondal, 2003, Tzioumaki *et al.* 2011).



Σχήμα 91

Στο σχήμα 92 απεικονίζεται το χαρακτηριστικό φάσμα ^1H NMR του νουλεοζίτη της [1-(β-D-γαλακτοπυρανοζυλο) ουρακίλης] -2'-σπειρανικού-5''-(4''-αμινο-1'',2''-οξαθειολο-2'',2''-διοξειδίου) (**50α**). Όπως φαίνεται, το σήμα του πρωτονίου της αμινομάδας της νουκλεοβάσης εμφανίζεται σαν μια απλή και ευρεία κορυφή στα 11.19 ppm, ενώ χαρακτηριστική είναι η κορυφή που προσδιορίζει το πρωτόνιο του H-6 της ουρακίλης, η οποία εμφανίζεται στα 7.65 ppm σαν μια διπλή με σταθερά σύζευξης $J_{5',6'} = 8.2$ Hz. Ακολουθεί το σήμα των δύο πρωτονίων της πρωτοταγής αμινο- ομάδας 4''-NH₂ ως μια απλή κορυφή στα 7.26 ppm και το σήμα πρωτονίου μιας υδροξυλομάδας του σακχάρου ως μια απλή κορυφή στα 6.53 ppm. Στη συνέχεια παρουσιάζεται η απλή κορυφή που αναφέρεται στο πρωτόνιο H-1' στα 5.97 ppm και που εν μέρει αλληλοεπικαλύπτεται από το σήμα του πρωτονίου μιας ακόμα υδροξυλομάδας, η οποία εμφανίζεται σαν μια απλή και ευρεία κορυφή στα 5.92 ppm. Ακολουθούν τα σήματα των πρωτονίων του H-3'' και του H-5 σαν μια απλή και διπλή κορυφή στα 5.59 και 5.57 ppm, αντίστοιχα, καθώς και το σήμα του πρωτονίου της τρίτης υδροξυλομάδας του σακχάρου σαν μια απλή και ευρεία κορυφή στα 4.73 ppm. Τέλος, διακρίνονται τα σήματα των

πρωτονίων H-3', H-4', H-5' και H-6' του υδατανθρακικού δακτυλίου ως πολλαπλές κορυφές περίπου στα 4.21-3.61 ppm.



Σχήμα 92

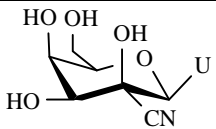
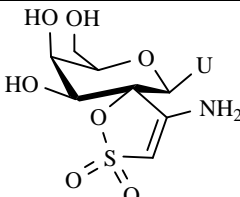
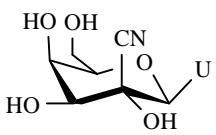
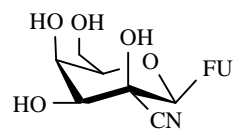
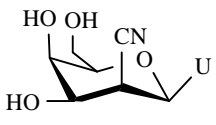
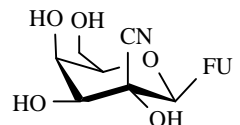
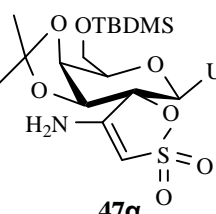
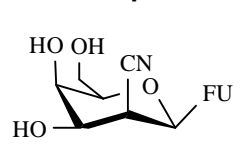
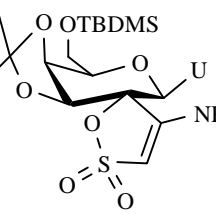
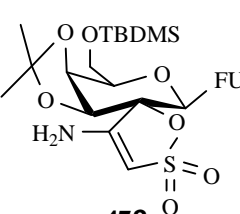
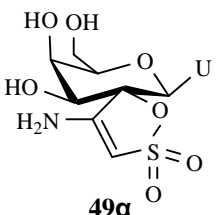
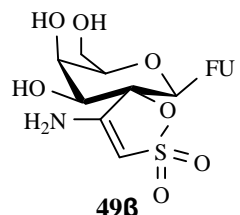
II.4.4 Αντιική και αντικαρκινική δράση των 2'-C-κυανο, 2'-δεοξυ-2'-C-κυανο και 2'-σπειρανικών-πυρανονουκλεοζιτών

Μετά την επιτυχή ολοκλήρωση της σύνθεσης των ενώσεων-στόχων εξετάστηκε η αντιική και αντικαρκινική τους δράση σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Ιολογίας και Χημειοθεραπείας του Ινστιτούτο Ιατρικής Έρευνας Rega στο Βέλγιο. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η βιολογική δράση των 2'-C-κυανο- **41α,β**, **42α,β**, των 2'-δεοξυ-2'-C-κυανο **44α,β**, των 2'-σπειρανικών- **49α,β**, **50α** αλλά και των 6'-TBDMS νουκλεοζιτών **47α,β** και **48α**. Η απόφαση να ερευνηθούν ως προς τη βιοδραστικότητα τους οι προστατευμένοι νουκλεοζίτες **47α,β** και **48α** στηρίχτηκε αφενός στο ότι η συγκεκριμένη κατηγορία ενώσεων παρουσιάζει σαν δομική απαίτηση της βιολογικής δράσης την παρουσία της λιπόφιλης TBDMS ομάδας στο τμήμα του σακχάρου (Camarasa *et al.* 2005) και αφετέρου στην ύπαρξη μελετών που υποστηρίζουν ότι πυρανονουκλεοζίτες, που φέρουν μία προστατευτική ομάδα στην 6'-θέση του σακχάρου εμφανίστηκαν να είναι πιο αποτελεσματικοί αντικαρκινικοί και αντιικοί παράγοντες (Manta *et al.* 2007, Manta *et al.* 2009, Manta *et al.* 2008).

Οι ενώσεις αξιολογήθηκαν για την κυτταροστατική τους δράση έναντι του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων λευχαιμίας (L1210), των ανθρώπινων T-λεμφοκυττάρων (CEM), καθώς επίσης και των ανθρώπινων τραχηλικών καρκινικών κυττάρων (HeLa). Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα 6 είναι εμφανές ότι τα ανάλογα της ουρακίλης παρουσίασαν ασθενή ή και παντελή έλλειψη κυτταροστατικής δράσης, εν αντιθέσει με αρκετά ανάλογα της 5-φθοροουρακίλης (5-FU), τα οποία παρουσίασαν αξιοσημείωτη αντιπολλαπλασιαστική δράση. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα 2'-C-κυανο- (πάνω ή κάτω)- 2'-υδροξυλο παράγωγα **41β** και **42β** παρουσίασαν ένα προφίλ κυτταροστατικής δράσης όμοιο με αυτό της ελεύθερης 5-FU, ενώ τα τρία άλλα παράγωγα της 5-FU, το 2'-δεοξυ-2'-C-κυανο- ανάλογο **44β** αλλά και οι 2'-σπειρανικοί-νουκλεοζίτες **47β** και **49β** εμφάνισαν σημαντικά λιγότερη κυτταροστατική δράση. Η έντονη κυτταροστατικότητα των νουκλεοζιτών **41β** και **42β** μπορεί ν' αποδοθεί σε εγγενή αστάθεια των ενώσεων, δηλαδή σε αυθόρμητη απελευθέρωση της 5-FU κατά την έκθεση τους σε κυτταρική καλλιέργεια, αλλά και στην ενζυμική

τους διάσπαση από τις πρωτεΐνες του αίματος και/ή από ενδοκυττάρια ένζυμα. Τέλος, με βάση την αυξημένη κυτταροστατική δράση που παρουσιάζουν οι 2'-σπειρανικοί-νουκλεοζίτες **47α,β** σε σχέση με τα απροστάτευτα παράγωγά τους **49α,β** μπορεί να υποστηριχθεί ότι η παρουσία της 6'-TBDMS ομάδας οδηγεί σε αύξηση της βιολογικής δράσης στο συγκεκριμένο τύπο ενώσεων. Οι νέες ενώσεις μελετήθηκαν ως προς τις αντιικές τους ιδιότητες έναντι διαφόρων DNA και RNA ιών, χωρίς όμως να παρουσιάσουν κάποια ενδιαφέρουσα δράση.

Πίνακας 6. Ανασταλτική δράση των ενώσεων **41α,β**, **42α,β**, **44α,β**, **47α,β**, **48α**, **49α,β** και **50α** έναντι του πολλαπλασιασμού των κυττάρων L1210, CEM και HeLa.

Προϊόν	IC ₅₀ (μM)			Προϊόν	IC ₅₀ (μM)		
	L1210	CEM	HeLa		L1210	CEM	HeLa
 41α	> 250	> 250	> 250	 50α	> 250	> 250	≥ 250
 42α	> 250	> 250	> 250	 41β	0.79 ± 0.45	16 ± 4	0.60 ± 0.04
 44α	> 250	> 250	> 250	 42β	0.68	20 ± 6	0.65 ± 0.23
 47α	30 ± 10	22 ± 1	28 ± 12	 44β	34 ± 1	112 ± 6	22 ± 2
 48α	111 ± 0	110 ± 2	87 ± 2	 47β	23 ± 2	24 ± 1	16 ± 5
 49α	> 250	> 250	> 250	 49β	88 ± 13	> 250	49 ± 6
				F-Uracil	0.33 ± 0.17	18 ± 5	0.54 ± 0.12

III. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

III.1 ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC: Thin Layer Chromatography)

Η παρακολούθηση της πορείας των αντιδράσεων και ο έλεγχος της καθαρότητας των ενώσεων έγινε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) σε πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με silica gel F₂₅₄ (0.2 mm) της εταιρίας E. Merck. Οι κηλίδες των χρωματογραφημάτων (TLC) είναι ορατές υπό λυχνία υπεριώδους (UV, 254 nm) και με ψεκασμό με διάλυμα θειϊκού οξέος 30% και εν συνεχεία θέρμανση στους 120 °C. Εναλλακτικά, στην περίπτωση των κετονουκλεοζιτών, τα TLC χρωματογραφήματα ψεκάζονται με διάλυμα 2,4-δινιτροφαινυλυδραζίνης (0.1%).

Χρωματογραφία στήλης

Η χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (flash column chromatography), επιτεύχθηκε με την εισαγωγή αέρα υπό πίεση εντός στήλης πακτωμένης με silica gel 60 (230-400 mesh) της εταιρίας E. Merck.

Μέτρηση της οπτικής ενεργότητας

Οι μετρήσεις της γωνίας στροφής πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με τη βοήθεια πολωσιμέτρου, τύπου Autopol I.

Φάσματα υπεριώδους ακτινοβολίας

Τα φάσματα υπεριώδους ακτινοβολίας ελήφθησαν σε φασματοφωτόμετρο, τύπου PG Instruments Ltd. Ο μοριακός συντελεστής απόσβεσης ϵ , προσδιορίστηκε από την εξίσωση

$$\epsilon = \log (I_0 / I) / (C \times d)$$

όπου $\log (I_0 / I)$ = οπτική πυκνότητα μετρημένη στο μέγιστο της απορρόφησης (λ_{\max})

C = συγκέντρωση της ουσίας (mol/L)

d = μήκος κυψελίδας (cm)

Φάσματα NMR

Τα φάσματα NMR καταγράφηκαν σε φασματόμετρο τύπου Bruker AM300 με συχνότητα συντονισμού τα 300.1 MHz για τους πυρήνες ^1H και 75.5 MHz για τους πυρήνες ^{13}C . Οι δευτεριωμένοι διαλύτες (CDCl_3 , $\text{MeOD-}d_4$, $\text{DMSO-}d_6$) ήταν υψηλής καθαρότητας και σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε εσωτερικό πρότυπο αναφοράς το τετραμεθυλοσιλάνιο TMS. Οι τιμές χημικής απορρόφησης δίνονται σε ppm (δ), ενώ οι τιμές των σταθερών σύζευξης σε Hz.

Φάσματα μάζας

Οι μετρήσεις μάζας έγιναν σε φασματόμετρο τύπου Thermo Quest Finnigan AQA και η χρησιμοποιούμενη μέθοδος ιονισμού ήταν διά ψεκασμού (electron spray ionization ESI)

Φάσματα IR

Τα φάσματα IR πάρθηκαν με χρήση του φασματοφωτομέτρου Thermo Scientific Nicolet IR100 FT-IR.

Προσδιορισμός των σημείων τήξεως

Τα σημεία τήξης των μη υγροσκοπικών στερεών καταγράφηκαν σε όργανο Mel-Temp Apparatus και δεν είναι διορθωμένα.

Ξήρανση διαλυτών

Όλες οι αντιδράσεις που περιελάμβαναν άνυδρους διαλύτες ή ουσίες ευαίσθητες στην ατμόσφαιρα έλαβαν χώρα υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου.

Το διχλωρομεθάνιο αποστάχθηκε παρουσία πεντοξειδίου του φωσφόρου και το απόσταγμα συλλέχθηκε σε φιάλη που περιείχε μοριακά κόσκινα 4\AA , όπου και αποθηκεύτηκε. Το ακετονιτρίλιο, το τολουόλιο και το *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο αποστάχθηκαν υπεράνω υδριδίου του ασβεστίου και το απόσταγμα συλλέχθηκε σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3\AA , όπου και αποθηκεύτηκε. Η πυριδίνη αποστάχθηκε παρουσία υδροξειδίου του καλίου και το απόσταγμα συλλέχθηκε σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 4\AA , όπου και

αποθηκεύτηκε. Το THF αποστάχθηκε από νάτριο/βενζοφαινόνη, αμέσως πριν από τη χρήση του.

Στοιχειακή ανάλυση

Οι στοιχειακές αναλύσεις των ουσιών έγιναν με τη χρήση αυτοματοποιημένων αναλυτών της εταιρίας Perkin-Elmer 2400 (% προσδιορισμός C, H και N) και οι τιμές κυμαίνονται σε εύρος $\pm 0.4\%$ των θεωρητικών.

III.2 Σύνθεση των 3'-C-αιθυνολο και 3'-C-(1,4-διυποκαστημενων-1,2,3-τριαζολο) δικάφαλων πυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων

III.2.1 Σύνθεση της 3-C-αιθυνολο-1,2,4,6-τετρακίς-Ο-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανόζης (3)

1,2:5,6-Δι-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-ριβοεξοφουρανοζο-3-ουλόζη (1)

Η εμπορικά διαθέσιμη ένωση, 1,2:5,6-δι-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-γλυκοφουρανόζη (DAG) (5.0 g, 19.20 mmol) διαλύεται σε διχλωρομεθάνιο (57 mL) και στη συνέχεια προστίθεται Ac_2O (5.43 mL, 57.60 mmol). Στο προκύπτον εναιώρημα προστίθεται PDC (8.67 g, 23.05 mmol) και ακολουθεί θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα για 4h υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Μετά το πέρας της αντίδρασης το προκύπτον παχύρρευστο διάλυμα μεταφέρεται σε χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, όπου πραγματοποιείται έκλουση με EtOAc και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα, που περιέχει Ac_2O αραιώνεται με τολουόλιο και στη συνέχεια με απόσταξη εξατμίζεται μέχρις ξηρού. Το επιθυμητό προϊόν **1** (4.0 g, 81%) παραλαμβάνεται υπό τη μορφή παχύρρευστου ελαίου και χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης **1** είναι σε συμφωνία με αυτά που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία (Elhalabi and Rice 2004).

3-C-Αιθυνολο-1,2:5,6-δισ-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζη (2)

Σε διάλυμα της 1,2:5,6-δισ-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-ριβοεξοφουρανοζο-3-ουλόζης (**1**) (4 g, 15.50 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (THF) (155 mL) προστίθενται, 186 mL διαλύματος $\text{HC}\equiv\text{CMgBr}$ σε THF (0.5 M, 93 mmol) υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου, για μία περίπου ώρα. Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC), στο μίγμα προστίθεται διάλυμα NH_4Cl (1M, 100 mL). Το μίγμα στη συνέχεια αραιώνεται με οξικό αιθυλεστέρα (800 mL) και εκχυλίζεται με κορεσμένο διάλυμα NaCl (400 mL). Κατόπιν, η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο Na_2SO_4 και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Ακολουθεί καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel),

χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα οξικό αιθυλεστέρα / *n*-εξάνιο (3:7), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **2** (3.74 g, 85%) υπό τη μορφή λευκού στερεού. Σημείο Τήξεως 104-105 °C. Rf = 0.51 (οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο 4:6).

$$[\alpha]_D^{22} = +3^\circ \quad (c = 0.5 \text{ χλωροφόρμιο})$$

ESI-MS (m/z): 285 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₄H₂₀O₆) C, H

Υπολ. (%) C : 59.14 H : 7.09

Ευρ. (%) C : 59.29 H : 7.12

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) (Kakinuma *et al.* 1992)

δ 5.82 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.4$ Hz, H-1), 4.62 (d, 1H, H-2), 4.44 (ddd, 1H, $J_{4,5} = 8.1$ Hz, $J_{5,6a} = 4.6$ Hz, $J_{5,6b} = 6.1$ Hz, H-5), 4.15 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 8.8$ Hz, H-6a, 4.04 (dd, 1H, H-6b), 3.86 (d, 1H, H-4), 3.13 (br s, 1H, OH), 2.68 (s, 1H, HC≡C), 1.60 (s, 3H, CH₃), 1.47 (s, 3H, CH₃), 1.37 (s, 6H, 2 x CH₃).

3-C-Αιθυνολο-1,2,4,6-τετρακίς-Ο-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανόζη (3)

Ένα διάλυμα της ένωσης **2** (3.74 g, 13.16 mmol) σε MeOH (20.5 mL) και νερό (116.9 mL) αναδεύεται στους 65-70 °C με ρητίνη Amberlite IR-120 (H⁺) (7.06 g). Μετά από 12h το προκύπτον εναιώρημα διηθείται και από το διήθημα απομακρύνονται οι διαλύτες υπό κενό. Το υπόλειμμα διαλύεται σε πυριδίνη (46.1 mL) και προστίθεται Ac₂O (23.7 mL). Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC), το διάλυμα ψύχεται στους 0 °C και προστίθεται μεθανόλη (11.9 mL) για να καταστείλει την αντίδραση. Οι διαλύτες απομακρύνονται υπό κενό, το υπόλειμμα διαλύεται σε οξικό αιθυλεστέρα και εκχυλίζεται αρχικά με κορεσμένο διάλυμα όξινου θειϊκού νατρίου (NaHSO₄), στη συνέχεια με κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃ και τέλος με νερό. Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄ και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το επιθυμητό προϊόν **3** (4.07 g, 83%) ελήφθη με λευκή αφρώδη υφή. Rf = 0.41 (οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο 1:1).

$$[\alpha]_D^{22} = -6^\circ \quad (c = 0.5 \text{ χλωροφόρμιο})$$

ESI-MS (*m/z*): 373 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₆H₂₀O₁₀) C, H

Υπολ. (%) C : 51.61 H : 5.41

Ευρ. (%) C : 51.57 H : 5.31

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 5.99 (d, 1H, *J*_{1,2} = 8.3 Hz, H-1), 5.29 (d, 1H, *J*_{4,5} = 9.9 Hz, H-4), 5.23 (d, 1H, H-2), 4.30 (dd, 1H, *J*_{6a,6b} = 12.3 Hz, *J*_{5,6a} = 4.2 Hz, H-6a), 4.25 (ddd, 1H, *J*_{5,6b} = 2.0 Hz, H-5), 4.09 (dd, 1H, H-6b), 2.76 (br s, 1H, OH), 2.47 (s, 1H, HC≡C), 2.17, 2.16, 2.11, 2.10 (4s, 12H, 4OAc).

III.2.2 Σύνθεση των 3'-C-αιθυλο-β-D-αλλοπυρανονουκλεοζιτών 5α-γ,ζ,στ

1-(3'-C-Αιθυλο-2',4',6'-τρις-Ο-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλο)-5-φθοροουρακίλη (4α)

Σε διάλυμα 5-φθοροουρακίλης (293 mg, 2.25 mmol) σε άνυδρο CH₃CN (8.8 mL) προστίθεται HMDS (589 μL, 2.79 mmol) και σακχαρίνη (19 mg, 0.104 mmol), και το προκύπτον εναιώρημα αναδεύεται με κάθετο ψυκτήρα για 30 min. Αφότου το μίγμα γίνει διαυγές, προστίθεται 3-C-αιθυλο-1,2,4,6-τετρα-Ο-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανόζη (**3**) (600 mg, 1.61 mmol) και Me₃SiOSO₂CF₃ (407 μL, 2.25 mmol), και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για μια επιπλέον ώρα με κάθετο ψυκτήρα στους 90 °C υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Στη συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου, εξουδετερώνεται με κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃, αραιώνεται με διχλωρομεθάνιο (400 mL) και εκχυλίζεται μία φορά με νερό (1 x 10 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄ και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο (3:7), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **4α** (605 mg, 85%), υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων. Σημείο Τήξεως 108-110 °C. R_f = 0.59 (οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο 1:1).

$[\alpha]_D^{22} = -6^\circ$ (c = 0.4 χλωροφόρμιο)

λ_{\max} 264 nm (ϵ 6575)

ESI-MS (m/z): 443 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₈H₁₉FN₂O₁₀) C, H, N

Υπολ. (%) C : 48.87 H : 4.33 N : 6.33

Ευρ. (%) C : 48.70 H : 4.21 N : 6.49

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 8.37 (br s, 1H, NH), 7.43 (d, 1H, $J_{6,F5} = 5.8$ Hz, H-6), 6.03 (dd, 1H, $J_{1',2'} = 9.2$ Hz, $J_{1',F5} = 1.2$ Hz, H-1'), 5.19 (d, 1H, $J_{4',5'} = 9.6$ Hz, H-4'), 5.08 (d, 1H, H-2'), 4.28–4.17 (m, 2H, H-6a', H-6b'), 4.07–4.04 (m, 1H, H-5'), 2.54 (s, 1H, HC≡C), 2.14, 2.10, 2.09 (3s, 9H, 3OAc).

1-(3'-C-Αιθυνολο-β-D-αλλοπυρανοζυλο)-5-φθοροουρακίλη (5a)

Διάλυμα της ένωσης **4a** (605 mg, 1.37 mmol) σε μεθανολική αμμωνία (κορεσμένη στους 0 °C, 57.3 mL) αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 12 h. Ο διαλύτης στη συνέχεια απομακρύνεται υπό κενό και το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης τον οξικό αιθυλεστέρα, οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **5a** (312 mg, 72%), με λευκή αφρώδη υφή. $R_f = 0.50$ (οξικός αιθυλεστέρας / μεθανόλη 9:1).

$[\alpha]_D^{22} = -6^\circ$ (c = 0.4 μεθανόλη)

λ_{\max} 264 nm (ϵ 8689)

ESI-MS (m/z): 317 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₂H₁₃FN₂O₇) C, H, N

Υπολ. (%) C : 45.58 H : 4.14 N : 8.86

Ευρ. (%) C : 45.62 H : 4.11 N : 8.93

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD)

δ 8.00 (d, 1H, $J_{6,F5} = 6.6$ Hz, H-6), 5.84 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.0$ Hz, H-1'), 3.87-3.68 (m, 5H, H-2', H-4', H-5', H-6a', H-6b'), 2.89 (s, 1H, HC≡C).

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD)

δ 158.01, 150.12, 140.91, 127.33, 91.29, 84.71, 79.43, 75.06, 73.52, 72.79, 72.28, 61.83.

IR (Nujol, cm⁻¹): 2115 (C≡C).

1-(3'-C-Αιθυνολο-2',4',6'-τρις-Ο-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλο)ουρακίλη (4β)

Το παράγωγο της ουρακίλης **4β** συντίθεται από το αιθυνολο σάκχαρο **3** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **4α** από την ένωση **3**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο (4:6), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **4β** (560 mg, 82%), υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων. Σημείο Τήξεως 97-99 °C. R_f = 0.34 (οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο 1:1).

$[\alpha]_D^{22} = +2^\circ$ (c = 0.5 χλωροφόρμιο)

λ_{\max} 257 nm (ε 5346)

ESI-MS (*m/z*): 425 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₈H₂₀N₂O₁₀) C, H, N

Υπολ. (%)	C : 50.95	H : 4.75	N : 6.60
Ευρ. (%)	C : 51.02	H : 4.69	N : 6.73

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 8.14 (br s, 1H, NH), 7.35 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.1$ Hz, H-6), 6.07 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.3$ Hz, H-1'), 5.78 (d, 1H, H-5), 5.19 (d, 1H, $J_{4',5'} = 9.7$ Hz, H-4'), 5.14 (d, 1H, H-2'), 4.28-4.17 (m, 2H, H-6a', H-6b'), 4.06-4.03 (m, 1H, H-5'), 2.53 (s, 1H, HC≡C), 2.14, 2.09, 2.08 (3s, 9H, 3OAc).

1-(3'-C-Αιθινυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλο)ουρακίλη (5β)

Το παράγωγο της ουρακίλης **5β** συντίθεται από το ακετυλιωμένο παράγωγο **4β** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **5α** από την ένωση **4α**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας / μεθανόλη (9:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **5β** (307 mg, 78%), με λευκή αφρώδη υφή. $R_f = 0.25$ (οξικός αιθυλεστέρας / μεθανόλη 9:1). $[\alpha]_D^{22} = +26^\circ$ (c = 0.5 μεθανόλη)

λ_{max} 259 nm (ϵ 5220)

ESI-MS (m/z): 299 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₂H₁₄N₂O₇) C, H, N

Υπολ. (%) C : 48.32 H : 4.73 N : 9.39

Ευρ. (%) C : 48.28 H : 4.83 N : 9.27

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD)

δ 7.71 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.1$ Hz, H-6), 5.82 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.3$ Hz, H-1'), 5.72 (d, 1H, H-5), 3.86-3.65 (m, 5H, H-2', H-4', H-5', H-6a', H-6b'), 2.85 (s, 1H, HC≡C).

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD)

δ 164.26, 150.13, 142.48, 102.09, 91.66, 83.42, 81.36, 74.97, 73.67, 72.88, 72.01, 61.03.

IR (Nujol, cm⁻¹): 2120 (C≡C).

1-(3'-C-Αιθινυλο-2',4',6'-τρις-Ο-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλο)θυμίνη (4γ)

Το παράγωγο της θυμίνης **4γ** συντίθεται από το αιθινυλο σάκχαρο **3** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **4α** από την ένωση **3**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο (3:7), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **4γ** (508 mg, 72%), υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων. Σημείο Τήξεως 94-96 °C. Rf = 0.46 (οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο 1:1).

$$[\alpha]_D^{22} = -7^\circ \quad (c = 0.7 \text{ χλωροφόρμιο})$$

$$\lambda_{\max} 262 \text{ nm } (\epsilon 7549)$$

ESI-MS (*m/z*): 439 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₉H₂₂N₂O₁₀) C, H, N

Υπολ. (%) C : 52.06 H : 5.06 N : 6.39

Ευρ. (%) C : 52.15 H : 4.99 N : 6.43

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 8.19 (br s, 1H, NH), 7.19 (s, 1H, H-6), 6.09 (d, 1H, *J*_{1',2'} = 9.2 Hz, H-1'), 5.24-5.18 (m, 2H, H-2', H-4'), 4.29-4.21 (m, 2H, H-6a', H-6b'), 4.09-4.07 (m, 1H, H-5'), 2.55 (s, 1H, HC≡C), 2.17, 2.12, 2.10 (3s, 9H, 3OAc), 1.95 (s, 3H, 5-CH₃).

1-(3'-C-Αιθινυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλο)θυμίνη (5γ)

Το παράγωγο της θυμίνης **5γ** συντίθεται από το ακετυλιωμένο παράγωγο **4γ** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **5α** από την ένωση **4α**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας / μεθανόλη (9:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **5γ** (271 mg, 75%), με λευκή αφρώδη υφή. Rf = 0.39 (οξικός αιθυλεστέρας / μεθανόλη 9:1).

$[\alpha]_D^{22} = +11^\circ$ (c = 0.6 μεθανόλη)

λ_{\max} 262 nm (ϵ 8776)

ESI-MS (m/z): 313 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₃H₁₆N₂O₇) C, H, N

Υπολ. (%) C : 50.00 H : 5.16 N : 8.97

Ευρ. (%) C : 50.10 H : 5.21 N : 8.89

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD)

δ 7.56 (s, 1H, H-6), 5.81 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.3$ Hz, H-1'), 3.86-3.66 (m, 5H, H-2', H-4', H-5', H-6a', H-6b'), 2.85 (s, 1H, HC≡C), 1.94 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD)

δ 163.64, 150.13, 136.74, 110.10, 91.37, 83.47, 80.02, 74.33, 73.91, 72.68, 71.89, 61.53, 12.21.

IR (Nujol, cm⁻¹): 2130 (C≡C).

1-(3'-C-Αιθινυλο-2',4',6'-τρις-Ο-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλο)-N⁴-βενζοϋλοκυτοσίνη (4δ)

Το παράγωγο της N⁴-βενζοϋλοκυτοσίνης **4δ** συντίθεται από το αιθινυλο σάκχαρο **3** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **4α** από την ένωση **3**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο (4:6), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **4δ** (578 mg, 68%), υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων. Σημείο Τήξεως 124–125 °C. R_f = 0.32 (οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο 1:1).

$[\alpha]_D^{22} = +10^\circ$ (c = 0.5 χλωροφόρμιο)

λ_{\max} 262 nm (ϵ 17613)

ESI-MS (*m/z*): 528 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₅H₂₅N₃O₁₀) C, H, N

Υπολ. (%) C : 56.92 H : 4.78 N : 7.97

Ευρ. (%) C : 56.86 H : 4.76 N : 7.91

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 7.94-7.49 (m, 7H, Bz, H-5 and H-6), 6.32 (d, 1H, *J*_{1',2'} = 9.3 Hz, H-1'), 5.29-5.14 (m, 2H, H-2', H-4'), 4.30-4.22 (m, 2H, H-6a', H-6b'), 4.08-4.05 (m, 1H, H-5'), 2.52 (s, 1H, HC≡C), 2.15, 2.09, 2.06 (3s, 9H, 3OAc).

1-(3'-C-Αιθυνολο-β-D-αλλοπυρανοζυλο)κυτοσίνη (5ζ)

Το παράγωγο της κυτοσίνης **5ζ** συντίθεται από το προστατευμένο παράγωγο **4δ** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **5α** από την ένωση **4α**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας / μεθανόλη (9:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **5ζ** (238 mg, 73%), με λευκή αφρώδη υφή. R_f = 0.23 (οξικός αιθυλεστέρας / μεθανόλη 8:2). [α]_D²² = +16° (c = 0.4 μεθανόλη)

λ_{max} 268 nm (ε 7913)

ESI-MS (*m/z*): 298 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₂H₁₅N₃O₆) C, H, N

Υπολ. (%) C : 48.48 H : 5.09 N : 14.14

Ευρ. (%) C : 48.38 H : 5.12 N : 14.19

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD)

7.72 (d, 1H, *J*_{5,6} = 7.2 Hz, H-6), 5.95-5.88 (m, 2H, H-1', H-5), 3.86-3.64 (m, 5H, H-2', H-4', H-5', H-6a', H-6b'), 2.83 (s, 1H, C≡C).

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD)

δ 165.73, 156.28, 143.03, 94.55, 92.94, 83.81, 79.92, 74.56, 74.13, 73.19, 72.71, 61.26.

IR (Nujol, cm⁻¹): 2124 (C≡C).

1-(3'-C-Αιθινυλο-2',4',6'-τρις-Ο-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλο)-N⁶-βενζοϋλοαδενίνη (4ε)

Το παράγωγο της N⁴-βενζοϋλοαδενίνης **4ε** συντίθεται από το αιθινυλο σάκχαρο **3** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **4α** από την ένωση **3**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο (4:6), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **4ε** (524 mg, 59%), με λευκή αφρώδη υφή. R_f = 0.14 (οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο 1:1).

[α]_D²² = -10° (c = 0.5 χλωροφόρμιο)

λ_{max} 280 nm (ε 18662)

ESI-MS (*m/z*): 552 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₆H₂₅N₅O₉) C, H, N

Υπολ. (%) C : 56.62 H : 4.57 N : 12.70

Ευρ. (%) C : 56.59 H : 4.56 N : 12.73

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 9.08 (br s, 1H, NH), 8.89 and 8.25 (2s, 2H, H-2 and H-8), 8.06-7.53 (m, 5H, Bz), 6.21 (d, 1H, J_{1',2'} = 9.3 Hz, H-1'), 5.64 (d, 1H, H-2'), 5.41 (d, 1H, J_{4',5'} = 9.5 Hz, H-4'), 4.38-4.28 (m, 2H, H-6a', H-6b'), 4.14-4.10 (m, 1H, H-5'), 2.58 (s, 1H, HC≡C), 2.19, 2.10, 1.87 (3s, 9H, 3OAc).

1-(3'-C-Αιθινυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλο)αδενίνη (5στ)

Το παράγωγο της αδενίνης **5στ** συντίθεται από το προστατευμένο παράγωγο **4ε** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **5α** από την ένωση **4α**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας / μεθανόλη (9:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **5στ** (229 mg, 75%), με λευκή αφρώδη υφή. $R_f = 0.18$ (οξικός αιθυλεστέρας / μεθανόλη 8:2).

$[\alpha]_D^{22} = -4^\circ$ (c = 0.1 διμεθυλοσουλφοξείδιο)

λ_{max} 263 nm (ϵ 12279)

ESI-MS (m/z): 322 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₃H₁₅N₅O₅) C, H, N

Υπολ. (%) C : 48.60 H : 4.71 N : 21.80

Ευρ. (%) C : 48.58 H : 4.58 N : 21.86

¹H-NMR (300 MHz, DMSO)

δ 8.33 and 8.15 (2s, 2H, H-2 and H-8), 7.15 (br s, 2H, NH₂), 5.65 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.3$ Hz, H-1'), 5.63 (s, 1H, 3'-OH), 5.36 (d, 1H, $J_{4'-OH,4'} = 7.9$ Hz, 4'-OH), 5.16 (d, 1H, $J_{2'-OH,2'} = 8.0$ Hz, 2'-OH), 4.48 (t, 1H, $J = 5.5$ Hz, 6'-OH), 4.26 (t, 1H, H-2'), 3.70-3.43 (m, 4H, H-4', H-5', H-6a', H-6b'), 3.26 (s, 1H, HC≡C).

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO)

δ 156.23, 152.37, 149.76, 140.33, 119.57, 100.66, 83.19, 80.01, 74.23, 73.87, 72.74, 72.43, 61.06.

IR (Nujol, cm⁻¹): 2129 (C≡C).

III.2.3 Σύνθεση των τριάζολο νουκλεοζιτών με διπλή κεφαλή 8α-η

1-{2',4',6'-Τρις-Ο-ακετυλο-3'-C-[1-[(αδενιν-9-υλο)αιθυλο]-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]-β-D-αλλοπυρανοζυλο}ουρακίλη (7α)

Σε ένα διάλυμα του αιθυνυλο νουκλεοζίτη της ουρακίλης **4β** (98 mg, 0.23 mmol) και του αζιδίου της αδενίνης **6α** (47 mg, 0.23 mmol) σε THF (2.3 mL), προστίθενται 2.3 mL H₂O στο οποίο έχουν διαλυθεί καταλυτικές ποσότητες ασκορβικού νατρίου (8 mg, 0.046 mmol) και CuSO₄·5H₂O (6 mg, 0.023 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση με reflux για 2h και εν συνεχεία ψύχεται. Στο διάλυμα προστίθεται MeOH και οι διαλύτες στη συνέχεια απομακρύνονται υπό κενό. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **7α** (121 mg, 84%), με λευκή αφρώδη υφή. R_f = 0.30 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 9:1).

$$[\alpha]_D^{22} = +10^\circ \quad (c = 0.5 \text{ χλωροφόρμιο})$$

λ_{\max} 260 nm (ϵ 10786)

ESI-MS (*m/z*): 629 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₅H₂₈N₁₀O₁₀) C, H, N

Υπολ. (%) C : 47.77 H : 4.49 N : 22.28

Ευρ. (%) C : 47.65 H : 4.46 N : 22.34

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, 45 °C)

δ 9.19 (br s, 1H, NH) 8.49 and 7.70 (2 br s, 2H, H-2 and H-8 Ade), 7.32 (d, 1H, $J_{5,6} = 7.6$ Hz, H-6 Ur), 7.10 (s, 1H, Triazole H), 6.20 (d, 1H, $J_{1',2'} = 8.7$ Hz, H-1'), 5.89 (br s, 2H, NH₂ Ade), 5.74 (d, 1H, H-5 Ur), 5.20 (d, 1H, H-2'), 5.05 (d, 1H, $J_{4',5'} = 9.8$ Hz, H-4'), 4.91 (br, 2H, CH₂), 4.73 (br, 2H, CH₂), 4.37–4.09 (m, 3H, H-5', H-6a', H-6b'), 2.07, 2.00, 1.90 (3s, 9H, 3OAc).

1-{3'-C-[1-[(Αδεριν-9-υλο)αιθυλο]-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]-β-D-αλλοπυρανοζυλο}ουρακίλη (8α)

Διάλυμα του προστατευμένου δικάφαλου νουκλεοζίτη **7α** (121 mg, 0.193 mmol) σε μεθανολική αμμωνία (κορεσμένη στους 0 °C, 8 mL) αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 12 h. Ο διαλύτης στη συνέχεια απομακρύνεται υπό κενό και το στερεό υπόλειμμα καθαρίζεται με ανακρυστάλλωση με μεθανόλη και νερό, οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **8α** (69 mg, 71%), υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων. Σημείο Τήξεως 225-227 °C (dec). Rf = 0.33 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 2:8).

$[\alpha]_D^{22} = +4^\circ$ (c = 0.3 διμεθυλοσουλφοξείδιο)

λ_{\max} 263 nm (ϵ 20310), 270 nm (ϵ 23650)

ESI-MS (m/z): 503 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₉H₂₂N₁₀O₇) C, H, N

Υπολ. (%) C : 45.42 H : 4.41 N : 27.88

Ευρ. (%) C : 45.37 H : 4.36 N : 27.79

¹H-NMR (300 MHz, DMSO, 50 °C):

δ 11.18 (br s, 1H, NH), 8.18 and 7.91 (2s, 2H, H-2 and H-8 Ade), 7.76 (s, 1H, Triazole H), 7.65 (d, 1H, $J_{5,6} = 7.1$ Hz, H-6 Ur), 6.83 (br s, 2H, NH₂ Ade), 5.84 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.2$ Hz, H-1'), 5.62 (d, 1H, H-5 Ur), 5.01 (br s, 1H, OH), 4.85 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H, CH₂), 4.76 (br s, 1H, OH), 4.65 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H, CH₂), 4.45 (br s, 1H, OH), 4.28 (br s, 1H, OH), 3.99-3.45 (m, 5H, H-2', H-4', H-5', H-6a' and H-6b').

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO)

δ 163.17, 155.94, 152.60, 151.04, 150.45, 149.35, 141.58, 140.76, 124.51, 118.55, 101.87, 80.30, 77.50, 75.31, 71.06, 69.69, 61.27, 48.52, 43.21.

1-{2',4',6'-Τρις-Ο-ακετυλο-3'-C-[1-[(αδενιν-9-υλο)αιθυλο]-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]-β-D-αλλοπυρανοζυλο}θυμίνη (7β)

Ο δικέφαλος νουκλεοζίτης **7β** συντίθεται από τον ακετυλιωμένο αιθυνολο νουκλεοζίτη της θυμίνης **4γ** και το αζίδιο της αδενίνης **6α** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **7α**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9.5:0.5), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **7β** (229 mg, 75%), με λευκή αφρώδη υφή. $R_f = 0.38$ (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 9:1).

$[\alpha]_D^{22} = +4^\circ$ (c = 0.5 χλωροφόρμιο)

λ_{max} 262 nm (ϵ 15229)

ESI-MS (m/z): 643 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₆H₃₀N₁₀O₁₀) C, H, N

Υπολ. (%) C : 48.60 H : 4.71 N : 21.80

Ευρ. (%) C : 48.63 H : 4.67 N : 21.75

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 9.99 (br s, 1H, NH Thy), 8.43 and 7.51 (2s, 2H, H-2 and H-8 Ade), 7.18 (s, 1H, H-6 Thy), 7.11 (s, 1H, Triazole H), 6.18 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.1$ Hz, H-1'), 6.07 (br s, 2H, NH₂ Ade), 5.25 (d, 1H, H-2'), 5.04 (d, 1H, $J_{4',5'} = 9.7$ Hz, H-4'), 4.93 (t, 2H, $J = 5.1$ Hz, CH₂), 4.75 (t, 2H, $J = 5.1$ Hz, CH₂), 4.38-4.07 (m, 3H, H-5', H-6a', H-6b'), 2.08, 2.01, 1.96 (3s, 9H, 3OAc), 1.85 (s, 3H, 5-CH₃ Thy).

1-{3'-C-[1-[(Αδενιν-9-υλο)αιθυλο]-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]-β-D-αλλοπυρανοζυλο}θυμίνη (8β)

Ο τελικός νουκλεοζίτης **8β** συντίθεται από τον ακετυλιωμένο δικέφαλο νουκλεοζίτη **7β** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **8α**. Το στερεό υπόλειμμα καθαρίζεται με ανακρυστάλλωση με μεθανόλη και νερό, οπότε

παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **8β** (102 mg, 69%), υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων. Σημείο Τήξεως 203-205 °C (dec). $R_f = 0.38$ (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 2:8).

$[\alpha]_D^{22} = +3^\circ$ (c = 0.2 διμεθυλοσουλφοξείδιο)

λ_{max} 270 nm (ϵ 24183), 263 nm (ϵ 26659)

ESI-MS (m/z): 517 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₀H₂₄N₁₀O₇) C, H, N

Υπολ. (%) C : 46.51 H : 4.68 N : 27.12

Ευρ. (%) C : 46.47 H : 4.59 N : 27.21

¹H-NMR (300 MHz, DMSO, 55 °C):

δ 10.80 (br s, 1H, NH Thy), 8.16, 7.89 and 7.75 (3s, 3H, H-2 Ade, H-8 Ade and H triazole), 7.48 (s, 1H, H-6 Thy), 6.72 (br s, 2H, NH₂ Ade), 5.83 (d, 1H, $J_{1,2'} = 9.0$ Hz, H-1'), 4.84 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz, CH₂), 4.63 (t, 2H, $J = 5.3$ Hz, CH₂), 4.50-3.20 (m, 9H, H-2', H-4', H-5', H-6a', H-6b' and 4OH), 1.82 (s, 3H, 5-CH₃ Thy).

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO)

δ 164.14, 156.12, 152.84, 151.35, 150.71, 150.33, 141.09, 137.23, 124.72, 121.10, 109.75, 80.53, 77.79, 75.50, 71.30, 70.10, 61.66, 48.96, 43.64, 12.4.

1-{2',4',6'-Τρις-Ο-ακετυλο-3'-C-[1-[(αδενιν-9-υλο)αιθυλο]-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]-β-D-αλλοπυρανοζυλο}-N⁴-βενζοϋλοκυτοσίνη (7γ)

Ο δικάφαλος νουκλεοζίτης **7γ** συντίθεται από τον ακετυλιωμένο αιθυνολο νουκλεοζίτη της N⁴-βενζοϋλοκυτοσίνης **4δ** και το αζίδιο της αδενίνης **6α** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **7α**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **7γ** (100 mg, 72%), με λευκή αφρώδη υφή. $R_f = 0.45$ (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 9:1).

$[\alpha]_D^{22} = +12^\circ$ (c = 0.5 χλωροφόρμιο)

λ_{\max} 262 nm (ϵ 26064)

ESI-MS (m/z): 732 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₃₂H₃₃N₁₁O₁₀) C, H, N

Υπολ. (%) C : 52.53 H : 4.55 N : 21.06

Ευρ. (%) C : 52.55 H : 4.56 N : 21.12

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 8.38 (br s, 1H, NH BzCyt), 7.97-7.49 (m, 9H, Bz, H-2 and H-8 Ade, H-5 and H-6 BzCyt), 7.11 (s, 1H, Triazole H), 6.45 (d, 1H, $J_{1',2'} = 8.9$ Hz, H-1'), 5.69 (br s, 2H, NH₂ Ade), 5.21 (d, 1H, H-2'), 5.09 (d, 1H, $J_{4',5'} = 9.7$ Hz, H-4'), 4.90 (br, 2H, CH₂), 4.71 (br, 2H, CH₂), 4.43-4.38 (m, 1H, H-5'), 4.29 (dd, 1H, $J_{6a',6b'} = 12.5$ Hz, $J_{5',6a'} = 4.5$ Hz, H-6a'), 4.14 (d, 1H, H-6b'), 2.08, 2.02, 1.90 (3s, 9H, 3OAc).

1-{3'-C-[1-[(Αδενιν-9-υλο)αιθυλο]-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]-β-D-αλλοπυρανοζυλο}κυτισίνη (8γ)

Ο τελικός νουκλεοζίτης **8γ** συντίθεται από τον προστατευμένο δικέφαλο νουκλεοζίτη **7γ** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **8α**. Το στερεό υπόλειμμα καθαρίζεται με ανακρυστάλλωση με μεθανόλη και νερό, οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **8γ** (48 mg, 70%), υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων. Σημείο Τήξεως 250-252 °C (dec). R_f = 0.20 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 2:8).

$[\alpha]_D^{22} = +3^\circ$ (c = 0.5 διμεθυλοσουλφοξείδιο)

λ_{\max} 263 nm (ϵ 23401)

ESI-MS (m/z): 502 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₉H₂₃N₁₁O₆) C, H, N

Υπολ. (%) C : 45.51 H : 4.62 N : 30.73

Ευρ. (%) C : 45.59 H : 4.61 N : 30.82

¹H-NMR (300 MHz, DMSO, 50 °C):

δ 8.17 and 7.91 (2s, 2H, H-2 Ade and H-8 Ade), 7.74 (s, 1H, Triazole H), 7.59 (d, 1H, *J*_{5,6} = 7.5 Hz, H-6 Cyt), 7.00-6.82 (br, 4H, NH₂ Ade and Cyt), 5.95 (d, 1H, *J*_{1',2'} = 9.5 Hz, H-1'), 5.79 (d, 1H, H-5 Cyt), 4.90 (br s, 1H, OH), 4.83 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH₂), 4.64 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH₂), 4.52-4.22 (m, 3H, H-2' and 2OH), 3.92-3.45 (m, 5H, H-4', H-5', H-6a', H-6a' and OH).

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO)

δ 165.83, 156.35, 156.23, 153.01, 151.12, 149.94, 142.45, 141.20, 124.91, 119.00, 94.80, 80.89, 77.75, 75.90, 72.06, 70.26, 61.71, 48.92, 43.63.

1-{2',4',6'-Τρις-Ο-ακετυλο-3'-C-[1-[(αδενιν-9-υλο)αιθυλο]-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]-β-D-αλλοπυρανοζυλο}-N⁴-βενζοϋλοαδενίνη (7δ)

Ο δικέφαλος νουκλεοζίτης **7δ** συντίθεται από τον ακετυλιωμένο αιθυνουλο νουκλεοζίτη της N⁴-βενζοϋλοαδενίνης **4ε** και το αζίδιο της αδενίνης **6α** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **7α**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **7δ** (107 mg, 79%), με λευκή αφρώδη υφή. R_f = 0.45 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 9:1).

[α]_D²² = -6° (c = 0.5 χλωροφόρμιο)

λ_{max} 276nm (ε 22506)

ESI-MS (m/z): 756 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₃₃H₃₃N₁₃O₉) C, H, N

Υπολ. (%) C : 52.45 H : 4.40 N : 24.10

Ευρ. (%) C : 52.38 H : 4.39 N : 24.12

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 9.12 (br s, 1H, NH BzAde), 8.86 and 8.36 (2s, 2H, H-2 and H-8 BzAde), 8.23 (s, 1H, H-2 Ade), 8.04 (d, 2H, *J* = 7.4 Hz, Bz), 7.63 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz, Bz), 7.54 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, Bz), 7.45 (s, 1H, H-8 Ade), 7.24 (s, 1H, Triazole H), 6.29 (d, 1H, *J*_{1',2'} = 9.1 Hz, H-1'), 5.93 (br s, 2H, NH₂ Ade), 5.64 (d, 1H, H-2'), 5.23 (d, 1H, *J*_{4',5'} = 9.8 Hz, H-4'), 4.90 (t, 2H, *J* = 5.3, CH₂), 4.72 (t, 2H, *J* = 5.3, CH₂), 4.49-4.45 (m, 1H, H-5'), 4.27 (dd, 1H, *J*_{6a',6b'} = 12.5 Hz, *J*_{5',6a'} = 4.8 Hz, H-6a'), 4.11 (dd, 1H, *J*_{5',6b'} = 1.0 Hz, H-6b'), 2.04, 2.02, 1.68 (3s, 9H, 3OAc).

1-{3'-C-[1-[(Αδενιν-9-υλο)αιθυλο]-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]-β-D-αλλοπυρανοζυλο}- αδενίνη (8δ)

Ο τελικός νουκλεοζίτης **8δ** συντίθεται από τον προστατευμένο δικέφαλο νουκλεοζίτη **7δ** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **8α**. Το στερεό υπόλειμμα καθαρίζεται με ανακρυστάλλωση με μεθανόλη και νερό, οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **8δ** (63 mg, 84%), υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων. Σημείο Τήξεως 204-206 °C (dec). R_f = 0.17 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 2:8).

[α]_D²² = -3° (c = 0.4 διμεθυλοσουλφοξείδιο)

λ_{max} 263 nm (ε 23342)

ESI-MS (m/z): 526 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₀H₂₃N₁₃O₅) C, H, N

Υπολ. (%) C : 45.71 H : 4.41 N : 34.65

Ευρ. (%) C : 45.78 H : 4.43 N : 34.69

¹H-NMR (300 MHz, DMSO, 50 °C):

δ 8.24, 8.17, 7.92 and 7.76 (4s, 4H, H-2 and H-8 Ade), 7.76 (s, 1H, Triazole H), 6.74 (br s, 4H, NH₂ Ade), 5.88 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.4$ Hz, H-1'), 4.99 (br s, 1H, OH), 4.83 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz, CH₂), 4.66 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz, CH₂), 4.48-4.18 (m, 3H, H-2' and 2OH), 3.92-3.50 (m, 5H, H-4', H-5', H-6a', H-6a' and OH).

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO)

δ 156.16, 156.13 154.5, 152.86, 150.67, 150.20, 149.80, 141.10, 140.25, 124.80, 118.99, 118.98, 80.98, 77.70, 75.56, 71.56, 70.09, 61.51, 48.81, 43.47.

1-{3'-C-[1-[(Αδενιν-9-υλο)αιθυλο]-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]-β-D-αλλοπυρανοζυλο}-5-φθοροουρακίλη (8ε)

Σε διάλυμα του μη προστατευμένου αιθυλο νουκλεοζίτη της 5-φθοροουρακίλης **5α** (80 mg, 0.25 mmol) και του αζιδίου της αδενίνης **6α** (51 mg, 0.25 mmol) σε CH₃CN/H₂O (9:1), προστίθεται ένα μικρό σύρμα χαλκού. Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση στους 35 °C για 18 h και εν συνεχεία ψύχεται. Ο διαλύτης συμπυκνώνεται και στο υπόλειμμα προστίθεται μικρή ποσότητα MeOH. Το στερεό που καταβυθίζεται παραλαμβάνεται με διήθηση υπό κενό σε Gooch και εν συνεχεία ανακρυσταλλώνεται με μεθανόλη και νερό, οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **8ε** (100 mg, 77%), υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων. Σημείο Τήξεως 238-240 °C (dec). R_f = 0.40 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 2:8).

$[\alpha]_D^{22} = +4^\circ$ (c = 0.2 διμεθυλοσουλφοξείδιο)

λ_{\max} 266 nm (ε 17627)

ESI-MS (m/z): 521 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₉H₂₁FN₁₀O₇) C, H, N

Υπολ. (%) C : 43.85 H : 4.07 N : 26.91

Ευρ. (%) C : 43.79 H : 4.03 N : 26.94

¹H-NMR (300 MHz, DMSO, 50 °C):

δ 11.50 (br s, 1H, NH), 8.16 (s, 1H, H-2 Ade), 8.01-7.83 (m, 2H, 6-H FUr and 8-H Ade), 7.73 (s, 1H, Triazole H), 6.80 (br s, 2H, NH₂), 5.82 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.3$ Hz, H-1'), 4.97 (br s, 1H, OH), 4.83 (t, 2H, $J = 6.1$ Hz, CH₂), 4.64 (t, 2H, $J = 6.1$ Hz, CH₂), 4.48-4.20 (m, 3H, H-2' and 2OH), 3.98-3.48 (m, 5H, H-4', H-5', H-6a', H-6a' and OH).

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO)

δ 157.20, 156.21, 154.30, 152.85, 150.47, 149.93, 141.09, 139.80, 126.10, 124.57, 119.10, 81.30, 77.70, 75.48, 71.35, 69.94, 61.63, 48.84, 43.43.

1-{2',4',6'-Τρις-Ο-ακετυλο-3'-C-[1-[(5-φθοροουρακίλ-1-υλο)αιθυλο]-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]-β-D-αλλοπυρανοζυλο}-5-φθοροουρακίλη (7ζ)

Ο δικέφαλος νουκλεοζίτης **7ζ** συντίθεται από τον ακετυλιωμένο αιθινυλο νουκλεοζίτη της 5-φθοροουρακίλης **4α** και το αζίδιο της 5-φθοροουρακίλης **6β** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **7α**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9.5:0.5), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **7ζ** (124 mg, 84%), με λευκή αφρώδη υφή. $R_f = 0.50$ (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 9:1).

$[\alpha]_D^{22} = +4^\circ$ (c = 0.4 χλωροφόρμιο)

λ_{max} 264 nm (ϵ 10965)

ESI-MS (m/z): 642 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₄H₂₅F₂N₇O₁₂) C, H, N

Υπολ. (%) C : 44.94 H : 3.93 N : 15.28

Ευρ. (%) C : 44.83 H : 3.91 N : 15.27

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 9.67 (br s, 1H, NH), 8.84 (br s, 1H, NH), 7.63 (s, 1H, Triazole H), 7.54 (d, 1H, $J_{6,F5} = 6.0$ Hz, H-6 FUr), 7.06 (d, 1H, $J_{6,F5} = 5.4$ Hz, H-6 FUr), 6.17 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.0$ Hz, H-1'), 5.36 (d, 1H, H-2'), 5.02 (d, 1H, $J_{4',5'} = 9.9$ Hz, H-4'), 4.75 (t, 2H, $J = 4.7$ Hz, CH₂), 4.44-4.38 (m, 1H, H-5'), 4.32-4.24 (m, 2H, CH₂), 4.18-4.11 (m, 2H, H-6a', H-6b'), 2.08, 2.05, 1.95 (3s, 9H, 3OAc).

1-{3'-C-[1-[(5-Φθοροουρακιλ-1-υλο)αιθυλο]-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]-β-D-αλλοπυρανοζυλο}-5-φθοροουρακίλη (8ζ)

Ο τελικός νουκλεοζίτης **8ζ** συντίθεται από τον ακετυλιωμένο δικέφαλο νουκλεοζίτη **7ζ** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **8α**. Το στερεό υπόλειμμα καθαρίζεται με ανακρυστάλλωση με μεθανόλη και σταγόνες διχλωρομεθανίου, οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **8ζ** (83 mg, 83%), υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων. Σημείο Τήξεως 184-186 °C. R_f = 0.28 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 7:3).

$[\alpha]_D^{22} = +9^\circ$ (c = 0.3 μεθανόλη)

λ_{\max} 269 nm (ε 13761)

ESI-MS (m/z): 516 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₈H₁₉F₂N₇O₉) C, H, N

Υπολ. (%) C : 41.95 H : 3.72 N : 19.02

Ευρ. (%) C : 41.94 H : 3.81 N : 19.09

¹H-NMR (300 MHz, DMSO):

δ 11.8 (br s, 2H, NH), 8.15 (d, 1H, $J_{6,F5} = 7.0$ Hz, H-6 FUr), 7.93 (s, 1H, Triazole H), 7.65 (d, 1H, $J_{6,F5} = 6.5$ Hz, H-6 FUr), 5.81 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.0$ Hz, H-1'), 5.43 (s, 1H, OH), 5.09 (d, 1H, H-2'), 4.78-4.56 (m, 4H, 2CH₂), 4.20-3.30 (m, 7H, H-4', H-5', H-6a', H-6b' και 3OH).

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO)

δ 157.75, 157.35, 150.55, 149.91, 149.87, 140.33, 139.81, 130.12, 126.22, 124.99, 81.00, 77.62, 75.53, 71.22, 69.78, 61.51, 48.27, 47.56.

1-{2',4',6'-Τρις-Ο-ακετυλο-3'-C-[1-[(5-φθοροουρακίλ-1-υλο)αιθυλο]-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]-β-D-αλλοπυρανοζυλο}ουρακίλη (7στ)

Ο δικέφαλος νουκλεοζίτης **7στ** συντίθεται από τον ακετυλιωμένο αιθυνολο νουκλεοζίτη της ουρακίλης **4β** και το αζίδιο της 5-φθοροουρακίλης **6β** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **7α**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9.5:0.5), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **7στ** (118 mg, 79%), με λευκή αφρώδη υφή. R_f = 0.45 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 9:1).

[α]_D²² = +5° (c = 1.1 χλωροφόρμιο)

λ_{max} 264 nm (ε 11784)

ESI-MS (m/z): 624 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₄H₂₆FN₇O₁₂) C, H, N

Υπολ. (%) C : 46.23 H : 4.20 N : 15.73

Ευρ. (%) C : 46.21 H : 4.27 N : 15.79

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 8.64 (br s, 1H, NH), 8.19 (br s, 1H, NH), 7.44 (s, 1H, Triazole H), 7.39 (d, 1H, J_{5,6} = 8.2 Hz, H-6 Ur), 7.04 (d, 1H, J_{6,F5} = 5.6 Hz, H-6 FUr), 6.14 (d, 1H, J_{1',2'} = 9.1 Hz, H-1'), 5.69 (d, 1H, H-5 Ur), 5.27 (d, 1H, H-2'), 4.99 (d, 1H, J_{4',5'} = 9.7 Hz, H-4'), 4.61 (t, 2H, J = 5.0 Hz, CH₂), 4.32-4.05 (m, 5H, H-5', CH₂, H-6a', H-6b'), 2.00, 1.95, 1.88 (3s, 9H, 3OAc).

1-{3'-C-[1-[(5-Φθοροουρακίλ-1-υλο)αιθυλο]-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]-β-D-αλλοπυρανοζυλο}ουρακίλη (8στ)

Ο τελικός νουκλεοζίτης **8στ** συντίθεται από τον ακετυλιωμένο δικέφαλο νουκλεοζίτη **7στ** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **8α**. Το στερεό υπόλειμμα καθαρίζεται με ανακρυστάλλωση με μεθανόλη και σταγόνες διχλωρομεθανίου, οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **8στ** (80 mg, 85%), υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων. Σημείο Τήξεως 190-192 °C. Rf = 0.25 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 7:3).

$$[\alpha]_D^{22} = +9^\circ \quad (c = 0.3 \text{ μεθανόλη})$$

λ_{\max} 258 nm (ϵ 19021), 263 nm (ϵ 18757)

ESI-MS (m/z): 498 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₈H₂₀FN₇O₉) C, H, N

Υπολ. (%) C : 43.47 H : 4.05 N : 19.71

Ευρ. (%) C : 43.53 H : 4.12 N : 19.65

¹H-NMR (300 MHz, DMSO):

δ 11.75 (br s, 1H, NH), 11.25 (br s, 1H, NH), 8.01 (s, 1H, Triazole H), 7.75 (d, 1H, $J_{6,F5} = 6.6$ Hz, H-6 FUr), 7.74 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.1$ Hz, H-6 Ur), 5.84 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.5$ Hz, H-1'), 5.63 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.1$ Hz, H-5 Ur), 5.34 (s, 1H, OH), 4.97 (d, 1H, H-2'), 4.73-4.47 (m, 4H, H-4', CH₂ και OH), 4.06 (t, 2H, $J = 5.6$ Hz, CH₂), 3.93 (t, 1H, $J = 6.2$ Hz, OH), 3.82-3.42 (m, 4H, H-5', H-6a', H-6b' και OH).

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO)

δ 163.30, 157.75, 151.29, 150.65, 149.89, 141.81, 139.85, 130.16, 125.02, 102.09, 80.55, 77.80, 75.61, 71.37, 70.02, 61.58, 48.18, 47.51.

1-{2',4',6'-Τρις-Ο-ακετυλο-3'-C-[1-[(θυμιν-1-υλο)αιθυλο]-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]-β-D-αλλοπυρανοζυλο}ουρακίλη (7η)

Ο δικέφαλος νουκλεοζίτης **7η** συντίθεται από τον ακετυλιωμένο αιθυνολο νουκλεοζίτη της ουρακίλης **4β** και το αζίδιο της θυμίνης **6γ** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **7α**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9.5:0.5), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **7η** (95 mg, 77%), με λευκή αφρώδη υφή. $R_f = 0.48$ (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 9:1).

$[\alpha]_D^{22} = +2^\circ$ (c = 0.5 χλωροφόρμιο)

λ_{max} 261 nm (ϵ 12865)

ESI-MS (m/z): 620 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₅H₂₉N₇O₁₂) C, H, N

Υπολ. (%) C : 48.47 H : 4.72 N : 15.83

Ευρ. (%) C : 48.56 H : 4.84 N : 15.89

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 9.75 (br s, 1H, NH), 9.46 (br s, 1H, NH), 7.45 (d, 1H, $J_{5,6} = 7.8$ Hz, H-6 Ur), 7.44 (s, 1H, Triazole H), 6.75 (s, 1H, H-6 Thy), 6.21 (d, 1H, $J_{1',2'} = 8.7$ Hz, H-1'), 5.79 (d, 1H, H-5 Ur), 5.36 (d, 1H, H-2'), 4.92 (d, 1H, $J_{4',5'} = 9.8$ Hz, H-4'), 4.73-4.67 (m, 2H, CH₂), 4.41-4.36 (m, 1H, H-5'), 4.29-4.09 (m, 4H, CH₂, H-6a', H-6b'), 1.92, 1.90, 1.81 (3s, 9H, 3OAc), 1.69 (s, 3H, 5-CH₃ Thy).

1-{3'-C-[1-[(Θυμιν-1-υλο)αιθυλο]-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]-β-D-αλλοπυρανοζυλο}ουρακίλη (8η)

Ο τελικός νουκλεοζίτης **8η** συντίθεται από τον ακετυλιωμένο δικέφαλο νουκλεοζίτη **7η** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **8α**. Το στερεό υπόλειμμα καθαρίζεται με ανακρυστάλλωση με μεθανόλη και σταγόνες διχλωρομεθανίου,

οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **8η** (65 mg, 86%), υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων. Σημείο Τήξεως 146-148 °C. Rf = 0.26 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 7:3).

$[\alpha]_D^{22} = +2^\circ$ (c = 0.2 μεθανόλη)

λ_{\max} 258 nm (ϵ 21045), 269 (ϵ 17681)

ESI-MS (m/z): 498 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₉H₂₃N₇O₉) C, H, N

Υπολ. (%) C : 46.25 H : 4.70 N : 19.87

Ευρ. (%) C : 46.34 H : 4.73 N : 19.86

¹H-NMR (300 MHz, DMSO, 50 °C):

δ 11.30 (br s, 2H, NH), 7.95 (s, 1H, Triazole H), 7.67 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.1$ Hz, H-6 Ur), 7.05 (s, 1H, H-6 Thy), 5.81 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.3$ Hz, H-1'), 5.62 (d, 1H, H-5 Ur), 5.31 (br s, 1H, OH), 4.75 (br s, 1H, OH), 4.62 (t, 2H, $J = 6.1$ Hz, CH₂), 4.50-4.22 (m, 2H, H-2' και OH), 4.08 (t, 2H, $J = 6.1$ Hz, CH₂), 3.98-3.48 (m, 5H, H-4', H-5', H-6a', H-6a' και OH). 1.64 (s, 3H, 5-CH₃ Thy).

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO)

δ 164.35, 163.16, 151.04, 150.89, 150.42, 141.58, 141.06, 124.66, 108.82, 101.86, 80.29, 77.51, 75.33, 71.08, 69.78, 61.29, 47.72, 47.61, 11.70.

III.3 Σύνθεση των 3'-C-κυανο και 3'-C-κυανο-3'-δεοξυ πυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων

III.3.1 Σύνθεση της 1,2,3,4,6-πεντα-Ο-ακετυλο-3-С-κυανο-D-γλυκοπυρανόζης (11)

1,2:5,6-Δις-Ο-ισοπροπυλιδενο-3-С-κυανο-α-D-γλυκοφουρανόζη (9)

Σε διάλυμα της 1,2:5,6-δις-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-ριβοεξοφουρανοζο-3-ουλόζης (1) (4 g, 15.50 mmol) σε διαιθυλαιθέρα (124 mL) και νερό (62 mL), προστίθενται, όξινο ανθρακικό νάτριο (2.6 g, 31.0 mmol) και κυανιούχο νάτριο (0.76 g, 15.50 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται έντονα σε θερμοκρασία δωματίου για 16 h. Ακολουθεί διαχωρισμός των δυο φάσεων και η υδατική φάση εκχυλίζεται με διαιθυλαιθέρα (2 x 124 mL). Οι οργανικές φάσεις ενώνονται και ξηραίνονται υπεράνω άνυδρου Na₂SO₄. Εν συνεχεία, ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό και το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα οξικό αιθυλεστέρα / *n*-εξάνιο (3:7), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **9** (4.28 g, 97%) υπό τη μορφή λευκού στερεού. Σημείο Τήξεως 98-100 °C (Rosenthal, Cliff. 1976). R_f = 0.40 (οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο 3:7).

$$[\alpha]_D^{22} = +46^\circ \quad (c = 0.3 \text{ χλωροφόρμιο})$$

ESI-MS (*m/z*): 286 (M+H⁺)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 5.97 (d, 1H, *J*_{1,2} = 3.4 Hz, H-1), 4.59 (d, 1H, H-2), 4.36–4.32 (m, 1H, H-5), 4.24–4.21 (m, 2H, H-6a, H-4), 4.11 (m, 1H, H-6b), 4.04 (s, 1H, 3-OH), 1.58, 1.55, 1.39, 1.37 (4s, 12H, 4CH₃).

3-С-Κυανο-D-γλυκοπυρανόζη (10)

Ένα διάλυμα της ένωσης **9** (2 g, 7.01 mmol) σε MeOH (10.9 mL) και νερό (62.2 mL) αναδεύεται στους 65-70 °C με ρητίνη Amberlite IR-120 (H⁺) (7.52 g). Μετά από 24h το προκύπτον εναιώρημα διηθείται και από το

διήθημα απομακρύνονται οι διαλύτες υπό κενό. Το επιθυμητό προϊόν **10** (1.25 g, 87%) παραλαμβάνεται υπό τη μορφή παχύρρευστου ελαίου και χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. $R_f = 0.33$ (οξικός αιθυλεστέρας / μεθανόλη 3:7).

$$[\alpha]_D^{22} = -25^\circ \quad (c = 0.4 \text{ μεθανόλη})$$

ESI-MS (m/z): 206 (M+H⁺)

1,2,3,4,6-Πεντακίς-Ο-ακετυλο-3-С-κυανο-β-D-γλυκοπυρανόζη (11)

Σε διάλυμα του κυανο σακχάρου **10** (1.25 g, 6.09 mmol) σε πυριδίνη (21.2 mL) προστίθεται Ac₂O (10.9 mL) και το προκύπτον εναιώρημα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1h. Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC) το διάλυμα ψύχεται στους 0 °C, και προστίθεται μεθανόλη (6 mL). Στη συνέχεια, οι διαλύτες απομακρύνονται υπό κενό, το υπόλειμμα διαλύεται σε διχλωρομεθάνιο και εκχυλίζεται αρχικά με κορεσμένο διάλυμα NaHSO₄ και στη συνέχεια με κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃. Η οργανική φάση ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου Na₂SO₄ και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το επιθυμητό προϊόν **11** (2.28 g, 90%) παραλαμβάνεται ως παχύρρευστο έλαιο και χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. $R_f = 0.43$ (οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο 3:7).

$$[\alpha]_D^{22} = +30^\circ \quad (c = 1.3 \text{ χλωροφόρμιο})$$

ESI-MS (m/z): 416 (M+H⁺)

III.3.2 Σύνθεση των 3'-C-κυανο-β-D-γλυκοπυρανονουκλεοζιτών 13α-δ

1-(2',3',4',6'-Τετρα-Ο-ακετυλο-3'-C-κυανο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-φθοροουρακίλη (12α)

Σε διάλυμα 5-φθοροουρακίλης (109 mg, 0.84 mmol) σε άνυδρο CH₃CN (3.5 mL) προστίθεται HMDS (220 μL, 1.04 mmol) και σακχαρίνη (7 mg, 0.039 mmol), και το προκύπτον εναιώρημα αναδεύεται στους 120 °C με κάθετο

ψυκτήρα για 30 min. Αφότου το μίγμα γίνει διαυγές, προστίθεται 1,2,3,4,6-πεντακίς-Ο-ακετυλο-3-*C*-κυανο-*D*-γλυκοπυρανόζη (**11**) (0.25 g, 0.6 mmol) και $\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$ (152 μL , 0.84 mmol), και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για τέσσερις επιπλέον ώρες με κάθετο ψυκτήρα στους 90 °C υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Στη συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου, εξουδετερώνεται με κορεσμένο διάλυμα NaHCO_3 και εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο (200 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο Na_2SO_4 και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο (4:6), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **12a** (0.18 g, 60%), υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων. Σημείο Τήξεως 114–116 °C. $R_f = 0.47$ (οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο 1:1). $[\alpha]_D^{22} = -2^\circ$ (c = 0.4 χλωροφόρμιο)

λ_{max} 262 nm (ϵ 7950)

ESI-MS (*m/z*): 486 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Στοιχειακή Ανάλυση: ($\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{FN}_3\text{O}_{11}$) C, H, N

Υπολ. (%)	C : 47.02	H : 4.15	N : 8.66
Ευρ. (%)	C : 47.22	H : 4.21	N : 8.79

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3)

δ 8.36 (br s, 1H, NH), 7.37 (d, 1H, $J_{6,\text{F5}} = 5.6$ Hz, H-6), 6.05 (dd, 1H, $J_{1',2'} = 9.5$ Hz, $J_{1',\text{F5}} = 1.2$ Hz, H-1'), 5.70 (d, 1H, H-2'), 5.64 (d, 1H, $J_{4',5'} = 10.2$ Hz, H-4'), 4.45–4.39 (m, 1H, H-5'), 4.22–4.14 (m, 2H, H-6a', H-6b'), 2.16, 2.14, 2.11, 2.04 (4s, 12H, 4OAc).

1-(3'-*C*-Κυανο- β -*D*-γλυκοπυρανοζυλο)-5-φθοροουρακίλη (**13a**)

Διάλυμα της ένωσης **12a** (0.18 g, 0.37 mmol) σε μεθανολική αμμωνία (κορεσμένη στους 0 °C, 20.6 mL) αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 h. Ο διαλύτης στη συνέχεια απομακρύνεται υπό κενό και το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη

έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **13α** (76 mg, 65%), με λευκή αφρώδη υφή. Rf = 0.40 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 8:2).

$[\alpha]_D^{22} = +20^\circ$ (c = 0.5 μεθανόλη)

λ_{\max} 266 nm (ϵ 7739)

ESI-MS (m/z): 318 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₁H₁₂FN₃O₇) C, H, N

Υπολ. (%) C : 41.65 H : 3.81 N : 13.25

Ευρ. (%) C : 41.94 H : 3.71 N : 13.51

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD)

δ 7.95 (d, 1H, $J_{6,F5} = 6.7$ Hz, H-6), 6.01 (dd, 1H, $J_{1',2'} = 10.3$ Hz, $J_{1',F5} = 1.3$ Hz, H-1'), 3.94–3.67 (m, 5H, H-2', H-4', H-5', H-6a', H-6b').

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD)

δ 159.22, 151.38, 139.15, 127.52, 119.28, 88.32, 79.01, 71.93, 71.70, 68.18, 61.37.

IR (Nujol, cm⁻¹): 2230 (CN).

1-(2',3',4',6'-Τετρακίς-Ο-ακετυλο-3'-C-κυανο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο) ουρακίλη (12α)

Το παράγωγο της ουρακίλης **12β** συντίθεται από το σάκχαρο **11** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **12α** από την ένωση **11**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο (4:6), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **12β** (0.17 g, 61%), υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων. Σημείο Τήξεως 190–192 °C. Rf = 0.29 (οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο 1:1).

$[\alpha]_D^{22} = -7^\circ$ (c = 0.7 χλωροφόρμιο)

λ_{\max} 260 nm (ϵ 5777)

ESI-MS (m/z): 468 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₉H₂₁N₃O₁₁) C, H, N

Υπολ. (%) C : 48.83 H : 4.53 N : 8.99

Ευρ. (%) C : 48.65 H : 4.11 N : 8.79

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 8.34 (br s, 1H, NH), 7.33 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.1$ Hz, H-6), 6.09 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.5$ Hz, H-1'), 5.85 (d, 1H, H-5), 5.79 (d, 1H, H-2'), 5.68 (d, 1H, $J_{4',5'} = 10.2$ Hz, H-4'), 4.46–4.42 (m, 1H, H-5'), 4.22–4.17 (m, 2H, H-6a', H-6b'), 2.19, 2.14, 2.12, 2.07 (4s, 12H, 4OAc).

1-(3'-C-Κυανο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)ουρακίλη (13β)

Το παράγωγο της ουρακίλης **13β** συντίθεται από το ακετυλιωμένο νουκλεοζίτη **12β** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **13α**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **13β** (70 mg, 64%), με λευκή αφρώδη υφή. $R_f = 0.29$ (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 8:2).

$[\alpha]_D^{22} = +7^\circ$ (c = 0.3 μεθανόλη)

λ_{\max} 258 nm (ϵ 11306)

ESI-MS (m/z): 300 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₁H₁₃N₃O₇) C, H, N

Υπολ. (%) C : 44.15 H : 4.38 N : 14.04

Ευρ. (%) C : 43.90 H : 4.28 N : 13.96

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD)

δ 7.70 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.0$ Hz, H-6), 6.01 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.0$ Hz, H-1'), 5.70 (d, 1H, H-5), 3.97–3.54 (m, 5H, H-2', H-4', H-5', H-6a', H-6b').

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD)

δ 164.12, 150.23, 141.44, 119.01, 102.6, 92.22, 79.68, 72.12, 70.9, 68.35, 61.32.

IR (Nujol, cm⁻¹): 2240 (CN).

1-(2',3',4',6'-Τετρακίς-Ο-ακετυλο-3'-C-κυανο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)θυμίνη (12γ)

Το παράγωγο της θυμίνης **12γ** συντίθεται από το σάκχαρο **11** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **12α** από την ένωση **11**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο (4:6), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **12γ** (0.16 g, 57%), υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων. Σημείο Τήξεως 127–129 °C. R_f = 0.34 (οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο 1:1).

$[\alpha]_D^{22} = -4^\circ$ (c = 0.4 χλωροφόρμιο)

λ_{\max} 259 nm (ε 9402)

ESI-MS (*m/z*): 482 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₀H₂₃N₃O₁₁) C, H, N

Υπολ. (%) C : 49.90 H : 4.82 N : 8.73

Ευρ. (%) C : 49.62 H : 4.58 N : 8.71

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 8.34 (br s, 1H, NH), 7.01 (s, 1H, H-6), 6.08 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.6$ Hz, H-1'), 5.80 (d, 1H, H-2'), 5.67 (d, 1H, $J_{4',5'} = 10.2$ Hz, H-4'), 4.47–4.38 (m, 1H, H-5'),

4.23–4.13 (m, 2H, H-6a', H-6b'), 2.18, 2.14, 2.12, 2.07 (4s, 12H, 4OAc), 1.97 (s, 3H, CH₃).

1-(3'-C-Κυανο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)θυμίνη (13γ)

Το παράγωγο της θυμίνης **13γ** συντίθεται από το ακετυλιωμένο νουκλεοζίτη **12β** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **13α**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **13γ** (114 mg, 71%), με λευκή αφρώδη υφή. R_f = 0.32 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 8:2).

$[\alpha]_D^{22} = +4^\circ$ (c = 0.3 μεθανόλη)

λ_{\max} 261 nm (ε 4238)

ESI-MS (m/z): 314 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₂H₁₅N₃O₇) C, H, N

Υπολ. (%) C : 46.01 H : 4.83 N : 13.41

Ευρ. (%) C : 45.79 H : 4.61 N : 13.26

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD)

δ 7.57 (s, 1H, H-6), 6.03 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.0$ Hz, H-1'), 4.00–3.67 (m, 5H, H-2', H-4', H-5', H-6a', H-6b'), 1.91 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD)

δ 162.62, 150.49, 137.12, 119.91, 110.69, 92.76, 79.83, 71.01, 70.90, 69.81, 62.46, 13.33.

IR (Nujol, cm⁻¹): 2245 (CN).

1-(2',3',4',6'-Τετρακίς-Ο-ακετυλο-3'-C-κυανο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-N⁴-βενζοϋλοκυτοσίνη (12δ)

Το παράγωγο της N⁴-βενζοϋλοκυτοσίνης **12δ** συντίθεται από το σάκχαρο **11** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **12α** από την ένωση **11**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο (4:6), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **12δ** (0.19 g, 56%), υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων. Σημείο Τήξεως 240–242 °C. R_f = 0.32 (οξικός αιθυλεστέρας/ *n*-εξάνιο 1:1).

$$[\alpha]_D^{22} = -5^\circ \quad (c = 0.4 \text{ χλωροφόρμιο})$$

$$\lambda_{\max} 263 \text{ nm } (\epsilon 25940)$$

ESI-MS (*m/z*): 571 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₆H₂₆N₄O₁₁) C, H, N

Υπολ. (%) C : 54.74 H : 4.59 N : 9.82

Ευρ. (%) C : 54.61 H : 4.65 N : 9.71

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 7.95-7.49 (m, 7H, Bz, H-5 και H-6), 6.37 (d, 1H, *J*_{1',2'} = 9.4 Hz, H-1'), 5.82 (d, 1H, H-2'), 5.67 (d, 1H, *J*_{4',5'} = 10.0 Hz, H-4'), 4.48–4.40 (m, 1H, H-5'), 4.28–4.14 (m, 2H, H-6a', H-6b'), 2.18, 2.14, 2.11, 2.05 (4s, 12H, 4OAc).

1-(3'-C-Κυανο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)κυτοσίνη (13δ)

Το παράγωγο της κυτοσίνης **13δ** συντίθεται από το προστατευμένο νουκλεοζίτη **12δ** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **13α**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **13δ** (61 mg, 61%), με λευκή αφρώδη υφή. R_f = 0.23 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 7:3).

$$[\alpha]_D^{22} = -3^\circ \quad (c = 0.3 \text{ μεθανόλη})$$

λ_{\max} 269 nm (ϵ 7569)

ESI-MS (m/z): 299 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₁H₁₄N₄O₆) C, H, N

Υπολ. (%) C : 44.30 H : 4.73 N : 18.79

Ευρ. (%) C : 44.48 H : 4.58 N : 18.96

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD)

δ 7.70 (d, 1H, $J_{5,6} = 7.5$ Hz, H-6), 6.12 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.0$ Hz, H-1'), 5.94 (d, 1H, H-5), 4.00–3.69 (m, 5H, H-2', H-4', H-5', H-6a', H-6b').

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD)

δ 165.72, 156.91, 143.22, 119.16, 94.96, 91.37, 79.96, 72.01, 70.28, 68.16, 61.92.

IR (Nujol, cm⁻¹): 2235 (CN).

III.3.3 Σύνθεση της 3-δεοξυ-1,2,4,6-τετρακίς-Ο-ακετυλο-3-С-κυανο-D-αλλοπυρανόζης (17)

3-Δεοξυ-1,2:5,6-δισ-Ο-ισοπροπυλιδενό-3-С-κυανο-α-D-αλλοφουρανόζη (15)

Σε διάλυμα της κυανυδρίνης **9** (2 g, 7.01 mmol) σε άνυδρο CH₃CN (46 mL), προστίθενται διαδοχικά DMAP (3.03 mmol, 0.37 g) και Et₃N (1.47 mL, 10.69 mmol) και στο εναιώρημα που προκύπτει προστίθεται στάγδην το PhOC(S)Cl (1.39 mL, 10.33 mmol) σε παγόλουτρο, υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Το προκύπτον διάλυμα συνεχίζει ν' αναδεύεται στους 0 °C για περίπου μία ώρα μέχρι το πέρας της αντίδρασης (έλεγχος με TLC). Εν συνεχεία η αντίδραση αραιώνεται με οξικό αιθυλεστέρα (500 mL) και εκχυλίζεται τρεις φορές με νερό (1 x 150 mL). Κατόπιν η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄ και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το υπόλειμα **14** συμπυκνώνεται αρχικά δυο φορές με άνυδρο τολουόλιο, διαλύεται έπειτα σε

τολουόλιο (74.0 mL) και ακολουθεί απαέρωση του μείγματος με άζωτο για 30 λεπτά. Στο διάλυμα προστίθενται Bu_3SnH (2.93 mL, 11.06 mmol) και AIBN (1.1 mmol, 182 mg) και το προκύπτων εναιώρημα θερμαίνεται στους 100 °C για 45 λεπτά υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Στη συνέχεια το διάλυμα ψύχεται, ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό και ακολουθεί καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο (3:7), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **15** (1.43 g, 76%), υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων. Σημείο Τήξεως 104–106 °C. $R_f = 0.44$ (οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο 3:7).

$$[\alpha]_D^{22} = +16^\circ \quad (c = 0.4 \text{ χλωροφόρμιο})$$

ESI-MS (*m/z*): 270 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Στοιχειακή Ανάλυση: ($\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{NO}_5$) C, H, N

Υπολ. (%)	C : 57.98	H : 7.11	N : 5.20
Ευρ. (%)	C : 58.12	H : 7.20	N : 5.41

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3)

δ 5.81 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.7$ Hz, H-1), 4.76 (dd, 1H, $J_{2,3} = 4.8$ Hz, H-2), 4.21- 3.94 (m, 4H, H-4, H-5, H-6a, H-6b), 2.88 (dd, 1H, H-3), 1.51 (s, 3H, CH_3), 1.42 (s, 3H, CH_3), 1.33 (s, 6H, 2 CH_3).

3-Δεοξυ-3-C-κυανο-α-D-αλλοπυρανόζη (**16**)

Το κυανο σάκχαρο **16** συντίθεται από την ένωση **15** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **10**. Το επιθυμητό προϊόν **16** (0.92 g, 92%) παραλαμβάνεται υπό τη μορφή παχύρρευστου ελαίου και χρησιμοποιείται χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. $R_f = 0.17$ (οξικός αιθυλεστέρας).

$$[\alpha]_D^{22} = +6^\circ \quad (c = 0.5 \text{ μεθανόλη})$$

ESI-MS (*m/z*): 190 ($\text{M}+\text{H}^+$)

1,2,4,6-Τετρα-Ο-ακετυλο-3-δεοξυ-3-C-κυανο-D-αλλοπυρανόζη (17)

Το ακετυλιωμένο σάκχαρο **17** συντίθεται από την ένωση **16** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **11**. Το επιθυμητό προϊόν **17** (1.56 g, 89%) παραλαμβάνεται ως παχύρρευστο έλαιο και χρησιμοποιείται χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Rf = 0.43 (οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο 3:7).

$$[\alpha]_D^{22} = -2^\circ \quad (c = 0.6 \text{ χλωροφόρμιο})$$

ESI-MS (*m/z*): 358 (M+H⁺)

III.3.4 Σύνθεση των 3'-δεοξυ-3'-C-κυανο-D-αλλοπυρανονουκλεοζιτών 19α-δ**1-(2',4',6'-Τρις-Ο-ακετυλο-3'-3'-δεοξυ-C-κυανο-β-D-αλλοπυρανοζυλο)-5-φθοροουρακίλη (18α)**

Σε διάλυμα 5-φθοροουρακίλης (126 mg, 0.97 mmol) σε άνυδρο CH₃CN (3.5 mL) προστίθεται HMDS (254 μL, 1.20 mmol) και σακχαρίνη (8 mg, 0.045 mmol), και το προκύπτον εναιώρημα αναδεύεται με κάθετο ψυκτήρα για 30 min. Αφού το μίγμα γίνει διαυγές, προστίθεται 3-δεοξυ-1,2,4,6-τετρα-Ο-ακετυλο-3-C-κυανο-D-αλλοπυρανόζη (**17**) (0.25 g, 0.69 mmol) και Me₃SiOSO₂CF₃ (152 μL, 0.84 mmol), και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για τέσσερις επιπλέον ώρες με κάθετο ψυκτήρα στους 85 °C υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Στη συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου, εξουδετερώνεται με κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃ και εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο (200 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄ και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο (4:6), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **18α** (0.19 g, 64%), υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων. Σημείο Τήξεως 108–110 °C. Rf = 0.33 (οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο 1:1).

$$[\alpha]_D^{22} = -2^\circ \quad (c = 0.3 \text{ χλωροφόρμιο})$$

λ_{\max} 263 nm (ϵ 9073)

ESI-MS (m/z): 428 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₇H₁₈FN₃O₉) C, H, N

Υπολ. (%) C : 47.78 H : 4.25 N : 9.83

Ευρ. (%) C : 47.56 H : 4.31 N : 9.79

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 8.58 (br s, 1H, NH), 7.18 (d, 1H, $J_{6,F5} = 5.6$ Hz, H-6), 5.93 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.4$ Hz, H-1'), 4.92 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 5.0$ Hz, H-2'), 5.79 (dd, 1H, $J_{3',4'} = 4.9$ Hz, $J_{4',5'} = 9.7$ Hz, H-4'), 4.21–4.06 (m, 3H, H-6a', H-6b', H-5'), 3.89 (t, 1H, H-3'), 2.03, 1.98, 1.96, (3s, 9H, 3OAc).

1-(3'-Δεοξυ-3'-C-κυανο-β-D-αλλοπυρανοζυλο)-5-φθορουρακίλη (19a)

Σε διάλυμα της ένωσης **18a** (0.19 g, 0.44 mmol) σε οξικό οξύ-πυριδίνη (2.2 mL, 1:4 v/v) προστίθεται ένυδρη υδραζίνη και το μείγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 16 h. Ο διαλύτης κατόπιν απομακρύνεται υπό κενό και το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **19a** (86 mg, 65%), με λευκή αφρώδη υφή. $R_f = 0.26$ (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 8:2).

$[\alpha]_D^{22} = -8^\circ$ (c = 0.7 μεθανόλη)

λ_{\max} 263 nm (ϵ 8929)

ESI-MS (m/z): 302 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₁H₁₂FN₃O₆) C, H, N

Υπολ. (%) C : 43.86 H : 4.02 N : 13.95

Ευρ. (%) C : 43.74 H : 3.94 N : 13.82

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD)

δ 7.80 (d, 1H, $J_{6,F5} = 6.5$ Hz, H-6), 5.78 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.2$ Hz, H-1'), 4.46–4.42 (m, 1H, H-5'), 4.23 (dd, 1H, $J_{3',4'} = 5.6$ Hz, $J_{4',5'} = 12.1$ Hz, H-4'), 4.05 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 5.1$ Hz, H-2'), 3.95–3.84 (m, 2H, H-6a', H-6b'), 3.75 (t, 1H, H-3').

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD)

δ 158.09, 150.72, 141.39, 128.03, 118.43, 96.49, 84.37, 67.33, 64.11, 61.09, 29.12.

IR (Nujol, cm⁻¹): 2250 (CN).

1-(3'-Δεοξυ-2',4',6'-τρις-Ο-ακετυλο-3'-C-κυανο-β-D-αλλοπυρανοζυλο) ουρακίλη (18β)

Το παράγωγο της ουρακίλης **18β** συντίθεται από το ακετυλιωμένο κυανο σάκχαρο **17** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **18α** από την ένωση **17**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο (1:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **18β** (0.18 g, 62%), υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων. Σημείο Τήξεως 124–126 °C. R_f = 0.20 (οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο 1:1).

$[\alpha]_D^{22} = -2^\circ$ (c = 0.3 χλωροφόρμιο)

λ_{\max} 256 nm (ε 13439)

ESI-MS (m/z): 410 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₇H₁₉N₃O) C, H, N

Υπολ. (%) C : 49.88 H : 4.68 N : 10.27

Ευρ. (%) C : 49.65 H : 4.51 N : 10.36

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 8.27 (br s, 1H, NH), 7.25 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.2$ Hz, H-6), 6.11 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.6$ Hz, H-1'), 5.80 (d, 1H, H-5), 5.12 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 5.2$ Hz, H-2'), 4.96 (dd, 1H,

$J_{3',4'} = 5.0$ Hz, $J_{4',5'} = 9.6$ Hz, H-4'), 4.38-4.23 (m, 3H, H-6a', H-6b', H-5'), 4.06 (t, 1H, H-3'), 2.20, 2.15, 2.12 (s, 9H, 3OAc).

1-(3'-Δεοξυ -3'-C-κυανο-β-D-αλλοπυρανοζυλο)ουρακίλη (19β)

Το παράγωγο της ουρακίλης **19β** συντίθεται από το ακετυλιωμένο νουκλεοζίτη **18β** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **19α**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **19β** (91 mg, 75%), με λευκή αφρώδη υφή. Rf = 0.20 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 9:1).

$[\alpha]_D^{22} = -22^\circ$ (c = 0.8 μεθανόλη)

λ_{\max} 261 nm (ϵ 15441)

ESI-MS (m/z): 284 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₁H₁₃N₃O₆) C, H, N

Υπολ. (%) C : 46.65 H : 4.63 N : 14.84

Ευρ. (%) C : 46.96 H : 4.78 N : 14.75

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD)

δ 7.61 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.1$ Hz, H-6), 5.82 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.3$ Hz, H-1'), 5.72 (d, 1H, H-5), 4.46–4.42 (m, 1H, H-5'), 4.23 (dd, 1H, $J_{3',4'} = 5.4$ Hz, $J_{4',5'} = 12.1$ Hz, H-4'), 4.08 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 5.1$ Hz, H-2'), 3.99–3.84 (m, 2H, H-6a', H-6b'), 3.76 (t, 1H, H-3').

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD)

δ 164.01, 150.12, 142.27, 118.96, 102.13, 98.17, 83.96, 66.89, 63.01, 61.20, 30.87.

R (Nujol, cm⁻¹): 2245 (CN).

1-(3'-Δεοξυ-2',4',6'-τρις-Ο-ακετυλο-3'-C-κυανο-β-D-αλλοπυρανοζυλο)θυμίνη (18γ)

Το παράγωγο της θυμίνης **18γ** συντίθεται από το ακετυλιωμένο κυανοσάκχαρο **17** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **18α** από την ένωση **17**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο (1:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **18γ** (0.19 g, 68%), υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων. Σημείο Τήξεως 106–108 °C. Rf = 0.25 (οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο 1:1).

$$[\alpha]_D^{22} = -4^\circ \quad (c = 0.3 \text{ χλωροφόρμιο})$$

λ_{\max} 261 nm (ϵ 7290)

ESI-MS (*m/z*): 424 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₈H₂₁N₃O₉) C, H, N

Υπολ. (%) C : 51.06 H : 5.00 N : 9.93

Ευρ. (%) C : 50.87 H : 4.96 N : 9.87

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 8.26 (br s, 1H, NH), 7.04 (s, 1H, H-6), 6.1 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.7$ Hz, H-1'), 5.12 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 5.2$ Hz, H-2'), 5.67 (dd, 1H, $J_{3',4'} = 4.9$ Hz, $J_{4',5'} = 9.6$ Hz, H-4'), 4.38–4.23 (m, 3H, H-6a', H-6b', H-5'), 4.06 (t, 1H, H-3'), 2.19, 2.13, 2.12 (3s, 9H, 3OAc), 1.96 (s, 3H, 5-CH₃).

1-(3'-Δεοξυ-3'-C-κυανο-β-D-αλλοπυρανοζυλο)θυμίνη (19γ)

Το παράγωγο της θυμίνης **19γ** συντίθεται από το ακετυλιωμένο νουκλεοζίτη **18γ** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **19α**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **19γ** (99 mg, 71%), με λευκή αφρώδη υφή. Rf = 0.20 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 9:1).

$[\alpha]_D^{22} = -16^\circ$ (c = 0.5 μεθανόλη)

λ_{\max} 262 nm (ϵ 14609)

ESI-MS (m/z): 298 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₂H₁₅N₃O₆) C, H, N

Υπολ. (%) C : 48.48 H : 5.09 N : 14.14

Ευρ. (%) C : 48.82 H : 5.12 N : 14.09

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD)

δ 7.40 (s, 1H, H-6), 5.77 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.4$ Hz, H-1'), 4.46–4.42 (m, 1H, H-5'), 4.24 (dd, 1H, $J_{3',4'} = 5.6$ Hz, $J_{4',5} = 12.0$ Hz, H-4'), 4.11 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 5.1$ Hz, H-2'), 3.99–3.84 (m, 2H, H-6a', H-6b), 3.70 (t, 1H, H-3'), 1.91 (s, 3H, 5-CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD)

δ 163.67, 150.19, 136.85, 119.01, 110.63, 97.67, 84.15, 67.29, 64.55, 61.30, 28.02, 12.68.

IR (Nujol, cm⁻¹): 2240 (CN).

1-(3'-Δεοξυ-2',4',6'-τρις-Ο-ακετυλο-3'-C-κυανο-β-D-αλλοπυρανοζυλο)-N⁴-βενζοϋλοκυτοσίνη (18δ)

Το παράγωγο της N⁴-βενζοϋλοκυτοσίνης **18δ** συντίθεται από το ακετυλιωμένο κυανο σάκχαρο **17** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **18α** από την ένωση **17**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο (1:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **18δ** (0.21 g, 59%), υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων. Σημείο Τήξεως 203–205 °C. R_f = 0.23 (οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο 1:1).

$[\alpha]_D^{22} = +2^\circ$ (c = 0.3 χλωροφόρμιο)

λ_{\max} 264 nm (ϵ 14496)

ESI-MS (*m/z*): 513 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₄H₂₄N₄O₉) C, H, N

Υπολ. (%) C : 56.25 H : 4.72 N : 10.93

Ευρ. (%) C : 56.64 H : 4.69 N : 10.68

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 7.94-7.51 (m, 7H, Bz, H5 και H-6), 6.40 (d, 1H, $J_{1',2'}$ = 9.6 Hz, H-1'), 5.17 (dd, 1H, $J_{2',3'}$ = 5.2 Hz, H-2'), 5.01 (dd, 1H, $J_{3',4'}$ = 5.0 Hz, $J_{4',5'}$ = 9.9 Hz, H-4'), 4.41–4.24 (m, 3H, H-6a', H-6b', H-5'), 4.06 (t, 1H, H-3'), 2.19, 2.14, 2.11 (3s, 9H, 3OAc).

1-(3'-Δεοξυ-3'-C-κυανο-β-D-αλλοπυρανοζυλο)κυτοσίνη (19δ)

Το παράγωγο της κυτοσίνης **19δ** συντίθεται από το ακετυλιωμένο νουκλεοζίτη **18δ** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **19α**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **19δ** (33 mg, 55%), με λευκή αφρώδη υφή. R_f = 0.25 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 7:3).

$[\alpha]_D^{22} = -6^\circ$ (c = 0.5 μεθανόλη)

λ_{\max} 266 nm (ε 12306)

ESI-MS (*m/z*): 283 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₁H₁₄N₄O₅) C, H, N

Υπολ. (%) C : 46.81 H : 5.00 N : 19.85

Ευρ. (%) C : 46.56 H : 4.78 N : 19.41

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD)

δ 7.68 (d, 1H, $J_{5,6}$ = 7.5 Hz, H-6), 5.97 (d, 1H, H-5), 5.89 (d, 1H, $J_{1',2'}$ = 9.0 Hz, H-1'), 4.13–3.74 (m, 6H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6a', H-6b').

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD)

δ 165.79, 155.73, 143.46, 118.86, 96.37, 94.96, 84.01, 67.38, 63.71, 61.32, 27.83.

IR (Nujol, cm^{-1}): 2235 (CN).

III.4 Σύνθεση των 4'-C-κυανο και 4'-C-κυανο-4'-δεοξυπυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων

III.4.1 Σύνθεση της 1-(4'-C-κυανο- α -D-μαννοπυρανοζυλο)-5-φθοροουρακίλης (31α)

1-(α -D-Μαννοπυρανοζυλο)-5-φθοροουρακίλη (21α)

Σε διάλυμα 5-φθοροουρακίλης (1.93 g, 14.8 mmol) σε άνυδρο CH_3CN (50.0 mL) προστίθεται HMDS (3.8 mL, 18.35 mmol) και σακχαρίνη (0.12 g, 0.7 mmol), και το προκύπτον εναιώρημα αναδεύεται με κάθετο ψυκτήρα για 30 min. Αφού το μίγμα γίνει διαυγές, προστίθεται 1,2,3,4,6-πεντα-Ο-ακετυλο-D-μαννοπυρανόζη (**20**) (4.12 g, 10.6 mmol) και $\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$ (2.7 mL, 14.8 mmol), και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για μία επιπλέον ώρα με κάθετο ψυκτήρα στους 90 °C υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Στη συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου, εξουδετερώνεται με κορεσμένο διάλυμα NaHCO_3 και εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο. Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο Na_2SO_4 και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα διαλύεται σε μεθανολική αμμωνία (κορεσμένη στους 0 °C, 590.0 mL) και αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 12 h. Ο διαλύτης στη συνέχεια απομακρύνεται υπό κενό και το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας / μεθανόλη (8:2), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **21α** (2.5 g, 75%), ως παχύρρευστο άχρωμο έλαιο. $R_f = 0.17$ (οξικός αιθυλεστέρας / μεθανόλη 8:2). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης **21α** είναι σε συμφωνία με αυτά που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία (Courtney S. 1999).

1-(2',3'-Ο-Ισοπροπυλιδενο-α-D-μαννοπυρανοζυλο)-5-φθοροουρακίλη (22α)

Σε διάλυμα του νουκλεοζίτη της φθοροουρακίλης **21a** (2.50 g, 8.6 mmol) σε άνυδρη ακετόνη (17.0 mL) προστίθεται $(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{OCH}_3)_2$ (17.0 mL) και *p*-TsOH (0.34 g, 1.8 mmol) και το προκύπτον εναιώρημα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Εν συνεχεία προστίθεται νερό (34.0 mL) και το μίγμα αναδεύεται για περίπου 16h. Μετά το πέρας της αντίδρασης (έλεγχος με TLC), προστίθεται τριαιθυλαμίνη μέχρι ουδετέρου pH (pH ≤ 7). Κατόπιν οι διαλύτες απομακρύνονται υπό κενό και το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **22α** (2.22 g, 78%), υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων. Σημείο Τήξεως 200–202 °C. Rf = 0.37 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 9:1).

$$[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +2^{\circ} \quad (c = 0.5 \text{ μεθανόλη})$$

$$\lambda_{\text{max}} 262 \text{ nm } (\epsilon 11076)$$

ESI-MS (*m/z*): 333 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₃H₁₇FN₂O₇) C, H, N

Υπολ. (%) C : 46.99 H : 5.16 N : 8.43

Ευρ. (%) C : 46.90 H : 5.29 N : 8.66

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 7.47 (d, 1H, $J_{6,\text{F5}} = 5.9 \text{ Hz}$, H-6), 5.70 (d, 1H, $J_{1',2'} = 7.8 \text{ Hz}$, H-1'), 4.51-4.41 (m, 2H, H-2', H-3'), 4.15 (t, 1H, $J_{3',4'} = J_{4',5'} = 7.1 \text{ Hz}$, H-4'), 3.89-3.75 (m, 3H, H-5', H-6a', H-6b), 1.53, 1.39 (2s, 6H, 2CH₃).

1-(2',3'-Ο-Ισοπροπυλιδενο-6'-Ο-τριτυλο-α-D-μαννοπυρανοζυλο)-5-φθοροουρακίλη (23α)

Σε διάλυμα της ένωσης **22α** (2.22 g, 6.7 mmol) σε άνυδρη πυριδίνη (34.0 mL), προστίθεται TiCl (2.43 g, 8.7 mmol) και καταλυτική ποσότητα

DMAP και το προκύπτον εναιώρημα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 16h περίπου υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Ακολουθεί προσθήκη μεθανόλης και στη συνέχεια οι διαλύτες απομακρύνονται υπό κενό. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο (1:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **23α** (2.22 g, 78%), ως παχύρρευστο άχρωμο έλαιο. R_f = 0.37 (οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο 1:1).

$[\alpha]_D^{22} = +10^\circ$ (c = 0.8 χλωροφόρμιο)

λ_{\max} 265 nm (ε 1048)

ESI-MS (m/z): 575 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₃₂H₃₁FN₂O₇) C, H, N

Υπολ. (%) C : 66.89 H : 5.44 N : 4.88

Ευρ. (%) C : 66.98 H : 5.27 N : 4.81

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 8.42 (br s, 1H, NH), 7.43-7.21 (m, 16H, 3C₆H₅, H-6), 5.77 (d, 1H, $J_{1',2'} = 5.4$ Hz, H-1'), 4.41-4.35 (m, 2H, H-2', H-3'), 4.22 (t, 1H, $J_{3',4'} = J_{4',5'} = 7.0$ Hz, H-4'), 3.87-3.79 (m, 1H, H-5'), 3.58-3.53 (m, 2H, H-6a', H-6b'), 1.50, 1.37 (2s, 6H, 2CH₃).

1-(2',3'-Ο-Ισοπροπυλιδενο-6'-Ο-τριτυλο-α-D-λυξο-εξωπυρανοζυλο-4'-υλοζο)-5-φθοροουρακίλη (**25α**)

Σε διάλυμα της ένωσης **23α** (2.69 g, 4.7 mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (47.0 mL) προστίθεται PDC (2.10 g, 5.6 mmol) και Ac₂O (1.3 mL, 13.9 mmol) και το προκύπτον εναιώρημα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 4h υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Εν συνεχεία το μείγμα της αντίδρασης καθαρίζεται απευθείας με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο (1:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **25α** (1.82 g, 68%), με λευκή αφρώδη υφή. R_f = 0.51 (οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο 1:1).

$[\alpha]_D^{22} = -4^\circ$ (c = 0.2 χλωροφόρμιο)

λ_{\max} 265 nm (ϵ 10487)

ESI-MS (m/z): 573 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₃₂H₂₉FN₂O₇) C, H, N

Υπολ. (%) C : 67.12 H : 5.11 N : 4.89

Ευρ. (%) C : 66.99 H : 5.22 N : 4.84

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 8.47 (br s, 1H, NH), 7.47-7.24 (m, 16H, 3C₆H₅, H-6), 5.73 (d, 1H, $J_{1',2'} = 4.7$ Hz, H-1'), 4.92 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 7.5$ Hz, H-2'), 4.74 (d, 1H, H-3'), 4.24 (dd, 1H, $J_{5',6a'} = 2.7$ Hz, $J_{5',6b'} = 5.3$ Hz, H-5'), 3.77 (dd, 1H, $J_{6a',6b'} = 10.6$ Hz, H-6a'), 3.49 (dd, 1H, H-6b'), 1.57, 1.43 (2s, 6H, 2CH₃).

1-(2',3'-Ο-Ισοπροπυλιδανο-4'-C-κυανο-6'-Ο-τριτυλο-α-D-μαννο πυρανοζυλο)-5-φθοροουρακίλη (27α)

Σε διάλυμα του κετοπυρανονουκλεοζίτη **25α** (1.82 g, 3.2 mmol) σε διαιθυλαιθέρα (50.0 mL) και νερό (25.0 mL), προστίθενται, όξινο ανθρακικό νάτριο (0.54 g, 6.4 mmol) και κυανιούχο νάτριο (0.16 g, 3.2 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται έντονα σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 72h. Ακολουθεί διαχωρισμός των δυο φάσεων και η υδατική φάση εκχυλίζεται με διαιθυλαιθέρα (2 x 50.0 mL). Οι οργανικές φάσεις ενώνονται και ξηραίνονται υπεράνω άνυδρου Na₂SO₄. Εν συνεχεία, ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό και το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9.6: 0.4), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **27α** (1.18 g, 62%), ως παχύρρευστο άχρωμο έλαιο. R_f = 0.49 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 9.6: 0.4).

$[\alpha]_D^{22} = -18^\circ$ (c = 1.3 χλωροφόρμιο)

ESI-MS (m/z): 600 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₃₃H₃₀FN₃O₇) C, H, N

Υπολ. (%)	C : 66.10	H : 5.04	N: 7.01
Ευρ. (%)	C : 66.29	H : 5.11	N: 7.23

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 8.96 (br s, 1H, NH), 7.43-7.28 (m, 16H, 3C₆H₅, H-6), 5.38 (d, 1H, $J_{1',2'} = 2.7$ Hz, H-1'), 4.83 (s, 1H, 4'-OH), 4.77 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 6.8$ Hz, H-2'), 4.60 (d, 1H, H-3'), 3.89 (t, 1H, $J_{5',6a'} = J_{5',6b'} = 6.5$ Hz, H-5'), 3.78-3.67 (m, 2H, H-6a',b'), 1.67, 1.38 (2s, 6H, 2CH₃).

1-(4'-C-κυανο-α-D-μαννοπυρανοζυλο)-5-φθοροουρακίλη (31α)

Ο προστατευμένος νουκλεοζίτης **27α** (0.59 g, 1.0 mmol) διαλύεται σε 4.5 mL 90% TFA σε μεθανόλη. Το προκύπτον εναιώρημα αναδεύεται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα απομακρύνονται οι διαλύτες υπό κενό, ώστε να απομακρυνθούν και τα ίχνη του TFA. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **31α** (0.24 g, 77%), με λευκή αφρώδη υφή. Rf = 0.12 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 9:1).

$[\alpha]_D^{22} = +6^\circ$ (c = 0.2 μεθανόλη)

λ_{\max} 263 nm (ε 5380)

ESI-MS (m/z): 318 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₁H₁₂FN₃O₇) C, H, N

Υπολ. (%)	C : 41.65	H : 3.81	N : 13.25
Ευρ. (%)	C : 41.87	H : 3.76	N : 13.32

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD)

δ 7.83 (d, 1H, $J_{6,F5} = 6.5$ Hz, H-6), 6.02 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.5$ Hz, H-1'), 4.39 (dd, 1H, $J_{5',6a'} = 9.3$ Hz, $J_{6a',6b'} = 12.8$ Hz, H-6a'), 4.22-3.99 (m, 3H, H-2', H-3', H-5'), 3.85 (dd, 1H, $J_{5',6b'} = 2.6$ Hz, H-6b').

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD)

δ 158.6, 149.6, 141.7, 128.1, 118.5, 82.9, 73.1, 71.9, 68.4, 65.6, 59.1.

IR (Nujol, cm^{-1}): 2235 (CN).

III.4.2 Σύνθεση της 1-(4'-C-κυανο- α -D-μαννοπυρανοζυλο)ουρακίλης (31 β)

Όλες οι μεθοδολογίες σύνθεσης και οι ταυτοποιήσεις των ενώσεων **21 β** , **22 β** , **23 β** , **25 β** αναλύονται στο πειραματικό μέρος της Διδακτορικής Διατριβής της Ν. Τζιουμάκης, Λάρισα 2010.

1-(2',3'-O-Ισοπροπυλιδενο-4'-C-κυανο-6'-O-τριτυλο- α -D-μαννοπυρανοζυλο)ουρακίλη (27 β)

Το παράγωγο της ουρακίλης **27 β** συντίθεται από την 1-(2',3'-O-ισοπροπυλιδενο-6'-O-τριτυλο- α -D-λυξο-εξωπυρανοζυλο-4'-υλοζο)ουρακίλη (**25 β**) (Agelis et al. 2008) ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **27 α** . Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9.6:0.4), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **27 β** (1.12 g, 60%), ως παχύρρευστο άχρωμο έλαιο. $R_f = 0.22$ (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 9.6:0.4).

$[\alpha]_D^{22} = -9^\circ$ (c = 0.5 χλωροφόρμιο)

λ_{max} 261 nm (ϵ 6756)

ESI-MS (m/z): 582 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Στοιχειακή Ανάλυση: ($\text{C}_{33}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_7$) C, H, N

Υπολ. (%) C : 68.15 H : 5.37 N : 7.22

Ευρ. (%) C : 68.23 H : 5.19 N : 7.41

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD)

δ 9.01 (br s, 1H, NH), 7.43-7.28 (m, 15H, 3C₆H₅), 7.19 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.1$ Hz, H-6), 5.79 (d, 1H, H-5), 5.39 (d, 1H, $J_{1',2'} = 2.0$ Hz, H-1'), 4.87 (s, 1H, 4'-OH), 4.82 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 6.8$ Hz, H-2'), 4.64 (d, 1H, H-3'), 3.96 (t, 1H, $J_{5',6a'} = J_{5',6b'} = 6.5$ Hz, H-5'), 3.70 (d, 2H, H-6a',b'), 1.68, 1.38 (2s, 6H, 2CH₃).

1-(4'-C-κυανο-α-D-μαννοπυρανοζυλο)ουρακίλη (31β)

Το παράγωγο της ουρακίλης **31β** συντίθεται από τον προστατευμένο νουκλεοζίτη **27β** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **31α**. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **31β** (0.20 g, 70%), με λευκή αφρώδη υφή. R_f = 0.10 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 9:1).

$[\alpha]_D^{22} = +74^\circ$ (c = 0.9 μεθανόλη)

λ_{\max} 257 nm (ε 7149)

ESI-MS (m/z): 300 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₁H₁₃N₃O₇) C, H, N

Υπολ. (%) C : 44.15 H : 4.38 N : 14.04

Ευρ. (%) C : 44.49 H : 4.56 N : 13.96

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD)

δ 7.57 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.1$ Hz, H-6), 5.94 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.6$ Hz, H-1'), 5.65 (d, 1H, H-5), 4.31 (dd, 1H, $J_{5',6a'} = 9.2$ Hz, $J_{6a',6b'} = 12.8$ Hz, H-6a'), 4.04-3.94 (m, 3H, H-2', H-3', H-5'), 3.76 (dd, 1H, $J_{5',6b'} = 2.7$ Hz, H-6b').

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD)

δ 162.7, 150.7, 140.2, 119.1, 103.1, 84.5, 73.6, 70.5, 67.8, 66.2, 59.2.

IR (Nujol, cm⁻¹): 2240 (CN).

III.4.3 Σύνθεση της 1-(4'-C-κυανο-α-D-μαννοπυρανοζυλο)θυμίνης (21γ)

1-(α-D-Μαννοπυρανοζυλο)θυμίνη (21γ)

Το παράγωγο της θυμίνης **21γ** συντίθεται από την ακετυλιωμένη μαννόζη **20**, ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **21α**. Το υπόλειμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας / μεθανόλη (8:2), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **21γ** (3.25 g, 75%), ως παχύρρευστο άχρωμο έλαιο. $R_f = 0.14$ (οξικός αιθυλεστέρας / μεθανόλη 8:2).

$$[\alpha]_D^{22} = -2^\circ \quad (c = 0.3 \text{ μεθανόλη})$$

$$\lambda_{\max} 262 \text{ nm } (\epsilon 11504)$$

ESI-MS (m/z): 289 ($M+H^+$)

Στοιχειακή Ανάλυση: ($C_{11}H_{16}N_2O_7$) C, H, N

Υπολ. (%) C : 45.83 H : 5.59 N : 9.72

Ευρ. (%) C : 45.71 H : 5.33 N : 10.01

1H -NMR (300 MHz, CD_3OD)

δ 7.64 (s, 1H, H-6), 6.00 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.1$ Hz, H-1'), 4.15 (dd, 1H, $J_{5',6a'} = 8.5$ Hz, $J_{6a',6b'} = 11.9$ Hz, H-6a'), 4.08-3.97 (m, 3H, H-2', H-3', H-5'), 3.83 (d, 1H, $J_{3',4'} = 1.9$ Hz, H-4'), 3.68 (dd, 1H, $J_{5',6b'} = 4.2$ Hz, H-6b'), 1.93 (1s, 3H, 5-CH₃).

1-(2',3'-Ο-Ισοπροπυλιδενο-α-D-μαννοπυρανοζυλο)θυμίνη (22γ)

Το παράγωγο της θυμίνης **22γ** συντίθεται από το νουκλεοζίτη **21γ** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **22α**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **22γ** (3.04 g, 82%), υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων. Σημείο Τήξεως 150-152 °C. $R_f = 0.37$ (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 9:1).

$[\alpha]_D^{22} = +16^\circ$ (c = 0.2 μεθανόλη)

λ_{\max} 263 nm (ϵ 7308)

ESI-MS (m/z): 329 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₄H₂₀N₂O₇) C, H, N

Υπολ. (%) C : 51.22 H : 6.14 N : 8.53

Ευρ. (%) C : 51.38 H : 6.24 N : 8.67

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 7.18 (s, 1H, H-6), 5.64 (d, 1H, $J_{1',2'} = 7.3$ Hz, H-1'), 4.46-4.37 (m, 2H, H-2', H-3'), 4.02 (dd, 1H, $J_{3',4'} = 8.8$, $J_{4',5'} = 6.3$ Hz, H-4'), 3.80-3.65 (m, 3H, H-5', H-6a', H-6b'), 1.86 (1s, 3H, 5-CH₃), 1.44, 1.31 (2s, 6H, 2CH₃).

1-(2',3'-Ο-Ισοπροπυλιδενο-6'-Ο-τριτυλο-α-D-μαννοπυρανοζυλο)θυμίνη (23γ)

Το παράγωγο της θυμίνης **23γ** συντίθεται από το νουκλεοζίτη **22γ** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **23α**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο (1:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **23γ** (2.09 g, 79%), με λευκή αφρώδη υφή. R_f = 0.21 (οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο 1:1).

$[\alpha]_D^{22} = +18^\circ$ (c = 0.9 χλωροφόρμιο)

λ_{\max} 265 nm (ϵ 9562)

ESI-MS (m/z): 571 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₃₃H₃₄N₂O₇) C, H, N

Υπολ. (%) C : 69.46 H : 6.01 N : 4.91

Ευρ. (%) C : 69.24 H : 6.31 N : 5.11

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 8.37 (br s, 1H, NH), 8.00 (s, 1H, H-6), 7.43-7.23 (m, 15H, 3C₆H₅), 5.71 (d, 1H, $J_{1',2'} = 6.9$ Hz, H-1'), 4.51-4.37 (m, 2H, H-2', H-3'), 4.11 (t, 1H, $J_{3',4'} = J_{4',5'} = 8.5$ Hz, H-4'), 3.86-3.80 (m, 1H, H-5'), 3.48-3.36 (m, 2H-6a', H-6b'), 1.93 (1s, 3H, 5-CH₃), 1.46, 1.33 (2s, 6H, 2CH₃).

1-(6'-O-tert-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-2',3'-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-μαννοπυρανοζυλο)θυμίνη (24γ)

Σε διάλυμα της 1-(2',3'-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-μαννοπυρανοζυλο)θυμίνης (**22γ**) (1.52 g, 4.6 mmol) σε πυριδίνη (23.0 mL) προστίθεται TBDMSCl (0.92 g, 6.1 mmol) και καταλυτική ποσότητα της DMAP. Το προκύπτον εναιώρημα αρχικά παραμένει για 30 λεπτά σε παγόλουτρο και για 5h (TLC) σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Στη συνέχεια προστίθεται μεθανόλη και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο (1:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **24γ** (1.58 g, 77%) ως παχύρρευστο άχρωμο έλαιο. R_f = 0.21 (οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο 1:1). $[\alpha]_D^{22} = -55^\circ$ (c = 1.2 χλωροφόρμιο)

λ_{\max} 266 nm (ε 9575)

ESI-MS (*m/z*): 443 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₀H₃₄N₂O₇Si) C, H, N

Υπολ. (%) C : 54.28 H : 7.74 N : 6.33

Ευρ. (%) C : 54.07 H : 7.72 N : 6.22

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD)

δ 8.76 (br s, 1H, NH), 7.13 (s, 1H, H-6), 5.65 (d, 1H, $J_{1',2'} = 5.7$ Hz, H-1'), 4.52-4.44 (m, 2H, H-2', H-3'), 4.14 (t, 1H, $J_{3',4'} = J_{4',5'} = 8.2$ Hz, H-4'), 3.92-3.75 (m, 3H, H-5', H-6a', H-6b'), 1.94 (1s, 3H, 5-CH₃), 1.53, 1.37 (2s, 6H, 2CH₃), 0.89 (s, 9H, t-Bu), 0.07 (s, 6H, 2Si-CH₃).

1-(2',3'-O-Ισοπροπυλιδενο-6'-O-τριτυλο-α-D-λυξο-εξωπυρανοζυλο-4'-υλοζο)θυμίνη (25γ)

Το παράγωγο της θυμίνης **25γ** συντίθεται από το νουκλεοζίτη **23γ** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **23α**. Το μείγμα της αντίδρασης καθαρίζεται απευθείας με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο (1:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **25γ** (1.39 g, 67%), με λευκή αφρώδη υφή. $R_f = 0.34$ (οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο 1:1).

$[\alpha]_D^{22} = -19^\circ$ (c = 0.9 χλωροφόρμιο)

λ_{\max} 265 nm (ϵ 9562)

ESI-MS (*m/z*): 569 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₃₃H₃₂N₂O₇) C, H, N

Υπολ. (%) C : 69.70 H : 5.67 N : 4.93

Ευρ. (%) C : 69.22 H : 5.34 N : 5.06

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 8.44 (br s, 1H, NH), 7.44-7.16 (m, 15H, 3C₆H₅), 7.04 (s, 1H, H-6), 5.58 (d, 1H, $J_{1',2'} = 3.5$ Hz, H-1'), 4.99 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 7.5$ Hz, H-2'), 4.72 (d, 1H, H-3'), 4.16 (dd, 1H, $J_{5',6a'} = 2.5$ Hz, $J_{5',6b'} = 5.5$ Hz, H-5'), 3.71 (dd, 1H, $J_{6a',6b'} = 10.5$ Hz, H-6a'), 3.43 (dd, 1H, H-6b'), 1.91 (1s, 3H, 5-CH₃), 1.55, 1.39 (2s, 6H, 2CH₃).

1-(6'-O-tert-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-2',3'-O-Ισοπροπυλιδενο-α-D-λυξο-εξωπυρανοζυλο-4'-υλοζο)θυμίνη (26γ)

Το παράγωγο της θυμίνης **26γ** συντίθεται από το νουκλεοζίτη **24γ** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **25α**. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μείγμα καθαρίζεται απευθείας με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο

(1:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **26γ** (1.04 g, 66%), με λευκή αφρώδη υφή. Rf = 0.38 (οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο 1:1).

$[\alpha]_D^{22} = +4^\circ$ (c = 0.6 χλωροφόρμιο)

λ_{\max} 263 nm (ϵ 3533)

ESI-MS (m/z): 441 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₀H₃₂N₂O₇Si) C, H, N

Υπολ. (%) C : 54.52 H : 7.32 N : 6.36

Ευρ. (%) C : 54.35 H : 7.54 N : 6.21

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 8.38 (br s, 1H, NH), 7.13 (s, 1H, H-6), 5.71 (d, 1H, $J_{1',2'} = 4.2$ Hz, H-1'), 4.91 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 7.6$ Hz, H-2'), 4.72 (d, 1H, H-3'), 4.24-4.22 (m, 1H, H-5'), 4.10 (dd, 1H, $J_{5',6a'} = 5.2$ Hz, $J_{6a',6b'} = 11.3$ Hz, H-6a'), 3.99 (dd, 1H, $J_{5',6b'} = 2.6$ Hz, H-6b'), 1.89 (1s, 3H, 5-CH₃), 1.55, 1.32 (2s, 6H, 2CH₃), 0.89 (s, 9H, t-Bu), 0.07 (s, 6H, 2Si-CH₃).

1-(6'-O-tert-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-2',3'-O-ισοπροπυλιδενο-4'-C-κυανο- α -D-μαννοπυρανοζυλο)θυμίνη (30γ)

Σε διάλυμα του κετοπυρανονουκλεοζίτη **26γ** (2.36 g, 1.0 mmol) σε διαιθυλαιθέρα (16.0 mL) και νερό (8.0 mL), προστίθεται κυανιούχο νάτριο (0.10 g, 2.1 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται έντονα σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 36h. Κατόπιν το διάλυμα αραιώνεται με οξικό αιθυλεστέρα και εκχυλίζεται με νερό. Η οργανική φάση ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου Na₂SO₄, ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό και το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9.6: 0.4), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **30γ** (0.67 g, 61%), ως παχύρρευστο άχρωμο έλαιο. Rf = 0.48 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 9.6: 0.4).

$[\alpha]_D^{22} = -40^\circ$ (c = 0.6 χλωροφόρμιο)

ESI-MS (m/z): 468 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₁H₃₃N₃O₇Si) C, H, N

Υπολ. (%)	C : 53.94	H : 7.11	N: 8.99
Ευρ. (%)	C : 54.11	H : 7.31	N: 8.87

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 8.81 (s, 1H, NH), 7.06 (s, 1H, H-6), 5.40 (d, 1H, $J_{1',2'} = 1.5$ Hz, H-1'), 5.26 (br s, 1H, 4'-OH), 4.84 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 6.9$ Hz, H-2'), 4.69 (d, 1H, H-3'), 4.12 (t, 1H, $J_{5',6a'} = J_{5',6b'} = 6.5$ Hz, H-5'), 4.02 (m, 2H, H-6a',b'), 1.95 (1s, 3H, 5-CH₃), 1.72, 1.39 (2s, 6H, 2CH₃), 0.89 (s, 9H, t-Bu), 0.15, 0.11 (2s, 6H, 2Si-CH₃).

1-(4'-C-κυανο-α-D-μαννοπυρανοζυλο)θυμίνη (31γ)

Το παράγωγο της θυμίνης **31γ** συντίθεται από το προστατευμένο νουκλεοζίτη **30γ** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **31α**. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **31γ** (0.16 g, 72%), με λευκή αφρώδη υφή. R_f = 0.10 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 9:1).

$[\alpha]_D^{22} = +30^\circ$ (c = 0.7 μεθανόλη)

λ_{\max} 267 nm (ε 2810)

ESI-MS (m/z): 314 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₂H₁₅N₃O₇) C, H, N

Υπολ. (%)	C : 46.01	H : 4.83	N : 13.41
Ευρ. (%)	C : 46.23	H : 4.77	N : 13.69

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD)

δ 7.49 (s, 1H, H-6), 6.03 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.5$ Hz, H-1'), 4.41 (dd, 1H, $J_{5',6a'} = 9.3$ Hz, $J_{6a',6b'} = 12.8$ Hz, H-6a'), 4.14-4.03 (m, 3H, H-2', H-3', H-5'), 3.85 (dd, 1H, $J_{5',6b'} = 2.8$ Hz, H-6a',b'), 1.89 (1s, 3H, 5-CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD)

δ 163.7, 150.1, 138.5, 118.8, 110.4, 83.6, 72.5, 71.9, 68.2, 66.4, 59.7, 13.4.

IR (Nujol, cm⁻¹): 2245 (CN).

III.4.4 Σύνθεση της 1-(4'-δεοξυ-4'-C-κυανο-α-D-ταλοπυρανοζυλο)-5-φθορουρακίλης (34α)

1-(4'-Δεοξυ-2',3'-Ο-ισοπροπυλιδενο-4'-C-κυανο-6'-Ο-τριτυλο-α-D-ταλοπυρανοζυλο)-5-φθορουρακίλη (32α)

Σε διάλυμα της κυανουδρίνης **27α** (0.59 g, 1.0 mmol) σε άνυδρο CH₃CN (10 mL), προστίθενται διαδοχικά DMAP (0.05 g, 0.4 mmol) και Et₃N (0.2 mL, 1.5 mmol) και στο εναιώρημα που προκύπτει προστίθεται στάγδην το PhOC(S)Cl (0.2 mL, 1.5 mmol) σε παγόλουτρο. Το προκύπτον διάλυμα συνεχίζει ν' αναδεύεται στους 0 °C για περίπου μία ώρα μέχρι το πέρας της αντίδρασης (TLC), υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Εν συνεχεία η αντίδραση αραιώνεται με οξικό αιθυλεστέρα και εκχυλίζεται με νερό. Κατόπιν η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄ και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το υπόλειμα συμπυκνώνεται αρχικά δυο φορές με άνυδρο τολουόλιο, διαλύεται έπειτα σε τολουόλιο (10 mL) και ακολουθεί απαέρωση του μείγματος με άζωτο για 30 λεπτά. Στο διάλυμα προστίθενται Bu₃SnH (0.4 mL, 1.6 mmol) και AIBN (0.03 g, 0.2 mmol) και το προκύπτον εναιώρημα θερμαίνεται στους 100 °C για 45 λεπτά. Στη συνέχεια το διάλυμα ψύχεται, ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό και ακολουθεί καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9.8:0.2), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **32α** (0.44 g, 77%), ως παχύρρευστο άχρωμο έλαιο. R_f = 0.43 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 9.8:0.2).

$[\alpha]_D^{22} = -48^\circ$ (c = 0.7 χλωροφόρμιο)

λ_{\max} 266 nm (ϵ 9518)

ESI-MS (m/z): 584 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₃₃H₃₀FN₃O₆) C, H, N

Υπολ. (%) C : 67.91 H : 5.18 N : 7.20

Ευρ. (%) C : 68.08 H : 5.12 N : 7.26

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 8.62 (br s, 1H, NH), 7.44-7.28 (m, 16H, 3C₆H₅, H-6), 5.50 (d, 1H, $J_{1',2'} = 3.8$ Hz, H-1'), 4.67 (t, 1H, $J_{2',3'} = J_{3',4'} = 6.5$ Hz, H-3'), 4.55 (dd, 1H, H-2'), 3.99 (dt, 1H, $J_{4',5'} = 3.0$ Hz, $J_{5',6a'} = J_{5',6b'} = 6.9$, H-5'), 3.60 (dd, 1H, $J_{6a',6b'} = 10.3$ Hz, H-6a'), 3.51 (dd, 1H, H-4'), 3.38 (dd, 1H, H-6b'), 1.66, 1.39 (2s, 6H, 2CH₃).

1-(4'-Δεοξυ-4'-C-κυανο-6'-α-D-ταλοπυρανοζυλο)-5-φθοροουρακίλη (34a)

Το παράγωγο της 5-φθοροουρακίλης **34a** συντίθεται από το προστατευμένο νουκλεοζίτη **32a** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **31a**. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **34a** (0.16 g, 71%), με λευκή αφρώδη υφή. $R_f = 0.15$ (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 9:1).

$[\alpha]_D^{22} = +9^\circ$ (c = 0.9 μεθανόλη)

λ_{\max} 262 nm (ϵ 2649)

ESI-MS (m/z): 302 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₁H₁₂FN₃O₆) C, H, N

Υπολ. (%) C : 43.86 H : 4.02 N : 13.95

Ευρ. (%) C : 43.70 H : 4.32 N : 14.22

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD)

δ 7.90 (d, 1H, $J_{6,F5} = 6.7$ Hz, H-6), 6.01 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.4$ Hz, H-1'), 4.41-4.26 (m, 3H, H3', H5', H-6a'), 3.79 (dd, 1H, $J_{5',6'b} = 1.5$ Hz, $J_{6a',6'b} = 11.7$ Hz, H-6b'), 3.70 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 2.8$ Hz, H-2'), 3.53 (dd, 1H, $J_{3',4'} = 6.3$ Hz, $J_{4',5'} = 2.6$ Hz, H-4').

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD)

δ 157.9, 149.3, 140.8, 128.7, 116.8, 83.1, 74.2, 72.1, 67.3, 65.6, 29.1.

IR (Nujol, cm^{-1}): 2245 (CN).

III.4.5 Σύνθεση της 1-(4'-δεοξυ-4'-C-κυανο- α -D-ταλοπυρανοζυλο)ουρακίλης (34 β)

1-(4'-Δεοξυ-2',3'-Ο-ισοπροπυλιδενο-4'-C-κυανο-6'-Ο-τριτυλο- α -D-ταλοπυρανοζυλο)ουρακίλη (32 β)

Το παράγωγο της ουρακίλης **32 β** συντίθεται από την κυανυδρίνη **27 β** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **32 α** . Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται σε στήλη χρωματογραφίας χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9.8:0.2), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **32 β** (0.39 g, 72%), ως παχύρρευστο άχρωμο έλαιο. $R_f = 0.25$ (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 9.8:0.2).

$[\alpha]_D^{22} = +20^\circ$ (c = 1.4 χλωροφόρμιο)

λ_{max} 258 nm (ϵ 5454)

ESI-MS (m/z): 566 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Στοιχειακή Ανάλυση: ($\text{C}_{33}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_6$) C, H, N

Υπολ. (%) C : 70.07 H : 5.52 N : 7.43

Ευρ. (%) C : 69.93 H : 5.66 N : 7.38

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3)

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 8.23 (br s, 1H, NH), 7.46-7.28 (m, 15H, $3\text{C}_6\text{H}_{15}$), 7.22 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.1$ Hz, H-6), 5.79 (d, 1H, H-5), 5.51 (d, 1H, $J_{1',2'} = 2.8$ Hz,

H-1'), 4.74 (t, 1H, $J_{2',3'} = J_{3',4'} = 6.7$ Hz, H-3'), 4.66 (dd, 1H, H-2'), 4.06 (dt, 1H, $J_{4',5'} = 2.3$ Hz, $J_{5',6a'} = J_{5',6b'} = 6.5$, H-5'), 3.60 (dd, 1H, $J_{6a',6b'} = 10.0$ Hz, H-6a'), 3.49 (dd, 1H, H-4'), 3.36 (dd, 1H, H-6b'), 1.66, 1.39 (2s, 6H, 2CH₃).

1-(4'-Δεοξυ-4'-C-κυανο-6'-α-D-ταλοπυρανοζυλο)ουρακίλη (34β)

Το παράγωγο της ουρακίλης **34β** συντίθεται από το προστατευμένο νουκλεοζίτη **32β** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **31α**. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **34β** (0.14 g, 72%), με λευκή αφρώδη υφή. R_f = 0.13 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 9:1).

$[\alpha]_D^{22} = +23^\circ$ (c = 0.5 μεθανόλη)

λ_{\max} 256 nm (ϵ 3062)

ESI-MS (m/z): 284 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₁H₁₃N₃O₆) C, H, N

Υπολ. (%) C : 46.65 H : 4.63 N : 14.84

Ευρ. (%) C : 46.35 H : 4.54 N : 14.96

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD)

δ 7.58 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.1$ Hz, H-6), 5.93 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.5$ Hz, H-1'), 5.64 (d, 1H, H-5), 4.30 (dd, 1H, $J_{5',6a'} = 9.2$ Hz, $J_{6a',6b'} = 12.4$ Hz, H-6a'), 4.23-4.18 (m, 2H, H3', H5'), 3.73-3.63 (m, 2H, H-2', H-6b'), 3.45 (dd, 1H, $J_{3',4'} = 6.4$ Hz, $J_{4',5'} = 2.6$ Hz, H-4').

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD)

δ 162.1, 149.5, 141.2, 117.1, 104.6, 82.8, 74.6, 72.3, 65.2, 64.6, 30.1.

IR (Nujol, cm⁻¹): 2250 (CN).

III.4.6 Σύνθεση της 1-(4'-δεοξυ-4'-C-κυανο-α-D-ταλοπυρανοζυλο)θυμίνης (34γ)

1-(4'-Δεοξυ-2',3'-Ο-ισοπροπυλιδενο-4'-C-κυανο-6'-Ο-τριτυλο-α-D-ταλοπυρανοζυλο)θυμίνη (32γ)

Σε διάλυμα του κετοπυρανονουκλεοζίτη **25γ** (1.39 g, 2.4 mmol) σε διαιθυλαιθέρα (40.0 mL) και νερό (20.0 mL), προστίθενται, όξινο ανθρακικό νάτριο (0.40 g, 4.8 mmol) και κυανιούχο νάτριο (0.12 g, 2.4 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται έντονα σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 24h. Ακολουθεί διαχωρισμός των δυο φάσεων και η υδατική φάση εκχυλίζεται με διαιθυλαιθέρα. Οι οργανικές φάσεις ενώνονται και ξηραίνονται υπεράνω άνυδρου Na₂SO₄. Ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό και το ακατέργαστο μείγμα των 2 κυανυδρινών **28γ** και **29γ** διαλύεται σε άνυδρο CH₃CN (17.0 mL), προστίθενται διαδοχικά DMAP (0.13 mg, 1.1 mmol) και Et₃N (0.5 mL, 3.7 mmol) και στο εναιώρημα που προκύπτει προστίθεται στάγδην το PhOC(S)Cl (0.5 mL, 3.7 mmol) σε παγόλουτρο υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Το προκύπτον διάλυμα συνεχίζει ν' αναδεύεται στους 0 °C για περίπου μία ώρα μέχρι το πέρας της αντίδρασης (TLC), οπότε και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το υπόλειμα συμπυκνώνεται αρχικά δυο φορές με άνυδρο τολουόλιο, διαλύεται έπειτα σε τολουόλιο (17.0 mL) και ακολουθεί απαέρωση του μείγματος με άζωτο για 30 λεπτά. Στο διάλυμα προστίθενται Bu₃SnH (1.1 mL, 3.8 mmol) και AIBN (0.07 g, 0.4 mmol) και το προκύπτον εναιώρημα θερμαίνεται στους 100 °C για 45 λεπτά υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Στη συνέχεια το διάλυμα ψύχεται, ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό και ακολουθεί καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9.8:0.2), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **32γ** (0.71 g, 50%), ως παχύρρευστο άχρωμο έλαιο. R_f = 0.38 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 9.8:0.2).

$$[\alpha]_D^{22} = -4^\circ \quad (c = 0.5 \text{ χλωροφόρμιο})$$

$$\lambda_{\max} 265 \text{ nm } (\epsilon 7429)$$

$$\text{ESI-MS } (m/z): 580 \text{ (M+H}^+\text{)}$$

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₃₄H₃₃N₃O₆) C, H, N

Υπολ. (%) C : 70.45 H : 5.74 N : 7.25

Ευρ. (%) C : 70.71 H : 5.62 N : 7.33

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 8.54 (br s, 1H, NH), 7.43-7.24 (m, 15H, 3C₆H₅), 7.03 (s, 1H, H-6), 5.46 (d, 1H, $J_{1',2'} = 2.5$ Hz, H-1'), 4.74 (t, 1H, $J_{2',3'} = J_{3',4'} = 6.8$ Hz, H-3'), 4.65 (dd, 1H, H-2'), 4.05 (dt, 1H, $J_{4',5'} = 2.7$ Hz, $J_{5',6a'} = J_{5',6b'} = 6.2$ Hz, H-5'), 3.56 (dd, 1H, $J_{6a',6b'} = 10.0$ Hz, H-6a'), 3.48 (dd, 1H, H-4'), 3.31 (dd, 1H, H-6b'), 1.93 (1s, 3H, 5-CH₃), 1.64, 1.36 (2s, 6H, 2CH₃).

1-(6'-O-tert-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-4'-δεοξυ-2',3'-Ο-ισοπροπυλιδενο-4'-C-κυανο-α-D-ταλοπυρανοζυλο)θυμίνη (33γ)

Το παράγωγο της θυμίνης **33γ** συντίθεται από την κυανυδρίνη **30γ** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **32α**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται σε στήλη χρωματογραφίας χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9.8:0.2), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **32γ** (0.23 g, 70 %), ως παχύρρευστο άχρωμο έλαιο. R_f = 0.37 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 9.8:0.2).

$[\alpha]_D^{22} = -36^\circ$ (c = 1.0 χλωροφόρμιο)

λ_{\max} 263 nm (ε 6376)

ESI-MS (m/z): 452 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₁H₃₃N₃O₆Si) C, H, N

Υπολ. (%) C : 55.85 H : 7.37 N : 9.30

Ευρ. (%) C : 55.97 H : 7.49 N : 9.37

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 8.77 (br s, 1H, NH), 7.08 (s, 1H, H-6), 5.52 (d, 1H, $J_{1',2'} = 2.6$ Hz, H-1'), 4.79 (t, 1H, $J_{2',3'} = J_{3',4'} = 6.7$ Hz, H-3'), 4.68 (dd, 1H, H-2'), 4.14 (m, 1H, H-5'), 3.88

(dd, 1H, $J_{6a',6b'} = 10.2$ Hz, $J_{5',6a'} = 5.9$ Hz, H-6a'), 3.49 (dd, 1H, H-4'), 3.39 (dd, 1H, $J_{5',6b'} = 7.9$ Hz, H-6b'), 1.95 (1s, 3H, 5-CH₃), 1.70, 1.38 (2s, 6H, 2CH₃), 0.86 (s, 9H, t-Bu), 0.08, 0.06 (2s, 6H, 2Si-CH₃).

1-(4'-Δεοξυ-4'-C-κυανο-6'-α-D-ταλοπυρανοζυλο)θυμίνη (34γ)

Το παράγωγο της θυμίνης **34γ** συντίθεται από το προστατευμένο νουκλεοζίτη **32γ** ή **33γ** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **31α**. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **34γ** (0.10 g, 69% από το **32γ** ή 0.11 g, 73% από το **33γ**), με λευκή αφρώδη υφή. $R_f = 0.14$ (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 9:1).

$[\alpha]_D^{22} = +4^\circ$ (c = 0.4 μεθανόλη)

λ_{max} 266 nm (ϵ 2447)

ESI-MS (m/z): 298 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₂H₁₅N₃O₆) C, H, N

Υπολ. (%) C : 48.48 H : 5.09 N : 14.14

Ευρ. (%) C : 48.24 H : 5.21 N : 14.27

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD)

δ 7.52 (s, 1H, H-6), 6.02 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.7$ Hz, H-1'), 4.43-4.26 (m, 3H, H-3', H-5', H-6a'), 3.73-3.63 (m, 2H, H-2', H-6b'), 3.55 (dd, 1H, $J_{3',4'} = 6.3$ Hz, $J_{4',5'} = 2.4$ Hz, H-4'), 1.89 (1s, 3H, 5-CH₃)

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD)

δ 163.2, 151.5, 140.8, 116.9, 111.2, 83.2, 74.1, 72.4, 64.8, 64.3, 29.8, 15.4.

IR (Nujol, cm⁻¹): 2235 (CN).

III.5 Σύνθεση των 2'-C-κυανο και 2'-σπειρανικών πυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων

III.5.1 Σύνθεση των 2'-C-κυανο και 2'-σπειρανικών πυρανονουκλεοζιτών της ουρακίλης

1-(β-D-γαλακτοπυρανοζυλο)ουρακίλη (35α)

Σε διάλυμα ουρακίλης (3.0 g, 26.9 mmol) σε άνυδρο CH₃CN (87.0 mL) προστίθεται HMDS (7.0 mL, 33.4 mmol) και σακχαρίνη (0.22 g, 1.2 mmol), και το προκύπτον εναιώρημα αναδεύεται με κάθετο ψυκτήρα για 30 min. Αφού το μίγμα γίνει διαυγές, προστίθεται 1,2,3,4,6-πεντα-O-ακετυλο-D-γαλακτοπυρανόζη (7.48 g, 19.2 mmol) και Me₃SiOSO₂CF₃ (4.9 mL, 26.9 mmol), και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για μία επιπλέον ώρα με κάθετο ψυκτήρα στους 80 °C υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Στη συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου, εξουδετερώνεται με κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃ και εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο. Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄ και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα διαλύεται σε μεθανολική αμμωνία (κορεσμένη στους 0 °C, 1075.0 mL) και αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 12 h. Ο διαλύτης στη συνέχεια απομακρύνεται υπό κενό και το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας / μεθανόλη (8:2), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **35α** (4.11 g, 78%), ως παχύρρευστο άχρωμο έλαιο. R_f = 0.12 (οξικός αιθυλεστέρας / μεθανόλη 8:2). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης **35α** είναι σε συμφωνία με αυτά που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία (Kondo *et al.*1971).

1-(6'-O-tert-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-β-D-γαλακτοπυρανοζυλο)ουρακίλη (36α)

Σε διάλυμα της (β-D-γαλακτοπυρανοζυλο)ουρακίλης (**35α**) (4.11 g, 15.0 mmol) σε πυριδίνη (75.0 mL) προστίθεται TBDMSCl (3.39 g, 22.5 mmol) και καταλυτική ποσότητα της DMAP. Το προκύπτον εναιώρημα αρχικά τοποθετήθηκε για 30 λεπτά σε παγόλουτρο και για 5h (TLC) σε θερμοκρασία δωματίου υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Στη συνέχεια προστίθεται μεθανόλη και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με

χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας / μεθανόλη (9:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **36α** (4.97 g, 85%) ως παχύρρευστο άχρωμο έλαιο. $R_f = 0.52$ (οξικός αιθυλεστέρας / μεθανόλη 8:2).

$[\alpha]_D^{22} = +2^\circ$ (c = 0.2 μεθανόλη)

λ_{max} 258 nm (ϵ 7286)

ESI-MS (m/z): 389 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₆H₂₈N₂O₇Si) C, H, N

Υπολ. (%)	C : 49.47	H : 7.26	N : 7.21
Ευρ. (%)	C : 49.71	H : 7.43	N : 7.02

¹H-NMR (300 MHz, DMSO)

δ 11.07 (br s, 1H, NH), 7.63 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.1$ Hz, H-6), 5.68 (d, 1H, H-5), 5.34 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.1$ Hz, H-1'), 5.27 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz, OH), 5.01 (s, 1H, OH), 4.58 (d, 1H, $J = 6.1$ Hz, OH), 3.76-3.49 (m, 6H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6a',b'), 0.83 (s, 9H, t-Bu), 0.02, 0.01 (2s, 6H, 2Si-CH₃).

1-(6'-O-tert-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-3',4'-O-ισοπροπυλιδενο-β-D-γαλακτοπυρανοζυλο)ουρακίλη (37α)

Σε ένα υπό ανάδευση διάλυμα του προϊόντος **36α** (4.97 g, 12.8 mmol) σε άνυδρη ακετόνη (226.0 mL) και (CH₃)₂C(OCH₃)₂ (12.7 mL) προστίθεται *p*-TsOH (0.46 g, 2.4 mmol) υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Μετά από 3h ανάδευσης η αντίδραση ολοκληρώνεται (TLC) και το μίγμα εξουδετερώνεται με τριαιθυλαμίνη μέχρι ουδετέρου pH (pH ≤ 7). Ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό και το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9.5:0.5), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **37α** (4.72 g, 86%), υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων. Σημείο Τήξεως 205-207°C. $R_f = 0.47$ (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 9:1).

$[\alpha]_D^{22} = +42^\circ$ (c = 0.6 χλωροφόρμιο)

λ_{\max} 259 nm (ϵ 4831)

ESI-MS (m/z): 389 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₉H₃₂N₂O₇Si) C, H, N

Υπολ. (%) C : 53.25 H : 7.53 N : 6.54

Ευρ. (%) C : 53.32 H : 7.43 N : 6.72

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 9.43 (br s, 1H, NH), 7.41 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.2$ Hz, H-6), 5.74 (d, 1H, $J_{1',2'} = 8.0$ Hz, H-1'), 5.57 (d, 1H, H-5), 4.32-4.26 (m, 2H, H-3', H-4'), 4.07 (dt, 1H, $J_{4',5'} = 1.4$ Hz, $J_{5',6a'} = J_{5',6b'} = 6.4$ Hz, H-5'), 3.89-3.78 (m, 2H, H-6a', b'), 3.72 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 5.8$ Hz, H-2'), 1.53, 1.37 (2s, 6H, 2CH₃), 0.88 (s, 9H, t-Bu), 0.06, 0.05 (2s, 6H, 2Si-CH₃).

1-(6'-O-tert-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-3',4'-Ο-ισοπροπυλιδανο-β-D-λυξο-εξωπυρανοζυλο-2'-υλοζο)ουρακίλη (38α)

Σε διάλυμα της ένωσης **37α** (4.72 g, 11.0 mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (110.0 mL) προστίθεται PDC (4.93 g, 13.1 mmol) και Ac₂O (3.1 mL, 32.7 mmol) και το προκύπτον εναιώρημα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 6h υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Εν συνεχεία το μείγμα της αντίδρασης καθαρίζεται απευθείας με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο (1:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **38α** (3.75 g, 80%), υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων. Σημείο Τήξεως 153-155°C. R_f = 0.45 (οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο 6:4).

$[\alpha]_D^{22} = -80^\circ$ (c = 1.0 χλωροφόρμιο)

λ_{\max} 257 nm (ϵ 11296)

ESI-MS (m/z): 427 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₉H₃₀N₂O₇Si) C, H, N

Υπολ. (%) C : 53.50 H : 7.09 N : 6.57

Ευρ. (%) C : 53.69 H : 7.13 N : 6.41

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 8.72 (br s, 1H, NH), 7.10 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.2$ Hz, H-6), 6.21 (s, 1H, H-1'), 5.77 (d, 1H, H-5), 4.71-4.67 (m, 2H, H-3', H-4'), 4.32 (dt, 1H, $J_{4',5'} = 0.7$ Hz, $J_{5',6a'} = J_{5',6b'} = 6.7$ Hz, H-5'), 3.89 (d, 2H, H-6a',b'), 1.45, 1.41 (2s, 6H, 2CH₃), 0.89 (s, 9H, t-Bu), 0.08, 0.07 (2s, 6H, 2Si-CH₃).

1-(6'-O-tert-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-3',4'-Ο-ισοπροπυλιδενο-2'-C-κυανο-β-D-ταλοπυρανοζυλο)ουρακίλη (39α) και 1-(6'-O-tert-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-3',4'-Ο-ισοπροπυλιδενο-2'-C-κυανο-β-D-γαλακτοπυρανοζυλο)ουρακίλη (40α)

Σε διάλυμα του κετοπυρανονουκλεοζίτη **38α** (3.75 g, 8.8 mmol) σε διαιθυλαιθέρα (440.0 mL) και νερό (220.0 mL), προστίθενται, όξινο ανθρακικό νάτριο (1.48 g, 17.6 mmol) και κυανιούχο νάτριο (0.34 g, 8.8 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται έντονα σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 72h. Ακολουθεί διαχωρισμός των δυο φάσεων και η υδατική φάση εκχυλίζεται με διαιθυλαιθέρα (2 x 400.0 mL). Οι οργανικές φάσεις ενώνονται και ξηραίνονται υπεράνω άνυδρου Na₂SO₄. Εν συνεχεία, ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό και το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9.8: 0.2).

Από τα πρώτα κλάσματα της στήλης παραλαμβάνεται το ταλοπυρανόζυλο παράγωγο **39α** (1.12 g, 28%), με λευκή αφρώδη υφή. R_f = 0.16 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 9.5: 0.5).

$[\alpha]_D^{22} = -18^\circ$ (c = 0.6 χλωροφόρμιο)

λ_{max} 259 nm (ε 9500)

ESI-MS (m/z): 454 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₀H₃₁N₃O₇Si) C, H, N

Υπολ. (%) C : 52.96 H : 6.89 N: 9.26

Ευρ. (%) C : 53.88 H : 6.93 N: 9.17

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 9.13 (br s, 1H, NH), 7.52 (d, 1H, *J*_{5,6} = 8.2 Hz, H-6), 6.54 (br s, 1H, 2'-OH), 6.15 (s, 1H, H-1'), 5.72 (d, 1H, H-5), 4.57-4.53 (m, 2H, H-3', H-4'), 4.42 (t, 1H, *J*_{5',6a'} = *J*_{5',6b'} = 6.5 Hz, H-5'), 3.78 (d, 2H, H-6a',b'), 1.59, 1.38 (2s, 6H, 2CH₃), 0.89 (s, 9H, t-Bu), 0.07, 0.06 (2s, 6H, 2Si-CH₃).

Από τα επόμενα κλάσματα της στήλης παραλαμβάνεται το γαλακτοπυρανόζυλο παράγωγο **40α** (2.08 g, 52%), με λευκή αφρώδη υφή. R_f = 0.12 (διχλωρομεθάνιο/ μεθανόλη 9.5: 0.5).

[α]_D²² = +24° (c = 0.5 χλωροφόρμιο)

λ_{max} 258 nm (ε 3883)

ESI-MS (m/z): 600 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₀H₃₁N₃O₇Si) C, H, N

Υπολ. (%) C : 52.96 H : 6.89 N: 9.26

Ευρ. (%) C : 52.80 H : 6.96 N: 9.32

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 10.06 (br s, 1H, NH), 7.45 (d, 1H, *J*_{5,6} = 8.2 Hz, H-6), 6.15 (br s, 1H, 2'-OH), 5.84 (d, 1H, H-5), 5.73 (s, 1H, H-1'), 4.52 (d, 1H, *J*_{3',4'} = 5.9 Hz, H-3'), 4.43 (dd, *J*_{4',5'} = 2.8 Hz, H-4'), 4.28-4.24 (m, 1H, H-5'), 4.01-3.89 (m, 2H, H-6a',b'), 1.74, 1.39 (2s, 6H, 2CH₃), 0.89 (s, 9H, t-Bu), 0.08, 0.07 (2s, 6H, 2Si-CH₃).

1-(2'-C-κυανο-β-D-ταλοπυρανόζυλο)ουρακίλη (**41α**)

Ο προστατευμένος νουκλεοζίτης **39α** (0.37 g, 0.8 mmol) διαλύεται σε 4.1 mL 90% TFA σε μεθανόλη. Το προκύπτον εναιώρημα αναδεύεται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα απομακρύνονται οι διαλύτες υπό κενό, ώστε να απομακρυνθούν και τα ίχνη του TFA. Το υπόλειμμα καθαρίζεται

με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **41α** (0.17 g, 72%), με λευκή αφρώδη υφή. $R_f = 0.24$ (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 8.5:1.5).

$[\alpha]_D^{22} = -6^\circ$ (c = 0.1 μεθανόλη)

λ_{max} 257 nm (ϵ 5362)

ESI-MS (m/z): 300 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₁H₁₃N₃O₇) C, H, N

Υπολ. (%) C : 44.15 H : 4.38 N : 14.04

Ευρ. (%) C : 44.29 H : 4.31 N : 14.20

¹H-NMR (300 MHz, DMSO)

δ 11.40 (br s, 1H, NH), 7.66 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.2$ Hz, H-6), 7.58 (s, 1H, H-1'), 6.34 (d, 1H, $J = 5.2$, OH), 6.24 (s, 1H, OH), 5.63 (d, 1H, H-5), 5.26 (d, 1H, $J = 4.3$, OH), 4.71 (t, 1H, $J = 4.3$, 6'-OH), 4.18-4.93 (m, 4H, H-3', H-4', H-5', H-6a'), 4.42 (dd, 1H, $J_{5',6b'} = 5.3$ Hz, $J_{6a',6b'} = 11.3$ Hz, H-6b').

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO)

δ 163.1, 150.6, 142.9, 118.9, 101.2, 80.6, 73.6, 73.3, 72.4, 63.4, 56.9.

IR (KBr, cm⁻¹): 2225 (CN).

1-(2'-C-Κυανο-β-D-γαλακτοπυρανοζυλο)ουρακίλη (**42α**)

Το παράγωγο της ουρακίλης **42α** συντίθεται από το προστατευμένο νουκλεοζίτη **40α** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **41α**. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **42α** (0.36 g, 78%), με λευκή αφρώδη υφή. $R_f = 0.23$ (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 8.5:1.5).

$[\alpha]_D^{22} = +14^\circ$ (c = 0.3 μεθανόλη)

λ_{\max} 257 nm (ϵ 4032)

ESI-MS (m/z): 300 ($M+H^+$)

Στοιχειακή Ανάλυση: ($C_{11}H_{13}N_3O_7$) C, H, N

Υπολ. (%) C : 44.15 H : 4.38 N : 14.04

Ευρ. (%) C : 44.01 H : 4.29 N : 14.17

1H -NMR (300 MHz, DMSO)

δ 11.19 (br s, 1H, NH), 7.69 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.2$ Hz, H-6), 7.08 (s, 1H, H-1'), 5.82 (d, 1H, $J = 2.7$, OH), 5.75 (d, 1H, H-5), 5.59 (s, 1H, OH), 4.93 (s, 1H, OH), 4.71 (t, 1H, $J = 4.7$, 6'-OH), 3.87-3.58 (m, 5H, H-3', H-4', H-5', H-6a',b').

^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO)

δ 163.2, 149.9, 140.2, 117.6, 101.5, 80.1, 79.6, 67.3, 66.2, 60.9, 36.8.

IR (KBr, cm^{-1}): 2250 (CN).

1-(6'-O-tert-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-2'-δεοξυ-3',4'-Ο-ισοπροπυλιδενο-2'-C-κυανο-β-D-ταλοπυρανοζυλο)ουρακίλη (43α)

Σε διάλυμα της κυανουδρίνης **39α** ή **40α** (0.37 g, 0.8 mmol) σε άνυδρο CH_3CN (12.0 mL), προστίθενται διαδοχικά DMAP (0.04 g, 0.3 mmol) και Et_3N (0.17 mL, 1.5 mmol) και στο εναιώρημα που προκύπτει προστίθεται στάγδην το $PhOC(S)Cl$ (0.2 mL, 1.5 mmol) σε παγόλουτρο υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Το προκύπτον διάλυμα συνεχίζει ν' αναδεύεται στους 0 °C για περίπου μία ώρα μέχρι το πέρας της αντίδρασης (TLC). Εν συνεχεία η αντίδραση αραιώνεται με οξικό αιθυλεστέρα και εκχυλίζεται με νερό. Κατόπιν η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο Na_2SO_4 και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το υπόλειμα συμπυκνώνεται αρχικά δυο φορές με άνυδρο τολουόλιο, διαλύεται έπειτα σε τολουόλιο (12.0 mL) και ακολουθεί απαέρωση του μείγματος με άζωτο για 30 λεπτά. Στο διάλυμα προστίθενται $(Me_3Si)_3SiH$ (0.34 mL, 1.1 mmol) και AIBN (0.08 g, 0.5 mmol) και το προκύπτον εναιώρημα θερμαίνεται στους 90 °C για 50 λεπτά. Στη συνέχεια το διάλυμα ψύχεται, ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό και ακολουθεί καθαρισμός του

υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9.8:0.2), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **43α** (0.25 g, 70% από το **39α** ή 0.23 g, 67% από το **40α**), ως παχύρρευστο άχρωμο έλαιο. $R_f = 0.33$ (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 9.8:0.2).

$[\alpha]_D^{22} = +54^\circ$ (c = 0.3 χλωροφόρμιο)

λ_{max} 257 nm (ϵ 4773)

ESI-MS (m/z): 438 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₀H₃₁N₃O₆Si) C, H, N

Υπολ. (%) C : 54.90 H : 7.14 N : 9.60

Ευρ. (%) C : 54.78 H : 7.11 N : 9.82

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 8.78 (br s, 1H, NH), 7.23 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.3$ Hz, H-6), 5.79 (d, 1H, H-5), 5.55 (d, 1H, $J_{1',2'} = 2.7$ Hz, H-1'), 4.57 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 7.1$ Hz, $J_{3',4'} = 5.7$ Hz, H-3'), 4.29 (dd, 1H, $J_{4',5'} = 2.9$ Hz, H-4'), 4.11-3.89 (m, 3H, H-5', H-6a', b'), 3.65 (dd, 1H, H-2'), 1.74, 1.39 (2s, 6H, 2CH₃), 0.89 (s, 9H, t-Bu), 0.10, 0.09 (2s, 6H, 2Si-CH₃).

1-(2'-Δεοξυ-2'-C-κυανο-β-D-ταλοπυρανοζυλο)ουρακίλη (**44α**)

Το παράγωγο της ουρακίλης **44α** συντίθεται από το προστατευμένο νουκλεοζίτη **43α** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **41α**. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **44α** (0.10 g, 78%), με λευκή αφρώδη υφή. $R_f = 0.27$ (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 8.5:1.5).

$[\alpha]_D^{22} = +6^\circ$ (c = 0.2 μεθανόλη)

λ_{max} 258 nm (ϵ 6229)

ESI-MS (m/z): 284 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₁H₁₃N₃O₆) C, H, N

Υπολ. (%) C : 46.65 H : 4.63 N : 14.84

Ευρ. (%) C : 46.78 H : 4.58 N : 14.76

¹H-NMR (300 MHz, DMSO)

δ 11.48 (br s, 1H, NH), 7.70 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.2$ Hz, H-6), 5.74-5.69 (m, 2H, H-5, OH), 5.66 (d, 1H, $J_{1',2'} = 2.6$, H-1'), 4.86 (d, 1H, $J = 2.8$, OH), 4.76 (t, 1H, $J = 5.3$, 6'-OH), 4.01-3.65 (m, 5H, H-3', H-4', H-5', H-6a',b'), 3.47 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 5.3$ Hz, H-2').

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO)

δ 163.2, 149.9, 140.2, 117.6, 101.5, 80.0, 79.6, 67.3, 66.2, 60.9, 36.9.

IR (KBr, cm⁻¹): 2250 (CN).

1-(6'-O-tert-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-3',4'-Ο-ισοπροπυλιδενο-2'-C-κυανο-2'-Ο-μεσυλο-β-D-ταλοπυρανοζυλο)ουρακίλη (45α)

Σε διάλυμα της κυανουδρίνης **39α** (0.37 g, 0.8 mmol) σε άνυδρη πυριδίνη (4.0 mL), προστίθεται MsCl (0.44 mL, 4.0 mmol) και το προκύπτον διάλυμα αναδεύεται στους 5-8 °C για 48 ώρες. Το μείγμα της αντίδρασης κατόπιν αποχύνεται σε παγόλουτρο και εκχυλίζεται με χλωροφόρμιο (2x15 mL). Τα ενωμένα οργανικά εκχυλίσματα πλένονται διαδοχικά με διάλυμα 1 N HCl (15 mL), διάλυμα NaHCO₃ (15 mL), και διάλυμα NaCl (15mL). Στη συνέχεια η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄ και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9.8: 0.2), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **45α** (0.30 g, 71%), ως παχύρρευστο άχρωμο έλαιο. R_f = 0.52 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 9.5:0.5).

$[\alpha]_D^{22} = -3^\circ$ (c = 0.2 χλωροφόρμιο)

λ_{\max} 256 nm (ϵ 9053)

ESI-MS (m/z): 531 ($M+H^+$)

Στοιχειακή Ανάλυση: ($C_{21}H_{33}N_3O_9SSi$) C, H, N

Υπολ. (%) C : 47.44 H : 6.26 N : 7.90

Ευρ. (%) C : 47.32 H : 6.30 N : 7.97

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$)

δ 8.47 (br s, 1H, NH), 7.49 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.3$ Hz, H-6), 6.65 (s, 1H, H-1'), 5.80 (d, 1H, H-5), 5.03 (d, 1H, $J_{3',4'} = 6.9$ Hz, H-3'), 4.65 (dd, 1H, $J_{4',5'} = 1.4$ Hz, H-4'), 4.33 (dt, 1H, $J_{5',6'a} = J_{5',6'a} = 6.5$ Hz, H-5'), 3.83-3.79 (m, 2H, H-6a',b'), 3.26 (s, 3H, CH_3SO_2), 1.69, 1.41 (2s, 6H, $2CH_3$), 0.89 (s, 9H, t-Bu), 0.07, 0.06 (2s, 6H, $2Si-CH_3$).

1-(6'-*O*-*tert*-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-3',4'-*O*-ισοπροπυλιδενο-2'-*C*-κυανο-2'-*O*-μεσυλο- β -D-γαλακτοπυρανοζυλο)ουρακίλη (46a)

Το μέσυλο παράγωγο της ουρακίλης **46a** συντίθεται από την κυανυδρίνη **40a** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **45a**. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9.8: 0.2), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **46a** (0.56 g, 69%), ως παχύρρευστο άχρωμο έλαιο. $R_f = 0.45$ (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 9.5:0.5).

$[\alpha]_D^{22} = +26^\circ$ (c = 0.5 χλωροφόρμιο)

λ_{\max} 256 nm (ϵ 9647)

ESI-MS (m/z): 284 ($M+H^+$)

Στοιχειακή Ανάλυση: ($C_{21}H_{33}N_3O_9SSi$) C, H, N

Υπολ. (%) C : 47.44 H : 6.26 N : 7.90

Ευρ. (%) C : 47.51 H : 6.19 N : 7.82

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 8.64 (br s, 1H, NH), 7.68 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.3$ Hz, H-6), 5.92 (s, 1H, H-1'), 5.83 (d, 1H, H-5), 4.79 (d, 1H, $J_{3',4'} = 6.1$ Hz, H-3'), 4.50 (dd, 1H, $J_{4',5'} = 2.7$ Hz, H-4'), 4.24 (dt, 1H, $J_{5',6'a} = J_{5',6'a} = 6.4$ Hz, H-5'), 4.01-3.89 (m, 2H, H-6a',b'), 3.24 (s, 3H, CH₃SO₂), 1.77, 1.42 (2s, 6H, 2CH₃), 0.89 (s, 9H, t-Bu), 0.08, 0.07 (2s, 6H, 2Si-CH₃).

[1-(6'-*O*-*tert*-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-3',4'-*O*-ισοπροπυλιδενο-β-D-ταλοπυρανοζυλο)ουρακίλη]-2'-σπειρανικο-5''-(4''-αμινο-1'',2''-οξαθειολο-2'',2''-διοξειδιο) (47α)

Σε διάλυμα του μέσυλο παραγωγού **45α** (0.30 g, 0.6 mmol) σε άνυδρο CH₃CN (6.0 mL), προστίθεται DBU (0.09 mL, 0.6 mmol) και το προκύπτον διάλυμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 36 ώρες. Στη συνέχεια το μίγμα εξουδετερώνεται με οξικό οξύ μέχρι ουδέτερου pH και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9.5: 0.5), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **47α** (0.18 g, 60%), με λευκή αφρώδη υφή. R_f = 0.38 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 9.5:0.5).

$[\alpha]_D^{22} = -6^\circ$ (c = 0.4 χλωροφόρμιο)

λ_{\max} 253 nm (ε 3429)

ESI-MS (m/z): 531 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₁H₃₃N₃O₉SSi) C, H, N

Υπολ. (%) C : 47.44 H : 6.26 N : 7.90

Ευρ. (%) C : 47.62 H : 6.34 N : 7.82

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 10.29 (br s, 1H, NH), 7.56 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.2$ Hz, H-6), 6.49 (s, 1H, H-1'), 6.02 (br s, 2H, NH₂-4''), 5.79 (d, 1H, H-5), 5.43 (s, 1H, H-3''), 4.65 (d, 1H, $J_{3',4'} =$

7.5 Hz, H-3'), 4.48 (d, 1H, H-4'), 4.35 (t, 1H, $J_{5',6'a} = J_{5',6'b} = 4.4$ Hz, H-5'), 3.84 (d, 2H, H-6a',b'), 1.57, 1.37 (2s, 6H, 2CH₃), 0.92 (s, 9H, t-Bu), 0.10, 0.08 (2s, 6H, 2Si-CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃)

δ 164.3, 152.3, 150.8, 140.6, 110.2, 100.9, 92.3, 83.8, 78.9, 75.1, 73.8, 70.7, 62.3, 26.3, 25.7, 25.1, 18.4, -5.3, -5.4.

IR (KBr, cm⁻¹): 3420, 3320 (NH₂), 1665 (C=C-N).

[1-(6'-O-tert-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-3',4'-Ο-ισοπροπυλιδενο-β-D-γαλακτοπυρανοζυλο)ουρακίλη]-2'-σπειρανικο-5''-(4''-αμινο-1'',2''-οξαθειολο-2'',2''-διοξειδιο) (48α)

Το σπειρανικό παράγωγο της ουρακίλης **48α** συντίθεται από το μέσυλο παράγωγο **46α** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **47α**. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9.5: 0.5), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **48α** (0.39 g, 70%), με λευκή αφρώδη υφή. R_f = 0.37 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 9.5:0.5).

$[\alpha]_D^{22} = +6^\circ$ (c = 0.5 χλωροφόρμιο)

λ_{\max} 257 nm (ε 8611)

ESI-MS (m/z): 531 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₁H₃₃N₃O₉SSi) C, H, N

Υπολ. (%) C : 47.44 H : 6.26 N : 7.90

Ευρ. (%) C : 47.52 H : 6.39 N : 7.78

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 10.94 (br s, 1H, NH), 7.88 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.1$ Hz, H-6), 6.27 (s, 1H, H-1'), 6.04 (s, 1H, H-3''), 5.43 (d, 1H, H-5), 5.35 (br s, 2H, NH₂-4''), 4.61-4.52 (m, 2H, H-

3',H-4'), 4.43 (t, 1H, $J_{5',6'a} = J_{5',6'b} = 6.1$ Hz, H-5'), 3.91-3.81 (m, 2H, H-6a',b'), 1.59, 1.41 (2s, 6H, 2CH₃), 0.91 (s, 9H, t-Bu), 0.09 (s, 6H, 2Si-CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃)

δ 164.7, 151.6, 150.3, 141.4, 110.6, 100.5, 92.9, 83.2, 79.3, 75.7, 73.3, 71.4, 61.8, 26.2, 25.7, 24.9, 18.1, -5.5, -5.6.

IR (KBr, cm⁻¹): 3450, 3360 (NH₂), 1660 (C=C-N).

[1-(β-D-Ταλοπυρανοζυλο)ουρακίλη]-2'-σπειρανικο-5''-(4''-αμινο-1'',2''-οξαθειολο-2'',2''-διοξειδιο) (49α)

Σε ένα υπό ανάδευση διάλυμα του σπειρανικού νουκλεοζίτη **47α** (0.17 g, 0.3 mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (1.0 mL) προστίθεται μεθανολικό υδροχλώριο (2.5 mL), το οποίο παρασκευάστηκε από ακετυλοχλωρίδιο (0.2 mL) και μεθανόλη (5.0 mL) στους 0 °C, υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Μετά το πέρας της αντίδρασης (6 h), το διάλυμα αραιώνεται με MeOH και προστίθεται περίσσεια NaHCO₃. Το προκύπτον μείγμα διηθείται υπό κενό από Celite και στη συνέχεια ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το υπόλειμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (8:2), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **49α** (0.07 g, 62%), με λευκή αφρώδη υφή. R_f = 0.22 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 8:2).

$[\alpha]_D^{22} = -26^\circ$ (c = 0.1 διμεθυλοσουλφοξειδιο)

λ_{\max} 260 nm (ε 10206)

ESI-MS (m/z): 378 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₂H₁₅N₃O₉S) C, H, N

Υπολ. (%) C : 38.20 H : 4.01 N : 11.14

Ευρ. (%) C : 38.29 H : 3.92 N : 11.19

¹H-NMR (300 MHz, DMSO)

δ 11.23 (br s, 1H, NH), 7.50 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.2$ Hz, H-6), 6.67 (br s, 2H, NH₂-4''), 6.34 (s, 1H, H-1'), 6.18 (br s, 2H, 2OH), 5.58 (d, 1H, H-5), 5.46 (s, 1H, H-3'), 4.72 (br s, 1H, OH), 4.13-3.59 (m, 5H, H-3', H-4', H-5', H-6a',b').

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO)

δ 163.2, 154.4, 150.5, 142.4, 101.6, 91.3, 86.4, 79.5, 75.4, 73.3, 66.1, 58.4.

IR (KBr, cm⁻¹): 3420, 3330 (NH₂), 1655 (C=C-N).

[1-(β-D-Γαλακτοπυρανοζυλο)ουρακίλη]-2'-σπειρανικο-5''-(4''-αμινο-1'',2''-οξαθειολο-2'',2''-διοξειδιο) (50α)

Το σπειρανικό παράγωγο της ουρακίλης **50α** συντίθεται από τον προστατευμένο νουκλεοζίτη **48α** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **49α**. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (8:2), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **50α** (0.18 g, 65%), με λευκή αφρώδη υφή. R_f = 0.21 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 8:2).

$[\alpha]_D^{22} = +36^\circ$ (c = 0.1 διμεθυλοσουλφοξειδιο)

λ_{\max} 260 nm (ε 8426)

ESI-MS (m/z): 378 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₂H₁₅N₃O₉S) C, H, N

Υπολ. (%) C : 38.20 H : 4.01 N : 11.14

Ευρ. (%) C : 38.46 H : 4.11 N : 11.25

¹H-NMR (300 MHz, DMSO)

δ 11.19 (br s, 1H, NH), 7.65 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.2$ Hz, H-6), 7.26 (br s, 2H, NH₂-4''), 6.53 (br s, 1H, OH), 5.97 (s, 1H, H-1'), 5.92 (br s, 1H, OH), 5.59 (s, 1H, H-3'), 5.57 (d, 1H, H-5), 4.73 (br s, 1H, OH), 4.21-3.61 (m, 5H, H-3', H-4', H-5', H-6a',b').

^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO)

δ 162.9, 152.8, 150.7, 140.8, 101.8, 92.2, 91.4, 82.2, 81.2, 72.3, 68.7, 60.6.

IR (KBr, cm^{-1}): 3400, 3380 (NH_2), 1620 ($\text{C}=\text{C}-\text{N}$).

III.5.2 Σύνθεση των 2'-C-κυανο και 2'-σπειρανικών πυρανονουκλεοζιτών της της 5-φθοροουρακίλης

1-(β -D-γαλακτοπυρανοζυλο)-5-φθοροουρακίλη (35 β)

Το παράγωγο της 5-φθοροουρακίλης **35 β** συντίθεται από την 1,2,3,4,6-πεντα-Ο-ακετυλο-D-γαλακτοπυρανόζη ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **35 α** . Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας / μεθανόλη (8:2), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **35 α** (4.11 g, 78%), ως παχύρρευστο άχρωμο έλαιο. $R_f = 0.14$ (οξικός αιθυλεστέρας / μεθανόλη 8:2). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης **35 β** είναι σε συμφωνία με αυτά που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία (Haeckel *et al.* 1996).

1-(6'-O-tert-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο- β -D-γαλακτοπυρανοζυλο)-5-φθοροουρακίλη (36 β)

Το παράγωγο της 5-φθοροουρακίλης **36 β** συντίθεται από την (β -D-γαλακτοπυρανοζυλο)-5-φθοροουρακίλη (**35 β**) ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **36 α** . Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας / μεθανόλη (9:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **36 β** (5.06 g, 83%), υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων. Σημείο Τήξεως 136-138 °C. $R_f = 0.60$ (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 8:2).

$[\alpha]_D^{22} = +7^\circ$ (c = 0.5 μεθανόλη)

λ_{max} 267 nm (ϵ 4579)

ESI-MS (m/z): 407 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₆H₂₇FN₂O₇Si) C, H, N

Υπολ. (%)	C : 47.28	H : 6.70	N : 6.89
Ευρ. (%)	C : 47.34	H : 6.82	N : 6.96

¹H-NMR (300 MHz, DMSO)

δ 11.75 (br s, 1H, NH), 8.01 (d, 1H, $J_{6,F5} = 7.1$ Hz, H-6), 5.33 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.0$ Hz, H-1'), 5.18 (d, 1H, $J = 2.9$ Hz, OH), 4.79 (s, 1H, OH), 4.35 (d, 1H, $J = 7.4$ Hz, OH), 3.82-3.51 (m, 6H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6a',b'), 0.86 (s, 9H, t-Bu), 0.03, 0.02 (2s, 6H, 2Si-CH₃).

1-(6'-O-tert-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-3',4'-Ο-ισοπροπυλιδενο-β-D-γαλακτοπυρανοζυλο)-5-φθοροουρακίλη (37β)

Το παράγωγο της 5-φθοροουρακίλης **37β** συντίθεται από τον νουκλεοζίτη **36β** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **37α**. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας / μεθανόλη (9.5:0.5), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **37β** (4.70 g, 84%), υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων. Σημείο Τήξεως 94-96 °C. R_f = 0.50 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 9:1).

$[\alpha]_D^{22} = +20^\circ$ (c = 0.5 χλωροφόρμιο)

λ_{\max} 267 nm (ε 4452)

ESI-MS (m/z): 447 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₉H₃₁FN₂O₇Si) C, H, N

Υπολ. (%)	C : 51.10	H : 7.00	N : 6.27
Ευρ. (%)	C : 50.92	H : 7.17	N : 6.21

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 9.15 (br s, 1H, NH), 7.51 (d, 1H, $J_{6,F5} = 5.9$ Hz, H-6), 5.57 (d, 1H, $J_{1',2'} = 7.9$ Hz, H-1'), 4.33-4.26 (m, 2H, H-3', H-4'), 4.07 (dt, 1H, $J_{4',5'} = 2.1$ Hz, $J_{5',6a'} =$

$J_{5',6b'} = 6.3$ Hz, H-5'), 3.92-3.80 (m, 2H, H-6a',b'), 3.74 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 6.1$ Hz, H-2'), 1.56, 1.38 (2s, 6H, 2CH₃), 0.90 (s, 9H, t-Bu), 0.08, 0.07 (2s, 6H, 2Si-CH₃).

1-(6'-O-tert-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-3',4'-O-ισοπροπυλιδενο-β-D-λυξο-εξωπυρανοζυλο-2'-υλοζο)-5-φθοροουρακίλη (38β)

Το παράγωγο της 5-φθοροουρακίλης **38β** συντίθεται από τον νουκλεοζίτη **37β** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **38α**. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο (1:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **38β** (3.87 g, 83%), υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων. Σημείο Τήξεως 155-157 °C. R_f = 0.50 (οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο 6:4).

$$[\alpha]_D^{22} = -2^\circ \quad (c = 0.3 \text{ χλωροφόρμιο})$$

λ_{\max} 264 nm (ϵ 13813)

ESI-MS (*m/z*): 445 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₉H₂₉FN₂O₇Si) C, H, N

Υπολ. (%) C : 51.34 H : 6.58 N : 6.30

Ευρ. (%) C : 51.42 H : 6.72 N : 6.22

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 8.46 (br s, 1H, NH), 7.19 (d, 1H, $J_{6,F5} = 5.7$ Hz, H-6), 6.15 (s, 1H, H-1'), 4.71-4.68 (m, 2H, H-3', H-4'), 4.31 (t, 1H, $J_{5',6a'} = J_{5',6b'} = 6.7$ Hz, H-5'), 3.89 (d, 2H, H-6a',b'), 1.48, 1.42 (2s, 6H, 2CH₃), 0.91 (s, 9H, t-Bu), 0.09 (s, 6H, 2Si-CH₃).

1-(6'-O-tert-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-3',4'-O-ισοπροπυλιδανο-2'-C-κυανο-β-D-ταλοπυρανοζυλο)-5-φθοροουρακίλη (39β) και 1-(6'-O-tert-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-3',4'-O-ισοπροπυλιδανο-2'-C-κυανο-β-D-γαλακτοπυρανοζυλο)-5-φθοροουρακίλη (40β)

Τα παράγωγα της 5-φθοροουρακίλης **39β** και **40β** συντίθενται από τον κετοπυρανονουκλεοζίτη **38β** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση των προϊόντων **39α** και **40α**. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9.8: 0.2).

Από τα πρώτα κλάσματα της στήλης παραλαμβάνεται το ταλοπυρανόζυλο παράγωγο **39β** (1.03 g, 25%), με λευκή αφρώδη υφή. Rf = 0.20 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 9.5: 0.5).

$$[\alpha]_D^{22} = +2^\circ \quad (c = 0.6 \text{ χλωροφόρμιο})$$

$$\lambda_{\max} 261 \text{ nm } (\epsilon 7775)$$

ESI-MS (m/z): 472 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₀H₃₀FN₃O₇Si) C, H, N

Υπολ. (%) C : 50.94 H : 6.41 N: 8.91

Ευρ. (%) C : 50.81 H : 6.52 N: 8.85

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 8.72 (br s, 1H, NH), 7.55 (d, 1H, J_{6,F5} = 5.3 Hz, H-6), 6.08 (s, 1H, H-1'), 5.78 (br s, 1H, 2'-OH), 4.56-4.48 (m, 2H, H-3', H-4'), 4.42 (dt, 1H, J_{4',5'} = 1.9 Hz, J_{5',6a'} = J_{5',6b'} = 6.5 Hz, H-5'), 3.81-3.79 (m, 2H, H-6a',b'), 1.62, 1.39 (2s, 6H, 2CH₃), 0.90 (s, 9H, t-Bu), 0.08, 0.07 (2s, 6H, 2Si-CH₃).

Από τα επόμενα κλάσματα της στήλης παραλαμβάνεται το γαλακτοπυρανόζυλο παράγωγο **40β** (2.29 g, 56%), με λευκή αφρώδη υφή. Rf = 0.15 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 9.5: 0.5).

$$[\alpha]_D^{22} = +7^\circ \quad (c = 0.2 \text{ χλωροφόρμιο})$$

$$\lambda_{\max} 263 \text{ nm } (\epsilon 13813)$$

ESI-MS (*m/z*): 472 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₀H₃₀FN₃O₇Si) C, H, N

Υπολ. (%) C : 50.94 H : 6.41 N: 8.91

Ευρ. (%) C : 51.03 H : 6.44 N: 8.97

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 9.47 (br s, 1H, NH), 7.85 (d, 1H, *J*_{6,F5} = 6.1 Hz, H-6), 5.77 (s, 1H, H-1'), 5.00 (br s, 1H, 2'-OH), 4.52 (d, 1H, *J*_{3',4'} = 6.3 Hz, H-3'), 4.43 (dd, 1H, *J*_{4',5'} = 2.6 Hz, H-4'), 4.22-4.18 (m, 1H, H-5'), 4.02-3.88 (m, 2H, H-6a',b'), 1.73, 1.41 (2s, 6H, 2CH₃), 0.91 (s, 9H, t-Bu), 0.10, 0.09 (2s, 6H, 2Si-CH₃).

1-(2'-C-Κυανο-β-D-ταλοπυρανοζυλο)-5-φθοροουρακίλη (41β)

Το παράγωγο της 5-φθοροουρακίλης **41β** συντίθεται από τον νουκλεοζίτη **39β** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **41α**. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **41β** (0.17 g, 74%), με λευκή αφρώδη υφή. R_f = 0.29 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 8.5:1.5).

[α]_D²² = -2° (c = 0.4 μεθανόλη)

λ_{max} 266 nm (ε 3192)

ESI-MS (*m/z*): 318 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₁H₁₂FN₃O₇) C, H, N

Υπολ. (%) C : 41.65 H : 3.81 N : 13.25

Ευρ. (%) C : 41.54 H : 3.76 N : 13.35

¹H-NMR (300 MHz, DMSO)

δ 11.98 (br s, 1H, NH), 7.80 (d, 1H, *J*_{6,F5} = 7.2 Hz, H-6), 7.62 (s, 1H, H-1'), 6.36 (d, 1H, *J* = 5.6 Hz, OH), 6.21 (s, 1H, OH), 5.28 (d, 1H, *J* = 4.8 Hz, OH),

4.72 (t, 1H, $J = 5.2$ Hz, 6'-OH), 4.07-3.92 (m, 4H, H-3', H-4', H-5', H-6a'), 3.64 (dd, 1H, $J_{5',6b'} = 5.7$ Hz, $J_{6a',6b'} = 12.8$ Hz, H-6b').

^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO)

δ 157.3, 149.6, 140.8, 124.7, 118.6, 82.7, 80.4, 73.9, 72.6, 68.2, 60.6.

IR (KBr, cm^{-1}): 2240 (CN).

1-(2'-C-κυανο-β-D-γαλακτοπυρανοζυλο)-5-φθοροουρακίλη (42β)

Το παράγωγο της 5-φθοροουρακίλης **42β** συντίθεται από το προστατευμένο νουκλεοζίτη **40β** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **41α**. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **42β** (0.41 g, 77%), με λευκή αφρώδη υφή. $R_f = 0.29$ (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 8.5:1.5). $[\alpha]_D^{22} = +8^\circ$ ($c = 0.2$ μεθανόλη)

λ_{max} 266 nm (ϵ 6595)

ESI-MS (m/z): 318 ($M+H^+$)

Στοιχειακή Ανάλυση: ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{FN}_3\text{O}_7$) C, H, N

Υπολ. (%) C : 41.65 H : 3.81 N : 13.25

Ευρ. (%) C : 41.62 H : 3.90 N : 13.39

^1H -NMR (300 MHz, DMSO)

δ 11.89 (br s, 1H, NH), 7.81 (d, 1H, $J_{6,F5} = 7.0$ Hz, H-6), 7.04 (s, 1H, H-1'), 5.74 (s, 1H, OH), 5.60 (s, 1H, OH), 4.85 (s, 1H, OH), 4.66 (s, 1H, OH), 3.91-3.61 (m, 5H, H-3', H-4', H-5', H-6a', b').

^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO)

δ 159.3, 150.4, 140.7, 128.8, 117.9, 101.2, 81.1, 76.4, 68.3, 66.8, 61.2.

IR (KBr, cm^{-1}): 2235 (CN).

1-(6'-O-tert-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-2'-δεοξυ-3',4'-Ο-ισοπροπυλιδενο-2'-C-κυανο-β-D-ταλοπυρανοζυλο)-5-φθοροουρακίλη (43β)

Το παράγωγο της 5-φθοροουρακίλης **43β** συντίθεται από το προστατευμένο νουκλεοζίτη **39β** ή **40β** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **43α**. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9.8:0.2), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **43β** (0.21 g, 63% από το **39β** ή 0.22 g, 66% από το **40β**), ως παχύρρευστο άχρωμο έλαιο. $R_f = 0.36$ (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 9.8:0.2).

$[\alpha]_D^{22} = -2^\circ$ (c = 0.2 χλωροφόρμιο)

λ_{max} 264 nm (ϵ 4259)

ESI-MS (m/z): 456 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₀H₃₀FN₃O₆Si) C, H, N

Υπολ. (%) C : 52.73 H : 6.64 N : 9.22

Ευρ. (%) C : 52.60 H : 6.72 N : 9.33

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 9.01 (br s, 1H, NH), 7.83 (d, 1H, $J_{6,F5} = 5.9$ Hz, H-6), 5.59 (d, 1H, $J_{1',2'} = 1.8$ Hz, H-1'), 4.59 (t, 1H, $J_{2',3'} = J_{3',4'} = 6.5$ Hz, H-3'), 4.30 (dd, 1H, $J_{4',5'} = 2.4$ Hz, H-4'), 4.10-3.89 (m, 3H, H-5', H-6a', b'), 3.67 (dd, 1H, H-2'), 1.74, 1.39 (2s, 6H, 2CH₃), 0.90 (s, 9H, t-Bu), 0.10 (s, 6H, 2Si-CH₃).

1-(2'-Δεοξυ-2'-C-κυανο-β-D-ταλοπυρανοζυλο)-5-φθοροουρακίλη (44β)

Το παράγωγο της 5-φθοροουρακίλης **44β** συντίθεται από το προστατευμένο νουκλεοζίτη **43β** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **41α**. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **44β** (0.11 g, 76%), με λευκή αφρώδη υφή. $R_f = 0.33$ (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 8.5:1.5).

$[\alpha]_D^{22} = -40^\circ$ (c = 0.2 μεθανόλη)

λ_{\max} 264 nm (ϵ 7366)

ESI-MS (m/z): 302 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₁H₁₂FN₃O₆) C, H, N

Υπολ. (%) C : 43.86 H : 4.02 N : 13.95

Ευρ. (%) C : 43.94 H : 4.13 N : 13.73

¹H-NMR (300 MHz, DMSO)

δ 12.15 (br s, 1H, NH), 7.92 (d, 1H, $J_{6,F5} = 7.0$ Hz, H-6), 5.77 (br s, 1H, OH), 5.66 (d, 1H, $J_{1',2'} = 1.7$, H-1'), 4.96 (d, 1H, $J = 3.9$, OH), 4.85 (t, 1H, $J = 5.5$, 6'-OH), 3.99-3.61 (m, 5H, H-3', H-4', H-5', H-6a',b'), 3.49 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 5.3$ Hz, H-2').

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO)

δ 158.4, 149.8, 140.3, 127.9, 118.9, 81.6, 76.7, 75.0, 73.2, 65.1, 37.8.

IR (KBr, cm⁻¹): 2220 (CN).

1-(6'-O-tert-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-3',4'-O-ισοπροπυλιδενο-2'-C-κυανο-2'-O-μεσυλο-β-D-ταλοπυρανοζυλο)-5-φθοροουρακίλη (45β)

Το μέσυλο παράγωγο της 5-φθοροουρακίλης **45β** συντίθεται από την κυανυδρίνη **39β** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **45α**. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9.8:0.2), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **45β** (0.27 g, 67%), με λευκή αφρώδη υφή. Rf = 0.54 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 9.5:0.5).

$[\alpha]_D^{22} = +2^\circ$ (c = 0.2 χλωροφόρμιο)

λ_{\max} 263 nm (ϵ 8012)

ESI-MS (*m/z*): 550 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₁H₃₂FN₃O₉SSi) C, H, N

Υπολ. (%) C : 45.89 H : 5.87 N : 7.64

Ευρ. (%) C : 45.71 H : 5.96 N : 7.54

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 8.16 (br s, 1H, NH), 7.53 (d, 1H, *J*_{6,F5} = 6.2 Hz, H-6), 6.62 (s, 1H, H-1'), 5.05 (d, 1H, *J*_{3',4'} = 6.8 Hz, H-3'), 4.66 (dd, 1H, *J*_{4',5'} = 1.4 Hz, H-4'), 4.34 (dt, 1H, *J*_{5',6'a} = *J*_{5',6'a} = 6.2 Hz, H-5'), 3.84-3.82 (m, 2H, H-6a',b'), 3.28 (s, 3H, CH₃SO₂), 1.69, 1.42 (2s, 6H, 2CH₃), 0.91 (s, 9H, t-Bu), 0.09 (s, 6H, 2Si-CH₃).

1-(6'-*O*-*tert*-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-3',4'-*O*-ισοπροπυλιδενο-2'-*C*-κυανο-2'-*O*-μεσυλο-β-D-γαλακτοπυρανοζυλο)ουρακίλη (46β)

Το μέσυλο παράγωγο της 5-φθοροουρακίλης **46β** συντίθεται από την κυανουδρίνη **40β** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **45α**. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9.8: 0.2), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **46α** (0.46 g, 61%), ως παχύρρευστο άχρωμο έλαιο. R_f = 0.48 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 9.5:0.5).

[α]_D²² = +12° (c = 0.3 χλωροφόρμιο)

λ_{max} 262 nm (ε 3678)

ESI-MS (*m/z*): 550 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₁H₃₂FN₃O₉SSi) C, H, N

Υπολ. (%) C : 45.89 H : 5.87 N : 7.64

Ευρ. (%) C : 45.82 H : 5.94 N : 7.73

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 8.59 (br s, 1H, NH), 7.75 (d, 1H, $J_{6,F5} = 5.9$ Hz, H-6), 5.93 (s, 1H, H-1'), 4.81 (d, 1H, $J_{3',4'} = 6.1$ Hz, H-3'), 4.50 (dd, 1H, $J_{4',5'} = 2.3$ Hz, H-4'), 4.23-4.18 (m, 1H, H-5'), 4.02-3.89 (m, 2H, H-6a',b'), 3.26 (s, 3H, CH₃SO₂), 1.77, 1.43 (2s, 6H, 2CH₃), 0.90 (s, 9H, t-Bu), 0.09 (s, 6H, 2Si-CH₃).

1-(6'-O-tert-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-3',4'-Ο-ισοπροπυλιδανο-β-D-ταλοπυρανοζυλο)-5-φθορο-ουρακίλη]-2'-σπειρανικο-5''-(4''-αμινο-1'',2''-οξαθειολο-2'',2''-διοξειδιο) (47β)

Το σπειρανικό παράγωγο της 5-φθοροουρακίλης **47β** συντίθεται από το μέσυλο παράγωγο **45β** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **47α**. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9.5: 0.5), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **47β** (0.20 g, 74%), με λευκή αφρώδη υφή. R_f = 0.38 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 9.5:0.5).

$[\alpha]_D^{22} = -22^\circ$ (c = 0.5 χλωροφόρμιο)

λ_{\max} 265 nm (ε 7399)

ESI-MS (m/z): 550 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₁H₃₂FN₃O₉SSi) C, H, N

Υπολ. (%) C : 45.89 H : 5.87 N : 7.64

Ευρ. (%) C : 45.99 H : 5.81 N : 7.70

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 10.61 (br s, 1H, NH), 7.68 (d, 1H, $J_{6,F5} = 6.0$ Hz, H-6), 6.47 (s, 1H, H-1'), 5.86 (br s, 2H, NH₂-4''), 5.45 (s, 1H, H-3''), 4.65 (d, 1H, $J_{3',4'} = 7.5$ Hz, H-3'), 4.48 (d, 1H, H-4'), 4.36 (t, 1H, $J_{5',6'a} = J_{5',6'a} = 4.6$ Hz, H-5'), 3.86 (d, 2H, H-6a',b'), 1.58, 1.38 (2s, 6H, 2CH₃), 0.93 (s, 9H, t-Bu), 0.12, 0.10 (2s, 6H, 2Si-CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃)

δ 159.1, 152.8, 150.3, 140.9, 127.9, 112.7, 92.8, 83.2, 79.2, 75.8, 73.2, 71.4, 62.9, 26.1, 25.8, 25.3, 18.7, -5.6, -5.7.

IR (KBr, cm⁻¹): 3410, 3360 (NH₂), 1620 (C=C-N).

[1-(β-D-Ταλοπυρανοζυλο)-5-φθοροουρακίλη]-2'-σπειρανικό-5''-(4''-αμινο-1'',2''-οξαθειολο-2'',2''-διοξειδιο) (49β)

Το σπειρανικό παράγωγο της 5-φθοροουρακίλης **49β** συντίθεται από τον προστατευμένο νουκλεοζίτη **47β** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **49α**. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (8: 2), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **49β** (0.08 g, 58%), με λευκή αφρώδη υφή. R_f = 0.24 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 8:2).

[α]_D²² = -12° (c = 0.1 διμεθυλοσουλφοξειδίο)

λ_{max} 263 nm (ε 2532)

ESI-MS (m/z): 378 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₂H₁₄FN₃O₉S) C, H, N

Υπολ. (%) C : 36.46 H : 3.57 N : 4.81

Ευρ. (%) C : 36.52 H : 3.68 N : 4.72

¹H-NMR (300 MHz, DMSO)

δ 11.61 (br s, 1H, NH), 7.69 (d, 1H, J_{6,F5} = 7.3 Hz, H-6), 6.69 (s, 1H, H-1'), 6.32 (br s, 2H, NH₂-4''), 6.19 και 6.15 (2 brs, 2H, 2OH), 5.47 (s, 1H, H-3'), 4.66 (brs, 1H, OH), 4.16-3.59 (m, 5H, H-3', H-4', H-5', 6-a',b')

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO)

δ 162.3, 158.7, 150.4, 140.8, 126.5, 90.8, 86.2, 79.1, 75.2, 70.4, 66.5, 62.5.

IR (KBr, cm⁻¹): 3450, 3320 (NH₂), 1655 (C=C-N).

IV. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε επιτυχώς η σύνθεση νέων σειρών πυρανονουκλεοζιτών, οι οποίοι διαθέτουν ως διακλάδωση στον εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο την κυανο ή την αιθυλομάδα. Συγκεκριμένα, επιτεύχθηκε η παρασκευή και η βιολογική αποτίμηση 39 τελικών ενώσεων, οι οποίες περιλαμβάνουν κυρίως κυανο και αιθυλο-ανάλογα καθώς και κάποια παράγωγα τους. Όλα τα μόρια-στόχοι ταυτοποιήθηκαν φασματοσκοπικά με φάσματα υπεριώδους, πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού άνθρακα και υδρογόνου, φασματοσκοπία μάζας, καθώς και στοιχειακές αναλύσεις.

Η προτεινόμενη συνθετική μεθοδολογία είχε ως κεντρικούς άξονες είτε αντιδράσεις που αφορούσαν την αρχική τροποποίηση των σακχάρων και την μετέπειτα σύζευξή τους με τις αντίστοιχες νουκλεοβάσεις, είτε αντιδράσεις τροποποίησης των υδατανθρακικών δακτυλίων ήδη συντεθειμένων νουκλεοζιτών. Με βάση την πρώτη συνθετική κατεύθυνση σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν οι 3'-C-αιθυλο και 3'-C-κυανο-πυρανονουκλεοζίτες, ενώ επιλέγοντας τη δεύτερη συνθετική προσέγγιση παρασκευάστηκαν οι 4'-C-κυανο και 2'-C-πυρανονουκλεοζίτες. Πρέπει να τονιστεί ότι στις περισσότερες περιπτώσεις οι αντιδράσεις πυρηνόφιλης προσθήκης της κυανο και της αιθυλομάδας στα κατάλληλα υποστρώματα αλλά και οι αντιδράσεις αναγωγής για την παρασκευή των αντίστοιχων δεοξυ-νουκλεοζιτών λαμβάνουν χώρα με εξαιρετικό στερεοχημικό έλεγχο, οδηγώντας στη σύνθεση ενός μόνο από τα δύο πιθανά ισομερή.

Αναλυτικότερα μέσω μιας απλής και σύντομης συνθετικής πορείας με αφετηρία ένα εύκολα προσβάσιμο αρχικό υπόστρωμα, παρασκευάστηκαν οι 3'-C-αιθυλο-πυρανονουκλεοζίτες, ενώ εκμεταλλευόμενοι στη συνέχεια την παρουσία του τριπλού δεσμού συντέθηκαν νέοι πυρανονουκλεοζίτες με δύο ετεροκυκλικές βάσεις. Δεδομένου των αποθαρρυντικών βιολογικών αποτελεσμάτων των αιθυλο-πυρανονουκλεοζιτών δεν σχεδιάστηκε η μεταφορά της αιθυλομάδας σε άλλη θέση του σακχάρου. Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι από τους νουκλεοζίτες με διπλή κεφαλή κάποια ανάλογα της αδενίνης παρουσίασαν μια μέτρια αλλά εκλεκτική ανασταλτική δράση έναντι των ανθρώπινων τραχηλικών καρκινικών κυττάρων (HeLa), γεγονός που

πιθανώς να δικαιολογεί την μελλοντική παρασκευή μορίων με παρόμοια χημική δομή που θα διαθέτουν ενδεχομένως καλύτερη βιολογική δράση.

Εφαρμόζοντας μια ανάλογη αποτελεσματική συνθετική πορεία με αυτήν των αιθυλο-αναλόγων συντέθηκαν οι 3'-C-κυανο-πυρανονουκλεοζίτες, ενώ με αφετηρία μια απλή αντίδραση αναγωγής του αρχικού κυανο-υποστρώματος παρασκευάστηκαν επίσης τα αντίστοιχα 3'-δεοξυ-3'-C-κυανο-νουκλεοζιτικά ανάλογα. Βιολογικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στους συγκεκριμένους πυρανονουκλεοζίτες, απέδειξαν ότι ο 3'-C-κυανο νουκλεοζίτης της 5-φθοροουρακίλης (5-FU) παρουσιάζει σημαντική κυτταροστατική δράση συγκρίσιμη με αυτή της 5-FU.

Προκειμένου να εξαχθούν χρήσιμα συμπεράσματα για τη σχέση χημικής δομής-βιολογικής δραστηριότητας των κυανο-πυρανονουκλεοζιτών κρίθηκε σκόπιμη αρχικά η σύνθεση των 4'-C-κυανο-πυρανονουκλεοζιτών, καθώς και των αντίστοιχων δεοξυ-αναλόγων τους. Η συνθετική διαδικασία περιλάμβανε απλές αντιδράσεις προστασίας και αποπροστασίας στα κατάλληλα ενδιάμεσα προϊόντα, οδηγώντας στην παραλαβή των τελικών 4'-διακλαδισμένων νουκλεοζιτών με ένα αποτελεσματικό αλλά και στερεοχημικά προβλεπόμενο τρόπο.

Ακολουθώντας μια παραπλήσια συνθετική πορεία παρασκευάστηκαν οι 2'-C-κυανο και 2'-δεοξυ-2'-C-κυανο-πυρανονουκλεοζίτες, ενώ ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της συγκεκριμένης πορείας αποτελεί η παραλαβή και των δύο πιθανών 2'-C-κυανο ισομερών μετά την στερεοεκλεκτική πυρηνόφιλη προσθήκη της κυανο-ομάδας στον πρόδρομο κετο-νουκλεοζίτη. Η πειραματική διαδικασία επεκτάθηκε προκειμένου να παρασκευαστούν τα αντίστοιχα 2'-σπειρανικά παράγωγα τους, καθώς οι ενώσεις αυτές μοιάζουν στη χημική δομή με τους TSAO νουκλεοζίτες που παρουσιάζουν έντονο βιολογικό ενδιαφέρον.

Αναλυτικότερα όσον αφορά τη βιολογική δράση των νέων κυανο-πυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων, οι νέες ενώσεις αν και δεν διαθέτουν ενδιαφέρουσες αντιικές ιδιότητες, ορισμένες από αυτές παρουσιάζουν αυξημένη ανασταλτική δράση έναντι του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων λευχαιμίας (L1210), των ανθρώπινων T-λεμφοκυττάρων (CEM), καθώς επίσης και των ανθρώπινων τραχηλικών καρκινικών κυττάρων (HeLa). Συγκεκριμένα, πειραματικές μελέτες κατέδειξαν ότι τα πυρανονουκλεοζιτικά

ανάλογα της 5-FU πιθανότατα δρουν ως προφάρμακα της ελεύθερης βάσης (5-FU), παρουσιάζοντας κυτταροστατικότητα συγκρίσιμη και σε κάποιες περιπτώσεις όμοια με αυτή.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι επί του παρόντος είναι ασαφές πώς τα κυανο-πυρανονουκλεοζιτικά ανάλογα ελευθερώνουν την 5-FU και ποια είναι η φαρμακοκινητική των συγκεκριμένων ενώσεων σε κυτταρικές καλλιέργειες ή σε ένα έμβιο οργανισμό. Παρόλο που μπορεί να υποστηριχθεί ότι η χορήγηση της ελεύθερης βάσης της 5-FU είναι ένας αρκετά αποτελεσματικός τρόπος αντιμετώπισης των καρκινικών κυττάρων, δεν μπορεί να αποκλειστεί ότι τα συγκεκριμένα κυανο-ανάλογα μπορεί να διαθέτουν ενδεχόμενα πλεονεκτήματα στη θεραπευτική δράση ή στην αποτελεσματικότητα μέσω διαφοροποιημένων φαρμακοκινητικών χαρακτηριστικών σε σχέση με την δράση της ελεύθερης 5-FU. Συνεπώς όσον αφορά τις προοπτικές των κυανο-αναλόγων σε πιθανές φαρμακολογικές εφαρμογές, ένα μελλοντικό αντικείμενο ενασχόλησης θα μπορούσε να είναι διάφορες μελέτες των συγκεκριμένων ενώσεων σε ζωικά μοντέλα “*in vivo*”.

V. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abraham, R.J.; Reid, M. *Magn. Reson. Chem.* **2000**, *38*, 570-579.
- Agelis, G.; Tzioumaki, N.; Tselios, T.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 1366-1375.
- Ahlquist, M.; Fokin, V. V. *Organometallics*, **2007**, *26*, 4389-4391.
- Alexandrova, L. A. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2011**, *37*, 651-671.
- Antonakis, K. "Hexopyranose nucleosides". In *Studies in Natural Products Chemistry, Stereoselective Synthesis (Part C)*; Elsevier, Amsterdam, **1989**, *4*, p. 241.
- Augustyns, K.; Rozenski, J.; Van Aerschot, A.; Busson, R.; Claes, P.; Herdewijn, P. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 1189-1198.
- Aujard, C.; Moulé, Y.; Chany-Morel, E.; Antonakis, K. *Biochem. Pharmacol.* **1978**, *27*, 1037-1042.
- Azuma, A.; Nakajima, Y.; Nishizono, N.; Minakawa, N.; Suzuki, M.; Hanaoka, K.; Kobayashi, T.; Tanaka, M.; Sasaki, T.; Matsuda, A. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 4183-4189.
- Balatsos, N. A. A.; Vlachakis, D.; Maragozidis, P.; Manta, S.; Anastasakis, D.; Kyritsis, A.; Vlassi, M.; Komiotis, D.; Stathopoulos, C. *Biochemistry* **2009**, *48*, 6044-6051.
- Balatsos, N.; Vlachakis, D.; Chatzigeorgiou, V.; Manta, S.; Komiotis, D.; Vlassi, M.; Stathopoulos C. *Biochimie* **2012**, *94*, 214-221.
- Barton, D. H. R.; McCombie, S. W. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1975**, *1*, 1574-1585.
- Berdis A. J. *Biochemistry* **2008**, *47*, 8253-8260.
- Blackburn, G. M.; Gait, M. J., *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*. Oxford University Press: New York, **1990**; p 446.
- Bloch, A.; Nichol, C. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1964**, 530-539.
- Bouali, A.; Ewing, D.F. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **1994**, *13*, 491-499.
- Bourgeois, J.M. *Helv. Chim. Acta* **1975**, *58*, 363-372.

- Boyd, M.J.; Crane, S.N.; Robichaud, J.; Scheiget, J.; Black, W.C.; Chauret, N.; Wang, Q.; Masse, F.; Oballa, R.M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 675–679.
- Brandsma, L. *Preparative Acetylene Chemistry*, 2nd ed., Elsevier, Amsterdam, **1988**.
- Camarasa, M.J.; Pérez-Pérez, M.J.; San-Félix, A.; Balzarini, J.; De Clercq, E. *J. Med. Chem.*, **1992**, *35*, 2721-2727.
- Camarasa, M.J.; San-Félix, A.; Velázquez, S.; Pérez-Pérez, M.J.; Gago, F.; Balzarini, J. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *4*, 945-963.
- Camarasa, M.J., San-Félix A., Pérez-Pérez, M.J. *Antiviral Chem. Chemother.* **2005**, *16*, 147-153.
- Challand, R.; Young, R. J. *Antiviral Chemotherapy* Mann, J. Ed.; UK, **1997**.
- Chatgililoglu, C.; Lalevée, J. *Molecules* **2012**, *17*, 527-555.
- Chen, J.J.; Wei, Y.; Drach, J. C.; Townsend, L.B. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2449-2456.
- Chirakul, P.; Sigurdsson, S.T. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 917-919.
- Chong, Y. G., G.; Chu, C. K. *Tetrahedron Asymm.* **2000**, *11*, 4853-4875.
- Chu, C. K., Baker, D. C., Eds.; *Nucleosides and Nucleotides as Antitumor and Antiviral Agents*; Plenum Press: New York, **1993**.
- Cihlara, T.; Rayb, A. S. *Antiviral Res.* **2010**, *85*, 39-58.
- Courtney, S. M. U.S. Patent 5 945 406, **1999**.
- Davoll, J.; Lythgoe, B.; Todd, A. R. *J. Chem. Soc.* **1948**, 967-969.
- Davoll, J.; Lowy, B. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 1650-1655.
- De Clercq, E.; Murase, J.; Marquez, V.E. *Biochem. Pharmacol.* **1991**, *41* 1821-1829.
- De Clercq E. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 13–25.
- De Clercq, E. *J. Clin. Virol.* **2004**, *30*, 115–133.
- De Clercq E.; Field, H. J. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *147*, 1–11.

- De Clercq, E. *Curr. Opin. Microbiol.* **2005**, 8, 552–560.
- Diaz, Y.; El-Laghdach, A.; Castillon, S. *Tetrahedron* **1997**, 53, 10921-10938.
- Dimopoulou, A.; Manta, S.; Kiritsis, C.; Gkaragkouni, D.N.; Papasotiriou, I.; Balzarini, J.; Komiotis, D.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23, 1330–1333.
- Dong, S.; Paquette L. A. *J. Org. Chem.*, 71, **2006**, 1647-1652.
- Elhalabi, J.; Rice, K. G. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2004**, 23, 195-205.
- Eliel, E. L., S. H. Wilen, et al. (1994). *Stereochemistry of Organic Compounds* pp 720-726.
- Elwell, L. P.; Ferone, R.; Freeman, G. A.; Fyfe, J. A.; Hill, J. A.; Ray, P. H.; Richards, C. A.; Singer, S. C.; Knick, V. B.; Rideout, J.L.; Zimmerman, T.P. *Antimicrob. Agents Chemother* **1987**, 31, 274-280.
- Ferreira, S. B.; Sodero, A. C. R.; Cardoso, M. F. C.; Lima, E. S.; Kaiser, C. R.; Silva, Jr. F. P., Ferreira, V. F. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 2364-2375.
- Fischer E.; Helferich B. Ber. *Deutsch. Chem. Ges.* **1914**, 47, 210–235.
- Fleming, F. F.; Yao, L.; Ravikumar, P.C.; Funk, L.; Shook, B. C. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 7902–7917.
- Galmarini, C. M.; Mackey, J. R.; Dumontet, C. *Lancet. Oncol.* **2002**, 3, 415-424.
- Gulland J.M.; Story L.F. *J. Chem. Soc.* **1938**, 259–261.
- Haeckel, R.; Weber, K.; Germann, C.; Haberkorn, U.; Zeisler, S.; Eisenbarth, J.; Wiessler, M.; Oberdorfer, F. *J. Labelled Comp. Rad.* **1996**, 38, 1061-1070.
- Halmos, T.; Cardon, A.; Antonakis, K. *Chem. Biol. Interactions*, **1983**, 46, 11-29.
- Haouz, A.; Vanheusden, V.; Munier-Lechman, H.; Froeyen, M.; Herdewijn, P.; Van Galenbergh, S.; Delarue, M. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 4963.

- Haraguchi, K.; Takahashi, H.; Tanaka, H. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 5657-5660.
- Haraguchi, K.; Takeda, S.; Tanaka, H.; Nitanda, T.; Baba, M.; Dutschman, G.E.; Cheng, Y.C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, *13*, 3775-3777.
- Hassner, A.; Krepski, L. R.; Alexanian, V. *Tetrahedron*, **1978**, *34*, 2069-2076.
- Hattori, H.; Tanaka, M.; Fukushima, M.; Sasaki, T.; Matsuda, A. *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 5005-5011.
- Hattori, H.; Nozawa, E.; Iino, T.; Yoshimura, Y.; Shuto, S.; Shimamoto, Y.; Nomura, M.; Fukushima, M.; Tanaka, M.; Sasaki, T.; Matsuda, A. *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 2892-2902.
- Hayakawa, H.; Kohgo, S.; Kitano, K.; Ashida, N.; Kodama, E.; Mitsuya, H.; Ohri, H.; *Antiviral. Chem. Chemother.* **2004**, *15*, 169-187.
- Hernández-Reyes, C. X.; Angeles-Beltrán, D.; Lomas-Romero, L.; González-Zamora, E.; Gaviño, R.; Cárdenas, J.; Morales-Serna, J. A.; Negrón-Silva, G. E. *Molecules* **2012**, *17*, 3359-3369.
- Herscovici, J.; Antonakis, K. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1980**, *12*, 561.
- Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 210-216.
- Hussain, S.P.; Hofseth, L.J.; Harris, C.C. *Nat Rev Cancer.* **2003**, *3*, 276-85.
- Iino, T.; Yoshimura, Y.; Matsuda, A. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 10397-10406.
- Johnson C. R.; Bhumralkar, D. R. *Nucleosides Nucleotides* **1995**, *14*, 185- 194.
- Jordheim, L.P.; Durantel, D.; Zoulim, F.; Dumontet, C.; *Nat Rev Drug Discov.* **2013**, *12*, 447-64.

- Kakinuma, K.; Iihama, Y.; Takagi, I.; Ozawa, K.; Yamauchi, N.; Imamura, N.; Esumi, Y.; Uramoto, M. *Tetrahedron*, **1992**, *48*, 3763-3774.
- Kassou, M.; Castillon, S. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 3696-3701.
- Kazimierczuk, Z.; Cottam, H. B.; Revankar, G. R.; Robins, R. K. *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, *106*, 6379-6382.
- Kazuno, H.; Fujioka, A.; Fukushima, M.; Wataya, Y.; Matsuda, A.; Sasaki, T. *Int J Oncol.*, **2009**, *34*, 1373-80.
- Khan, A. T.; Mondal, E.; *Synlett* **2003**, *5*, 694-698.
- Kim, H.-J.; Chen, F.; Benner, S. A. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 3664-3669.
- Kohgo, S.; Yamada, K.; Kitano, K.; Sakata, S.; Hayakawa, H.; Nameki, D.; Kodama, E.; Matsuoka, M.; Mitsuya, H.; Ohru, H. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2003**, *22*, 887-889.
- Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-21.
- Kondo, T.; Goto, T. *Agr. Biol. Chem.* **1971**, *35*, 625-628.
- Komiotis, D.; Manta, S.; Tsoukala, E.; Tzioumaki, N. *Curr. Med. Chem.: Anti-Infect. Agents*, **2008**, *7*, 219-244.
- Kumara Swamy, K. C.; Bhuvan Kumar, N. N.; Balaraman, E.; Pavan Kumar, K. V. P. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2551-2651
- Lagrange, A.; Olesker, A.; Winternitz, F. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 4495-4498.
- Langen P. Antimetabolites of nucleic acid metabolism. New York: Gordon and Breach, **1975**.
- Laurence, C.; Brameld, K. A.; Graton, J.; Le Questel, J.-Y.; Renault, E. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4073-4086.
- Le Questel J.Y. *J. Phys. Org. Chem.* **2000**, *13*, 347-358.
- Li, J.; Zheng, M.; Tang, W.; He, P.L.; Zhu, W.; Li, T.; Zuo, J.P.; Liu, H.; Jiang, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5009-5013.
- Liu, X.; Guo, X.; Wang, F.; Lei, G.; Luo, D. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2007**, *26*, 45-49.

- Liu, X.-J.; Nowak, B.; Wang, Y.-Q.; Plunkett, W. *Chin. J. Cancer* **2012**, *31*, 373-380.
- Martin, N.H.; Nance, K.H. *J. Mol. Graph. Model.* **2002**, *21*, 51-56.
- Matsuda, A.; Nakajima, Y.; Azuma, A.; Tanaka, M.; Sasaki, T. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2917-2919.
- Maity, J. K.; Ghosh, R.; Drew, M.G.B.; Achari, B.; Mandal, S.B. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 4305–4308.
- Majdam, K.; Lubecka, K.; Kaufman-Szymczyk, A.; Fabianowska-Majewska, K. *Acta Pol Pharm.* **2011**, *68*, 459-66.
- Mane, R.S.; Ghosh, S.; Chopade, B.A; Reiser, O.; Dhavale, D.D. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 2892–2895.
- Mansour, T.S.; Storer, R. *Curr. Pharm. Design* **1997**, *3*, 227–264.
- Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 980-987.
- Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 420-428.
- Manta, S.; Tsoukala, E.; Tzioumaki, N.; Goropevsek, A.; Pamulapati, R.T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 2696-2704.
- Manta, S.; Parmenopoulou, V.; Kiritsis, C.; Dimopoulou, A.; Kollatos, N.; Papatotiriou, I.; Balzarini, J.; Komiotis, D. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2012**, *31*, 522-535.
- Manta, S.; Kiritsis, C.; Dimopoulou, A.; Parmenopoulou, V.; Kollatos, N.; Tsotinis, A.; Komiotis, D. *Anti-Infective Agents* **2014**, *12*, 2-57.
- Mathé, C.; Gosselin, G. *Antiviral Res.* **2006**, *71*, 276-281.
- Maurinsh, Y.; Schraml, J.; De Winter, H.; Blaton, N.; Peeters, O.; Lescrinier, E.; Rozenski, J.; Van Aerschot, A.; De Clercq, E.; Busson, R.; Herdewijn, P. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2861.
- McCarthy, J. R.; Matthews, D. P.; Stemerick, D. M.; Huber, E. W.; Bey, P.; Lippert, B. J.; Snyder, R. D.; Sunkarall, P. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7439-7440.

- Meike, S.; Yamamori, T.; Yasui, H.; Eitaki, M.; Matsuda, A.; Morimatsu, M.; Fukushima, M.; Yamasaki, Y.; Inanami, O. *Molecular Cancer* **2011** 10:92.
- Meneni, S.; Ott, I.; Sergeant, C.D.; Sniady, A.; Gust, R.; Dembinski R. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15, 3082-3088.
- Minakawa, N.; Takeda, T.; Sasaki, T.; Matsuda, A.; Ueda, T. *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 778 – 786.
- Mikhailopulo I.A. *Curr. Org. Chem.* **2007**, 11, 317–335.
- Mikhailopulo, I.A.; Miroshnikov, A.I. *Acta Naturae.* **2010**, 2, 36–59.
- Montgomery J.A. *Heterocycles* **1984**, 21, 137–150.
- Nagendrappa G. *Resonance* **2008**, 13, 355-368.
- Nair, V.; Buenger, G. S. *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 3695-3697.
- Neilson, T.; Werstiuk, E. S. *Can. J. Chem.* **1971**, 49, 493-499.
- Niedballa, U.; Vorbruggen, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1970**, 9, 461-462.
- Nord, D. L.; Dalley, N. K.; Mc Kernan, P. A.; Robins, R. K. *J. Med. Chem.* **1987**, 30, 1044-1054.
- Ostrowski, T.; Wroblowski, B.; Busson, R.; Rozenski, J.; De Clercq, E.; Bennet, M. S.; Champness, J. N.; Summers, W. C.; Sanderson, M. R.; Herdewijn, P. *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 4343.
- Ojima, W.; Geng, X.; Wu, X.; Qu, C.; Borella, C. P.; Xie, H.; Wilhelm, S. D.; Leece, B. A.; Bartle, L. M.; Goldmacher, V. S.; Chari, R. V. J. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 5620.
- Ohrui, H.; Kohgo, S.; Kitano, K.; Sakata, S.; Kodama, E.; Yoshimura, K.; Matsuoka, M.; Shigeta, S.; Mitsuya, H. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 4516-4525.
- Onodera, K.; Hirano, S.; Masuda, F.; Kashimura N. *J. Org. Chem.* **1966**, 31, 2403–2406
- O-Yang, C.; Wu, H. Y.; Fraser-Smith, E. B.; Walker, K. A. M. *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 37-40.
- Paju, A.; Päre, M.; Selyutina, A.; Zusinaite, E.; Merits, A.; Pehk, T.;

- Siirde, K.; Müürisepp, A.M.; Kailas, T.; Lopp, M. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **2010**, 29, 707–720.
- Pastor-Anglada, M.; Felipe, A.; Casado, F.J. *Trends Pharmacol Sci.* **1998**, 19, 424-30.
 - Perez-Perez, M. J.; Camarasa, M. J.; Diaz-Ortiz, A.; San-Felix, A.; De las Heras, F. G. *Carbohydr. Res.* **1991**, 216, 399-411.
 - Petrelli, R.; Vita, P.; Torquati, I.; Felczak, K.; Wilson, D.J.; Franchetti, P.; Cappellacci, L. *Recent. Pat. Anticancer Drug. Discov.* **2013**, 8,103-25.
 - Prusoff, W.H. *Trans. Am. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol.* **1963**, 67, 707–709.
 - Rico-Gómez, R.; López-Romero, J. M.; Hierrezuelo, J.; Brea, J.; Loza, M.I.; Pérez-González, M. *Carbohydrate Research* **2008**, 343, 855–864.
 - Robles, R.; Rodriguez, C.; Izquierdo, I.; Plaza, M. T.; Mota, A. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, 8, 2959.
 - Rosenthal, J.A.; Cliff, B.L. *Can. J. Chem.* **1976**, 54, 543-547.
 - Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2002**, 41, 2596-2599.
 - Rouillard, M.; Geribaldi, S.; Khazarian J.; Azzaro, M. *Org. Magn. Reson.* **1980**, 13, 323-327.
 - Sandrini, M. P. B.; Shannon, O. ; Clausen, A. R.; Bjorck, L.; Piskur, J. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, 51, 2726–2732.
 - Spanou, C.; Manta, S.; Komiotis D.; Dervishi, A.; Kouretas, D. *Int. J. Mol. Sci.* **2007**, 8, 695.
 - Spanou, C.; Tzioumaki, N.; Manta, S.; Margaritis, P.; Kouretas, D.; Komiotis, D.; Liadaki, K. *Pharmacology & Pharmacy* **2011**, 2, 122-126.
 - Stauffer, C.S.; Fothergill, A.W.; Rinaldi, M.G.; Dutta, A. *Future Med Chem.* **2009**, 1, 379-89.
 - Szafraniec, S.I.; Stachnik, K.J.; Skierski, J.S.; *Acta Pol Pharm.* **2004**, 61, 297-305.
 - Takenuki, K.; Matsuda, A.; Ueda, T.; Sasaki, T.; Fujii, A.; Yamagami, K. *J. Med. Chem.* **1988**, 31, 1063-1064.

- Tiwari, K. N.; Shortnacy-Fowler, A. T.; Parker W. B.; Waud, W. R.; Secrist III, J. A. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2009**, *28*, 657-677.
- Townsend, L. B., Ed., *Chemistry of Nucleosides and Nucleotides*. Plenum Press: New York, **1988**.
- Trachsel D. *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 2754-2759.
- Tronchet, J.M.J.; Kovacs, I.; Seman, M.; Dilda, P.; De Clercq, E.; Balzarini, J. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2000**, *19*, 775-794.
- Tsirkone, V. G.; Tsoukala, E.; Lamprakis, C.; Manta, S.; Hayes, J. M.; Skamnaki, V. T.; Drakou, C.; Zographos, S. E.; Komiotis, D.; Leonidas, D. D. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 3413-3425.
- Trakossas, S.; Coutouli-Argyropoulou, E.; Hadjipavlou-Litina, D.J. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 1673-1676.
- Tsoukala, E.; Tzioumaki, N.; Manta, S.; Riga, A.; Balzarini, J.; Komiotis, D. *Bioorg Chem.* **2010**, *38*, 285-93.
- Tsoukala, E.; Manta, S.; Kiritsis, C.; Komiotis, D. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2012**, *12*, 255-275.
- Tzioumaki, N.; Tsoukala, E.; Manta, S.; Agelis, G.; Balzarini, J.; Komiotis, D. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2009**, *342*, 353-360.
- Tzioumaki, N.; Manta, S.; Tsoukala, E.; Voorde J.V.; Liekens, S.; Komiotis, D.; Balzarini, J. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 993-1005.
- Tzioumaki, N.; Tsoukala, E.; Manta, S.; Kiritsis, C.; Balzarini, J.; Komiotis, D. *Carbohydr. Res.* **2011**, *346*, 328-333.
- Umemoto, T.; Wengel, J. Madsen, A. S. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 1793-1797.
- Vanheusden, V.; Busson, R.; Herdewijn, P.; Van Calenbergh, S. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4446.
- Velázquez, S.; Jimeno, M.L.; Camarasa, M.J.; Balzarini, J. *Tetrahedron*, **1994**, *50*, 11013-11022.
- Verheggen, I.; Van Aerschot, A.; Toppet, S.; Snoeck, R.; Janssen, G.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Herdewijn, P. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2033-2040.

- Verheggen, I.; Van Aerschot, A.; Van Meervelt, L.; Rozenski, J.; Wiebe, L.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Balzarini, J.; Claes, P.; De Clercq, E.; Herdewijn, P. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 826-835.
- Vorbrüggen, H.; Hofle, G. *Chem. Ber.* **1981**, *114*, 1256-1268.
- Vorbrüggen, H.; Krolkiewicz, K.; Bennua, B.U.; *Chem. Ber.* **1981**, *114*, 1234-1255.
- Vorbrüggen, H.; Ruh-Pohlenz, C. *Org. React.* **2000**, *55*, 1-630;
- Vorbrüggen, H.; Ruh-Pohlenz, C.; Handbook of Nucleoside Synthesis, John Wiley & Sons, Inc., Chichester, UK, **2001**.
- Wagner, C. R.; Iyer, V. V.; McIntee, E. J. *Med. Res. Rev.* **2000**, *20*, 417-451.
- Watanabe, K.A.; Chiu, T.M.K.; Hollenberg, D.H.; Fox, J.J. *J. Org. Chem.* **39**, **1974**, 2482-2486.
- Wermuth C. G. (ed), "The Practice of Medicinal Chemistry, 3 rd. Edition" Academic. Press, New York, **2008**.
- Worrell, B. T.; Malik, J. A.; Fokin, V. V. *Science* **2013**, *340*,457-460.
- Wu, Q.; Qu, F.; Wan, J.; Xia, Y.; Peng, L. Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids **2005**, *24*, 999–1008.
- Wu, T.; Nauwelaerts, K.; Van Aerschot, A.; Froeyen, M.; Lescrinier, E.; Herdewijn, P. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 5423-5431.
- Zhenchuk, A.; Lotfi, K.; Juliusson, G.; Albertioni, F.; Biochem. Pharmacol. **2009**, *78*, 1351–1359.
- Zhu, W.; Gumina, G.; Schinazi, R.F.; Chu, C.K. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 6423-6431.
- Ziemniak, J.A.; Wynn, R.J.; Aranda, J.V.; Zarowitz, B.J.; Schentag, J.J. *Dev. Pharmacol. Therap.* **1984**, *7*, 30–38.

ABSTRACT

Nucleoside analogues have attracted much scientific attention in recent years as a result of their promising therapeutical applications. The present doctoral dissertation is mainly focused on the synthesis of novel branched-chain C-cyano or C-ethynyl nucleosides bearing six-membered carbohydrate moieties.

Taking into consideration the recent findings on several branched C-cyano and C-ethynyl furanonucleosides as antiviral agents and based on the fact that a number of these analogues have been reported to exhibit potent and broad spectrum anti-cancer activities, it was of interest to prepare new series of pyranonucleosides having a cyano and ethynyl group at the branching point of the carbohydrate ring.

The synthesis of a new class of nucleoside analogues possessing an ethynyl in the 3'-position of the sugar moiety is first reported. The presence of the triple bond of C-ethynyl-pyranonucleosides, provided an excellent opportunity to further synthesize new double-headed nucleosides. In addition, 3'-C-cyano-pyranonucleosides were prepared following a similar sequence of reactions used for the synthesis of C-ethynyl derivatives. The synthesis of their corresponding 3'-C-cyano-3'-deoxy nucleosides is also presented. In an effort to explore the structure-activity relationships of branched-chain C-cyano pyranonucleosides, the synthesis of 4'-C-cyano and 4'-C-cyano-4'-deoxy analogues was also performed. Last, a simple and efficient protocol for the synthesis of 2'-C-cyano and 2'-C-cyano-2'-deoxy was also developed. The novel 2'-substituted derivatives were further converted to pyranosyl analogues bearing a spiro ring at position-2' of the sugar moiety.

The target nucleosides were evaluated for their antiviral and cytostatic properties using several virus strains and cancer cell lines. It is interesting to note that some of the C-cyano nucleoside derivatives, showed a similar cytostatic activity spectrum to the free base, 5-fluorouracil.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ-ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Synthesis and Biological Evaluation of 3'-C-Ethynyl and 3'-C-(1,4-disubstituted-1,2,3-triazolo) Double-Headed Pyranonucleosides

Christos Kiritsis¹, Stella Manta¹, Ioannis Papisotiriou², Evdoxia Coutouli-Argyropoulou³, Sakellarios Trakossas³, Jan Balzarini⁴ and Dimitri Komiotis^{1,*}

¹Department of Biochemistry and Biotechnology, Laboratory of Bio-organic Chemistry, University of Thessaly, 41221 Larissa, Greece

²Research Genetic Cancer Center (R.G.C.C. Ltd.), Megalou Alexandrou 155 str. GR-53070 Filotas, Greece

³Department of Chemistry, Laboratory of Organic Chemistry, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki 54124, Greece

⁴Rega Institute for Medical Research, Katholieke Universiteit Leuven, 3000 Leuven, Belgium

Abstract: A novel series of 3'-C-ethynyl and 3'-C-(1,4-disubstituted-1,2,3-triazolo) double-headed pyranonucleosides has been designed and synthesized. Reaction of 3-keto glucoside **1** with ethynyl magnesium bromide gave the desired precursor 3-C-ethynyl-1,2:5,6-di-*O*-isopropylidene- α -D-allofuranose (**2**). Hydrolysis followed by acetylation led to the 1,2,4,6-tetra-*O*-acetyl-3-C-ethynyl- β -D-allopyranose (**3**). Compound **3** was condensed with silylated 5-fluorouracil, uracil, thymine, *N*⁴-benzoylcytosine and *N*⁶-benzoyladenine, respectively and deacetylated to afford the target 1-(3'-C-ethynyl- β -D-allopyranosyl)nucleosides **5a-c,f,g**. Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (CuAAC) reaction was utilized to couple the 3'-C-ethynyl pyranonucleoside derivatives with azidoethyl adenine, 5-fluorouracil and thymine, respectively to afford novel triazole double-headed nucleoside analogues **8a-h**. 3'-C-Ethynyl pyranonucleosides and the new double-headed analogues were evaluated for their antiviral and cytostatic activities. Although none of the compounds showed pronounced cytostatic activity and were devoid of a significant antiviral potential, the double-headed nucleoside derivatives **8a**, **8c** and **8e** showed a moderate cytostatic activity against human cervix carcinoma HeLa cells which may be the basis for the synthesis of analogous derivatives with improved cytostatic potential.

Keywords: Branched-chain nucleosides, C-ethynyl pyranonucleosides, click chemistry, double-headed nucleosides.

INTRODUCTION

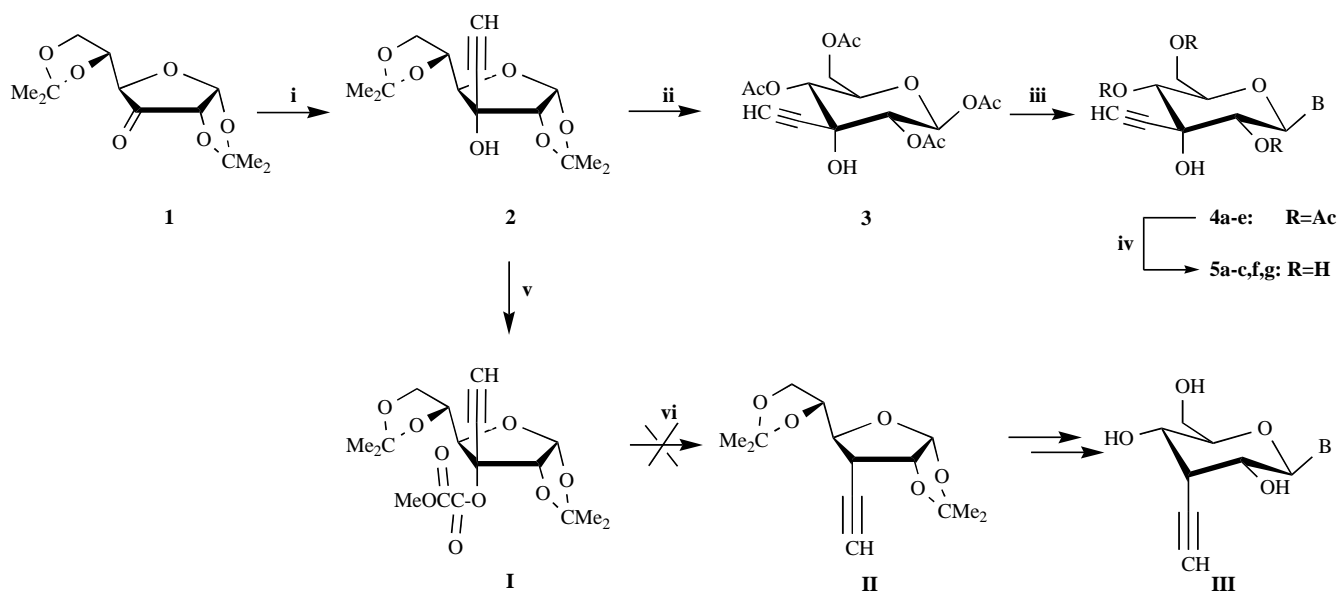
Modified nucleosides have emerged as important therapeutic agents for the development of antiviral and anti-tumor drugs [1-4]. During the last decades, many modifications of the base and/or sugar moiety of natural nucleosides have been attempted, in order to discover novel derivatives endowed with potential biological properties.

Recently, considerable attention has been paid to furano-nucleosides containing an ethynyl group in their carbohydrate backbone as a result of their significant biological activity. Branched C-ethynyl nucleoside analogues showed antiviral properties against herpes simplex virus type-1 (HSV-1) and human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) [5-8], while 3'-C-ethynyl-branched nucleoside analogues have been reported to exhibit potent and broad spectrum anti-cancer activities [9-11]. Among them, the 1-(3'-C-ethynyl- β -D-ribo-pentofuranosyl)cytosine, a promising RNA-directed nucleoside anti-metabolite, is currently undergoing clinical trials [12,13].

Last decade, nucleosides bearing pyranosyl ring have been evaluated for their potential anticancer [14-16], antioxidant [17,18] and antibiotic [19] properties and as building blocks in nucleic acid synthesis [20]. In seeking to investigate novel biologically active agents, we recently reported that new classes of uncommon 3'-fluorinated and 3'-C-cyano pyranonucleosides proved to be efficient as tumor cell growth inhibitors and showed to have a promising potential in combating rotaviral infections [21-25]. Experimental evidence also disclosed that human poly(A)-specific ribonuclease [26] and glycogen phosphorylase [27] are among the molecular targets of these compounds.

With the above applications in mind and as an extension of our studies, we decided to synthesize novel pyranonucleosides in which the fluorine atom or the cyano group will be replaced by the biologically promising ethynyl group. Therefore, we report herein on the preparation and biological evaluation of 3'-C-ethynyl- β -D-allopyranonucleoside analogues, containing 5-fluorouracil, uracil, thymine, cytosine and adenine as base moieties. The presence of the triple bond of C-ethynyl-pyranonucleosides, provided an excellent opportunity to further synthesize a novel class of double-headed pyranonucleosides, *via* CuAAC reaction [28-31] with various purine or pyrimidine azides. Thus, in the present study, we also describe the utilization of 3'-C-ethynyl- β -D-

*Address correspondence to this author at the University of Thessaly, Department of Biochemistry & Biotechnology, Laboratory of Bio-organic Chemistry, 26 Ploutonos Str., 41221 Larissa, Greece; Tel: +30 2410 565285; Fax: +30 2410 565290; E-mail: dkom@bio.uth.gr



B=a: 5-fluorouracil, b: uracil, c: thymine, d: *N*⁴-benzoylcytosine, e: *N*⁶-benzoyladenine, f: cytosine, g: adenine

Scheme 1. (i) $\text{HC}\equiv\text{CMgBr}$, THF; (ii) a) H_2O , MeOH, Amberlite IR 120(H^+); b) Ac_2O , pyridine; (iii) Silylated base, CH_3CN , $\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$; (iv) Methanolic ammonia. (v) Methoxalyl chloride, triethylamine, 4-Dimethylaminopyridine, CH_2Cl_2 ; (vi) tributyltin hydride, 2,2'-azobis(isobutyronitrile), toluene, 100°C .

allopyranonucleosides as synthons for newly uncommon double-headed nucleosides and supply data on their biological activity.

CHEMISTRY

3'-C-Ethynyl- β -D-allopyranonucleosides **5a-c,f,g** were prepared according to the synthetic route outlined in Scheme 1. Reaction of known furanose **1** [32] with $\text{HC}\equiv\text{CMgBr}$ in tetrahydrofuran (THF) afforded 3-C-ethynyl-1,2,5,6-di-O-isopropylidene- α -D-allofuranose (**2**), with high stereoselectivity [33]. The assignment of its configuration was further supported by NOE measurements, as depicted in Fig. (1). The mutual NOE enhancements observed between ethynyl proton with both H-2 and H-5 show that all these protons are in the β face of the furanose ring. Similarly, the positive NOE observed between the free OH group with H-4 shows also that these protons are on the same side of the ring system. Hydrolysis of **2** using Amberlite IR 120 (H^+) resin followed by direct standard acetylation gave the 1,2,4,6-tetra-O-acetyl-3-C-ethynyl- β -D-allopyranose (**3**). ^1H NMR spectra of analogue **3** –in accordance with mass spectroscopy data–revealed the presence of only four acetoxy groups, suggesting that its tertiary hydroxyl was not acetylated [34]. Compound **3** was readily converted into the protected 1-(2',4',6'-tri-O-acetyl-3'-C-ethynyl- β -D-allopyranosyl) nucleosides **4a-e**, upon reaction with silyl-protected 5-fluorouracil, uracil, thymine, *N*⁴-benzoylcytosine and *N*⁶-benzoyladenine, respectively, in the presence of trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate ($\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$) as catalyst [35]. As expected, ^1H NMR spectra of **4a-e** showed a large coupling between protons H-1' and H-2' ($J_{1',2'} = 9.2\text{--}9.3$ Hz), indicating an axial orientation of both protons and an equatorially oriented base ring. Removal of all protecting groups of **4a-e**, with saturated methanolic ammonia [36], furnished the target products

5a-c,f,g, in good yields (72–78%). The IR spectra of the newly synthesized nucleosides **5** exhibited characteristic absorption bands at $2115\text{--}2130\text{ cm}^{-1}$ due to the presence of the ethynyl group.

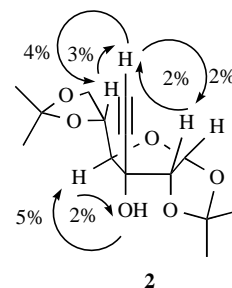
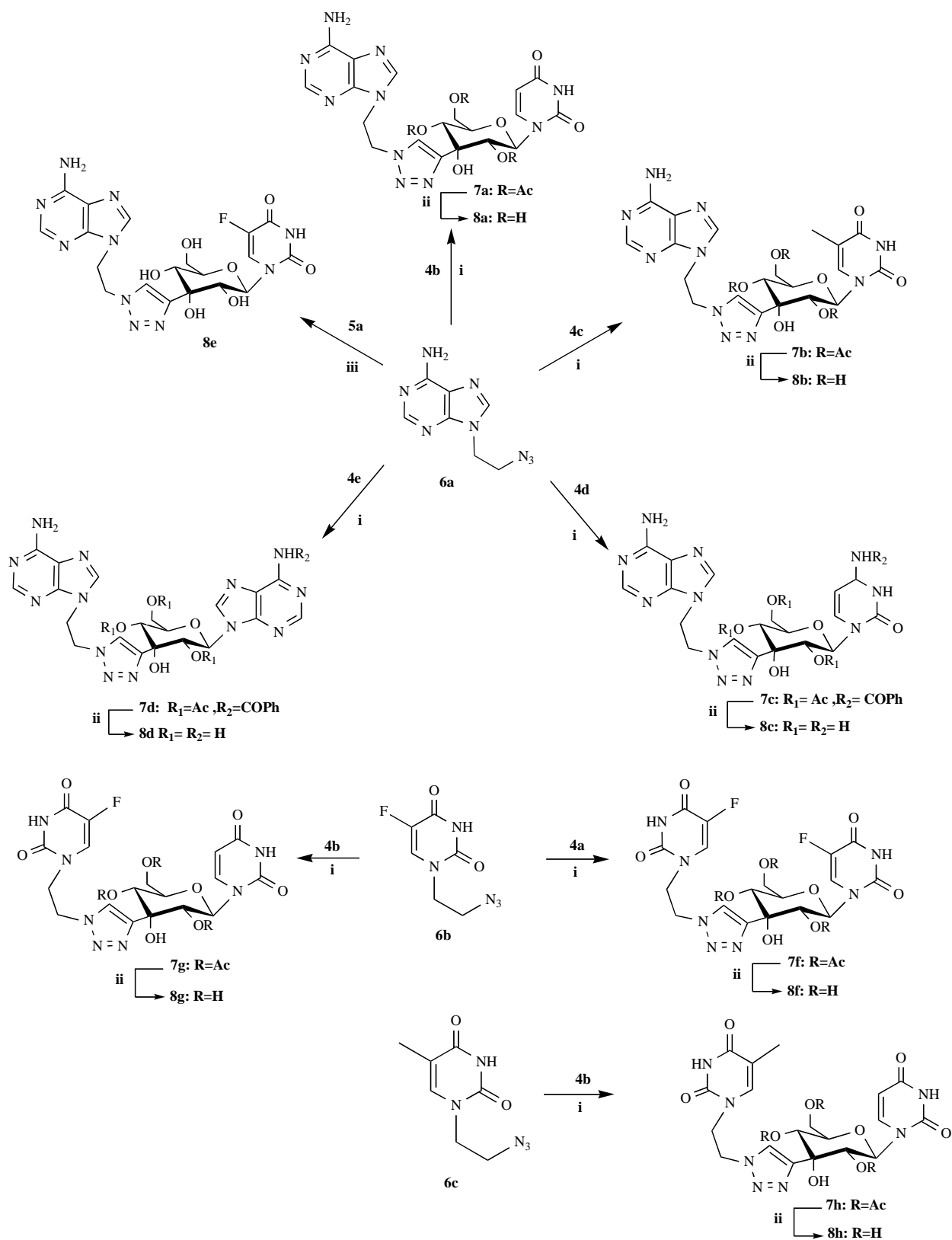


Fig. (1). NOE enhancements measured on compound **2**.

To further explore structure-activity relationships, the synthesis of a new class of 3'-deoxy-3'-C-ethynyl pyranonucleosides **III** was undertaken (Scheme 1). Although alcohol **2** was easily converted to methoxalate ester **I**, all attempts to deoxygenate the latter were unsuccessful. It seems that the presence of the ethynyl group destabilizes the planar radical intermediate formed and deoxygenation reaction leads to intractable materials.

Compounds **4a-e** and **5a** were used as key intermediates to prepare 1,2,3-triazole double-headed nucleoside analogues **8a-h** (Scheme 2). CuAAC reaction between azidoethyl adenine **6a** and C-ethynyl pyranonucleosides **4b-e**, performed with catalytic amounts of $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ and sodium ascorbate in refluxing THF/ H_2O (1:1), afforded the protected triazole double-headed nucleoside analogues **7a-d**. Removal of all O-acetyl protecting groups of **7a-d** with saturated methanolic ammonia gave **8a-d**, respectively. By the same manner,



Scheme 2. (i) THF, H₂O, CuSO₄·5H₂O, sodium ascorbate; ii) Methanolic ammonia; iii) CH₃CN, H₂O, copper wire.

CuAAC reaction of azidoethyl fluorouracil **6b** with protected C-ethynyl derivatives **4a,b** and of azidoethyl thymine **6c** with uracil derivative **4b**, respectively followed by subse-

quent deacetylation of the nucleosides formed **7f,g,h**, yielded the target compound **8f,g,h**, in very good yields (83-86%). In the case of triazole derivative **8e**, a modified click cycloaddi-

Table 1. Cytostatic Activity of 5a-c,f,g and 8a-h Against a Panel of Tumor Cell Lines

Compound	IC ₅₀ ^a (μM)		
	L1210	CEM	HeLa
5a	> 200	> 200	> 200
5b	> 200	> 200	> 200
5c	> 200	> 200	> 200
5f	> 200	> 200	> 200
5g	> 250	> 250	244 ± 9
8a	> 200	> 200	89 ± 1
8b	188 ± 22	> 250	≥ 250
8c	> 200	> 200	115 ± 7
8d	> 250	> 250	> 250
8e	129 ± 94	> 250	94 ± 43
8f	> 250	> 250	182 ± 95
8g	> 250	> 250	≥ 250
8h	> 200	> 200	> 200

^a50% inhibitory concentration, or compound concentration required to inhibit cell proliferation by 50%.

tion method was employed. Thus, reaction of the azide **6a** and unprotected analogue **5a** catalyzed by copper wire, in refluxing CH₃CN/H₂O (9:1), gave the double-headed nucleoside **8e**. All triazole cycloadducts were well characterized by NMR, UV spectroscopies, mass spectrometry and elemental analysis. ¹H NMR data, revealed the resonance of H-C(5) of the triazole ring in the aromatic region, while ¹³C NMR spectra showed the C-atom signals corresponding to the triazole derivatives. Due to the broadening of the peaks some of the ¹H NMR spectra were recorded at higher temperatures (45-55 °C). The proton assignment was supported in most cases by H,H-COSY experiments, whereas those of carbon by DEPT experiments. The characterization of the obtained cycloadducts as 1,4-regioisomers was made in comparison with their chemical shifts with other analogous 4-substituted triazoles [28]. The most informative peak is that of the CH-triazole carbon which appears at a very narrow range (δ 124.5-125.0). It should also be mentioned that in all cases, transformation into the triazole cycloadducts was quantitative and no byproducts were observed, while copper-catalyzed click reactions directed the formation of only one regioisomer (1,4-regioisomer is formed out of the two possibilities) [29, 37].

BIOLOGICAL EVALUATION

The compounds have been evaluated against a broad panel of DNA and RNA viruses, but found to be inactive at the highest tested concentration (100-200 μM). Also, none of the compounds showed pronounced cytostatic or cytotoxic activity in the monolayer cell cultures used for the antiviral assays, as well as in the murine leukemia L1210 and human

lymphocyte CEM tumor cell cultures (Table 1). Compounds **8a**, **8c** and **8e** showed a moderate cytostatic activity against human cervix carcinoma HeLa cells (IC₅₀: 89-115 μM) which may be the basis for preparing closely related derivatives with improved cytostatic potential.

EXPERIMENTAL SECTION

Chemistry

General Procedures

Melting points were recorded in a Mel-Temp apparatus and are uncorrected. Thin-layer chromatography (TLC) was performed on Merck precoated 60F₂₅₄ plates. Reactions were monitored by TLC on silica gel, with detection by UV light (254 nm) or by charring with sulfuric acid. Flash chromatography was performed using silica gel (240-400 mesh, Merck). Microanalyses were performed on a Perkin-Elmer 2400-II Analyzer. Analyses were within ± 0.4% of the calculated values. ¹H NMR spectra were recorded at 300 MHz on a Bruker AVANCE III 300 spectrometer and ¹³C NMR spectra at 75.5 MHz on the same spectrometer, using chloroform-*d* (CDCl₃), methanol-*d*₄ (CD₃OD), and dimethyl sulfoxide-*d*₆ (DMSO-*d*₆). Chemical shifts are reported in parts per million (δ) downfield from tetramethylsilane (TMS) as internal standard. UV-Vis spectra were recorded on a PG T70 UV-VIS spectrometer and mass spectra were obtained with a Micro-mass Platform LC (ESIMS). Optical rotations were measured using Autopol I polarimeter. Infrared spectra were obtained with a Thermo Scientific Nicolet IR100 FT-IR spectrometer.

With the exception of CuAAC all reactions were carried out in dry solvents. Acetonitrile and toluene were distilled from calcium hydride and stored over 3E molecular sieves. *N,N*-Dimethylformamide (DMF) was stored over 3E molecular sieves. THF was freshly distilled under nitrogen from sodium/benzophenone before use. All reactions sensitive to oxygen or moisture were carried out under nitrogen atmosphere.

3-C-Ethynyl-1,2:5,6-di-O-isopropylidene- α -D-allofuranose (2)

A THF solution of HC≡CMgBr (186 mL, 0.5 M in THF, 93 mmol) was added to a solution of **1** (4 g, 15.50 mmol) in THF (155 mL) at room temperature. The mixture was stirred for 60 min, and aqueous NH₄Cl (1M, 100 mL) was added. The mixture was diluted with ethyl acetate (EtOAc) (800 mL), washed with brine (400 mL), dried with sodium sulphate, and evaporated. The residue was purified by flash chromatography (EtOAc/hexane, 3:7) to give compound **2** (3.74 g, 85%) as a white solid: mp 104-105 °C; Rf= 0.51 (EtOAc/hexane 4:6); [α]_D²² +3 (c 0.5, CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 5.83 (d, 1H, *J*_{1,2} = 3.5 Hz, H-1), 4.63 (d, 1H, H-2), 4.44 (ddd, *J*_{4,5} = 8.2 Hz, *J*_{5,6a} = 4.6 Hz, *J*_{5,6b} = 6.2 Hz, 1H, H-5), 4.15 (dd, 1H, *J*_{6a,6b} = 8.8 Hz, H-6a), 4.04 (dd, 1H, H-6b), 3.87 (d, 1H, H-4), 3.12 (br s, 1H, OH), 2.68 (s, 1H, HC≡C), 1.61 (s, 3H, CH₃), 1.47 (s, 3H, CH₃), 1.38 (s, 6H, 2 CH₃). ESIMS: *m/z* 285.3 [M+H⁺].

1,2,4,6-Tetra-O-acetyl-3-C-ethynyl- β -D-allopyranose (3)

To a solution of **2** (3.74 g, 13.16 mmol) in methanol (MeOH) (20.5 mL) and H₂O (116.9 mL) was added Amber-

lite IR 120 (H^+) resin and the mixture was refluxed overnight. The reaction mixture was filtered and evaporated to dryness. The residue was then dissolved in a mixture of pyridine (46.1 mL) and acetic anhydride (Ac_2O) (23.7 mL). The reaction was carried out at room temperature for 1 hour, then was quenched with MeOH at 0 °C and was concentrated in vacuum. The residue was diluted with EtOAc and washed with saturated sodium bisulfate, sodium bicarbonate and water. The organic extract was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness to give compound **3** (4.07 g, 83%) as a white foam: Rf= 0.41 (EtOAc/hexane 1:1); $[\alpha]_D^{22}$ -6 (c 0.5, $CHCl_3$); 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 5.99 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 8.3 Hz, H-1), 5.29 (d, 1H, $J_{4,5}$ = 9.9 Hz, H-4), 5.23 (d, 1H, H-2), 4.30 (dd, 1H, $J_{6a,6b}$ = 12.3 Hz, $J_{5,6a}$ = 4.2 Hz, H-6a), 4.25 (ddd, 1H, $J_{5,6b}$ = 2.0 Hz, H-5), 4.09 (dd, 1H, H-6b), 2.76 (br s, 1H, OH), 2.47 (s, 1H, $HC\equiv C$), 2.17, 2.16, 2.11, 2.10 (4s, 12H, 4OAc). ESIMS: m/z 373.3 $[M+H^+]$.

General Procedure for Preparation of 3'-C-ethynyl- β -D-allopyranonucleosides 4a-e

A mixture of the proper base (2.25 mmol), hexamethyldisilazane (HMDS) (2.79 mmol) and saccharine (0.104 mmol) in anhydrous CH_3CN (8.8 mL) was refluxed for 30 min under nitrogen. 1,2,4,6-Tetra-*O*-acetyl-3'-C-ethynyl- β -D-allopyranose (**3**) (1.61 mmol) and $Me_3SiOSO_2CF_3$ (2.25 mmol) were then added and the reaction mixture was refluxed for 2 hours, cooled, neutralized with aqueous sodium bicarbonate, and extracted with CH_2Cl_2 (400 mL). The organic extract was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. The residue was purified by flash chromatography (3:7 EtOAc/hexane) to give compounds **4a-d** as white solids and compound **4e** as a white foam.

Data for 1-(2',4',6'-tri-*O*-acetyl-3'-C-ethynyl- β -D-allopyranosyl)5-fluorouracil (4a)

Yield 85%; mp 108-110 °C; Rf= 0.59 (EtOAc/hexane 1:1); $[\alpha]_D^{22}$ -6 (c 0.4, $CHCl_3$); λ_{max} 264 nm (ϵ 6575); 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 8.37 (br s, 1H, NH), 7.43 (d, 1H, $J_{6,F5}$ = 5.8 Hz, H-6), 6.03 (dd, 1H, $J_{1,2'}$ = 9.2 Hz, $J_{1',F5}$ = 1.2 Hz, H-1'), 5.19 (d, 1H, $J_{4',5'}$ = 9.6 Hz, H-4'), 5.08 (d, 1H, H-2'), 4.28-4.17 (m, 2H, H-6a', H-6b'), 4.07-4.04 (m, 1H, H-5'), 2.54 (s, 1H, $HC\equiv C$), 2.14, 2.10, 2.09 (3s, 9H, 3OAc). ESIMS m/z 443.4 $[M+H^+]$.

Data for 1-(2',4',6'-tri-*O*-acetyl-3'-C-ethynyl- β -D-allopyranosyl)uracil (4b)

Yield 82%; mp 97-99 °C; Rf= 0.34 (EtOAc/hexane 1:1); $[\alpha]_D^{22}$ +2 (c 0.5, $CHCl_3$); λ_{max} 257 nm (ϵ 5346); 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 8.14 (br s, 1H, NH), 7.35 (d, 1H, $J_{5,6}$ = 8.1 Hz, H-6), 6.07 (d, 1H, $J_{1,2'}$ = 9.3 Hz, H-1'), 5.78 (d, 1H, H-5), 5.19 (d, 1H, $J_{4',5'}$ = 9.7 Hz, H-4'), 5.14 (d, 1H, H-2'), 4.28-4.17 (m, 2H, H-6a', H-6b'), 4.06-4.03 (m, 1H, H-5'), 2.53 (s, 1H, $HC\equiv C$), 2.14, 2.09, 2.08 (3s, 9H, 3OAc). ESIMS: m/z 425.4 $[M+H^+]$.

Data for 1-(2',4',6'-tri-*O*-acetyl-3'-C-ethynyl- β -D-allopyranosyl)thymine (4c)

Yield 72%; mp 94-96 °C; Rf= 0.46 (EtOAc/hexane, 1:1); $[\alpha]_D^{22}$ -7 (c 0.7, $CHCl_3$); λ_{max} 262 nm (ϵ 7549); 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 8.19 (br s, 1H, NH), 7.19 (s, 1H, H-6),

6.09 (d, 1H, $J_{1,2'}$ = 9.2 Hz, H-1'), 5.24-5.18 (m, 2H, H-2', H-4'), 4.29-4.21 (m, 2H, H-6a', H-6b'), 4.09-4.07 (m, 1H, H-5'), 2.55 (s, 1H, $HC\equiv C$), 2.17, 2.12, 2.10 (3s, 9H, 3OAc), 1.95 (s, 3H, 5- CH_3). ESIMS: m/z 439.4 $[M+H^+]$.

Data for 1-(2',4',6'-tri-*O*-acetyl-3'-C-ethynyl- β -D-allopyranosyl) N^4 -benzoylcytosine (4d)

Yield 68%; mp 124-125 °C; Rf= 0.32 (EtOAc/hexane, 1:1); $[\alpha]_D^{22}$ +10 (c 0.5, $CHCl_3$); λ_{max} 262 nm (ϵ 17613); 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 7.94-7.49 (m, 7H, Bz, H-5 and H-6), 6.32 (d, 1H, $J_{1,2'}$ = 9.3 Hz, H-1'), 5.29-5.14 (m, 2H, H-2', H-4'), 4.30-4.22 (m, 2H, H-6a', H-6b'), 4.08-4.05 (m, 1H, H-5'), 2.52 (s, 1H, $HC\equiv C$), 2.15, 2.09, 2.06 (3s, 9H, 3OAc). ESIMS: m/z 528.5 $[M+H^+]$.

Data for 9-(2',4',6'-tri-*O*-acetyl-3'-C-ethynyl- β -D-allopyranosyl) N^6 -benzoyladenine (4e)

Yield 59%; Rf= 0.14 (EtOAc/hexane, 1:1); $[\alpha]_D^{22}$ -10 (c 0.5, $CHCl_3$); λ_{max} 280 nm (ϵ 18662); 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 9.08 (br s, 1H, NH), 8.89 and 8.25 (2s, 2H, H-2 and H-8), 8.06-7.53 (m, 5H, Bz), 6.21 (d, 1H, $J_{1,2'}$ = 9.3 Hz, H-1'), 5.64 (d, 1H, H-2'), 5.41 (d, 1H, $J_{4',5'}$ = 9.5 Hz, H-4'), 4.38-4.28 (m, 2H, H-6a', H-6b'), 4.14-4.10 (m, 1H, H-5'), 2.58 (s, 1H, $HC\equiv C$), 2.19, 2.10, 1.87 (3s, 9H, 3OAc). ESIMS: m/z 552.5 $[M+H^+]$.

General Procedure for Preparation of 3'-C-ethynyl- β -D-allopyranonucleosides 5a-c,f,g

The protected nucleosides **4** (1.37 mmol) were treated with ammonia/MeOH (saturated at 0 °C, 57.3 mL). The solution was stirred overnight at room temperature and then was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (EtOAc) to afford pure **5** as white foams.

Data for 1-(3'-C-ethynyl- β -D-allopyranosyl)5-fluorouracil (5a)

Yield 72%; Rf= 0.50 (EtOAc/MeOH, 9:1); $[\alpha]_D^{22}$ +10 (c 0.3, CD_3OD); λ_{max} 264 nm (ϵ 8689); 1H NMR (CD_3OD , 300 MHz): δ 8.00 (d, 1H, $J_{6,F5}$ = 6.6 Hz, H-6), 5.84 (d, 1H, $J_{1,2'}$ = 9.0 Hz, H-1'), 3.87-3.68 (m, 5H, H-2', H-4', H-5', H-6a', H-6b'), 2.89 (s, 1H, $HC\equiv C$); ^{13}C NMR (CD_3OD , 75.5 MHz): δ 158.01, 150.12, 140.91, 127.33, 91.29, 84.71, 79.43, 75.06, 73.52, 72.79, 72.28, 61.83; IR (Nujol, cm^{-1}): 2115 ($C\equiv C$). MS: m/z 317.2 $[M+H^+]$.

Data for 1-(3'-C-ethynyl- β -D-allopyranosyl)uracil (5b)

Yield 78%; Rf= 0.25 (EtOAc/MeOH, 9:1); $[\alpha]_D^{22}$ +26 (c 0.5, CD_3OD); λ_{max} 259 nm (ϵ 5220); 1H NMR (CD_3OD , 300 MHz): δ 7.71 (d, 1H, $J_{5,6}$ = 8.1 Hz, H-6), 5.82 (d, 1H, $J_{1,2'}$ = 9.3 Hz, H-1'), 5.72 (d, 1H, H-5), 3.86-3.65 (m, 5H, H-2', H-4', H-5', H-6a', H-6b'), 2.85 (s, 1H, $HC\equiv C$); ^{13}C NMR (CD_3OD , 75.5 MHz): δ 164.26, 150.13, 142.48, 102.09, 91.66, 83.42, 81.36, 74.97, 73.67, 72.88, 72.01, 61.03; IR (Nujol, cm^{-1}): 2120 ($C\equiv C$). ESIMS: m/z 299.3 $[M+H^+]$.

Data for 1-(3'-C-ethynyl- β -D-allopyranosyl)thymine (5c)

Yield 75%; Rf= 0.39 (EtOAc/MeOH, 9:1); $[\alpha]_D^{22}$ +11 (c 0.6, CD_3OD); λ_{max} 262 nm (ϵ 8776); 1H NMR (CD_3OD , 300 MHz): δ 7.56 (s, 1H, H-6), 5.81 (d, 1H, $J_{1,2'}$ = 9.3 Hz, H-1'), 3.86-3.66 (m, 5H, H-2', H-4', H-5', H-6a', H-6b'), 2.85 (s, 1H, $HC\equiv C$), 1.94 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (CD_3OD , 75.5

MHz): δ 163.64, 150.13, 136.74, 110.10, 91.37, 83.47, 80.02, 74.33, 73.91, 72.68, 71.89, 61.53, 12.21; IR (Nujol, cm^{-1}): 2130 ($\text{C}\equiv\text{C}$). ESIMS: m/z 313.3 [$\text{M}+\text{H}^+$].

Data for 1-(3'-C-ethynyl- β -D-allopyranosyl)cytosine (5f)

Yield 73%; Rf= 0.23 (EtOAc/MeOH 8:2); $[\alpha]_{\text{D}}^{22}$ +16 (c 0.4, CD_3OD); λ_{max} 268 nm (ϵ 7913); ^1H NMR (CD_3OD , 300 MHz): δ 7.72 (d, 1H, $J_{5,6}$ = 7.2 Hz, H-6), 5.95-5.88 (m, 2H, H-1', H-5), 3.86-3.64 (m, 5H, H-2', H-4', H-5', H-6a', H-6b'), 2.83 (s, 1H, $\text{HC}\equiv\text{C}$); ^{13}C NMR (CD_3OD , 75.5 MHz): δ 165.73, 156.28, 143.03, 94.55, 92.94, 83.81, 79.92, 74.56, 74.13, 73.19, 72.71, 61.26; IR (Nujol, cm^{-1}): 2124 ($\text{C}\equiv\text{C}$). ESIMS: m/z 298.3 [$\text{M}+\text{H}^+$].

Data for 9-(3'-C-ethynyl- β -D-allopyranosyl)adenine (5g)

Yield 75%; Rf= 0.18 (EtOAc/MeOH, 8:2); $[\alpha]_{\text{D}}^{22}$ -4 (c 0.1, DMSO); λ_{max} 263 nm (ϵ 12279); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 8.33 and 8.15 (2s, 2H, H-2 and H-8), 7.15 (br s, 2H, NH_2), 5.65 (d, 1H, $J_{1',2'}$ = 9.3 Hz, H-1'), 5.63 (s, 1H, 3'-OH), 5.36 (d, 1H, $J_{4',5'}$ = 7.9 Hz, 4'-OH), 5.16 (d, 1H, $J_{2',\text{OH},2'}$ = 8.0 Hz, 2'-OH), 4.48 (t, 1H, J = 5.5 Hz, 6'-OH), 4.26 (t, 1H, H-2'), 3.70-3.43 (m, 4H, H-4', H-5', H-6a', H-6b'), 3.26 (s, 1H, $\text{HC}\equiv\text{C}$); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75.5 MHz): δ 156.23, 152.37, 149.76, 140.33, 119.57, 100.66, 83.19, 80.01, 74.23, 73.87, 72.74, 72.43, 61.06; IR (Nujol, cm^{-1}): 2129 ($\text{C}\equiv\text{C}$). ESIMS: m/z 322.3 [$\text{M}+\text{H}^+$].

Preparation of Azides 6a,b,c

Azides **6a** and **6c** were prepared according to the procedures described in the literature [38,39].

1-(2-Azidoethyl)5-fluorouracil (6b)

A mixture of 5-fluorouracil (500 mg, 3.85 mmol), HMDS (3mL) and trimethylchlorosilane (0.25 mL) was refluxed under nitrogen. After evaporation of excess HMDS under reduced pressure, 1,2-dibromoethane (1 mL, 11.6 mmol) and dry DMF (12 mL) were added and the reaction mixture was heated at 80 °C under nitrogen for 20 hours. After evaporation of the solvent under reduced pressure the residue was separated by flash chromatography (EtOAc) to give 1-(2-bromoethyl)5-fluorouracil (395mg, 40%) as an oily solid which was identified only by its ^1H NMR and used for the next step without further purification. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 11.25 (br s, 1H, NH), 7.63 (d, 1H, $J_{6,\text{F}5}$ = 6.4 Hz, H-6), 4.15-4.05 (m, 2H, CH_2) 3.62-3.56 (m, 2H, CH_2). A solution of 1-(2-bromoethyl)5-fluorouracil (395 mg, 1.67 mmol) in dry THF (15 mL), trimethylsilyl azide (564 mg 4.9 mmol) and tetrabutylammonium fluoride (TBAF) (7 mL, 1M in THF) was heated at 65 °C under nitrogen for 3 hours. After the removal of the solvent the residue was treated with ethanol to give **6b** (230 mg, 69%), as a white solid: mp 177-179 °C; Rf= 0.49 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 9:1); λ_{max} 270 nm (ϵ 3429); ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 8.23 (br s, 1H, NH), 7.31 (d, 1H, $J_{6,\text{F}5}$ = 5.5 Hz, H-6), 3.85 (t, J = 5.8 Hz, 2H, CH_2), 3.72 (t, J = 5.8 Hz, 2H, CH_2). ^{13}C NMR ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 75.5 MHz): δ 157.87, 149.53, 139.8, 129.22, 49.27, 48.01. ESIMS m/z 200.1 [$\text{M}+\text{H}^+$].

General Procedure for Preparation of Double-Headed Nucleosides 7a-d,f-h

To a stirred mixture of the alkyne **4** (0.23 mmol) and the azide **6** (0.23 mmol) in THF (2.3 mL), was added a solution

of sodium ascorbate (0.046 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.023 mmol) in H_2O (2.3 mL). The reaction mixture was refluxed for 2 hours and then cooled. After being treated with MeOH and concentrated, the residue was purified by flash chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 95:5) to give the double-headed nucleosides **7** as white foams.

Data for 1-[2',4',6'-tri-O-acetyl-3'-C-[1-((adenine-9-yl)ethyl)-1,2,3-triazol-4-yl]- β -D-allopyranosyl]uracil (7a)

Yield 74%; Rf= 0.30 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 9:1); $[\alpha]_{\text{D}}^{22}$ +10 (c 0.5, CHCl_3); λ_{max} 260 nm (ϵ 10786); ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, 45 °C): δ 9.19 (br s, 1H, NH) 8.49 and 7.70 (2 br s, 2H, H-2 and H-8 Ade), 7.32 (d, 1H, $J_{5,6}$ = 7.6 Hz, H-6 Ur), 7.10 (s, 1H, Triazole H), 6.20 (d, 1H, $J_{1',2'}$ = 8.7 Hz, H-1'), 5.89 (br s, 2H, NH_2 Ade), 5.74 (d, 1H, H-5 Ur), 5.20 (d, 1H, H-2'), 5.05 (d, 1H, $J_{4',5'}$ = 9.8 Hz, H-4'), 4.91 (br, 2H, CH_2), 4.73 (br, 2H, CH_2), 4.37-4.09 (m, 3H, H-5', H-6a', H-6b'), 2.07, 2.00, 1.90 (3s, 9H, 3OAc). ESIMS m/z 629.6 [$\text{M}+\text{H}^+$].

Data for 1-[2',4',6'-tri-O-acetyl-3'-C-[1-((adenine-9-yl)ethyl)-1,2,3-triazol-4-yl]- β -D-allopyranosyl]thymine (7b)

Yield 69%; Rf= 0.38 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 9:1); $[\alpha]_{\text{D}}^{22}$ +4 (c 0.5, CHCl_3); λ_{max} 262 nm (ϵ 15229); ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 9.99 (br s, 1H, NH Thy), 8.43 and 7.51 (2s, 2H, H-2 and H-8 Ade), 7.18 (s, 1H, H-6 Thy), 7.11 (s, 1H, Triazole H), 6.18 (d, 1H, $J_{1',2'}$ = 9.1 Hz, H-1'), 6.07 (br s, 2H, NH_2 Ade), 5.25 (d, 1H, H-2'), 5.04 (d, 1H, $J_{4',5'}$ = 9.7 Hz, H-4'), 4.93 (t, 2H, J = 5.1 Hz, CH_2), 4.75 (t, 2H, J = 5.1 Hz, CH_2), 4.38-4.07 (m, 3H, H-5', H-6a', H-6b'), 2.08, 2.01, 1.96 (3s, 9H, 3OAc), 1.85 (s, 3H, 5- CH_3 Thy). ESIMS m/z 643.6 [$\text{M}+\text{H}^+$].

Data for 1-[2',4',6'-tri-O-acetyl-3'-C-[1-((adenine-9-yl)ethyl)-1,2,3-triazol-4-yl]- β -D-allopyranosyl] N^4 -benzoylcytosine (7c)

Yield 72%; Rf= 0.45 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 9:1); $[\alpha]_{\text{D}}^{22}$ +12 (c 0.5, CHCl_3); λ_{max} 262 nm (ϵ 26064); ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 8.38 (br s, 1H, NH BzCyt), 7.97-7.49 (m, 9H, Bz, H-2 and H-8 Ade, H-5 and H-6 BzCyt), 7.11 (s, 1H, Triazole H), 6.45 (d, 1H, $J_{1',2'}$ = 8.9 Hz, H-1'), 5.69 (br s, 2H, NH_2 Ade), 5.21 (d, 1H, H-2'), 5.09 (d, 1H, $J_{4',5'}$ = 9.7 Hz, H-4'), 4.90 (br, 2H, CH_2), 4.71 (br, 2H, CH_2), 4.43-4.38 (m, 1H, H-5'), 4.29 (dd, 1H, $J_{6a',6b'}$ = 12.5 Hz, $J_{5',6a'}$ = 4.5 Hz, H-6a'), 4.14 (d, 1H, H-6b'), 2.08, 2.02, 1.90 (3s, 9H, 3OAc). ESIMS m/z 732.7 [$\text{M}+\text{H}^+$].

Data for 9-[2',4',6'-tri-O-acetyl-3'-C-[1-((adenine-9-yl)ethyl)-1,2,3-triazol-4-yl]- β -D-allopyranosyl] N^6 -benzoyladenine (7d)

Yield 79%; Rf= 0.43 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 9:1); $[\alpha]_{\text{D}}^{22}$ -6 (c 0.5, CHCl_3); λ_{max} 276nm (ϵ 22506), ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 9.12 (br s, 1H, NH BzAde), 8.86 and 8.36 (2s, 2H, H-2 and H-8 BzAde), 8.23 (s, 1H, H-2 Ade), 8.04 (d, 2H, J = 7.4 Hz, Bz), 7.63 (t, 1H, J = 7.4 Hz, Bz), 7.54 (t, 2H, J = 7.4 Hz, Bz), 7.45 (s, 1H, H-8 Ade), 7.24 (s, 1H, Triazole H), 6.29 (d, 1H, $J_{1',2'}$ = 9.1 Hz, H-1'), 5.93 (br s, 2H, NH_2 Ade), 5.64 (d, 1H, H-2'), 5.23 (d, 1H, $J_{4',5'}$ = 9.8 Hz, H-4'), 4.90 (t, 2H, J = 5.3, CH_2), 4.72 (t, 2H, J = 5.3, CH_2), 4.49-4.45 (m, 1H, H-5'), 4.27 (dd, 1H, $J_{6a',6b'}$ = 12.5 Hz, $J_{5',6a'}$ = 4.8 Hz, H-6a'), 4.11 (dd, 1H, $J_{5',6b'}$ = 1.0 Hz, H-6b'), 2.04, 2.02, 1.68 (3s, 9H, 3OAc). ESIMS m/z 756.7 [$\text{M}+\text{H}^+$].

Data for 1-[2',4',6'-tri-O-acetyl-3'-C-[1-((5-fluorouracil-1-yl)ethyl)-1,2,3-triazol-4-yl]-β-D-allopyranosyl]5-fluorouracil (7f)

Yield 84%; Rf= 0.50 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1); [α]_D²² +4 (c 0.4, CHCl₃); λ_{max} 264 nm (ε 10965); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 9.67 (br s, 1H, NH), 8.84 (br s, 1H, NH), 7.63 (s, 1H, Triazole H), 7.54 (d, 1H, J_{6,F5} = 6.0 Hz, H-6 FUr), 7.06 (d, 1H, J_{6,F5} = 5.4 Hz, H-6 FUr), 6.17 (d, 1H, J_{1',2'} = 9.0 Hz, H-1'), 5.36 (d, 1H, H-2'), 5.02 (d, 1H, J_{4',5'} = 9.9 Hz, H-4'), 4.75 (t, 2H, J = 4.7 Hz, CH₂), 4.44-4.38 (m, 1H, H-5'), 4.32-4.24 (m, 2H, CH₂), 4.18-4.11 (m, 2H, H-6a', H-6b'), 2.08, 2.05, 1.95 (3s, 9H, 3OAc). ESIMS *m/z* 642.5 [M+H⁺].

Data for 1-[2',4',6'-tri-O-acetyl-3'-C-[1-((5-fluorouracil-1-yl)ethyl)-1,2,3-triazol-4-yl]-β-D-allopyranosyl]uracil (7g)

Yield 79%; Rf= 0.45 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1); [α]_D²² +5 (c 1.1, CHCl₃); λ_{max} 264 nm (ε 11784); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.64 (br s, 1H, NH), 8.19 (br s, 1H, NH), 7.44 (s, 1H, Triazole H), 7.39 (d, 1H, J_{5,6} = 8.2 Hz, H-6 Ur), 7.04 (d, 1H, J_{5,6} = 5.6 Hz, H-6 FUr), 6.14 (d, 1H, J_{1',2'} = 9.1 Hz, H-1'), 5.69 (d, 1H, H-5 Ur), 5.27 (d, 1H, H-2'), 4.99 (d, 1H, J_{4',5'} = 9.7 Hz, H-4'), 4.61 (t, 2H, J = 5.0 Hz, CH₂), 4.32-4.05 (m, 5H, H-5', CH₂, H-6a', H-6b'), 2.00, 1.95, 1.88 (3s, 9H, 3OAc). ESIMS *m/z* 624.5 [M+H⁺].

Data for 1-[2',4',6'-tri-O-acetyl-3'-C-[1-((thymine-1-yl)ethyl)-1,2,3-triazol-4-yl]-β-D-allopyranosyl]uracil (7h)

Yield 67%; Rf= 0.48 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1); [α]_D²² +2 (c 0.5, CHCl₃); λ_{max} 261 nm (ε 12865); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 9.75 (br s, 1H, NH), 9.46 (br s, 1H, NH), 7.45 (d, 1H, J_{5,6} = 7.8 Hz, H-6 Ur), 7.44 (s, 1H, Triazole H), 6.75 (s, 1H, H-6 Thy), 6.21 (d, 1H, J_{1',2'} = 8.7 Hz, H-1'), 5.79 (d, 1H, H-5 Ur), 5.36 (d, 1H, H-2'), 4.92 (d, 1H, J_{4',5'} = 9.8 Hz, H-4'), 4.73-4.67 (m, 2H, CH₂), 4.41-4.36 (m, 1H, H-5'), 4.29-4.09 (m, 4H, CH₂, H-6a', H-6b'), 1.92, 1.90, 1.81 (3s, 9H, 3OAc), 1.69 (s, 3H, 5-CH₃ Thy). ESIMS *m/z* 620.5 [M+H⁺].

General Procedure for Preparation of Double-Headed Nucleosides 8a-d

The protected double-headed nucleosides **7a-d** (0.193 mmol) were treated with ammonia/MeOH (saturated at 0 °C, 8 mL). The solution was stirred overnight at room temperature and then was concentrated under reduced pressure. The residue was recrystallized from MeOH/H₂O to afford **8a-d** as white solids respectively.

Data for 1-[3'-C-[1-((adenine-9-yl)ethyl)-1,2,3-triazol-4-yl]-β-D-allopyranosyl]uracil (8a)

Yield 77%; mp 225-227 °C (dec); Rf= 0.33 (CH₂Cl₂/MeOH, 2:8); [α]_D²² +4 (c 0.3, DMSO); λ_{max} 263 nm (ε 20310), 270 nm (ε 23650); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz, 50 °C): δ 11.18 (br s, 1H, NH), 8.18 and 7.91 (2s, 2H, H-2 and H-8 Ade), 7.76 (s, 1H, Triazole H), 7.65 (d, 1H, J_{5,6} = 7.1 Hz, H-6 Ur), 6.83 (br s, 2H, NH₂ Ade), 5.84 (d, 1H, J_{1',2'} = 9.2 Hz, H-1'), 5.62 (d, 1H, H-5 Ur), 5.01 (br s, 1H, OH), 4.85 (t, J = 5.9 Hz, 2H, CH₂), 4.76 (br s, 1H, OH), 4.65 (t, J = 5.9 Hz, 2H, CH₂), 4.45 (br s, 1H, OH), 4.28 (br s, 1H, OH), 3.99-3.45 (m, 5H, H-2', H-4', H-5', H-6a' and H-6b'). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.5 MHz): δ 163.17, 155.94, 152.60, 151.04, 150.45, 149.35, 141.58, 140.76, 124.51, 118.55,

101.87, 80.30, 77.50, 75.31, 71.06, 69.69, 61.27, 48.52, 43.21. ESIMS: *m/z* 503.4 [M+H⁺].

Data for 1-[3'-C-[1-((adenine-9-yl)ethyl)-1,2,3-triazol-4-yl]-β-D-allopyranosyl]thymine (8b)

Yield 87%; mp 203-205 °C (dec); Rf= 0.38 (CH₂Cl₂/MeOH, 2:8); [α]_D²² +3 (c 0.2, DMSO); λ_{max} 270 nm (ε 24183), 263 nm (ε 26659); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz, 55 °C): δ 10.80 (br s, 1H, NH Thy), 8.16, 7.89 and 7.75 (3s, 3H, H-2 Ade, H-8 Ade and H triazole), 7.48 (s, 1H, H-6 Thy), 6.72 (br s, 2H, NH₂ Ade), 5.83 (d, 1H, J_{1',2'} = 9.0 Hz, H-1'), 4.84 (t, 2H, J = 6.0 Hz, CH₂), 4.63 (t, 2H, J = 5.3 Hz, CH₂), 4.50-3.20 (m, 9H, H-2', H-4', H-5', H-6a', H-6b' and 4OH), 1.82 (s, 3H, 5-CH₃ Thy). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.5 MHz): δ 164.14, 156.12, 152.84, 151.35, 150.71, 150.33, 141.09, 137.23, 124.72, 121.10, 109.75, 80.53, 77.79, 75.50, 71.30, 70.10, 61.66, 48.96, 43.64, 12.4. ESIMS: *m/z* 517.5 [M+H⁺].

Data for 1-[3'-C-[1-((adenine-9-yl)ethyl)-1,2,3-triazol-4-yl]-β-D-allopyranosyl]cytosine (8c)

Yield 70%; mp 250-252 °C (dec); Rf= 0.20 (CH₂Cl₂/MeOH, 2:8); [α]_D²² +3 (c 0.5, DMSO); λ_{max} 263 nm (ε 23401); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz, 50 °C): δ 8.17 and 7.91 (2s, 2H, H-2 Ade and H-8 Ade), 7.74 (s, 1H, Triazole H), 7.59 (d, 1H, J_{5,6} = 7.5 Hz, H-6 Cyt), 7.00-6.82 (br, 4H, NH₂ Ade and Cyt), 5.95 (d, 1H, J_{1',2'} = 9.5 Hz, H-1'), 5.79 (d, 1H, H-5 Cyt), 4.90 (br s, 1H, OH), 4.83 (t, J = 6.0 Hz, 2H, CH₂), 4.64 (t, J = 6.0 Hz, 2H, CH₂), 4.52-4.22 (m, 3H, H-2' and 2OH), 3.92-3.45 (m, 5H, H-4', H-5', H-6a', H-6b' and OH). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.5 MHz): δ 165.83, 156.35, 156.23, 153.01, 151.12, 149.94, 142.45, 141.20, 124.91, 119.00, 94.80, 80.89, 77.75, 75.90, 72.06, 70.26, 61.71, 48.92, 43.63. ESIMS: *m/z* 502.5 [M+H⁺].

Data for 9-[3'-C-[1-((adenine-9-yl)ethyl)-1,2,3-triazol-4-yl]-β-D-allopyranosyl]adenine (8d)

Yield 84%; mp 204-206 °C (dec); Rf= 0.17 (CH₂Cl₂/MeOH, 2:8); [α]_D²² -3 (c 0.4, DMSO); λ_{max} 263 nm (ε 23342); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz, 50 °C): δ 8.24, 8.17, 7.92 and 7.76 (4s, 4H, H-2 and H-8 Ade), 7.76 (s, 1H, Triazole H), 6.74 (br s, 4H, NH₂ Ade), 5.88 (d, 1H, J_{1',2'} = 9.4 Hz, H-1'), 4.99 (br s, 1H, OH), 4.83 (t, 2H, J = 6.0 Hz, CH₂), 4.66 (t, 2H, J = 6.0 Hz, CH₂), 4.48-4.18 (m, 3H, H-2' and 2OH), 3.92-3.50 (m, 5H, H-4', H-5', H-6a', H-6b' and OH). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.5 MHz): δ 156.16, 156.13, 154.5, 152.86, 150.67, 150.20, 149.80, 141.10, 140.25, 124.80, 118.99, 118.98, 80.98, 77.70, 75.56, 71.56, 70.09, 61.51, 48.81, 43.47. ESIMS: *m/z* 526.5 [M+H⁺].

1-[3'-C-[1-((Adenine-9-yl)ethyl)-1,2,3-triazol-4-yl]-β-D-allopyranosyl]5-fluorouracil (8e)

A mixture of the alkyne **5a** (80 mg, 0.25 mmol) and the azide **6a** (51 mg, 0.25 mmol) was stirred in CH₃CN/H₂O (9:1) in the presence of a copper wire. The reaction mixture was moderate heated for 18 hours and then cooled. After being treated with MeOH and concentrated, the residue was recrystallized from (MeOH/H₂O) to afford pure **8e** (100 mg, 77%) as a white solid: mp 238-240 °C (dec); Rf= 0.40 (CH₂Cl₂/MeOH, 2:8); [α]_D²² +4 (c 0.2, DMSO); λ_{max} 266 nm (ε 17627); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz, 50 °C): δ 11.50

(br s, 1H, NH), 8.16 (s, 1H, H-2 Ade), 8.01-7.83 (m, 2H, 6-H FUr and 8-H Ade), 7.73 (s, 1H, Triazole H), 6.80 (br s, 2H, NH₂), 5.82 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.3$ Hz, H-1'), 4.97 (br s, 1H, OH), 4.83 (t, 2H, $J = 6.1$ Hz, CH₂), 4.64 (t, 2H, $J = 6.1$ Hz, CH₂), 4.48-4.20 (m, 3H, H-2' and 2OH), 3.98-3.48 (m, 5H, H-4', H-5', H-6a', H-6a' and OH). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.5 MHz): δ 157.20, 156.21, 154.30, 152.85, 150.47, 149.93, 141.09, 139.80, 126.10, 124.57, 119.10, 81.30, 77.70, 75.48, 71.35, 69.94, 61.63, 48.84, 43.43. ESIMS: m/z 521.4 [M+H⁺].

General Procedure for Preparation of Double-Headed Nucleosides 8f-h

The protected double-headed nucleosides **7f-h** (0.193 mmol) were treated with ammonia/MeOH (saturated at 0 °C, 8 mL). The solution was stirred overnight at room temperature and then was concentrated under reduced pressure. The residue was recrystallized from MeOH/CH₂Cl₂ to afford **8f-h** as white solids respectively.

Data for 1-[3'-C-[1-*l*-(5-fluorouracil-1-yl)ethyl]-1,2,3-triazol-4-yl]- β -D-allopyranosyl]5-fluorouracil (8f)

Yield 83%; mp 184-186 °C; Rf= 0.28 (CH₂Cl₂/MeOH, 7:3); [α]_D²² +9 (c 0.3, CH₃OH); λ_{\max} 269 nm (ϵ 13761); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 11.8 (br s, 2H, NH), 8.15 (d, 1H, $J_{6,F5} = 7.0$ Hz, H-6 FUr), 7.93 (s, 1H, Triazole H), 7.65 (d, 1H, $J_{6,F5} = 6.5$ Hz, H-6 FUr), 5.81 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.0$ Hz, H-1'), 5.43 (s, 1H, OH), 5.09 (d, 1H, H-2'), 4.78-4.56 (m, 4H, 2CH₂), 4.20-3.30 (m, 7H, H-4', H-5', H-6a', H-6b' and 3OH). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.5 MHz): δ 157.75, 157.35, 150.55, 149.91, 149.87, 140.33, 139.81, 130.12, 126.22, 124.99, 81.00, 77.62, 75.53, 71.22, 69.78, 61.51, 48.27, 47.56. ESIMS: m/z 516.4 [M+H⁺].

Data for 1-[3'-C-[1-*l*-(5-fluorouracil-1-yl)ethyl]-1,2,3-triazol-4-yl]- β -D-allopyranosyl]uracil (8g)

Yield 85%; mp 190-192 °C; Rf= 0.25 (CH₂Cl₂/MeOH, 7:3); [α]_D²² +2 (c 0.5, CH₃OH); λ_{\max} 258 nm (ϵ 19021), 263 nm (ϵ 18757); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 11.75 (br s, 1H, NH), 11.25 (br s, 1H, NH), 8.01 (s, 1H, Triazole H), 7.75 (d, 1H, $J_{H-6,F} = 6.6$ Hz, H-6 FUr), 7.74 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.1$ Hz, H-6 Ur), 5.84 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.5$ Hz, H-1'), 5.63 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.1$ Hz, H-5 Ur), 5.34 (s, 1H, OH), 4.97 (d, 1H, H-2'), 4.73-4.47 (m, 4H, H-4', CH₂ and OH), 4.06 (t, 2H, $J = 5.6$ Hz, CH₂), 3.93 (br, 1H, OH), 3.82-3.42 (m, 4H, H-5', H-6a', H-6b' and OH). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.5 MHz): δ 163.30, 157.75, 151.29, 150.65, 149.89, 141.81, 139.85, 130.16, 125.02, 102.09, 80.55, 77.80, 75.61, 71.37, 70.02, 61.58, 48.18, 47.51. ESIMS: m/z 498.4 [M+H⁺].

Data for 1-[3'-C-[1-*l*-(thymine-1-yl)ethyl]-1,2,3-triazol-4-yl]- β -D-allopyranosyl]uracil (8h)

Yield 86%; mp 146-148 °C; Rf= 0.26 (CH₂Cl₂/MeOH, 7:3); [α]_D²² +2 (c 0.2, CH₃OH); λ_{\max} 258 nm (ϵ 21045), 269 nm (ϵ 17681); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz, 50 °C): δ 11.30 (br s, 2H, NH), 7.95 (s, 1H, Triazole H), 7.67 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.1$ Hz, H-6 Ur), 7.05 (s, 1H, H-6 Thy), 5.81 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.3$ Hz, H-1'), 5.62 (d, 1H, H-5 Ur), 5.31 (br s, 1H, OH), 4.75 (br s, 1H, OH), 4.62 (t, 2H, $J = 6.1$ Hz, CH₂), 4.50-4.22 (m, 2H, H-2' and OH), 4.08 (t, 2H, $J = 6.1$ Hz, CH₂), 3.98-3.48 (m, 5H, H-4', H-5', H-6a', H-6a' and OH), 1.64 (s, 3H,

5-CH₃ Thy); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.5 MHz): δ 164.35, 163.16, 151.04, 150.89, 150.42, 141.58, 141.06, 124.66, 108.82, 101.86, 80.29, 77.51, 75.33, 71.08, 69.78, 61.29, 47.72, 47.61, 11.70. ESIMS: m/z 494.4 [M+H⁺].

BIOLOGICAL ASSAYS

Antiviral Assays

The antiviral assays [except anti-human immunodeficiency virus (HIV) assays] were based on inhibition of virus-induced cytopathicity in HEL [herpes simplex virus type 1 (HSV-1), HSV-2 (G), vaccinia virus, vesicular stomatitis virus, varicella-zoster virus (OKA and 07-1) and human cytomegalovirus (AD169 and Davis)], Vero (parainfluenza-3, reovirus-1, Sindbis, Coxsackie B4, and Punta Toro virus), HeLa (vesicular stomatitis virus, Coxsackie virus B4, and respiratory syncytial virus), CrFK (feline herpes virus and feline corona (FIPV) virus) and MDCK (influenza virus A (H1N1 and H3N2) and influenza virus B) cell cultures. Confluent cell cultures in microtiter 96-well plates were inoculated with 100 cell culture inhibitory dose-50 (CCID₅₀) of virus (1 CCID₅₀ being the virus dose to infect 50% of the cell cultures) and the cell cultures were incubated in the presence of varying concentrations (100, 20, 5, ... μ M) of the test compounds. Viral cytopathicity was recorded as soon as it reached completion in the control virus-infected cell cultures that were not treated with the test compounds. The methodology of the anti-HIV assays was as follows: human CEM (3×10^5 cells/ml) cells were infected with 100 CCID₅₀ of HIV-1(III_B) or HIV-2(ROD)/mL and seeded in 200 μ L wells of a microtiter plate containing appropriate dilutions of the test compounds. After 4 days of incubation at 37 °C, HIV-induced CEM giant cell formation was examined microscopically

Cytostatic Assays

To each well of a 96-well microtiter plate were added 5×10^4 cells and a given amount of the test compound. The cells were allowed to proliferate for 48 hours (murine leukemia L1210) or 72 hours (human lymphocyte CEM and human cervix carcinoma HeLa) at 37 °C in a humidified CO₂-controlled atmosphere. At the end of the incubation period, the cells were counted in a Coulter Counter (Coulter Electronics Ltd., Harpenden Herts, United Kingdom). The IC₅₀ (50% inhibitory concentration) was defined as the concentration of compound that reduced the number of cells by 50%.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by the Postgraduate Programmes "Biotechnology-Quality assessment in Nutrition and the Environment", "Application of Molecular Biology-Molecular Genetics-Molecular Markers", Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly and the K.U.Leuven (GOA 10/014). The authors thank Mrs. Lizette van Berckelaer, Mrs. Leentje Persoons, Mrs. Frieda De Meyer, Mrs. Anita Camps, Mrs. Lies Van den Heurck, Mr. Steven Carmans and Mrs. Leen Ingels for excellent technical assistance.

REFERENCES

- [1] Galmarini, C.M.; Mackey, J.R.; Dumontet, C. Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment. *Lancet Oncol.*, **2002**, 3(7), 415-424.
- [2] Meadows, C.D.; Gervay-Hague, J. Current Developments in HIV Chemotherapy. *Chem. Med. Chem.*, **2006**, 1(1), 16-29.
- [3] Mathé, C.; Gosselin, G. L-Nucleoside enantiomers as antiviral drugs: A mini-review. *Antiviral Res.*, **2006**, 71(2-3), 276-281.
- [4] Komiotis, D.; Manta, S.; Tsoukala, E.; Tzioumaki, N. Antiviral Unsaturated Nucleosides. *Curr. Med. Chem.: Anti-Infect. Agents*, **2008**, 7(4), 219-244.
- [5] Sugimoto, I.; Shuto, S.; Mori, S.; Shigeta, S.; Matsuda, A. Nucleosides and Nucleotides. 183. Synthesis of 4'- α -Branched Thymidines as a New Type of Antiviral Agent. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1999**, 9(3), 385-388.
- [6] Ohru, H.; Kohgo, S.; Kitano, K.; Sakata, S.; Kodama, E.; Yoshimura, K.; Matsuoka, M.; Shigeta, S.; Mitsuya, H. Syntheses of 4'-C-Ethynyl- β -D-arabino- and 4'-C-Ethynyl-2'-deoxy- β -D-ribo-pentofuranosylpyrimidines and -purines and Evaluation of Their Anti-HIV Activity. *J. Med. Chem.*, **2000**, 43(23), 4516-4525.
- [7] Kodama, E.; Kohgo, S.; Kitano, K.; Machida, H.; Gatanaga, H.; Shigeta, S.; Matsuoka, M.; Ohru, H.; Mitsuya, H. 4'-Ethynyl Nucleoside Analogs: Potent Inhibitors of Multidrug-Resistant Human Immunodeficiency Virus Variants In Vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2001**, 45(5), 1539-1546.
- [8] Hayakawa, H.; Kohgo, S.; Kitano, K.; Ashida, N.; Kodama, E.; Mitsuya, H.; Ohru, H. Potential of 4'-C-substituted nucleosides for the treatment of HIV-1. *Antiviral Chem. Chemother.*, **2004**, 15, 169-187.
- [9] Matsuda, A.; Hattori, H.; Tanaka, M.; Sasaki, T. Nucleosides and nucleotides. 152. 1-(3-C-Ethynyl- β -D-ribo-pentofuranosyl)uracil as a broad spectrum antitumor nucleoside. *BioMed. Chem. Lett.*, **1996**, 6(16), 1887-1892.
- [10] Hattori, H.; Tanaka, M.; Fukushima, M.; Sasaki, T.; Matsuda, A. Nucleosides and Nucleotides. 158. 1-(3-C-Ethynyl- β -D-ribo-pentofuranosyl)-cytosine, 1-(3-C-Ethynyl- β -D-ribo-pentofuranosyl)uracil, and Their Nucleobase Analogues as New Potential Multifunctional Antitumor Nucleosides with a Broad Spectrum of Activity. *J. Med. Chem.*, **1996**, 39(25), 5005-5011.
- [11] Hattori, H.; Nozawa, E.; Iino, T.; Yoshimura, Y.; Shuto, S.; Shimamoto, Y.; Nomura, M.; Fukushima, M.; Tanaka, M.; Sasaki, T.; Matsuda, A. Nucleosides and Nucleotides. 175. Structural Requirements of the Sugar Moiety for the Antitumor Activities of New Nucleoside Antimetabolites, 1-(3-C-Ethynyl- β -D-ribo-pentofuranosyl)cytosine and -uracil. *J. Med. Chem.*, **1998**, 41(15), 2892-2902.
- [12] Kazuno, H.; Fujioka, A.; Fukushima, M.; Wataya, Y.; Matsuda, A.; Sasaki, T. 1-(3-C-Ethynyl- β -D-ribo-pentofuranosyl)cytosine (ECYd, TAS-106), a novel potent inhibitor of RNA polymerase, potentiates the cytotoxicity of CDDP in human cancer cells both *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Oncol.*, **2009**, 34(5), 1373-1380.
- [13] Yonemura, Y.; Endo, Y.; Obata, T.; Sasaki, T. Recent advances in the treatment of peritoneal dissemination of gastrointestinal cancers by nucleoside antimetabolites. *Cancer Sci.*, **2007**, 98(1), 11-18.
- [14] Agelis, G.; Tzioumaki, N.; Botić, T.; Cencić, A.; Komiotis, D. Exomethylene pyranonucleosides: Efficient synthesis and biological evaluation of 1-(2,3,4-trideoxy-2-methylene- β -D-glycero-hex-3-enopyranosyl)thymine. *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, 15(16), 5448-5456.
- [15] Agelis, G.; Tzioumaki, N.; Tselios, T.; Botić, T.; Cencić, A.; Komiotis, D. Synthesis and molecular modelling of unsaturated exomethylene pyranonucleoside analogues with antitumor and antiviral activities. *Eur. J. Med. Chem.*, **2008**, 43(7), 1366-1375.
- [16] Egron, M.J.; Dorange, B.I.; Antonakis, K.; Herscovici, J.; Ollapally, A.P. Unsaturated fluoroketonucleosides as anticancer agents: the synthesis and biological activity of 5-fluoro-1-(3,4-di-deoxy-3-fluoro-6-O-trityl-beta-D-glycero-hex-3-eno-pyranos-2-ulosyl) uracil. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **2002**, 21(4-5), 327-334.
- [17] Spanou, C.; Manta, S.; Komiotis, D.; Dervishi, A.; Kouretas, D. Antioxidant Activity of a Series of Fluorinated Pyrano-nucleoside Analogues of N⁶-benzoyl Cytosine and N⁶-benzoyl Adenine. *Int. J. Mol. Sci.*, **2007**, 8(7), 695-704.
- [18] Spanou, C.; Tzioumaki, N.; Manta, S.; Margaris, P.; Kouretas, D.; Komiotis, D.; Liadaki, K. Unsaturated Keto and Exomethylene Pyranonucleoside Analogues of Thymine and Uracil Exhibit Potent Antioxidant Properties. *Pharmacol. Pharmacy*, **2011**, 2(3), 122-126.
- [19] Haouz, A.; Vanheusden, V.; Munier-Lechman, H.; Froeyen, M.; Herdewijn, P.; Van Galenbergh, S.; Delarue, M. Enzymatic and Structural Analysis of Inhibitors Designed against Mycobacterium tuberculosis Thymidylate Kinase. *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278(7), 4963-4971.
- [20] Vastmans, K.; Froeyen, M.; Kerremans, L.; Pochet, S.; Herdewijn, P. Reverse Transcriptase Incorporation of 1,5-Anhydrohexitol Nucleotides. *Nucleic Acids Res.*, **2001**, 29(15), 3154-3163.
- [21] Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencić, A.; Komiotis, D. Fluoro-ketopyranosyl nucleosides: Synthesis and biological evaluation of 3-fluoro-2-keto- β -D-glucopyranosyl derivatives of N⁴-benzoyl cytosine. *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, 15(2), 980-987.
- [22] Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencić, A.; Komiotis, D. Unsaturated fluoro-ketopyranosyl nucleosides: synthesis and biological evaluation of 3-fluoro-4-keto- β -D-glucopyranosyl derivatives of N⁴-benzoyl cytosine and N⁶-benzoyl adenine. *Eur. J. Med. Chem.*, **2008**, 43(2), 420-428.
- [23] Manta, S.; Tzioumaki, N.; Tsoukala, E.; Panagiotopoulou, A.; Pelecanou, M.; Balzarini, J.; Komiotis, D. Unsaturated dideoxy fluoro-ketopyranosyl nucleosides as new cytostatic agents: a convenient synthesis of 2,6-dideoxy-3-fluoro-4-keto- β -D-glucopyranosyl analogues of uracil, 5-fluorouracil, thymine, N⁴-benzoyl cytosine and N⁶-benzoyl adenine. *Eur. J. Med. Chem.*, **2009**, 44(11), 4764-4771.
- [24] Tsoukala, E.; Tzioumaki, N.; Manta, S.; Riga, A.; Balzarini, J.; Komiotis, D. Synthesis of 3-fluoro-6-S-(2-S-pyridyl) nucleosides as potential lead cytostatic agents. *Bioorg. Chem.*, **2010**, 38(6), 285-293.
- [25] Kiritsis, C.; Manta, S.; Parmenopoulou V.; Balzarini J.; Komiotis D. Branched-chain C-cyano pyranonucleosides: Synthesis of 3'-C-cyano & 3'-C-cyano-3'-deoxy pyrimidine pyranonucleosides as novel cytotoxic agents. *Eur. J. Med. Chem.*, **2011**, 46(11), 5668-5674.
- [26] Balatsos, N.A.A.; Vlachakis, D.; Maragozidis, P.; Manta, S.; Anastakis, D.; Kyritsis, A.; Vlassi, M.; Komiotis, D.; Stathopoulos, C. Competitive inhibition of human poly(A)-specific ribonuclease (PARN) by synthetic fluoro-pyranosyl nucleosides. *Biochemistry*, **2009**, 48(26), 6044-6051.
- [27] Tsirkone, G.V.; Tsoukala, E.; Lamprakis, C.; Manta, S.; Hayes, M.J.; Skamnaki, T.V.; Drakou, C.; Zographos, E.S.; Komiotis, D.; Leonidas, D.D. 1-(3-Deoxy-3-fluoro- β -D-glucopyranosyl) pyrimidine derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase b: Kinetic, crystallographic and modelling studies. *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, 18(10), 3413-3425.
- [28] Trakossas, S.; Coutouli-Argyropoulou, E.; Hadjipavlou-Litina, D.J. Synthesis of modified triazole nucleosides possessing one or two base moieties via a click chemistry approach. *Tetrahedron Lett.*, **2011**, 52(14), 1673-1676.
- [29] Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2001**, 40(11), 2004-2021.
- [30] Gramlich, P. M. E.; Wirges, C. T.; Manetto, A.; Carell, T. Postsynthetic DNA Modification through the Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition Reaction. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2008**, 47(44), 8350-8358.
- [31] Amblard, F.; Cho, J. H.; Schinazi, R. F. Cu(I)-Catalyzed Huisgen Azide-Alkyne 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction in Nucleoside, Nucleotide, and Oligonucleotide Chemistry. *Chem. Rev.*, **2009**, 109(9), 4207-4220.
- [32] Elhalabi, J.; Rice, K. G. Synthesis of Uridine 5'-[2-S-Pyridyl-3-thio- α -D-galactopyranosyl Diphosphate]: Precursor of UDP-Thiogal Sugar Nucleotide Donor Substrate for β -1,4-Galactosyltransferase. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **2004**, 23(1-2), 195-205.
- [33] Kakinuma, K.; Iihama, Y.; Takagi, I.; Ozawa, K.; Yamauchi, N.; Imamura, N.; Esumi, Y.; Uramoto, M. Diacetone Glucose Architecture as a Chirality Template. II. Versatile Synthon for the Chiral Deuterium Labeling and Synthesis of All Diastereoisomers of Chirally Monodeuterated Glycerol. *Tetrahedron*, **1992**, 48(18), 3763-3774.
- [34] Hassner, A.; Krepski, L. R.; Alexanian, V. Aminopyridines as acylation catalysts for tertiary alcohols. *Tetrahedron*, **1978**, 34(14), 2069-2076.

- [35] Vorbruggen, H.; Hofle, G. Nucleoside Syntheses, XXIII On the Mechanism of Nucleoside Synthesis. *Chem. Ber.*, **1981**, *114*, 1256-1268.
- [36] Vanheusden, V.; Busson, R.; Herdewijn, P.; Calenbergh, S. V. Synthesis and Conformational Analysis of 1-[2,4-Dideoxy-4-C-hydroxymethyl- α -L-lyxopyranosyl]thymine. *J. Org. Chem.*, **2004**, *69*(13), 4446-4453.
- [37] Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2002**, *41*(14), 2596-2599.
- [38] Roy, B.; Dutta, S.; Chowdhary, A.; Basak, A.; Dasgupta, S. Design, synthesis and RNase A inhibition activity of catechin and epicatechin and nucleobase chimeric molecules. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, *18*(20), 5411-5414.
- [39] Nawrot, B.; Michalak, O.; Olejniczak, S.; Wieczorek, M.W.; Lis, T.; Stec, W.J. Alkylation of thymine with 1,2-dibromoethane. *Tetrahedron*, **2001**, *57*(18), 3979-3985.

Received: August 26, 2011

Revised: March 09, 2012

Accepted: March 14, 2012



Short communication

Branched-chain C-cyano pyranonucleosides: Synthesis of 3'-C-cyano & 3'-C-cyano-3'-deoxy pyrimidine pyranonucleosides as novel cytotoxic agents

Christos Kiritsis^a, Stella Manta^a, Vanessa Parmenopoulou^a, Jan Balzarini^b, Dimitri Komiotis^{a,*}^aDepartment of Biochemistry and Biotechnology, Laboratory of Bio-Organic Chemistry, University of Thessaly, 26 Ploutonos Str., 41221 Larissa, Greece^bRega Institute for Medical Research, Katholieke Universiteit Leuven, 3000 Leuven, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 June 2011

Received in revised form

22 August 2011

Accepted 23 August 2011

Available online 1 September 2011

Keywords:

C-cyano pyranonucleosides

Cytotoxicity

5-fluorouracil

ABSTRACT

This report describes the total and facile synthesis of 3'-C-cyano & 3'-C-cyano-3'-deoxy pyrimidine pyranonucleosides. Reaction of 3-keto glucoside **1** with sodium cyanide gave the desired precursor 3-C-cyano-1,2:5,6-di-O-isopropylidene- α -D-glucopyranose (**2**). Hydrolysis followed by acetylation led to the 1,2,3,4,6-penta-O-acetyl-3-C-cyano-D-glucopyranose (**4**). Compound **4** was condensed with silylated 5-fluorouracil, uracil, thymine and *N*⁴-benzoylcytosine, respectively and deacetylated to afford the target 1-(3'-C-cyano- β -D-glucopyranosyl)nucleosides **6a–d**. Routine deoxygenation at position 3' of cyanohydrin **2**, followed by hydrolysis and acetylation led to the 3-C-cyano-3-deoxy-1,2,4,6-tetra-O-acetyl-D-allopyranose (**10**). Coupling of sugar **10** with silylated pyrimidines and subsequent deacetylation yielded the target 1-(3'-C-cyano-3'-deoxy- β -D-allopyranosyl)nucleosides **12a–d**. The new analogues were evaluated for their antiviral and cytostatic activities. It was found that **6a** was endowed with a pronounced anti-proliferative activity that was only 2- to 8-fold less potent than that shown for the parental base 5-fluorouracil. None of the compounds showed activity against a broad panel of DNA and RNA viruses.

© 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Modified nucleosides constitute a major class of biologically active compounds, especially as antitumor and antiviral agents [1–4]. Cytotoxic nucleoside analogues were among the first chemotherapeutic agents to be introduced for the medical treatment of cancer [5]. Nucleoside chemistry has also evolved to facilitate efficient routes to effective agents for the treatment of viral diseases caused by HIV [6] and herpes viruses [7]. Subsequently, nucleosides, which are frequently altered in the carbohydrate or base moiety, became the focus for the development of novel chemotherapeutic agents.

During the last decades, several branched-chain sugar nucleosides have been extensively studied for their potential antitumor or antiviral properties [8–11]. Attachment of the cyano group to the sugar moiety has been an attractive object for nucleoside chemists due to its small size and its great electron withdrawing character. Thus, cyano ribofuranose nucleosides have been reported as interesting antiviral agents [12–14], while replacement of the hydroxyl group of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine (ara-C) by the

cyano group led to a new biologically active compound [15,16], with a novel mechanism of anticancer action [17].

Lately, nucleosides bearing pyranosyl rings have been evaluated for their potential antiviral [18–20], antioxidant [21] and antibiotic [22] properties and as building blocks in nucleic acid synthesis [23,24]. As part of our efforts to develop novel biologically active agents, we recently reported that new classes of uncommon 3'-fluorinated pyranonucleosides have a promising potential in combating the rotaviral infections and in the treatment of colon cancer, and are efficient as antitumor growth inhibitors [25–29]. Experimental data also revealed that human poly(A)-specific ribonuclease [30] and glycogen phosphorylase [31] are among the molecular targets of these compounds.

In view of the interesting biological activity of the fluorinated pyranonucleosides, we decided to extend our studies to the synthesis of novel molecules in which an electron withdrawing cyano group replaces the fluorine atom. Therefore, we report the stereocontrolled synthesis of novel branched-chain C-cyano pyrimidine pyranonucleosides, i.e. 3'-C-cyano- β -D-glucopyranonucleosides and 3'-C-cyano-3'-deoxy- β -D-allopyranonucleosides, bearing 5-fluorouracil, uracil, thymine and cytosine as heterocyclic bases, in order to assess their biological activity. The chemical synthesis and biological activity of these compounds are presented herein.

* Corresponding author. Tel.: +30 2410 565285; fax: +30 2410 565290.

E-mail address: dkom@bio.uth.gr (D. Komiotis).

2. Results and discussion

2.1. Chemistry

3'-C-Cyano- β -D-glucopyranonucleosides **6a–d** were prepared according to the synthetic route outlined in Scheme 1. Treatment of the 1,2:5,6-di-O-isopropylidene- α -D-ribo-hexofuranos-3-ulose (**1**) [32] with sodium cyanide in a two-phase ethylether/H₂O system, in the presence of sodium bicarbonate, afforded the thermodynamically more stable gluco cyanohydrin epimer **2**, in a virtually quantitative yield [33,34]. The assignment of its configuration was further supported by NOE measurements, as depicted in Fig. 1. A 5% NOE enhancement of H-2 and a 7% NOE enhancement of H-5 on irradiation of the proton of the free OH group show that these protons are on the same side of the ring system. Hydrolysis of **2** using Amberlite IR 120 (H⁺) resin in methanol followed by acetylation using acetic anhydride (Ac₂O) in pyridine [32] led to the 1,2,3,4,6-penta-O-acetyl-3-C-cyano-D-glucopyranose (**4**). The protected, 1-(2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-3'-C-cyano- β -D-glucopyranosyl) pyrimidine nucleosides **5a–d** were obtained upon coupling of the precursor material **4** with silylated 5-fluorouracil, uracil, thymine and N⁴-benzoylcytosine, respectively, in the presence of trimethylsilyl trifluoromethane-sulfonate (Me₃SiOSO₂CF₃), in refluxing acetonitrile [35]. The ¹H NMR spectra obtained for the protected nucleosides **5a–d**, showed large coupling constants between protons H-1' and H-2' ($J_{1',2'} = 9.4–9.6$ Hz), indicating an axial orientation of both protons and equatorially oriented base rings. Fully deprotection of **5a–d**, performed by saturated methanolic ammonia [36], gave the desired nucleosides **6a–d**.

Compound **2** was the starting material for the synthesis of 3'-C-cyano- β -D-allopyranonucleosides **12a–d** (Scheme 1). Phenoxycarbonylation of **2** under a commonly used condition, phenyl chlorothionoformate, 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP) and triethylamine (Et₃N) in CH₃CN [16], afforded the 3'-O-phenoxycarbonyl derivative **7**, which proved to be unstable during the purification process. Therefore, crude **7** was directly submitted to deoxygenation with Bu₃SnH in the presence of 2,2'-azobis(isobutyronitrile) (AIBN), to give the 3'-deoxy derivative sugar **8**, in 76% overall yield. In order to elucidate the structure of the newly synthesized **8**, NOE measurements were performed, as depicted in Fig. 1. The mutual NOE enhancements observed between H-2 with both H-1 and H-3 show that all these protons are in the same β face of the furanose ring. In this type of radical deoxygenation, the hydrogen atom enters from the less hindered, β -face of the planar radical intermediate, opposite to the bulky 1,2-O-isopropylidene group.

Hydrolysis of **8** using Amberlite IR 120 (H⁺) resin in methanol followed by direct standard acetylation led to the 1,2,4,6-tetra-O-acetyl-3-C-cyano-3-deoxy-D-allopyranose (**10**). Condensation of cyano sugar **10** with per-O-silylated 5-fluorouracil, uracil, thymine and N⁴-benzoylcytosine using Me₃SiOSO₂CF₃ as activator, afforded the 1-(2',4',6'-tri-O-acetyl-3'-C-cyano-3'-deoxy- β -D-allopyranosyl) pyrimidine nucleosides **11a–d**, respectively [35]. ¹H NMR data obtained for the newly synthesized nucleosides **11a–d** ($J_{1',2'} = 9.4–9.7$ Hz, $J_{2',3'} = 5.0–5.2$ Hz), revealed the β -configuration of the sugar moiety and an axial oriented cyano group, respectively.

Finally, treatment of **11a–d** with hydrazine hydrate in buffered acetic acid (AcOH)–pyridine gave the fully deprotected nucleosides **12a–d**, in yields that varied from 55% to 75%. Interestingly, attempts to deprotect **11a–d** by NH₃/methanol (MeOH) under the subsequent basic conditions produced complex mixtures, containing β -elimination products, probably due to the acidity of H-3' and the presence of two leaving groups (OAc) at the 2'- and 4'-positions of the sugar moiety.

2.2. Biological activity

The cytostatic activity of **6a–d** and **12a–d** was determined against murine leukemia L1210, human lymphocyte CEM and human cervix carcinoma HeLa cell cultures. The test compounds showed poor, if any cytostatic activity against the three cell lines, except the 3'-C-cyano-5-fluorouracil pyranonucleoside **6a** that showed pronounced antiproliferative activity against all three cell lines. Its cytostatic activity spectrum was similar to that of the parent base 5-fluorouracil. It is currently unclear whether **6a** is biologically active as such, or, alternatively, acts as a prodrug of 5-fluorouracil, from which the free base may be released by the action of phosphorolytic enzymes and/or by a spontaneous release (Table 1).

None of the compounds was endowed with activity against a broad panel of DNA and RNA viruses in cell culture at 100 μ M.

3. Conclusion

In conclusion, the stereocontrolled synthesis of the 3'-C-cyano & 3'-C-cyano-3'-deoxy pyranonucleoside analogues bearing 5-fluorouracil, uracil, thymine and cytosine, respectively was undertaken. The target nucleosides were tested for their inhibitory effects on the proliferation of murine leukemia L1210, human lymphocyte CEM and human cervix carcinoma HeLa cell cultures. 3'-C-Cyano-5-fluorouracil pyranonucleoside **6a** showed a similar cytostatic activity spectrum as the free base 5-fluorouracil.

4. Experimental part

4.1. Chemistry

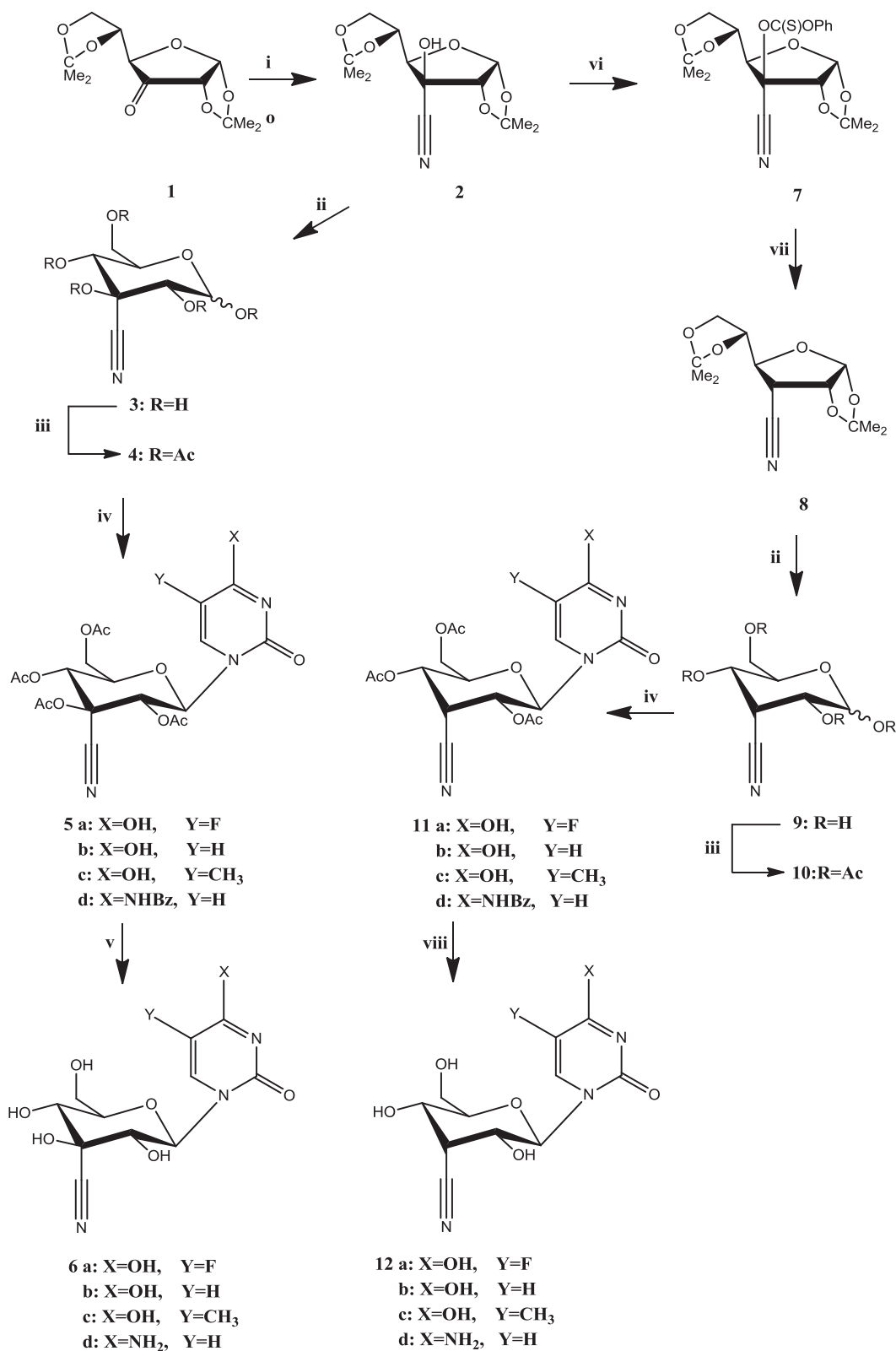
Melting points were recorded in a Mel-Temp apparatus and are uncorrected. Thin layer chromatography (TLC) was performed on Merck precoated 60F₂₅₄ plates. Reactions were monitored by TLC on silica gel, with detection by UV light (254 nm) or by charring with sulfuric acid. Flash column chromatography was performed using silica gel (240–400 mesh, Merck). ¹H and ¹³C NMR spectra were obtained at room temperature with a Bruker 400 spectrometer at 400 and 100 MHz, respectively, using CDCl₃ and methanol-d₄ (CD₃OD) with internal tetramethylsilane (TMS).

UV–Vis spectra were recorded on a PG T70 UV–VIS spectrometer and mass spectra were obtained with a Micromass Platform LC (ESI–MS). Optical rotations were measured using an Autopol I polarimeter. Infrared spectra were obtained with a Thermo Scientific Nicolet IR100 FT-IR spectrometer. Acetonitrile and toluene were distilled from calcium hydride and stored over 3E molecular sieves.

4.2. Synthesis of 1,2,3,4,6-penta-O-acetyl-3-C-cyano-D-glucopyranose (**4**)

4.2.1. Synthesis of 3-C-cyano-1,2:5,6-di-O-isopropylidene- α -D-glucofuranose (**2**)

A mixture of 1,2:5,6-di-O-isopropylidene- α -D-ribo-hexofuranos-3-ulose (**1**) (4 g, 15.5 mmol), H₂O (62 mL), ethylether (124 mL), sodium bicarbonate (2.6 g, 15.5 mmol) and sodium cyanide (0.76 g, 7.75 mmol) was stirred vigorously at room temperature overnight. The organic phase was separated, and the aqueous phase was washed with ethylether (2 x 124 mL). The combined ether phases were dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The residue was purified by flash chromatography [(ethylacetate) EtOAc/hexane, 3:7] to give compound **2** (4.28 g, 97%, R_f = 0.40 in EtOAc/hexane, 3:7) as a white solid, mp 98–100 °C [34]. $[\alpha]_D^{22} + 46$ (c 0.3, CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃): δ 5.97 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.4$ Hz, H-1), 4.59 (d, 1H, H-2), 4.36–4.32 (m, 1H, H-5),



Scheme 1. (i) H₂O, ethylether, NaHCO₃, NaCN; (ii) H₂O, MeOH, Amberlite IR 120 (H⁺); (iii) Ac₂O, pyridine; (iv) Silylated base, CH₃CN, Me₃SiOSO₂CF₃; (v) Methanolic ammonia; (vi) Phenyl chlorothionformate, Et₃N, DMAP, CH₃CN, 0 °C; (vii) Bu₃SnH, AIBN, toluene, 100 °C; (viii) N₂H₄·H₂O, AcOH, pyridine.

4.24–4.21 (m, 2H, H-6a, H-4), 4.11 (m, 1H, H-6b), 4.04 (s, 1H, 3-OH), 1.58, 1.55, 1.39, 1.37 (4s, 12H, 4CH₃); Anal. Calcd for C₁₃H₁₉NO₆: C, 54.73; H, 6.71; N, 4.91. Found: C, 54.84; H, 6.77; N, 4.82; ESI-MS (*m/z*): 286.32 (M + H⁺).

4.2.2. Synthesis of 3-C-cyano-D-glucopyranose (3)

To a solution of **2** (2 g, 7.01 mmol) in MeOH (10.9 mL) and H₂O (62.2 mL) was added Amberlite IR 120 (H⁺) resin and the mixture was refluxed overnight. The reaction mixture was filtered and

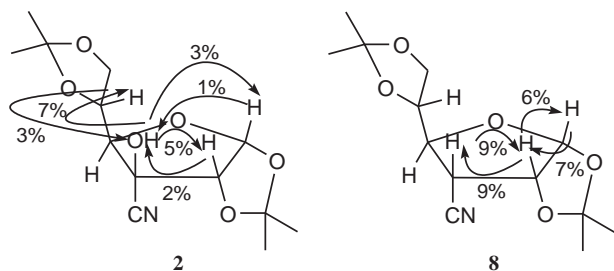


Fig. 1. NOE enhancements measured on compounds **2** and **8**.

evaporated to dryness to give compound **3** (1.25 g, 87%, Rf = 0.33 in EtOAc/MeOH, 9:1) as a viscous oil, and it was used without further purification. $[\alpha]_D^{22} - 25$ (c 0.44, MeOH); Anal. Calcd for $C_7H_{11}NO_6$: C, 40.98; H, 5.40; N, 6.83. Found: C, 40.81; H, 5.35, N, 6.92; ESI-MS: (m/z) 206.19 ($M + H^+$).

4.2.3. Synthesis of 1,2,3,4,6-penta-O-acetyl-3-C-cyano-D-glucopyranose (**4**)

Compound **3** (1.25 g, 6.09 mmol) was dissolved in a mixture of pyridine (21.2 mL) and Ac_2O (10.9 mL). The reaction was carried out at room temperature for 1 h, then was quenched with MeOH at 0 °C and was concentrated in vacuum. The residue was diluted with EtOAc, washed with saturated sodium bisulfate, sodium bicarbonate and H_2O . The organic extract was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness to give compound **4** (2.28 g, 90%, Rf = 0.43 in EtOAc/hexane, 3:7) as a colorless oil. $[\alpha]_D^{22} + 30$ (c 1.30, $CHCl_3$); Anal. Calcd for $C_{17}H_{21}NO_{11}$: C, 49.16; H, 5.10; N, 3.37. Found: C, 49.40; H, 5.12; N, 3.46; ESI-MS: (m/z) 416.36 ($M + H^+$).

4.3. Synthesis of 3'-C-cyano-β-D-glucopyranonucleosides **6a–d**

4.3.1. Synthesis of 1-(2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-3'-C-cyano-β-D-glucopyranosyl)5-fluorouracil (**5a**)

A mixture of 5-fluorouracil (109 mg, 0.84 mmol), hexamethyldisilazane (HMDS) (220 μL, 1.04 mmol) and saccharine (7 mg, 0.039 mmol) in anhydrous CH_3CN (3.5 mL) was refluxed for 30 min under nitrogen. 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl-3-C-cyano-D-glucopyranose (**4**) (0.25 g, 0.6 mmol) and $Me_3SiOSO_2CF_3$ (152 μL, 0.84 mmol) were then added and the reaction mixture was refluxed for 4 h, cooled, neutralized with aqueous sodium bicarbonate, and extracted with CH_2Cl_2 (200 mL). The organic extract was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. The residue was purified by flash chromatography (EtOAc/hexane, 4:6) to give pure **5a**

(0.18 g, 60%, Rf = 0.47 in EtOAc/hexane, 1:1) as a white solid, mp 114–116 °C. $[\alpha]_D^{22} - 2$ (c 0.37, $CHCl_3$); λ_{max} 262 nm (ϵ 7950); 1H NMR ($CDCl_3$): δ 8.36 (br s, 1H, NH), 7.37 (d, 1H, $J_{6,F5} = 5.6$ Hz, H-6), 6.05 (dd, 1H, $J_{1,2'} = 9.5$ Hz, $J_{1',F5} = 1.2$ Hz, H-1'), 5.70 (d, 1H, H-2'), 5.64 (d, 1H, $J_{4',5'} = 10.2$ Hz, H-4'), 4.45–4.39 (m, 1H, H-5'), 4.22–4.14 (m, 2H, H-6a', H-6b'), 2.16, 2.14, 2.11, 2.04 (4s, 12H, 4OAc); . Anal. Calcd for $C_{19}H_{20}FN_3O_{11}$: C, 47.02; H, 4.15; N, 8.66; Found: C, 47.22; H, 4.21; N, 8.79. ESI-MS (m/z) 486.39 ($M + H^+$).

4.3.2. Synthesis of 1-(3'-C-cyano-β-D-glucopyranosyl)5-fluorouracil (**6a**)

Compound **5a** (0.18 g, 0.37 mmol) was treated with ammonia/MeOH (saturated at 0 °C, 20.6 mL). The solution was stirred overnight at room temperature and then was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (CH_2Cl_2 /MeOH, 9:1) to afford pure **6a** (76 mg, 65%, Rf = 0.40 in CH_2Cl_2 /MeOH, 8:2) as a white foam. $[\alpha]_D^{22} + 20$ (c 0.50, CD_3OD); λ_{max} 266 nm (ϵ 7739); 1H NMR (CD_3OD): δ 7.95 (d, 1H, $J_{6,F5} = 6.7$ Hz, H-6), 6.01 (dd, 1H, $J_{1,2'} = 10.3$ Hz, $J_{1',F5} = 1.3$ Hz, H-1'), 3.94–3.67 (m, 5H, H-2', H-4', H-5', H-6a', H-6b'); ^{13}C NMR (CD_3OD): δ 159.22, 151.38, 139.15, 127.52, 119.28, 88.32, 79.01, 71.93, 71.70, 68.18, 61.37; IR (Nujol, cm^{-1}): 2230 (CN); Anal. Calcd for $C_{11}H_{12}FN_3O_7$: C, 41.65; H, 3.81; N, 13.25. Found: C, 41.94; H, 3.71; N, 13.51; ESI-MS (m/z) 318.20 ($M + H^+$).

4.3.3. Synthesis of 1-(2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-3'-C-cyano-β-D-glucopyranosyl)uracil (**5b**)

Uracil derivative **5b** was synthesized from **4** by the similar procedure as described for **5a**. It was purified by flash chromatography (EtOAc/hexane, 4:6) to give pure **5b** (0.17 g, 61%, Rf = 0.29 in EtOAc/hexane, 1:1) as a white solid, mp 190–192 °C. $[\alpha]_D^{22} - 7$ (c 0.7, $CHCl_3$); λ_{max} 260 nm (ϵ 5777); 1H NMR ($CDCl_3$): δ 8.34 (br s, 1H, NH), 7.33 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.1$ Hz, H-6), 6.09 (d, 1H, $J_{1,2'} = 9.5$ Hz, H-1'), 5.85 (d, 1H, H-5), 5.79 (d, 1H, H-2'), 5.68 (d, 1H, $J_{4',5'} = 10.2$ Hz, H-4'), 4.46–4.42 (m, 1H, H-5'), 4.22–4.17 (m, 2H, H-6a', H-6b'), 2.19, 2.14, 2.12, 2.07 (4s, 12H, 4OAc); Anal. Calcd for $C_{19}H_{21}N_3O_{11}$: C, 48.83; H, 4.53; N, 8.99. Found: C, 48.65; H, 4.11; N, 8.79; ESI-MS (m/z) 468.40 ($M + H^+$).

4.3.4. Synthesis of 1-(3'-C-cyano-β-D-glucopyranosyl)uracil (**6b**)

Uracil derivative **6b** was synthesized from **5b** by the similar procedure as described for **6a**. The residue was purified by flash chromatography (CH_2Cl_2 /MeOH, 9:1) to afford pure **6b** (70 mg, 64%, Rf = 0.29 in CH_2Cl_2 /MeOH, 8:2) as a white foam. $[\alpha]_D^{22} + 7$ (c 0.32, CD_3OD); λ_{max} 258 nm (ϵ 11306); 1H NMR (CD_3OD): δ 7.70 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.0$ Hz, H-6), 6.01 (d, 1H, $J_{1,2'} = 9.0$ Hz, H-1'), 5.70 (d, 1H, H-5), 3.97–3.54 (m, 5H, H-2', H-4', H-5', H-6a', H-6b'); ^{13}C NMR (CD_3OD): δ 164.12, 150.23, 141.44, 119.01, 102.6, 92.22, 79.68, 72.12, 70.9, 68.35, 61.32; IR (Nujol, cm^{-1}): 2240 (CN); Anal. Calcd for $C_{11}H_{13}N_3O_7$: C, 44.15; H, 4.38; N, 14.04. Found: C, 43.90; H, 4.28; N, 13.96; ESI-MS (m/z) 300.22 ($M + H^+$).

4.3.5. Synthesis of 1-(2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-3'-C-cyano-β-D-glucopyranosyl)thymine (**5c**)

Thymine derivative **5c** was synthesized from **4** by the similar procedure as described for **5a**. It was purified by flash chromatography (EtOAc/hexane, 4:6) to give pure **5c** (0.16 g, 57%, Rf = 0.34 in EtOAc/hexane, 1:1) as a white solid, mp 127–129 °C. $[\alpha]_D^{22} - 4$ (c 0.39, $CHCl_3$); λ_{max} 259 nm (ϵ 9402); 1H NMR ($CDCl_3$): δ 8.34 (br s, 1H, NH), 7.01 (s, 1H, H-6), 6.08 (d, 1H, $J_{1,2'} = 9.6$ Hz, H-1'), 5.80 (d, 1H, H-2'), 5.67 (d, 1H, $J_{4',5'} = 10.2$ Hz, H-4'), 4.47–4.38 (m, 1H, H-5'), 4.23–4.13 (m, 2H, H-6a', H-6b'), 2.18, 2.14, 2.12, 2.07 (4s, 12H, 4OAc), 1.97 (s, 3H, CH_3); Anal. Calcd for $C_{20}H_{23}N_3O_{11}$: C, 49.90; H, 4.82; N, 8.73. Found: C, 49.62; H, 4.58; N, 8.71; ESI-MS (m/z) 482.42 ($M + H^+$).

Table 1

Cytostatic activity of **6a–d** and **12a–d** against a panel of tumor cell lines.

Compound	IC ₅₀ ^a (μM)		
	L1210	CEM	HeLa
6a	1.9 ± 0.0	32 ± 9.6	4.5 ± 1.2
6b	417 ± 376	> 500	> 500
6c	539 ± 85	> 500	> 500
6d	147 ± 14	> 500	377 ± 0
12a	550 ± 10	> 500	819 ± 44
12b	> 500	> 500	811 ± 40
12c	> 750	> 750	> 750
12d	> 750	> 750	> 750
F-Uracil	0.49 ± 0.13	18 ± 5	0.54 ± 0.12

^a 50% inhibitory concentration, or compound concentration required to inhibit cell proliferation by 50%. Data are the mean of 2–3 independent experiments (±S.D.).

4.3.6. Synthesis of 1-(3'-C-cyano-β-D-glucopyranosyl)thymine (**6c**)

Thymine derivative **6c** was synthesized from **5c** by the similar procedure as described for **6a**. The residue was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1) to afford pure **6c** (114 mg, 71%, Rf = 0.32 in CH₂Cl₂/MeOH, 8:2) as a white foam. $[\alpha]_D^{22} + 4$ (c 0.31, CD₃OD); λ_{\max} 261 nm (ϵ 4238); ¹H NMR (CD₃OD): δ 7.57 (s, 1H, H-6), 6.03 (d, 1H, $J_{1,2'} = 9.0$ Hz, H-1'), 4.00–3.67 (m, 5H, H-2', H-4', H-5', H-6a', H-6b'), 1.91 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (CD₃OD): δ 162.62, 150.49, 137.12, 119.91, 110.69, 92.76, 79.83, 71.01, 70.90, 69.81, 62.46, 13.33; IR (Nujol, cm⁻¹): 2245 (CN); Anal. Calcd for C₁₂H₁₅N₃O₇: C, 46.01; H, 4.83; N, 13.41. Found: C, 45.79; H, 4.61; N, 13.26; ESI-MS (m/z) 314.28 (M + H⁺).

4.3.7. Synthesis of 1-(2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-3'-C-cyano-β-D-glucopyranosyl)N⁴-benzoylcytosine (**5d**)

N⁴-benzoyl cytosine derivative **5d** was synthesized from **4** by the similar procedure as described for **5a**. It was purified by flash chromatography (EtOAc/hexane, 4:6) to give pure **5d** (0.19 g, 56%, Rf = 0.32 in EtOAc/hexane, 1:1) as a white solid, mp 240–242 °C. $[\alpha]_D^{22} - 5$ (c 0.43, CHCl₃); λ_{\max} 263 nm (ϵ 25940); ¹H NMR (CDCl₃): δ 7.95–7.49 (m, 7H, Bz, H-5 and H-6), 6.37 (d, 1H, $J_{1,2'} = 9.4$ Hz, H-1'), 5.82 (d, 1H, H-2'), 5.67 (d, 1H, $J_{4,5'} = 10.0$ Hz, H-4'), 4.48–4.40 (m, 1H, H-5'), 4.28–4.14 (m, 2H, H-6a', H-6b'), 2.18, 2.14, 2.11, 2.05 (4s, 12H, 4OAc); Anal. Calcd for C₂₆H₂₆N₄O₁₁: C, 54.74; H, 4.59; N, 9.82. Found: C, 54.61; H, 4.65; N, 9.71; ESI-MS (m/z) 571.48 (M + H⁺).

4.3.8. Synthesis of 1-(3'-C-cyano-β-D-glucopyranosyl)cytosine (**6d**)

Cytosine derivative **6d** was synthesized from **5d** by the similar procedure as described for **6a**. The residue was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1) to afford pure **6d** (61 mg, 61%, Rf = 0.23 in CH₂Cl₂/MeOH, 7:3) as a white foam. $[\alpha]_D^{22} - 3$ (c 0.31, CD₃OD); λ_{\max} 269 nm (ϵ 7569); ¹H NMR (CD₃OD): δ 7.70 (d, 1H, $J_{5,6} = 7.5$ Hz, H-6), 6.12 (d, 1H, $J_{1,2'} = 9.0$ Hz, H-1'), 5.94 (d, 1H, H-5), 4.00–3.69 (m, 5H, H-2', H-4', H-5', H-6a', H-6b'); ¹³C NMR (CD₃OD): δ 165.72, 156.91, 143.22, 119.16, 94.96, 91.37, 79.96, 72.01, 70.28, 68.16, 61.92; IR (Nujol, cm⁻¹): 2235 (CN); Anal. Calcd for C₁₁H₁₄N₄O₆: C, 44.30; H, 4.73; N, 18.79. Found: C, 44.48; H, 4.58; N, 18.96; ESI-MS (m/z) 299.23 (M + H⁺).

4.4. Synthesis of 1,2,4,6-tetra-O-acetyl-3-C-cyano-3-deoxy-D-allopyranose (**10**)

4.4.1. Synthesis of 3-C-cyano-3-deoxy-1,2:5,6-di-O-isopropylidene-α-D-allofuranose (**8**)

Phenyl chlorothionoformate (1.39 mL, 10.33 mmol) was added to a solution of **2** (2 g, 7.01 mmol), DMAP (3.03 mmol, 0.37 g), and Et₃N (1.47 mL, 10.69 mmol) in CH₃CN (73.68 mL) under nitrogen at 0 °C. The mixture was stirred for 1 h and then diluted with AcOEt (500 mL). The whole was washed with H₂O (3 × 150 mL) and the separated organic phase was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. The residue **7** was coevaporated two times with toluene and then was dissolved in toluene (73.68 mL). Bu₃SnH (2.93 mL, 11.06 mmol) was added to the above solution containing AIBN (1.1 mmol, 182 mg) at 100 °C under nitrogen. After being heated for 45 min, the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (EtOAc/hexane, 3:7) to give compound **8** (1.43 g, 76%, Rf = 0.44 in EtOAc/hexane, 3:7) as a white solid: mp 104–106 °C. $[\alpha]_D^{22} + 16$ (c 0.40, CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃): δ 5.81 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.7$ Hz, H-1), 4.76 (dd, 1H, $J_{2,3} = 4.8$ Hz, H-2), 4.21–3.94 (m, 4H, H-4, H-5, H-6a, H-6b), 2.88 (dd, 1H, H-3), 1.51 (s, 3H, CH₃), 1.42 (s, 3H, CH₃), 1.33 (s, 6H, 2 CH₃). Anal. Calcd for C₁₃H₁₉N₃O₅: C, 57.98; H, 7.11; N, 5.20. Found: C, 58.12; H, 7.20; N, 5.41; ESI-MS (m/z) 270.27 (M + H⁺).

4.4.2. Synthesis of 3-C-cyano-3-deoxy-α-D-allopyranose (**9**)

To a solution of **8** (1.43 g, 5.31 mmol) in MeOH (10.9 mL) and H₂O (62.2 mL) was added Amberlite IR 120 (H⁺) resin and the mixture was refluxed overnight. The reaction mixture was filtered and evaporated to dryness to give compound **9** (924 mg, 92%, Rf = 0.17 in EtOAc) as a viscous oil, and it was used without further purification. $[\alpha]_D^{22} + 6$ (c 0.45, MeOH); Anal. Calcd for C₇H₁₁N₃O₅: C, 44.45; H, 5.86; N, 7.40. Found: C, 44.21; H, 5.92; N, 7.22; ESI-MS: (m/z) 190.20 (M + H⁺).

4.4.3. Synthesis of 1,2,4,6-tetra-O-acetyl-3-C-cyano-3-deoxy-D-allopyranose (**10**)

Compound **9** (924 mg, 4.89 mmol) was dissolved in a mixture of pyridine (17.12 mL) and Ac₂O (8.8 mL). The reaction was carried out at room temperature for 1 h, then was quenched with MeOH at 0 °C and was concentrated in vacuum. The residue was diluted with EtOAc, washed with saturated sodium bisulfate, sodium bicarbonate and H₂O. The organic extract was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness to give compound **10** (1.56 g, 89%, Rf = 0.41 in EtOAc/hexane, 3:7) as a colorless oil. $[\alpha]_D^{22} - 2$ (c 0.55, CHCl₃); Anal. Calcd for C₁₅H₁₉N₃O₉: C, 50.42; H, 5.36; N, 3.92. Found: C, 50.54; H, 5.32; N, 3.87; ESI-MS: (m/z) 358.30 (M + H⁺).

4.5. Synthesis of 3'-C-cyano-3'-deoxy-β-D-allopyranonucleosides **12a–d**

4.5.1. Synthesis of 1-(2',4',6'-tri-O-acetyl-3'-C-cyano-3'-deoxy-β-D-allopyranosyl)5-fluorouracil (**11a**)

A mixture of 5-fluorouracil (126 mg, 0.97 mmol), HMDS (254 μL, 1.20 mmol) and saccharine (8 mg, 0.045 mmol) in anhydrous CH₃CN (3.5 mL) was refluxed for 30 min under nitrogen. 1,2,4,6-tetra-O-acetyl-3-C-cyano-3-deoxy D-allopyranose (**10**) (0.25 g, 0.69 mmol) and Me₃SiOSO₂CF₃ (152 μL, 0.84 mmol) were then added and the reaction mixture was refluxed for 4 h, cooled, neutralized with aqueous sodium bicarbonate, and extracted with CH₂Cl₂ (200 mL). The organic extract was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. The residue was purified by flash chromatography (EtOAc/hexane, 4:6) to give pure **11a** (0.19 g, 64%, Rf = 0.33 in EtOAc/hexane, 1:1) as a white solid, mp 108–110 °C. $[\alpha]_D^{22} - 2$ (c 0.28, CHCl₃); λ_{\max} (CHCl₃) 263 nm (ϵ 9073); ¹H NMR (CDCl₃): δ 8.58 (br s, 1H, NH), 7.18 (d, 1H, $J_{6,F5} = 5.6$ Hz, H-6), 5.93 (d, 1H, $J_{1,2'} = 9.4$ Hz, H-1'), 4.92 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 5.0$ Hz, H-2'), 5.79 (dd, 1H, $J_{3',4'} = 4.9$ Hz, $J_{4',5'} = 9.7$ Hz, H-4'), 4.21–4.06 (m, 3H, H-6a', H-6b', H-5'), 3.89 (t, 1H, H-3'), 2.03, 1.98, 1.96, (3s, 9H, 3OAc); Anal. Calcd for C₁₇H₁₈FN₃O₉: C, 47.78; H, 4.25; N, 9.83. Found: C, 47.56; H, 4.31; N, 9.79; ESI-MS (m/z) 428.36 (M + H⁺).

4.5.2. Synthesis of 1-(3'-C-cyano-3'-deoxy-β-D-allopyranosyl)5-fluorouracil (**12a**)

To a solution of compound **11a** (0.19 g, 0.44 mmol) in AcOH-pyridine (2.2 mL, 1:4 v/v), 85% hydrazine hydrate (0.31 mL, 5.28 mmol) was added at room temperature. After continually stirring for 16h, acetone (1.1 mL) was added, and stirring for an additional 30 min. The mixture was evaporated to dryness and the residue was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1) to afford pure **12a** (86 mg, 65%, Rf = 0.26 in CH₂Cl₂/MeOH, 9:1) as a white foam. $[\alpha]_D^{22} - 8$ (c 0.65, CD₃OD); λ_{\max} 263 nm (ϵ 8929); ¹H NMR (CD₃OD): δ 7.80 (d, 1H, $J_{6,F5} = 6.5$ Hz, H-6), 6.01 (d, 1H, $J_{1,2'} = 9.2$ Hz, H-1'), 4.46–4.42 (m, 1H, H-5'), 4.23 (dd, 1H, $J_{3',4'} = 5.6$ Hz, $J_{4',5'} = 12.1$ Hz, H-4'), 4.05 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 5.1$ Hz, H-2'), 3.95–3.84 (m, 2H, H-6a', H-6b'), 3.75 (t, 1H, H-3'); ¹³C NMR (CD₃OD): δ 158.09, 150.72, 141.39, 128.03, 118.43, 96.49, 84.37, 67.33, 64.11, 61.09, 29.12; IR (Nujol, cm⁻¹): 2250 (CN); Anal. Calcd for C₁₁H₁₂FN₃O₆: C, 43.86; H, 4.02; N, 13.95. Found: C, 43.74; H, 3.94; N, 13.82; ESI-MS (m/z) 302.21 (M + H⁺).

4.5.3. Synthesis of 1-(2',4',6'-tri-O-acetyl-3'-C-cyano-3'-deoxy-β-D-allopyranosyl)uracil (**11b**)

Uracil derivative **11b** was synthesized from **10** by the similar procedure as described for **11a**. It was purified by flash chromatography (EtOAc/hexane, 1:1) to give pure **11b** (0.18 g, 62%, Rf = 0.2 in EtOAc/hexane, 1:1) as a white solid, mp 124–126 °C. $[\alpha]_D^{22} - 2$ (c 0.30, CHCl₃); λ_{\max} 256 nm (ϵ 13439); ¹H NMR (CDCl₃): δ 8.27 (br s, 1H, NH), 7.25 (d, 1H, J_{5,6} = 8.2 Hz, H-6), 6.11 (d, 1H, J_{1',2'} = 9.6 Hz, H-1'), 5.80 (d, 1H, H-5), 5.12 (dd, 1H, J_{2',3'} = 5.2 Hz, H-2'), 4.96 (dd, 1H, J_{3',4'} = 5.0 Hz, J_{4',5'} = 9.6 Hz, H-4'), 4.38–4.23 (m, 3H, H-6a', H-6b', H-5'), 4.06 (t, 1H, H-3'), 2.20, 2.15, 2.12 (s, 9H, 3OAc); Anal. Calcd for C₁₇H₁₉N₃O₉: C, 49.88; H, 4.68; N, 10.27. Found: C, 49.65; H, 4.51; N, 10.36; ESI-MS (*m/z*) 410.32 (M + H⁺).

4.5.4. Synthesis of 1-(3'-C-cyano-3'-deoxy-β-D-allopyranosyl)uracil (**12b**)

Uracil derivative **12b** was synthesized from **11b** by the similar procedure as described for **12a**. The residue was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1) to afford pure **12b** (91 mg, 75%, Rf = 0.19 in CH₂Cl₂/MeOH, 9:1) as a white foam. $[\alpha]_D^{22} - 22$ (c 0.80, CD₃OD); λ_{\max} 261 nm (ϵ 15441); ¹H NMR (CD₃OD): δ 7.61 (d, 1H, J_{5,6} = 8.1 Hz, H-6), 5.82 (d, 1H, J_{1',2'} = 9.3 Hz, H-1'), 5.72 (d, 1H, H-5), 4.46–4.42 (m, 1H, H-5'), 4.23 (dd, 1H, J_{3',4'} = 5.4 Hz, J_{4',5'} = 12.1 Hz, H-4'), 4.08 (dd, 1H, J_{2',3'} = 5.1 Hz, H-2'), 3.99–3.84 (m, 2H, H-6a', H-6b'), 3.76 (t, 1H, H-3'); ¹³C NMR (CD₃OD): δ 164.01, 150.12, 142.27, 118.96, 102.13, 98.17, 83.96, 66.89, 63.01, 61.20, 30.87; IR (Nujol, cm⁻¹): 2245 (CN); Anal. Calcd for C₁₁H₁₃N₃O₆: C, 46.65; H, 4.63; N, 14.84. Found: C, 46.96; H, 4.78; N, 14.75; ESI-MS (*m/z*) 284.22 (M + H⁺).

4.5.5. Synthesis of 1-(2',4',6'-tri-O-acetyl-3'-C-cyano-3'-deoxy-β-D-allopyranosyl)thymine (**11c**)

Thymine derivative **11c** was synthesized from **10** by the similar procedure as described for **11a**. It was purified by flash chromatography (EtOAc/hexane, 1:1) to give pure **11c** (0.19 g, 68%, Rf = 0.25 in EtOAc/hexane, 1:1) as a white solid, mp 106–108 °C. $[\alpha]_D^{22} - 4$ (c 0.30, CHCl₃); λ_{\max} (CHCl₃) 261 nm (ϵ 7290); ¹H NMR (CDCl₃): δ 8.26 (br s, 1H, NH), 7.04 (s, 1H, H-6), 6.1 (d, 1H, J_{1',2'} = 9.7 Hz, H-1'), 5.12 (dd, 1H, J_{2',3'} = 5.2 Hz, H-2'), 5.67 (dd, 1H, J_{3',4'} = 4.9 Hz, J_{4',5'} = 9.6 Hz, H-4'), 4.38–4.23 (m, 3H, H-6a', H-6b', H-5'), 4.06 (t, 1H, H-3'), 2.19, 2.13, 2.12 (3s, 9H, 3OAc), 1.96 (s, 3H, 5-CH₃); Anal. Calcd for C₁₈H₂₁N₃O₉: C, 51.06; H, 5.00; N, 9.93. Found: C, 50.87; H, 4.96; N, 9.87; ESI-MS (*m/z*) 424.39 (M + H⁺).

4.5.6. Synthesis of 1-(3'-C-cyano-3'-deoxy-β-D-allopyranosyl)thymine (**12c**)

Thymine derivative **12c** was synthesized from **11c** by the similar procedure as described for **12a**. The residue was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1) to afford pure **12c** (99 mg, 71%, Rf = 0.20 in CH₂Cl₂/MeOH, 9:1) as a white foam. $[\alpha]_D^{22} - 16$ (c 0.50, CD₃OD); λ_{\max} 262 nm (ϵ 14609); ¹H NMR (CD₃OD): δ 7.40 (s, 1H, H-6), 5.77 (d, 1H, J_{1',2'} = 9.4 Hz, H-1'), 4.46–4.42 (m, 1H, H-5'), 4.24 (dd, 1H, J_{3',4'} = 5.6 Hz, J_{4',5'} = 12.0 Hz, H-4'), 4.11 (dd, 1H, J_{2',3'} = 5.1 Hz, H-2'), 3.99–3.84 (m, 2H, H-6a', H-6b'), 3.70 (t, 1H, H-3'), 1.91 (s, 3H, 5-CH₃); ¹³C NMR (CD₃OD): δ 163.67, 150.19, 136.85, 119.01, 110.63, 97.67, 84.15, 67.29, 64.55, 61.30, 28.02, 12.68; IR (Nujol, cm⁻¹): 2240 (CN); Anal. Calcd for C₁₂H₁₅N₃O₆: C, 48.48; H, 5.09; N, 14.14. Found: C, 48.82; H, 5.12; N, 14.09; ESI-MS (*m/z*) 298.27 (M + H⁺).

4.5.7. Synthesis of 1-(2',4',6'-tri-O-acetyl-3'-C-cyano-3'-deoxy-β-D-allopyranosyl)N⁴-benzoylcytosine (**11d**)

N⁴-benzoylcytosine derivative **11d** was synthesized from **10** by the similar procedure as described for **11a**. It was purified by flash

chromatography (EtOAc/hexane, 1:1) to give pure **11d** (0.21 g, 59%, Rf = 0.23 in EtOAc/hexane, 1:1) as a white solid, mp 203–205 °C. $[\alpha]_D^{22} + 2$ (c 0.28, CHCl₃); λ_{\max} 264 nm (ϵ 14496); ¹H NMR (CDCl₃): δ 7.94–7.51 (m, 7H, Bz, H5 and H-6), 6.40 (d, 1H, J_{1',2'} = 9.6 Hz, H-1'), 5.17 (dd, 1H, J_{2',3'} = 5.2 Hz, H-2'), 5.01 (dd, 1H, J_{3',4'} = 5.0 Hz, J_{4',5'} = 9.9 Hz, H-4'), 4.41–4.24 (m, 3H, H-6a', H-6b', H-5'), 4.06 (t, 1H, H-3'), 2.19, 2.14, 2.11 (3s, 9H, 3OAc); Anal. Calcd for C₂₄H₂₄N₄O₉: C, 56.25; H, 4.72; N, 10.93. Found: C, 56.64; H, 4.69; N, 10.68; ESI-MS (*m/z*) 513.48 (M + H⁺).

4.5.8. Synthesis of 1-(3'-C-cyano-3'-deoxy-β-D-allopyranosyl)cytosine (**12d**)

Cytosine derivative **12d** was synthesized from **11d** by the similar procedure as described for **12a**. The residue was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1) to afford pure **12d** (33 mg, 55%, Rf = 0.25 in CH₂Cl₂/MeOH, 7:3) as an orange foam. $[\alpha]_D^{22} - 6$ (c 0.50, CD₃OD); λ_{\max} 266 nm (ϵ 12306); ¹H NMR (CD₃OD): δ 7.68 (d, 1H, J_{5,6} = 7.5 Hz, H-6), 5.97 (d, 1H, J_{1',2'} = 9.0 Hz, H-1'), 5.97 (d, 1H, H-5), 4.13–3.74 (m, 6H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6a', H-6b'); ¹³C NMR (CD₃OD): δ 165.79, 155.73, 143.46, 118.86, 96.37, 94.96, 84.01, 67.38, 63.71, 61.32, 27.83; IR (Nujol, cm⁻¹): 2235 (CN); Anal. Calcd for C₁₁H₁₄N₄O₅: C, 46.81; H, 5.00; N, 19.85. Found: C, 46.56; H, 4.78; N, 19.41; ESI-MS (*m/z*) 283.28 (M + H⁺).

4.5.9. Antiviral and cytostatic assays

The antiviral assays [except anti-human immunodeficiency virus (HIV) assays] were based on inhibition of virus-induced cytopathicity in HEL [herpes simplex virus type 1 (HSV-1), HSV-2 (G), vaccinia virus, and vesicular stomatitis virus], Vero (parainfluenza-3, reovirus-1, Coxsackie B4, and Punta Toro virus), HeLa (vesicular stomatitis virus, Coxsackie virus B4, and respiratory syncytial virus), MDCK (influenza A (H1N1; H3N2) and B virus) and CrFK (feline corona virus (FIPV) and feline herpes virus) cell cultures. Confluent cell cultures in microtiter 96-well plates were inoculated with 100 cell culture inhibitory dose-50 (CCID₅₀) of virus (1 CCID₅₀ being the virus dose to infect 50% of the cell cultures) in the presence of varying concentrations (5,000, 1,000, 200 ... nM) of the test compounds. Viral cytopathicity was recorded as soon as it reached completion in the control virus-infected cell cultures that were not treated with the test compounds.

The anti-HIV activity and anti-proliferative activity were evaluated against HIV-1 strain IIIB and HIV-2 strain ROD in human T-lymphocyte CEM cell cultures. Briefly, virus stocks were titrated in CEM cells and expressed as the 50% cell culture infective dose (CCID₅₀). CEM cells were suspended in culture medium at $\sim 3 \times 10^5$ cells/ml and infected with HIV at ~ 100 CCID₅₀. Immediately after viral exposure, 100 μ l of the cell suspension was placed in each well of a flat-bottomed microtiter tray containing various concentrations of the test compounds. After a 4-day incubation period at 37 °C, the giant cell formation was microscopically determined. Compounds were tested in parallel for cytostatic effects in uninfected CEM cells.

Acknowledgements

This work was supported in part by the Postgraduate Programmes "Biotechnology-Quality assessment in Nutrition and the Environment", "Application of Molecular Biology-Molecular Genetics-Molecular Markers", Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly and the Concerted Actions of the K.U.Leuven (GOA no. 10/14). The authors thank Lizette van Berckelaer, Leentje Persoons, Leen Ingels, Frieda De Meyer and Ria Van Berwaer for excellent technical assistance.

References

- [1] W. Zhou, G. Gumina, Y. Chong, J. Wang, R.F. Shinazi, C.K. Chu, *J. Med. Chem.* 47 (2004) 3399–3408.
- [2] R.K. Robins, G.D. Kini, in: D.E.V. Wilman (Ed.), *The Chemistry of Antitumor Agents*, Chapman and Hall, New York, 1990, pp. 299–321.
- [3] M. MacCoss, M.J. Robins, in: D.E.V. Wilman (Ed.), *The Chemistry of Antitumor Agents*, Chapman and Hall, New York, 1990, pp. 261–298.
- [4] D. Komiotis, S. Manta, E. Tsoukala, N. Tzioumaki, *Curr. Med. Chem. Anti-Infect. Agents* 7 (2008) 219–244.
- [5] C.M. Galmarini, J.R. Mackey, C. Dumontet, *Lancet Oncol.* 3 (2002) 415–424.
- [6] E. De Clercq, *Biochim. Biophys. Acta* 1587 (2002) 258–275.
- [7] R.C. Brady, D.I. Bernstein, *Antivir. Res.* 61 (2004) 73–81.
- [8] K. Takenuki, A. Matsuda, T. Ueda, T. Sasaki, A. Fujii, K. Yamagami, *J. Med. Chem.* 31 (1988) 1063–1064.
- [9] J.R. McCarthy, D.P. Matthews, D.M. Stemerick, E.W. Huber, P. Bey, B.J. Lippert, R.D. Snyder, P.S. Sunkara, *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991) 7439–7440.
- [10] H. Hattori, M. Tanaka, M. Fukushima, T. Sasaki, A. Matsuda, *J. Med. Chem.* 39 (1996) 5005–5011.
- [11] H. Hayakawa, S. Kohgo, K. Kitano, N. Ashida, E. Kodama, H. Mitsuya, H. Ohru, *Antiviral. Chem. Chemother.* 15 (2004) 169–187.
- [12] M.J. Camarasa, A. Diaz-Ortiz, A. Calvo-Mateo, F.G. De las Heras, J. Balzarini, E. De Clercq, *J. Med. Chem.* 32 (1989) 1732–1738.
- [13] C. O-Yang, H.Y. Wu, E.B. Fraser-Smith, K.A.M. Walker, *Tetrahedron Lett.* 33 (1992) 37–40.
- [14] W. Zhu, G. Gumina, R.F. Schinazi, C.K. Chu, *Tetrahedron* 59 (2003) 6423–6431.
- [15] A. Matsuda, Y. Nakajima, A. Azuma, M. Tanaka, T. Sasaki, *J. Med. Chem.* 34 (1991) 2917–2919.
- [16] A. Azuma, Y. Nakajima, N. Nishizono, N. Minakawa, M. Suzuki, K. Hanaoka, T. Kobayashi, M. Tanaka, T. Sasaki, A. Matsuda, *J. Med. Chem.* 36 (1993) 4183–4189.
- [17] A. Azuma, P. Huang, A. Matsuda, W. Plunkett, *Mol. Pharmacol.* 59 (2001) 725–731.
- [18] I. Verheggen, A. Van Aerschot, L. Van Meervelt, J. Rozenski, L. Wiebe, R. Snoeck, G. Andrei, J. Balzarini, P. Claes, E. De Clercq, P. Herdewijn, *J. Med. Chem.* 38 (1995) 826–835.
- [19] T. Ostrowski, B. Wroblowski, R. Busson, J. Rozenski, E. De Clercq, M.S. Bennet, J.N. Champness, W.C. Summers, M.R. Sanderson, P. Herdewijn, *J. Med. Chem.* 41 (1998) 4343–4353.
- [20] Y. Maurinsh, J. Schraml, H. De Winter, N. Blaton, O. Peeters, E. Lescrier, J. Rozenski, A. Van Aerschot, E. De Clercq, R. Busson, P. Herdewijn, *J. Org. Chem.* 62 (1997) 2861–2871.
- [21] C. Spanou, S. Manta, D. Komiotis, A. Dervishi, D. Kouretas, *Int. J. Mol. Sci.* 8 (2007) 695–704.
- [22] A. Haouz, V. Vanheusden, H. Munier-Lechman, M. Froeyen, P. Herdewijn, S. Van Calenbergh, M. Delarue, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 4963–4971.
- [23] K. Vastmans, S. Pochet, A. Peys, L. Kerremans, A. Van Aerschot, C. Hendrix, P. Marliere, P. Herdewijn, *Biochemistry* 39 (2000) 12757–12765.
- [24] K. Vastmans, M. Froeyen, L. Kerremans, S. Pochet, P. Herdewijn, *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) 3154–3163.
- [25] S. Manta, G. Agelis, T. Botić, A. Cencić, D. Komiotis, *Bioorg. Med. Chem.* 15 (2007) 980–987.
- [26] S. Manta, G. Agelis, T. Botić, A. Cencić, D. Komiotis, *Eur. J. Med. Chem.* 43 (2008) 420–428.
- [27] S. Manta, E. Tsoukala, N. Tzioumaki, A. Goropevsek, R.T. Pamulapati, A. Cencić, D. Komiotis, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 2696–2704.
- [28] S. Manta, N. Tzioumaki, E. Tsoukala, A. Panagiotopoulou, M. Pelecanou, J. Balzarini, D. Komiotis, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 4764–4771.
- [29] E. Tsoukala, N. Tzioumaki, S. Manta, A. Riga, J. Balzarini, D. Komiotis, *Bioorg. Chem.* 38 (2010) 285–293.
- [30] N.A.A. Balatsos, D. Vlachakis, P. Maragozidis, S. Manta, D. Anastasakis, A. Kyritsis, M. Vlasi, D. Komiotis, C. Stathopoulos, *Biochemistry* 48 (2009) 6044–6051.
- [31] V.G. Tsirkone, E. Tsoukala, C. Lamprakis, S. Manta, J.M. Hayes, V.T. Skamnaki, C. Drakou, S.E. Zographos, D. Komiotis, D.D. Leonidas, *Bioorg. Med. Chem.* 18 (2010) 3423–3425.
- [32] J. Elhalabi, K.G. Rice, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 23 (2004) 195–205.
- [33] J.M. Bourgeois, *Helv. Chim. Acta* 58 (1975) 363–372.
- [34] J.A. Rosenthal, B.L. Cliff, *Can. J. Chem.* 54 (1976) 543–547.
- [35] H. Vorbruggen, G. Hofle, *Chem. Ber* 114 (1981) 1256–1268.
- [36] V. Vanheusden, R. Busson, P. Herdewijn, S. Van Calenbergh, *J. Org. Chem.* 69 (2004) 4446–4453.



Note

Stereocontrolled synthesis of 4'-C-cyano and 4'-C-cyano-4'-deoxy pyrimidine pyranonucleosides as potential chemotherapeutic agents

Christos Kiritsis^a, Stella Manta^a, Vanessa Parmenopoulou^a, Athina Dimopoulou^a, Nikolaos Kollatos^a, Ioannis Papatirou^b, Jan Balzarini^c, Dimitri Komiotis^{a,*}

^a Department of Biochemistry and Biotechnology, Laboratory of Bio-Organic Chemistry, University of Thessaly, 26 Ploutonos Str., 41221 Larissa, Greece

^b Research Genetic Cancer Center (R.G.C.C. Ltd.), Megalou Alexandrou 155 str., GR-53070 Filotas, Greece

^c Rega Institute for Medical Research, KU Leuven, B-3000 Leuven, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 September 2012

Received in revised form 15 October 2012

Accepted 16 October 2012

Available online 24 October 2012

Keywords:

C-Cyano pyranonucleosides

Stereocontrolled synthesis

Cytotoxicity

5-Fluorouracil

ABSTRACT

A new series of 4'-C-cyano and 4'-C-cyano-4'-deoxy pyrimidine pyranonucleosides has been designed and synthesized. Commercially available 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetyl- α -D-mannopyranose (**1**) was condensed with silylated 5-fluorouracil, uracil, and thymine, respectively to afford after deacetylation 1-(α -D-mannopyranosyl)nucleosides (**2a–c**). Subjecting **2a–c** to the sequence of specific acetalation, selective protection of the primary hydroxyl group and oxidation, the 4'-ketonucleosides **6a–c** and **7c** were obtained. Reaction of compounds **6a,b**, and **7c** with sodium cyanide and subsequent deprotection gave the target 1-(4'-C-cyano- α -D-mannopyranosyl)nucleosides **12a–c**. Deoxygenation at the 4'-position of cyanohydrins **8a,b**, and **11c** followed by deprotection led to the desired 1-(4'-C-cyano-4'-deoxy- α -D-talopyranosyl)nucleosides (**15a–c**). The newly synthesized compounds were evaluated for their potential antiviral and cytostatic activities in cell culture.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Nucleoside chemistry represents an important research area for drug discovery, as many nucleoside analogues are prominent drugs and have been widely applied to cancer and viral chemotherapy.^{1–5} Extensive modifications have been performed on both the heterocyclic base and the sugar moiety in the search for effective and selective derivatives with a therapeutic profile.

Considering that glycosidic bond cleavage is a frequently encountered degradative pathway of nucleosides,⁶ special attention has been drawn to six-membered nucleosides, which showed resistance to hydrolysis⁷ and exhibited antiviral,^{8,9} antibiotic,¹⁰ antioxidant,^{11,12} and antitumor³ properties. The introduction of fluoro, keto,^{13–18} exomethylene,^{19–21} ethynyl,²² azido, and amino²³ groups to pyranonucleosides has led to novel scaffolds endowed with interesting biological activities. Experimental data also suggested, that human poly(A)-specific ribonuclease²⁴ and glycogen phosphorylase^{25–28} are among the molecular targets of several of these compounds, while it was revealed that 5-fluorouracil nucleoside analogues likely represent novel prodrugs of 5-fluorouracil targeting thymidylate synthase.²⁹

In the field of modified nucleosides, considerable interest has been drawn in the synthesis of cyano-substituted nucleosides and their analogues, with the cyano group incorporated either on the base moiety or on the sugar part frequently leading to a drastic

change in biological activity and stability.^{30,31} A number of cyano ribofuranoses have demonstrated substantial antiviral^{32–34} and anticancer properties,^{31,35} while their promising therapeutic potential has been partly attributed to the small size and high electronegativity of the cyano group.

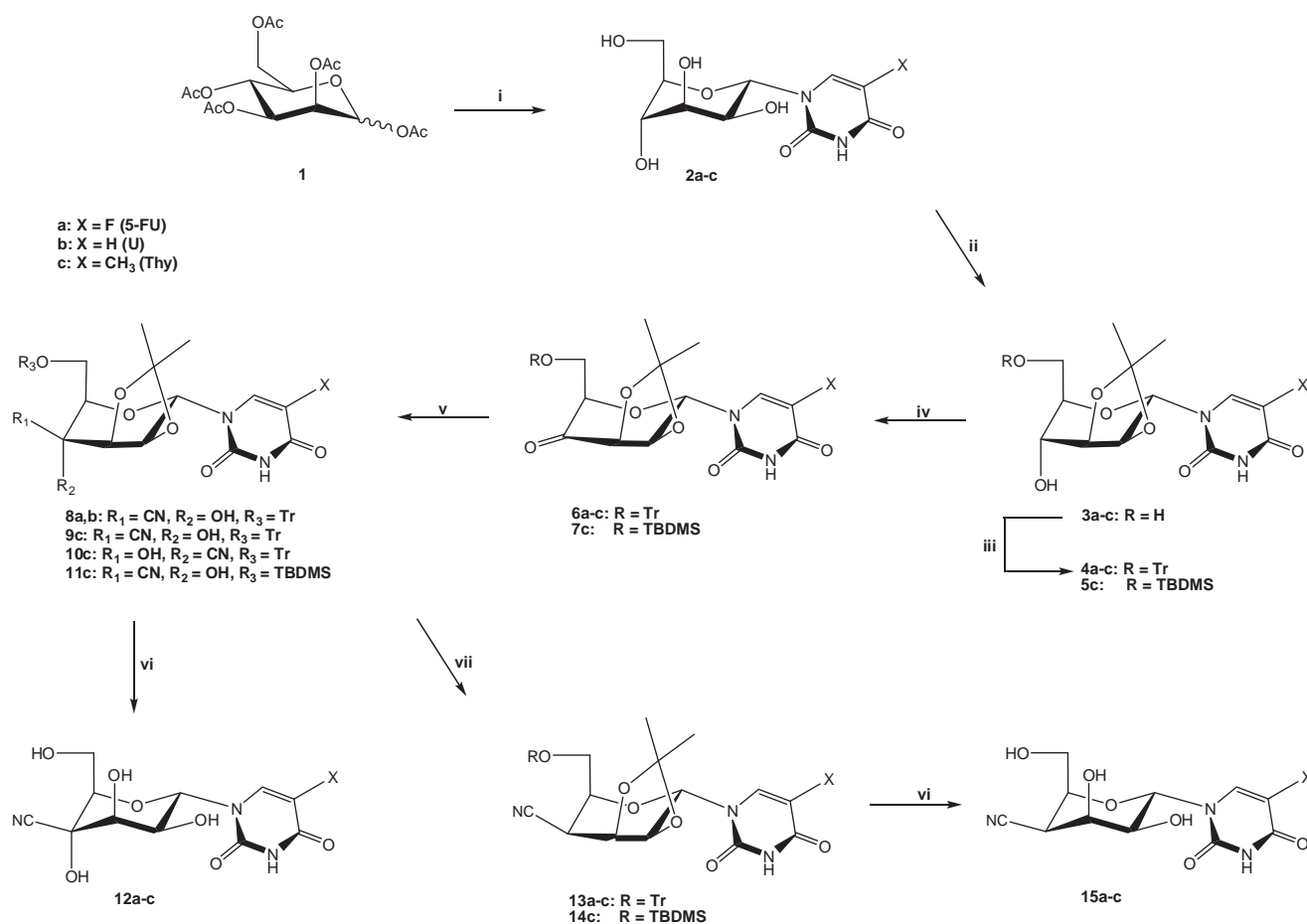
Taking into consideration our recent findings on 3'-C-cyano and 3'-deoxy-C-cyano pyranonucleosides as cytotoxic agents³⁶ and based on the fact that various 4'-C substituted nucleosides,^{37,38} such as 4'-cyano-thymidine,³¹ exhibit very potent anti-HIV and/or antitumor activity,³⁹ it was envisaged that the transposition of nitrile from C-3' to C-4' could also result in nucleosides of significant biological interest. Thus, we report herein the stereocontrolled synthesis of a novel series of branched-chain C-cyano pyrimidine pyranonucleosides, 4'-C-cyano- α -D-mannopyranonucleosides (**12a–c**), and 4'-C-cyano-4'-deoxy- α -D-talopyranonucleosides (**15a–c**), containing 5-fluorouracil, uracil, and thymine as base moieties. The synthesis and biological assessment of these compounds are presented herein.

Retrosynthetic analysis suggested that the 4'-C-cyano nucleosides could be obtained from the corresponding 4'-keto nucleosides by a nucleophilic addition reaction. The synthesis of the keto pyranonucleosides **6a–c** and **7c**, as key intermediates is outlined in Scheme 1.

The α -pyranonucleosides of 5-fluorouracil **2a**,⁴⁰ uracil **2b**,²⁰ and thymine **2c** (Scheme 1), were readily prepared by condensing peracetylated mannose (**1**) with the proper silylated base followed by subsequent deacetylation. The ¹H NMR spectra of **2a–c** showed a

* Corresponding author. Tel.: +30 2410 565285; fax: +30 2410 565290.

E-mail address: dkom@bio.uth.gr (D. Komiotis).



Scheme 1. Reagents and conditions: (i) silylated base, CH₃CN, Me₃SiOSO₂CF₃; methanolic ammonia; (ii) acetone, 2,2-dimethoxypropane, *p*-toluenesulfonic acid, water; (iii) TrCl or TBDMS, pyridine, DMAP; (iv) PDC, Ac₂O, dry CH₂Cl₂; (v) (a) (R = Tr) H₂O, Et₂O, NaHCO₃, NaCN, (b) (R = TBDMS) H₂O, Et₂O, NaCN; (vi) TFA 90% in MeOH; (vii) phenyl chlorothionoformate, Et₃N, DMAP, CH₃CN, 0 °C; Bu₃SnH, AIBN, toluene, 100 °C.

large coupling between protons H-1' and H-2', indicating an axial orientation of both protons and an equatorially oriented base ring. Subjecting **2a–c** to the sequence of specific acetalation, selective tritylation of the primary hydroxyl group and oxidation,²⁰ the desired 4'-ketonucleosides **6** were obtained. The ¹H NMR spectra of **6a–c** revealed the presence of H-3' at δ 4.74–4.65 as a doublet, due to coupling with H-2', confirming thus the absence of proton at C-4'.

Treatment of ketonucleosides **6a,b** with sodium cyanide (NaCN) and sodium bicarbonate (NaHCO₃) in a two-phase ethyl ether (Et₂O)/water (H₂O) system,³² favoured the equatorial approach of CN[−] affording the cyanohydrins **8a,b** as the only stable products. Their stability may be related to the trans diaxially oriented two oxygen atoms attached to C-3' and C-4'. The structure of these compounds was assigned on the basis of NOE experiments. Thus, the mutual NOE enhancements observed between the free OH group of cyanohydrin **8a** with both H-3' and H-5' show that these protons are on the same side of the plane (Fig. 1). Interestingly, the same reaction of CN[−] on thymine nucleoside **6c** resulted in an inseparable ca. 1:1 mixture of two 4'-epimers **9c** and **10c**, while changes in solvent, pH, or temperature had no significant effect on the epimers' ratio. In an effort to improve the stereoselectivity, we also examined the influence of the 6'-protective group on the steric course of the reaction. Thus, treatment of thymine analogue **3c** with *t*-butyldimethylsilyl chloride (TBDMSCl)¹⁹ followed by oxidation, furnished 4'-keto analogue **7c**, which upon reaction with NaCN in aqueous ether³⁵ gave the single manno cyanohydrin

11c. It seems that the presence of the TBDMS group on C-6' facilitated the equatorial orientation of the C-4' cyano group, possibly due to steric effects. NOE data confirmed this stereochemical trend since the free OH group of **11c** exhibited positive NOEs with the nearby protons H-3' and H-5', suggesting their close proximity. Finally, full deprotection of **8a,b**, and **11c**, using trifluoroacetic acid (TFA) gave the desired nucleosides **12a–c**.

With the stereochemistry of the newly synthesized cyanohydrins secure, we turned our attention to the synthesis of their 4'-deoxy derivatives **15a–c** (Scheme 1). Phenoxythiocarbonylation of **8a,b**, and **11c** under commonly used conditions, phenyl chlorothionoformate, 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP), and triethylamine (Et₃N) in CH₃CN,³⁵ followed by reaction with Bu₃SnH in the presence of 2,2'-azobis(isobutyronitrile) (AIBN), gave stereospecifically, the 4'-deoxy derivatives **13a,b**, and **14c**. Interestingly, radical deoxygenation of the epimers **9c** and **10c** also proceeded stereospecifically to furnish thymine derivative **13c**, as the only product. The stereochemistry of C-4' of the deoxygenated compounds was determined by NOE measurements. Irradiation of H-4' of compound **13b**, chosen as model molecule, produced strong enhancements for the H-3' (12%) and H-5' (12%); conversely, when H-3' and H-5' was irradiated, a positive NOE effect was observed for H-4' (10% and 13%, respectively) (Fig. 1). These data suggest that all of these protons are in the same face of the pyranose ring, concluding that the hydrogen atom enters from the less hindered, α-face of the planar radical intermediate, opposite to the bulky 2',3'-O-isopropylidene group. Finally, compounds **13a,b**, and **13c**

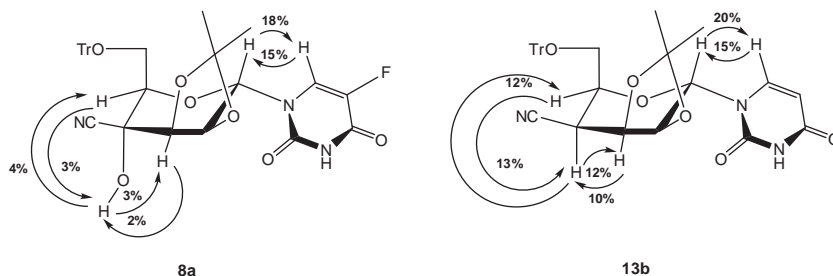


Figure 1. Selected NOEs observed for compounds **8a** and **13b**.

or **14c** were converted to the fully unprotected derivatives **15a–c**, respectively, by treatment with TFA 90% in MeOH.

The target nucleosides **12a–c** and **15a–c** were tested for their inhibitory effects on the proliferation of murine leukemia cells (L1210), human T-lymphocyte cells (CEM) and human cervix carcinoma cells (HeLa). The uracil (**12b**, **15b**) and thymine (**12c**, **15c**) 4'-CN(4'-deoxy) derivatives hardly inhibit tumor cell proliferation. Their IC_{50} s were invariably around or above 200 μ M. Instead, the 5-fluorouracil 4'-CN(4'-deoxy) nucleoside derivatives **12a** and **15a** were endowed with a much more pronounced antiproliferative effect. In fact, they inhibited L1210 and HeLa tumor cell proliferation at IC_{50} s that ranged between 2.6 and 4.1 μ M. They were somewhat less inhibitory against CEM cell proliferation. The cytostatic profile of the new compounds **12a** and **15a** closely parallels that of 5-fluorouracil. When evaluated against thymidine kinase-deficient L1210 and HeLa tumor cell lines, the compounds fully kept their cytostatic activity (Table 1). These findings strongly suggest that the cytostatic activity of the 5-fluorouracil derivatives does not require TK-dependent phosphorylation (like 5-fluoro-2'-deoxyuridine) and thus most likely function as prodrugs of 5-fluorouracil that need to be converted first to the free 5-fluorouracil base prior to further metabolic activation. In this respect both 4'-C-cyano- and 4'-C-cyano-4'-deoxy pyrimidine pyranonucleoside analogues behave similarly as the earlier described 3'-C-cyano- and 3'-C-cyano-3'-deoxy pyrimidine pyranonucleoside analogues of 5-fluorouracil.³⁶ None of the compounds showed antiviral activity in cell culture. It is currently unclear how 5-fluorouracil is released from the pyranonucleoside derivatives and what the kinetics of 5-FU release in the intact cell cultures or in an in vivo environment are. Although it can be argued that administration of 5-FU itself might be the most efficient modality for susceptible cancer drug treatment, it cannot be excluded that 5-FU derivatives of the 3'- or 4'-C-cyano(deoxy)pyrimidine pyranonucleosides might have eventual advantages in efficacy or therapeutic window by potentially altered delivery characteristics of these compounds versus the free 5-FU parent drug. In vivo studies in animal models may further address this issue.

In conclusion, we present herein a stereocontrolled synthesis of a new series of 4'-C-cyano and 4'-C-cyano-4'-deoxy pyrimidine pyranonucleosides, which involves simple protection–deprotection sequences on suitable intermediates. These results allow access to 4'-C branched chain nucleoside analogues, in a highly predictable and efficient manner. The target nucleosides were evaluated for their antiviral and cytostatic activity. Although the synthesized compounds were devoid of a significant antiviral potential, the 5-fluorouracil 4'-CN(4'-deoxy) nucleoside derivatives **12a** and **15a** showed a similar cytostatic activity spectrum as the free base 5-fluorouracil.

1. Experimental

1.1. General procedure

Melting points were recorded in a Mel-Temp apparatus and are uncorrected. Thin layer chromatography (TLC) was performed on Merck precoated 60F₂₅₄ plates. Reactions were monitored by TLC on silica gel, with detection by UV light (254 nm) or by charring with sulfuric acid. Flash chromatography was performed using silica gel (240–400 mesh, Merck). ¹H NMR spectra were recorded at 300 MHz on a Bruker AVANCE^{III} 300 spectrometer and ¹³C NMR spectra at 75.5 MHz on the same spectrometer, using chloroform-*d* (CDCl₃), methanol-*d*₄ (CD₃OD). Chemical shifts are reported in parts per million (δ) downfield from tetramethylsilane (TMS) as internal standard.

UV–Vis spectra were recorded on a PG T70 UV–VIS spectrometer and mass spectra were obtained on a Thermo Quest Finnigan AQA Mass Spectrometer (electrospray ionization). Optical rotations were measured using an Autopol I polarimeter. Infrared spectra were obtained with a Thermo Scientific Nicolet IR100 FT-IR spectrometer. All reactions were carried out in dry solvents. Dichloromethane (CH₂Cl₂) was distilled from phosphorus pentoxide and stored over 4 Å molecular sieves. Acetonitrile and toluene were distilled from calcium hydride and stored over 3 Å molecular sieves. Pyridine was stored over potassium hydroxide pellets. All

Table 1
Cytostatic activity of **12a–c** and **15a–c** against a panel of tumor cell lines

Compound	IC_{50}^a (μ M)				
	L1210	CEM	HeLa	L1210/TK ⁻	HeLa TK ⁻
12a	3.0 ± 0.9	57 ± 7	3.2 ± 0.0	2.6 ± 0.7	0.81 ± 0.10
12b	>500	>500	494 ± 8	>500	>500
12c	>500	>500	433 ± 94	>500	≥ 500
15a	4.1 ± 0.6	18 ± 6	2.6 ± 0.9	4.6 ± 1.5	0.49 ± 0.02
15b	210 ± 16	221 ± 8	195 ± 21	227 ± 6	205 ± 8
15c	262 ± 12	332 ± 64	188 ± 4	266 ± 17	214 ± 18
5-Fluorouracil	0.38 ± 0.17	18 ± 5	0.54 ± 0.12	0.32 ± 0.31	0.23 ± 0.01
5-Fluoro-dUrd	0.0011 ± 0.0002	0.022 ± 0.006	0.050 ± 0.011	3.0 ± 0.1	1.4 ± 0.4

^a 50% inhibitory concentration or compound concentration required to inhibit tumoral proliferation by 50%.

reactions sensitive to oxygen or moisture were carried out under nitrogen atmosphere using oven-dried glassware.

1.2. Synthesis of 1-(4'-C-cyano- α -D-mannopyranosyl)5-fluorouracil (**12a**)

1.2.1. 1-(2',3'-O-Isopropylidene- α -D-mannopyranosyl)5-fluorouracil (**3a**)

To a stirred suspension of **2a**⁴⁰ (2.50 g, 8.6 mmol) in anhydrous acetone (17.0 mL) and 2,2-dimethoxypropane (17.0 mL) was added *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.34 g, 1.8 mmol). After 50 min, water (34.0 mL) was added and the reaction mixture was stirred for 16 h. The resulting solution was neutralized with saturated sodium bicarbonate so that pH did not exceed 7, concentrated and the residue was purified by flash chromatography (9:1 CH₂Cl₂–MeOH, *R_f* 0.37) to give 2.22 g (78%) of compound **3a** as a white solid, mp 200–202 °C: $[\alpha]_D^{22} +2$ (c 0.5, MeOH); UV (MeOH): λ_{\max} 262 nm (ϵ 11,076); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 7.47 (d, 1H, *J*_{5,6} = 5.9 Hz, H-6), 5.70 (d, 1H, *J*_{1',2'} = 7.8 Hz, H-1'), 4.51–4.41 (m, 2H, H-2', H-3'), 4.15 (t, 1H, *J*_{3',4'} = *J*_{4',5'} = 7.1 Hz, H-4'), 3.89–3.75 (m, 3H, H-5', H-6a', H-6b'), 1.53, 1.39 (2s, 6H, 2CH₃). Anal. Calcd for C₁₃H₁₇FN₂O₇: C, 46.99; H, 5.16; N, 8.43. Found: C, 46.90; H, 5.29; N, 8.66. ESIMS *m/z* 333.29 [M+H⁺].

1.2.2. 1-(2',3'-O-Isopropylidene-6'-O-trityl- α -D-mannopyranosyl)5-fluorouracil (**4a**)

To a solution of **3a** (2.22 g, 6.7 mmol) in pyridine (34.0 mL) were added triphenylmethyl chloride (2.43 g, 8.7 mmol) and a catalytic amount of 4-dimethylaminopyridine. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. After being quenched with MeOH and concentrated, the residue was purified by flash chromatography (1:1 hexane–EtOAc, *R_f* 0.37) to give 2.69 g (70%) of compound **4a** as a colorless oil: $[\alpha]_D^{22} +10$ (c 0.8, CHCl₃); UV (CHCl₃): λ_{\max} 265 nm (ϵ 1048); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.42 (br s, 1H, NH), 7.43–7.21 (m, 16H, 3C₆H₅, H-6), 5.77 (d, 1H, *J*_{1',2'} = 5.4 Hz, H-1'), 4.41–4.35 (m, 2H, H-2', H-3'), 4.22 (t, 1H, *J*_{3',4'} = *J*_{4',5'} = 7.0 Hz, H-4'), 3.87–3.79 (m, 1H, H-5'), 3.58–3.53 (m, 2H, H-6a', H-6b'), 1.50, 1.37 (2s, 6H, 2CH₃). Anal. Calcd for C₃₂H₃₁FN₂O₇: C, 66.89; H, 5.44; N, 4.88. Found: C, 66.98; H, 5.27; N, 4.81. ESIMS *m/z* 575.59 [M+H⁺].

1.2.3. 1-(2',3'-O-Isopropylidene-6'-O-trityl- α -D-lyxo-hexopyranosyl-4-ulose)5-fluorouracil (**6a**)

A mixture of **4a** (2.69 g, 4.7 mmol), PDC (2.10 g, 5.6 mmol), and Ac₂O (1.3 mL, 13.9 mmol) was stirred in dry CH₂Cl₂ (47.0 mL) for 5 h, under nitrogen at room temperature. Purification by flash chromatography (1:1 hexane–EtOAc, *R_f* 0.51) yielded 1.82 g (68%) of compound **6a** as a white foam: $[\alpha]_D^{22} -4$ (c 0.2, CHCl₃); UV (CHCl₃): λ_{\max} 265 nm (ϵ 10,487); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.47 (br s, 1H, NH), 7.47–7.24 (m, 16H, 3C₆H₅, H-6), 5.73 (d, 1H, *J*_{1',2'} = 4.7 Hz, H-1'), 4.92 (dd, 1H, *J*_{2',3'} = 7.5 Hz, H-2'), 4.74 (d, 1H, H-3'), 4.24 (dd, 1H, *J*_{5',6a'} = 2.7 Hz, *J*_{5',6b'} = 5.3 Hz, H-5'), 3.77 (dd, 1H, *J*_{6a',6b'} = 10.6 Hz, H-6a'), 3.49 (dd, 1H, H-6b'), 1.57, 1.43 (2s, 6H, 2CH₃). Anal. Calcd for C₃₂H₂₉FN₂O₇: C, 67.12; H, 5.11; N, 4.89. Found: C, 66.99; H, 5.22; N, 4.84. ESIMS *m/z* 573.60 [M+H⁺].

1.2.4. 1-(4'-C-Cyano-2',3'-O-isopropylidene-6'-O-trityl- α -D-mannopyranosyl)5-fluorouracil (**8a**)

A mixture of **6a** (1.82 g, 3.2 mmol), H₂O (25.0 mL), Et₂O (50.0 mL), NaHCO₃ (0.54 g, 6.4 mmol) and NaCN (0.16 g, 3.2 mmol) was stirred vigorously at room temperature for 72 h. The organic phase was separated, and the aqueous phase was washed with Et₂O. The combined ether phases were dried over Na₂SO₄, filtered, and evaporated to dryness. The residue was purified by flash chromatography (9.6:0.4 CH₂Cl₂–MeOH, *R_f* 0.49) to give 1.18 g (62%) of

compound **8a** as a colorless oil: $[\alpha]_D^{22} -18$ (c 1.3, CHCl₃); UV (CHCl₃): λ_{\max} 262 nm (ϵ 9356); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.96 (br s, 1H, NH), 7.43–7.28 (m, 16H, 3C₆H₅, H-6), 5.38 (d, 1H, *J*_{1',2'} = 2.7 Hz, H-1'), 4.83 (s, 1H, 4'-OH), 4.77 (dd, 1H, *J*_{2',3'} = 6.8 Hz, H-2'), 4.60 (d, 1H, H-3'), 3.89 (t, 1H, *J*_{5',6a'} = *J*_{5',6b'} = 6.5 Hz, H-5'), 3.78–3.67 (m, 2H, H-6a',b'), 1.67, 1.38 (2s, 6H, 2CH₃). Anal. Calcd for C₃₃H₃₀FN₃O₇: C, 66.10; H, 5.04; N, 7.01. Found: C, 66.29; H, 5.11; N, 7.23. ESIMS *m/z* 600.58 [M+H⁺].

1.2.5. 1-(4'-C-Cyano- α -D-mannopyranosyl)5-fluorouracil (**12a**)

Compound **8a** (0.59 g, 1.0 mmol) was dissolved in 4.5 mL of 90% TFA in MeOH. The solution was stirred for 10 min at room temperature and then concentrated under reduced pressure, in order to remove traces of TFA. The residue was purified by flash chromatography (9:1 CH₂Cl₂–MeOH, *R_f* 0.12) to give 0.24 g (77%) of compound **12a** as a white foam. $[\alpha]_D^{22} +6$ (c 0.2, MeOH); UV (MeOH): λ_{\max} 263 nm (ϵ 5380); IR (Nujol, cm⁻¹): 2235 (CN); ¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz): δ 7.74 (d, 1H, *J*_{5,6} = 6.5 Hz, H-6), 5.93 (d, 1H, *J*_{1',2'} = 9.5 Hz, H-1'), 4.30 (dd, 1H, *J*_{5',6a'} = 9.3 Hz, *J*_{6a',6b'} = 12.8 Hz, H-6a'), 4.13–3.91 (m, 3H, H-2', H-3', H-5'), 3.76 (dd, 1H, *J*_{5',6b'} = 2.6 Hz, H-6b'); ¹³C NMR (CD₃OD, 75.5 MHz): δ 158.6, 149.6, 141.7, 128.1, 118.5, 82.9, 73.1, 71.9, 68.4, 65.6, 59.1. Anal. Calcd for C₁₁H₁₂FN₃O₇: C, 41.65; H, 3.81; N, 13.25. Found: C, 41.87; H, 3.76; N, 13.32. ESIMS *m/z* 318.22 [M+H⁺].

1.3. Synthesis of 1-(4'-C-cyano- α -D-mannopyranosyl)uracil (**12b**)

1.3.1. 1-(4'-C-Cyano-2',3'-O-isopropylidene-6'-O-trityl- α -D-mannopyranosyl)uracil (**8b**)

Uracil derivative **8b** was synthesized from 1-(2',3'-O-isopropylidene-6'-O-trityl- α -D-lyxo-hexopyranosyl-4-ulose)uracil (**6b**)²⁰ by the similar procedure as described for **8a**. It was purified by flash chromatography (9.6:0.4 CH₂Cl₂–MeOH, *R_f* 0.22) to give 1.12 g (60%) of compound **8b** as a colorless oil: $[\alpha]_D^{22} -9$ (c 0.5, CHCl₃); UV (CHCl₃): λ_{\max} 261 nm (ϵ 6756); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 9.01 (br s, 1H, NH), 7.43–7.28 (m, 15H, 3C₆H₅), 7.19 (d, 1H, *J*_{5,6} = 8.1 Hz, H-6), 5.79 (d, 1H, H-5), 5.39 (d, 1H, *J*_{1',2'} = 2.0 Hz, H-1'), 4.87 (s, 1H, 4'-OH), 4.82 (dd, 1H, *J*_{2',3'} = 6.8 Hz, H-2'), 4.64 (d, 1H, H-3'), 3.96 (t, 1H, *J*_{5',6a'} = *J*_{5',6b'} = 6.5 Hz, H-5'), 3.70 (d, 2H, H-6a',b'), 1.68, 1.38 (2s, 6H, 2CH₃). Anal. Calcd for C₃₃H₃₁N₃O₇: C, 68.15; H, 5.37; N, 7.22. Found: C, 68.23; H, 5.19; N, 7.41. ESIMS *m/z* 582.64 [M+H⁺].

1.3.2. 1-(4'-C-Cyano- α -D-mannopyranosyl)uracil (**12b**)

Uracil derivative **12b** was synthesized from **8b** by the similar procedure as described for **12a**. It was purified by flash chromatography (9:1 CH₂Cl₂–MeOH, *R_f* 0.10) to give 0.20 g (70%) of compound **12b** as a white foam: $[\alpha]_D^{22} +74$ (c 0.9, MeOH); UV (MeOH): λ_{\max} 257 nm (ϵ 7149); IR (Nujol, cm⁻¹): 2240 (CN); ¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz): δ 7.57 (d, 1H, *J*_{5,6} = 8.1 Hz, H-6), 5.94 (d, 1H, *J*_{1',2'} = 9.6 Hz, H-1'), 5.65 (d, 1H, H-5), 4.31 (dd, 1H, *J*_{5',6a'} = 9.2 Hz, *J*_{6a',6b'} = 12.8 Hz, H-6a'), 4.04–3.94 (m, 3H, H-2', H-3', H-5'), 3.76 (dd, 1H, *J*_{5',6b'} = 2.7 Hz, H-6b'); ¹³C NMR (CD₃OD, 75.5 MHz): δ 162.7, 150.7, 140.2, 119.1, 103.1, 84.5, 73.6, 70.5, 67.8, 66.2, 59.2. Anal. Calcd for C₁₁H₁₃N₃O₇: C, 44.15; H, 4.38; N, 14.04. Found: C, 44.49; H, 4.56; N, 13.96. ESIMS *m/z* 300.22 [M+H⁺].

1.4. Synthesis of 1-(4'-C-cyano- α -D-mannopyranosyl)thymine (**12c**)

1.4.1. 1-(α -D-Mannopyranosyl)thymine (**2c**)

A mixture of thymine (2.66 g, 21.1 mmol), hexamethyldisilazane (HMDS) (5.5 mL, 26.2 mmol) and saccharine (0.18 g,

1.0 mmol) in dry CH₃CN (69.0 mL) was refluxed for 30 min. To this were added 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetyl- α -D-mannopyranose (**1**) (5.89 g, 15.1 mmol) and Me₃SiOSO₂CF₃ (2.5 mL, 21.1 mmol). The reaction mixture was refluxed at 110 °C for 1 h, cooled, neutralized with aqueous sodium bicarbonate, and extracted with CH₂Cl₂. The organic extract was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered, and evaporated to dryness. The residue was then treated with ammonia/MeOH (saturated at 0 °C, 840.0 mL). The solution was stirred overnight at room temperature and then was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (8:2 EtOAc–MeOH, *R_f* 0.14) to give 3.25 g (75%) of compound **2c** as a colorless oil: $[\alpha]_D^{22} +26$ (c 0.7, MeOH); UV (MeOH): λ_{\max} 262 nm (ϵ 11,504); ¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz): δ 7.64 (s, 1H, H-6), 6.00 (d, 1H, *J*_{1',2'} = 9.1 Hz, H-1'), 4.15 (dd, 1H, *J*_{5',6a'} = 8.5 Hz, *J*_{6a',6b'} = 11.9 Hz, H-6a'), 4.08–3.97 (m, 3H, H-2', H-3', H-5'), 3.83 (d, 1H, *J*_{3',4'} = 1.9 Hz, H-4'), 3.68 (dd, 1H, *J*_{5',6b'} = 4.2 Hz, H-6b'), 1.93 (1s, 3H, 5-CH₃). Anal. Calcd for C₁₁H₁₆N₂O₇: C, 45.83; H, 5.59; N, 9.72. Found: C, 45.71; H, 5.33; N, 10.01. ESIMS *m/z* 289.27 [M+H⁺].

1.4.2. 1-(2',3'-*O*-Isopropylidene- α -D-mannopyranosyl)thymine (**3c**)

Thymine derivative **3c** was synthesized from **2c** by the similar procedure as described for **3a**. It was purified by flash chromatography (9:1 CH₂Cl₂–MeOH, *R_f* 0.37) to give 3.04 g (82%) of compound **3c** as a white solid, mp 150–152 °C: $[\alpha]_D^{22} +16$ (c 0.2, MeOH); UV (MeOH): λ_{\max} 263 nm (ϵ 7308); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 7.18 (s, 1H, H-6), 5.64 (d, 1H, *J*_{1',2'} = 7.3 Hz, H-1'), 4.46–4.37 (m, 2H, H-2', H-3'), 4.02 (dd, 1H, *J*_{3',4'} = 8.8 Hz, *J*_{4',5'} = 6.3 Hz, H-4'), 3.80–3.65 (m, 3H, H-5', H-6a', H-6b'), 1.86 (1s, 3H, 5-CH₃), 1.44, 1.31 (2s, 6H, 2CH₃). Anal. Calcd for C₁₄H₂₀N₂O₇: C, 51.22; H, 6.14; N, 8.53. Found: C, 51.38; H, 6.24; N, 8.67. ESIMS *m/z* 329.33 [M+H⁺].

1.4.3. 1-(2',3'-*O*-Isopropylidene-6'-*O*-trityl- α -D-mannopyranosyl)thymine (**4c**)

Thymine derivative **4c** was synthesized from **3c** by the similar procedure as described for **4a**. It was purified by flash chromatography (1:1 hexane–EtOAc, *R_f* 0.21) to give 2.09 g (79%) of compound **4c** as a white foam: $[\alpha]_D^{22} +18$ (c 0.9, CHCl₃); UV (CHCl₃): λ_{\max} 265 nm (ϵ 9562); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.37 (br s, 1H, NH), 8.00 (s, 1H, H-6), 7.43–7.23 (m, 15H, 3C₆H₅), 5.71 (d, 1H, *J*_{1',2'} = 6.9 Hz, H-1'), 4.51–4.37 (m, 2H, H-2', H-3'), 4.11 (t, 1H, *J*_{3',4'} = *J*_{4',5'} = 8.5 Hz, H-4'), 3.86–3.80 (m, 1H, H-5'), 3.48–3.36 (m, 2H-6a', H-6b'), 1.93 (1s, 3H, 5-CH₃), 1.46, 1.33 (2s, 6H, 2CH₃). Anal. Calcd for C₃₃H₃₄N₂O₇: C, 69.46; H, 6.01; N, 4.91. Found: C, 69.24; H, 6.31; N, 5.11. ESIMS *m/z* 571.61 [M+H⁺].

1.4.4. 1-(6'-*O*-*t*-Butyldimethylsilyl-2',3'-*O*-isopropylidene- α -D-mannopyranosyl)thymine (**5c**)

To a stirred solution of **3c** (1.52 g, 4.6 mmol) in pyridine (23.0 mL) were added successively TBDMSCl (0.92 g, 6.1 mmol) and a catalytic amount of 4-dimethylaminopyridine. The reaction mixture was stirred for 30 min at 0 °C under nitrogen and then at room temperature for 5 h. After, the reaction mixture was quenched with MeOH and evaporated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography (1:1 hexane–EtOAc, *R_f* 0.21) to give 1.58 g (77%) of compound **5c** as a colorless oil: $[\alpha]_D^{22} -55$ (c 1.2, CHCl₃); UV (CHCl₃): λ_{\max} 266 nm (ϵ 9575); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.76 (br s, 1H, NH), 7.13 (s, 1H, H-6), 5.65 (d, 1H, *J*_{1',2'} = 5.7 Hz, H-1'), 4.52–4.44 (m, 2H, H-2', H-3'), 4.14 (t, 1H, *J*_{3',4'} = *J*_{4',5'} = 8.2 Hz, H-4'), 3.92–3.75 (m, 3H, H-5', H-6a', H-6b'), 1.94 (1s, 3H, 5-CH₃), 1.53, 1.37 (2s, 6H, 2CH₃), 0.89 (s, 9H, *t*-Bu), 0.07 (s, 6H, 2Si-CH₃). Anal. Calcd for C₂₀H₃₄N₂O₇:

Si, C, 54.28; H, 7.74; N, 6.33. Found: C, 54.07; H, 7.72; N, 6.22. ESIMS *m/z* 443.60 [M+H⁺].

1.4.5. 1-(2',3'-*O*-Isopropylidene-6'-*O*-trityl- α -D-lyxo-hexopyranosyl-4-ulo)thymine (**6c**)

Thymine derivative **6c** was synthesized from **4c** by the similar procedure as described for **6a**. It was purified by flash chromatography (1:1 hexane–EtOAc, *R_f* 0.34) to give 1.39 g (67%) of compound **6c** as a white foam: $[\alpha]_D^{22} -19$ (c 0.9, CHCl₃); UV (CHCl₃): λ_{\max} 265 nm (ϵ 9562); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.44 (br s, 1H, NH), 7.44–7.16 (m, 15H, 3C₆H₅), 7.04 (s, 1H, H-6), 5.58 (d, 1H, *J*_{1',2'} = 3.5 Hz, H-1'), 4.99 (dd, 1H, *J*_{2',3'} = 7.5 Hz, H-2'), 4.72 (d, 1H, H-3'), 4.16 (dd, 1H, *J*_{5',6a'} = 2.5 Hz, *J*_{5',6b'} = 5.5 Hz, H-5'), 3.71 (dd, 1H, *J*_{6a',6b'} = 10.5 Hz, H-6a'), 3.43 (dd, 1H, H-6b'), 1.91 (1s, 3H, 5-CH₃), 1.55, 1.39 (2s, 6H, 2CH₃). Anal. Calcd for C₃₃H₃₂N₂O₇: C, 69.70; H, 5.67; N, 4.93. Found: C, 69.22; H, 5.34; N, 5.06. ESIMS *m/z* 569.64 [M+H⁺].

1.4.6. 1-(6'-*O*-*t*-Butyldimethylsilyl-2',3'-*O*-isopropylidene- α -D-lyxo-hexopyranosyl-4-ulo)thymine (**7c**)

Thymine derivative **7c** was synthesized from **5c** by the similar procedure as described for **6a**. It was purified by flash chromatography (1:1 hexane–EtOAc, *R_f* 0.38) to give 1.04 g (66%) of compound **7c** as a colorless oil: $[\alpha]_D^{22} +4$ (c 0.6, CHCl₃); UV (CHCl₃): λ_{\max} 263 nm (ϵ 3533); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.38 (br s, 1H, NH), 7.13 (s, 1H, H-6), 5.71 (d, 1H, *J*_{1',2'} = 4.2 Hz, H-1'), 4.91 (dd, 1H, *J*_{2',3'} = 7.6 Hz, H-2'), 4.72 (d, 1H, H-3'), 4.24–4.22 (m, 1H, H-5'), 4.10 (dd, 1H, *J*_{5',6a'} = 5.2 Hz, *J*_{6a',6b'} = 11.3 Hz, H-6a'), 3.99 (dd, 1H, *J*_{5',6b'} = 2.6 Hz, H-6b'), 1.89 (1s, 3H, 5-CH₃), 1.55, 1.32 (2s, 6H, 2CH₃), 0.89 (s, 9H, *t*-Bu), 0.07 (s, 6H, 2Si-CH₃). Anal. Calcd for C₂₀H₃₂N₂O₇Si: C, 54.52; H, 7.32; N, 6.36. Found: C, 54.35; H, 7.54; N, 6.21. ESIMS *m/z* 441.55 [M+H⁺].

1.4.7. 1-(6'-*O*-*t*-Butyldimethylsilyl-4'-*C*-cyano-2',3'-*O*-isopropylidene- α -D-mannopyranosyl)thymine (**11c**)

Sodium cyanide (0.10 g, 2.1 mmol) was added to a solution of **7c** (2.36 g, 1.0 mmol) in a mixture of Et₂O–H₂O (2:1 v/v, 24.0 mL). The mixture was vigorously stirred for 36 h at room temperature. AcOEt was added to the mixture and the whole was extracted with H₂O. The residue was purified by flash chromatography (9.6:0.4 CH₂Cl₂–MeOH, *R_f* 0.48) to give 0.67 g (61%) of compound **11c** as a colorless oil: $[\alpha]_D^{22} -40$ (c 0.6, CHCl₃); UV (CHCl₃): λ_{\max} 265 nm (ϵ 11,261); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.81 (s, 1H, NH), 7.06 (s, 1H, H-6), 5.40 (d, 1H, *J*_{1',2'} = 1.5 Hz, H-1'), 5.26 (br s, 1H, 4'-OH), 4.84 (dd, 1H, *J*_{2',3'} = 6.9 Hz, H-2'), 4.69 (d, 1H, H-3'), 4.12 (t, 1H, *J*_{5',6a'} = *J*_{5',6b'} = 6.5 Hz, H-5'), 4.02 (m, 2H, H-6a',b'), 1.95 (1s, 3H, 5-CH₃), 1.72, 1.39 (2s, 6H, 2CH₃), 0.89 (s, 9H, *t*-Bu), 0.15, 0.11 (2s, 6H, 2Si-CH₃). Anal. Calcd for C₂₁H₃₃N₃O₇Si: C, 53.94; H, 7.11; N, 8.99. Found: C, 54.11; H, 7.31; N, 8.87. ESIMS *m/z* 468.60 [M+H⁺].

1.4.8. 1-(4'-*C*-Cyano- α -D-mannopyranosyl)thymine (**12c**)

Thymine derivative **12c** was synthesized from **11c** by the similar procedure as described for **12a**. It was purified by flash chromatography (1:1 CH₂Cl₂–MeOH, *R_f* 0.10) to give 0.16 g (72%) of compound **12c** as a white foam: $[\alpha]_D^{22} +30$ (c 0.7, MeOH); UV (MeOH): λ_{\max} 267 nm (ϵ 2810); IR (Nujol, cm⁻¹): 2245 (CN); ¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz): δ 7.49 (s, 1H, H-6), 6.03 (d, 1H, *J*_{1',2'} = 9.5 Hz, H-1'), 4.41 (dd, 1H, *J*_{5',6a'} = 9.3 Hz, *J*_{6a',6b'} = 12.8 Hz, H-6a'), 4.14–4.03 (m, 3H, H-2', H-3', H-5'), 3.85 (dd, 1H, *J*_{5',6b'} = 2.8 Hz, H-6a',b'), 1.89 (1s, 3H, 5-CH₃); ¹³C NMR (CD₃OD, 75.5 MHz): δ 163.7, 150.1, 138.5, 118.8, 110.4, 83.6, 72.5, 71.9, 68.2, 66.4, 59.7, 13.4. Anal. Calcd for C₁₂H₁₅N₃O₇: C, 46.01; H, 4.83; N, 13.41. Found: C, 46.23; H, 4.77; N, 13.69. ESIMS *m/z* 314.28 [M+H⁺].

1.5. Synthesis of 1-(4'-C-cyano-4'-C-deoxy)5-fluorouracil (**15a**)

1.5.1. 1-(4'-C-Cyano-4'-C-deoxy-2',3'-O-isopropylidene-6'-O-trityl- α -D-mannopyranosyl)5-fluorouracil (**13a**)

Phenyl chlorothionoformate (0.2 mL, 1.5 mmol) was added to a solution of **8a** (0.59 g, 1.0 mmol), DMAP (0.05 g, 0.4 mmol), and Et₃N (0.2 mL, 1.5 mmol) in CH₃CN (10 mL) under nitrogen at 0 °C. The mixture was stirred for 1 h and then diluted with AcOEt. The whole was washed with H₂O and the separated organic phase was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered, and evaporated to dryness. The residue was coevaporated two times with toluene and then was dissolved in toluene (10 mL). Bu₃SnH (0.4 mL, 1.6 mmol) was added to the above solution containing AIBN (0.03 g, 0.2 mmol) at 100 °C under nitrogen. After being heated for 45 min, the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (9.8:0.2 CH₂Cl₂–MeOH, R_f 0.43) to give 0.44 g (77%) of compound **13a** as a colorless oil: [α]_D²² –48 (c 0.7, CHCl₃); UV (CHCl₃): λ_{\max} 266 nm (ϵ 9518); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.62 (br s, 1H, NH), 7.44–7.28 (m, 16H, 3C₆H₅, H-6), 5.50 (d, 1H, J_{1',2'} = 3.8 Hz, H-1'), 4.67 (t, 1H, J_{2',3'} = J_{3',4'} = 6.5 Hz, H-3'), 4.55 (dd, 1H, H-2'), 3.99 (dt, 1H, J_{4',5'} = 3.0 Hz, J_{5',6a'} = J_{5',6b'} = 6.9 Hz, H-5'), 3.60 (dd, 1H, J_{6a',6b'} = 10.3 Hz, H-6a'), 3.51 (dd, 1H, H-4'), 3.38 (dd, 1H, H-6b'), 1.66, 1.39 (2s, 6H, 2CH₃). Anal. Calcd for C₃₃H₃₀FN₃O₆: C, 67.91; H, 5.18; N, 7.20. Found: C, 68.08; H, 5.12; N, 7.26. ESIMS *m/z* 584.62 [M+H⁺].

1.5.2. 1-(4'-C-Cyano-4'-C-deoxy)5-fluorouracil (**15a**)

5-Fluorouracil derivative **15a** was synthesized from **13a** by the similar procedure as described for **12a**. It was purified by flash chromatography (9:1 CH₂Cl₂–MeOH, R_f 0.15) to give 0.16 g (71%) of compound **15a** as a white foam: [α]_D²² +9 (c 0.9, MeOH); UV (MeOH): λ_{\max} 262 nm (ϵ 2649); IR (Nujol, cm⁻¹): 2245 (CN); ¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz): δ 7.90 (d, 1H, J_{5,6} = 6.7 Hz, H-6), 6.01 (d, 1H, J_{1',2'} = 9.4 Hz, H-1'), 4.41–4.26 (m, 3H, H3', H5', H-6a'), 3.79 (dd, 1H, J_{5',6b'} = 1.5 Hz, J_{6a',6b'} = 11.7 Hz, H-6b'), 3.70 (dd, 1H, J_{2',3'} = 2.8 Hz, H-2'), 3.53 (dd, 1H, J_{3',4'} = 6.3 Hz, J_{4',5'} = 2.6 Hz, H-4'); ¹³C NMR (CD₃OD, 75.5 MHz): δ 157.9, 149.3, 140.8, 128.7, 116.8, 83.1, 74.2, 72.1, 67.3, 65.6, 29.1. Anal. Calcd for C₁₁H₁₂FN₃O₆: C, 43.86; H, 4.02; N, 13.95. Found: C, 43.70; H, 4.32; N, 14.22. ESIMS *m/z* 302.21 [M+H⁺].

1.6. Synthesis of 1-(4'-C-cyano-4'-C-deoxy)uracil (**15b**)

1.6.1. 1-(4'-C-Cyano-4'-C-deoxy-2',3'-O-isopropylidene-6'-O-trityl- α -D-mannopyranosyl)uracil (**13b**)

Uracil derivative **13b** was synthesized from **8b** by the similar procedure as described for **13a**. It was purified by flash chromatography (9.8:0.2 CH₂Cl₂–MeOH, R_f 0.25) to give 0.39 g (72%) of compound **13b** as a colorless oil: [α]_D²² +20 (c 1.4, CHCl₃); UV (CHCl₃): λ_{\max} 258 nm (ϵ 5454); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.23 (br s, 1H, NH), 7.46–7.28 (m, 15H, 3C₆H₅), 7.22 (d, 1H, J_{5,6} = 8.1 Hz, H-6), 5.79 (d, 1H, H-5), 5.51 (d, 1H, J_{1',2'} = 2.8 Hz, H-1'), 4.74 (t, 1H, J_{2',3'} = J_{3',4'} = 6.7 Hz, H-3'), 4.66 (dd, 1H, H-2'), 4.06 (dt, 1H, J_{4',5'} = 2.3 Hz, J_{5',6a'} = J_{5',6b'} = 6.5 Hz, H-5'), 3.60 (dd, 1H, J_{6a',6b'} = 10.0 Hz, H-6a'), 3.49 (dd, 1H, H-4'), 3.36 (dd, 1H, H-6b'), 1.66, 1.39 (2s, 6H, 2CH₃). Anal. Calcd for C₃₃H₃₁N₃O₆: C, 70.07; H, 5.52; N, 7.43. Found: C, 69.93; H, 5.66; N, 7.38. ESIMS *m/z* 566.60 [M+H⁺].

1.6.2. 1-(4'-C-Cyano-4'-C-deoxy)uracil (**15b**)

Uracil derivative **15b** was synthesized from **13b** by the similar procedure as described for **12a**. It was purified by flash chromatography (9:1 CH₂Cl₂–MeOH, R_f 0.13) to give 0.14 g (72%) of compound **15b** as a white foam: [α]_D²² +23 (c 0.5, CHCl₃); UV (CHCl₃): λ_{\max} 256 nm (ϵ 3062); IR (Nujol, cm⁻¹): 2250 (CN); ¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz): δ 7.58 (d, 1H, J_{5,6} = 8.1 Hz, H-6), 5.93 (d, 1H, J_{1',2'} = 9.5 Hz, H-1'), 5.64 (d, 1H, H-5), 4.30 (dd, 1H, J_{5',6a'} = 9.2 Hz,

J_{6a',6b'} = 12.4 Hz, H-6a'), 4.23–4.18 (m, 2H, H-3', H-5'), 3.73–3.63 (m, 2H, H-2', H-6b'), 3.45 (dd, 1H, J_{3',4'} = 6.4 Hz, J_{4',5'} = 2.6 Hz, H-4'); ¹³C NMR (CD₃OD, 75.5 MHz): δ 162.1, 149.5, 141.2, 117.1, 104.6, 82.8, 74.6, 72.3, 65.2, 64.6, 30.1. Calcd for C₁₁H₁₃N₃O₆: C, 46.65; H, 4.63; N, 14.84. Found: C, 46.35; H, 4.54; N, 14.96. ESIMS *m/z* 284.23 [M+H⁺].

1.7. Synthesis of 1-(4'-C-cyano-4'-C-deoxy)thymine (**15c**)

1.7.1. 1-(4'-C-Cyano-4'-C-deoxy-2',3'-O-isopropylidene-6'-O-trityl- α -D-mannopyranosyl)thymine (**13c**)

A mixture of the **6c** (1.39 g, 2.4 mmol), water (20.0 mL), ethyl ether (40.0 mL), sodium bicarbonate (0.40 g, 4.8 mmol), and sodium cyanide (0.12 g, 2.4 mmol) was stirred vigorously at room temperature for 24 h. The organic phase was separated, and the aqueous phase was washed with Et₂O. The combined ethereal phases were dried over anhydrous sodium sulfate, filtered, and evaporated to dryness. The residue, a mixture of two epimeric cyanohydrins **9c** and **10c**, was dissolved in acetonitrile (17.0 mL). To this solution were added DMAP (0.13 mg, 1.1 mmol), Et₃N (0.5 mL, 3.7 mmol), and phenyl chlorothionoformate (0.5 mL, 3.7 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 1 h, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was coevaporated two times with toluene and then was dissolved in toluene (17.0 mL). Bu₃SnH (1.1 mL, 3.8 mmol) was added to the above solution containing AIBN (0.07 g, 0.4 mmol) at 100 °C under nitrogen. After being heated for 45 min, the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (9.8:0.2 CH₂Cl₂–MeOH, R_f 0.38) to give 0.71 g (50%) of compound **13c** as a colorless oil: [α]_D²² –4 (c 0.5, CHCl₃); UV (CHCl₃): λ_{\max} 265 nm (ϵ 7429); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.54 (br s, 1H, NH), 7.43–7.24 (m, 15H, 3C₆H₅), 7.03 (s, 1H, H-6), 5.46 (d, 1H, J_{1',2'} = 2.5 Hz, H-1'), 4.74 (t, 1H, J_{2',3'} = J_{3',4'} = 6.8 Hz, H-3'), 4.65 (dd, 1H, H-2'), 4.05 (dt, 1H, J_{4',5'} = 2.7 Hz, J_{5',6a'} = J_{5',6b'} = 6.2 Hz, H-5'), 3.56 (dd, 1H, J_{6a',6b'} = 10.0 Hz, H-6a'), 3.48 (dd, 1H, H-4'), 3.31 (dd, 1H, H-6b'), 1.93 (1s, 3H, 5-CH₃), 1.64, 1.36 (2s, 6H, 2CH₃). Anal. Calcd for C₃₄H₃₃N₃O₆: C, 70.45; H, 5.74; N, 7.25. Found: C, 70.71; H, 5.62; N, 7.33. ESIMS *m/z* 580.66 [M+H⁺].

1.7.2. 1-(6'-O-*t*-Butyldimethylsilyl-4'-C-cyano-4'-C-deoxy-2',3'-O-isopropylidene- α -D-mannopyranosyl)thymine (**14c**)

Thymine derivative **14c** was synthesized from **11c** by the similar procedure as described for **13a**. It was purified by flash chromatography (9.8:0.2 CH₂Cl₂–MeOH, R_f 0.37) to give 0.23 g (70%) of compound **14c** as a colorless oil: [α]_D²² –36 (c 1.0, CHCl₃); UV (CHCl₃): λ_{\max} 263 nm (ϵ 6376); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.77 (br s, 1H, NH), 7.08 (s, 1H, H-6), 5.52 (d, 1H, J_{1',2'} = 2.6 Hz, H-1'), 4.79 (t, 1H, J_{2',3'} = J_{3',4'} = 6.7 Hz, H-3'), 4.68 (dd, 1H, H-2'), 4.14 (m, 1H, H-5'), 3.88 (dd, 1H, J_{6a',6b'} = 10.2 Hz, J_{5',6a'} = 5.9 Hz, H-6a'), 3.49 (dd, 1H, H-4'), 3.39 (dd, 1H, J_{5',6b'} = 7.9 Hz, H-6b'), 1.95 (1s, 3H, 5-CH₃), 1.70, 1.38 (2s, 6H, 2CH₃), 0.86 (s, 9H, *t*-Bu), 0.08, 0.06 (2s, 6H, 2Si-CH₃). Anal. Calcd for C₂₁H₃₃N₃O₆Si: C, 55.85; H, 7.37; N, 9.30. Found: C, 55.97; H, 7.49; N, 9.37. ESIMS *m/z* 452.61 [M+H⁺].

1.7.3. 1-(4'-C-Cyano-4'-C-deoxy)thymine (**15c**)

Thymine derivative **15c** was synthesized from **13c** or **14c** by the similar procedure as described for **15a**. It was purified by flash chromatography (9:1 CH₂Cl₂–MeOH, R_f 0.14) to give **15c** (0.10 g, 69% from **13c** or 0.11 g, 73% from **14c**) of compound as a white foam: [α]_D²² +4 (c 0.4, CHCl₃); UV (CHCl₃): λ_{\max} 266 nm (ϵ 2447); IR (Nujol, cm⁻¹): 2235 (CN); ¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz): δ 7.52 (s, 1H, H-6), 6.02 (d, 1H, J_{1',2'} = 9.7 Hz, H-1'), 4.43–4.26 (m, 3H, H-3', H-5', H-6a'), 3.73–3.63 (m, 2H, H-2', H-6b'), 3.55 (dd, 1H, J_{3',4'} = 6.3 Hz, J_{4',5'} = 2.4 Hz, H-4'), 1.89 (1s, 3H, 5-CH₃); ¹³C NMR (CD₃OD, 75.5 MHz): δ 163.2, 151.5, 140.8, 116.9, 111.2, 83.2, 74.1, 72.4, 64.8, 64.3, 29.8, 15.4. Anal. Calcd for C₁₂H₁₅N₃O₆: C,

48.48; H, 5.09; N, 14.14. Found: C, 48.24; H, 5.21; N, 14.27. ESIMS m/z 298.24 [M+H]⁺.

1.8. Cytostatic activity assays

Murine leukemia L1210 and thymidine kinase (TK)-deficient L1210 (L1210/TK⁻), human T-lymphocyte CEM and human cervix carcinoma (HeLa) and HeLa/TK⁻ cells were suspended at 300,000–500,000 cells/mL of culture medium, and 100 μ L of a cell suspension was added to 100 μ L of an appropriate dilution of the test compounds in wells of 96-well microtiter plates. After incubation at 37 °C for two (L1210, FM3A) or three (CEM, HeLa) days, the cell number was determined using a Coulter counter. The IC₅₀ was defined as the compound concentration required to inhibit cell proliferation by 50%.

1.9. Antiviral activity assays

The antiviral assays [except anti-human immunodeficiency virus (HIV) assays] were based on inhibition of virus-induced cytopathicity in HEL [herpes simplex virus type 1 (HSV-1), HSV-2 (G), vaccinia virus and vesicular stomatitis virus], Vero (parainfluenza-3, reovirus-1, Sindbis, Coxsackie B4, and Punta Toro virus), or HeLa (vesicular stomatitis virus, Coxsackie virus B4, and respiratory syncytial virus) cell cultures. Confluent cell cultures in microtiter 96-well plates were inoculated with 100 cell culture inhibitory dose-50 (CCID₅₀) of virus (1 CCID₅₀ being the virus dose to infect 50% of the cell cultures) in the presence of varying concentrations (200, 40, 8, ... μ M) of the test compounds. Viral cytopathicity was recorded as soon as it reached completion in the control virus-infected cell cultures that were not treated with the test compounds. The methodology of the anti-HIV assays was as follows: human CEM ($\sim 3 \times 10^5$ cells/cm³) cells were infected with 100 CCID₅₀ of HIV-1(III_B) or HIV-2(ROD)/mL and seeded in 200 μ L wells of a microtiter plate containing appropriate dilutions of the test compounds. After 4 days of incubation at 37 °C, HIV-induced CEM giant cell formation was examined microscopically.

Acknowledgements

This work was supported in part by the Postgraduate Programmes 'Biotechnology-Quality assessment in Nutrition and the Environment', 'Application of Molecular Biology-Molecular Genetics-Molecular Markers', Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, and the KU Leuven (GOA 10/14). We thank Lizette van Berckelaer, Leen Ingels, Leentje Persoons and Frieda De Meyer for excellent technical assistance in the biological assays.

References

- Galmardini, C. M.; Mackey, J. R.; Dumontet, C. *Lancet Oncol.* **2002**, *3*, 415–424.
- Meadows, D. C.; Gervay-Hague, J. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 16–29.
- Tsoukala, E.; Manta, S.; Kiritsis, C.; Komiotis, D. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2012**, *12*, 255–275.
- De Clercq, E. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2002**, *2*, 163–175.
- Komiotis, D.; Manta, S.; Tsoukala, E.; Tzioumaki, N. *Curr. Med. Chem.: Anti-Infect. Agents* **2008**, *7*, 219–244.
- Nair, V.; Buenger, G. S. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3695–3697.
- Barral, K.; Halfon, P.; Pèpe, G.; Camplo, M. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 81–84.
- Verheggen, I.; Van Aerschot, A.; Toppet, S.; Snoeck, R.; Janssen, G.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Herdewijn, P. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2033–2040.
- Verheggen, I.; Van Aerschot, A.; Van Meervelt, L.; Rozenski, J.; Wiebe, L.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Balzarini, J.; Claes, P.; De Clercq, E.; Herdewijn, P. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 826–835.
- Haouz, A.; Vanheusden, V.; Munier-Lechman, H.; Froeyen, M.; Herdewijn, P.; Van Galenbergh, S.; Delarue, M. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 4963–4971.
- Spanou, C.; Manta, S.; Komiotis, D.; Dervishi, A.; Kouretas, D. *Int. J. Mol. Sci.* **2007**, *8*, 695–704.
- Spanou, C.; Tzioumaki, N.; Manta, S.; Margaritis, P.; Kouretas, D.; Komiotis, D.; Liadaki, K. *Pharmacol. Pharm.* **2011**, *2*, 122–126.
- Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencić, A.; Komiotis, D. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 980–987.
- Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencić, A.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 420–428.
- Manta, S.; Tzioumaki, N.; Tsoukala, E.; Panagiotopoulou, A.; Pelecanou, M.; Balzarini, J.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 4764–4771.
- Manta, S.; Tsoukala, E.; Tzioumaki, N.; Goropevšek, A.; Pamulapati, R. T.; Cencić, A.; Balzarini, J.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 2696–2704.
- Manta, S.; Tsoukala, E.; Tzioumaki, N.; Kiritsis, C.; Balzarini, J.; Komiotis, D. *Bioorg. Chem.* **2010**, *38*, 48–55.
- Tsoukala, E.; Manta, S.; Tzioumaki, N.; Kiritsis, C.; Komiotis, D. *Carbohydr. Res.* **2011**, *346*, 328–333.
- Agelis, G.; Tzioumaki, N.; Botić, T.; Cencić, A.; Komiotis, D. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 5448–5456.
- Agelis, G.; Tzioumaki, N.; Tselios, T.; Botić, T.; Cencić, A.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 1366–1375.
- Tzioumaki, N.; Tsoukala, E.; Manta, S.; Agelis, G.; Balzarini, J.; Komiotis, D. *Arch. Pharm.* **2009**, *342*, 353–360.
- Kiritsis, C.; Manta, S.; Papasotiriou, I.; Coutouli-Argyropoulou, E.; Trakossas, S.; Balzarini, J.; Komiotis, D. *Med. Chem.* **2012**, *8*, 320–329.
- Manta, S.; Parmenopoulou, V.; Kiritsis, C.; Dimopoulou, A.; Kollatos, N.; Papasotiriou, I.; Balzarini, J.; Komiotis, D. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2012**, *31*, 522–535.
- Balatsos, N. A. A.; Vlachakis, D.; Maragozidis, P.; Manta, S.; Anastasakis, D.; Kyritsis, A.; Vlasi, M.; Komiotis, D.; Stathopoulos, C. *Biochemistry* **2009**, *48*, 6044–6051.
- Tsirkone, V. G.; Tsoukala, E.; Lamprakis, C.; Manta, S.; Hayes, J. M.; Skamnaki, V. T.; Drakou, C.; Zographos, S. E.; Komiotis, D.; Leonidas, D. D. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 3413–3425.
- Manta, S.; Xipnitou, A.; Kiritsis, C.; Kantsadi, A. L.; Hayes, J. M.; Skamnaki, V. T.; Lamprakis, C.; Kontou, M.; Zoumpoulakis, P.; Zographos, S. E.; Leonidas, D. D.; Komiotis, D. *Chem. Biol. Drug Des.* **2012**, *79*, 663–673.
- Kantsadi, A. L.; Manta, S.; Psara, A.-M. G.; Dimopoulou, A.; Kiritsis, C.; Parmenopoulou, V.; Skamnaki, V. T.; Zoumpoulakis, P.; Zographos, S. E.; Leonidas, D. D.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *54*, 740–749.
- Kantsadi, A. L.; Hayes, J. M.; Manta, S.; Skamnaki, V. T.; Kiritsis, C.; Psara, A.-M. G.; Koutsogiannis, Z.; Dimopoulou, A.; Theofanous, S.; Nikoleousakos, N.; Zoumpoulakis, P.; Kontou, M.; Papadopoulos, G.; Zographos, S. E.; Komiotis, D.; Leonidas, D. D. *ChemMedChem* **2012**, *7*, 722–732.
- Tzioumaki, N.; Manta, S.; Tsoukala, E.; Vande Voorde, J.; Liekens, S.; Komiotis, D.; Balzarini, J. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 993–1005.
- Kim, H.-J.; Chen, F.; Benner, S. A. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 3664–3669.
- Matsuda, A.; Nakajima, Y.; Azuma, A.; Tanaka, M.; Sasaki, T. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2917–2919.
- Camarasa, M.-J.; Diaz-Ortiz, A.; Calvo-Mateo, A.; De las Heras, F. G.; Balzarini, J.; De Clercq, E. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1732–1738.
- O-Yang, C.; Wu, H. Y.; Fraser-Smith, E. B.; Walker, K. A. M. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 37–40.
- Zhu, W.; Gumina, G.; Schinazi, R. F.; Chu, C. K. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 6423–6431.
- Azuma, A.; Nakajima, Y.; Nishizono, N.; Minakawa, N.; Suzuki, M.; Hanaoka, K.; Kobayashi, T.; Tanaka, M.; Sasaki, T.; Matsuda, A. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 4183–4189.
- Kiritsis, C.; Manta, S.; Parmenopoulou, V.; Balzarini, J.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 5668–5674.
- Hayakawa, H.; Kohgo, S.; Kitano, K.; Ashida, N.; Kodama, E.; Mitsuya, H.; Ohri, H. *Antiviral Chem. Chemother.* **2004**, *15*, 169–187.
- Alexandrova, L. A. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2011**, *37*, 651–671.
- Tiwari, K. N.; Shortnacy-Fowler, A. T.; Parker, W. B.; Waud, W. R.; Secrist, J. A. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2009**, *28*, 657–677.
- Courtney, S. M. U.S. Patent 5,945,406, 1999.



Note

Stereoselective facile synthesis of 2'-spiro pyrimidine pyranonucleosides via their key intermediate 2'-C-cyano analogues. Evaluation of their bioactivity



Christos Kiritsis^a, Stella Manta^a, Athina Dimopoulou^a, Vanessa Parmenopoulou^a, Petros Gkizis^b, Jan Balzarini^c, Dimitri Komiotis^{a,*}

^a Department of Biochemistry and Biotechnology, Laboratory of Bio-Organic Chemistry, University of Thessaly, 26 Ploutonos Str., 41221 Larissa, Greece

^b Department of Chemistry, Aristotle University of Thessaloniki, University Campus, 54124 Thessaloniki, Greece

^c Rega Institute for Medical Research, KU Leuven, B-3000 Leuven, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 August 2013

Received in revised form 31 October 2013

Accepted 3 November 2013

Available online 9 November 2013

Keywords:

C-Cyano pyranonucleosides

Spiro-nucleosides

Cytostatic agents

5-Fluorouracil

ABSTRACT

A novel series of 2'-spiro pyrimidine pyranonucleosides has been designed and synthesized. Their precursors, 2'-C-cyano nucleosides **5a,b** and **6a,b**, were obtained by subjecting **1a,b** to the sequence of selective protection of the primary hydroxyl group, acetalation, oxidation, and finally treatment with sodium cyanide. Deoxygenation at the 2'-position of cyanohydrins **5a,b** or **6a,b** led to the 2'-deoxy derivatives **9a,b**. Fully deprotection of **5a,b**, **6a,b**, and **9a,b** gave the desired 2'-C-cyano **7a,b**, **8a,b**, and 2'-C-cyano-2'-deoxy pyranonucleosides **10a,b**, respectively. Mesylation of the corresponding cyanohydrins **5a,b** and **6a,b** afforded compounds **11a,b** and **12a,b** which after base treatment and subsequent deprotection furnished the spiro nucleosides **15a,b** and **16a**. The new analogues were evaluated for their potential cytostatic activities in cell culture.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Nucleoside analogues have long played a pivotal role in the treatment of viral infections and cancer.^{1–4} These therapeutic compounds mimic physiological nucleosides in terms of uptake and metabolism and are incorporated into newly synthesized DNA, resulting in synthesis inhibition and DNA chain termination.⁵ However, their clinical use is often limited by important side-effects and natural or acquired drug resistance, thus there is an ongoing medical need for more effective, selective, and non-toxic derivatives.

Nucleosides containing sugar-ring modifications^{6,7} are recognized as an important class of biologically active molecules. Particularly, branched-chain cyano furanonucleosides have drawn much attention from medicinal chemists due to their antiviral and anticancer properties^{8,9} and their potential to provide an access to the synthesis of branched-chain spiro derivatives endowed with potent anti-HIV properties.^{10,11} Spirobicyclic cores display an important role in the development of new bioactive substances,¹² while a number of spiro nucleosides, as conformationally restricted analogues, exhibited interesting antiviral activities.^{13–15}

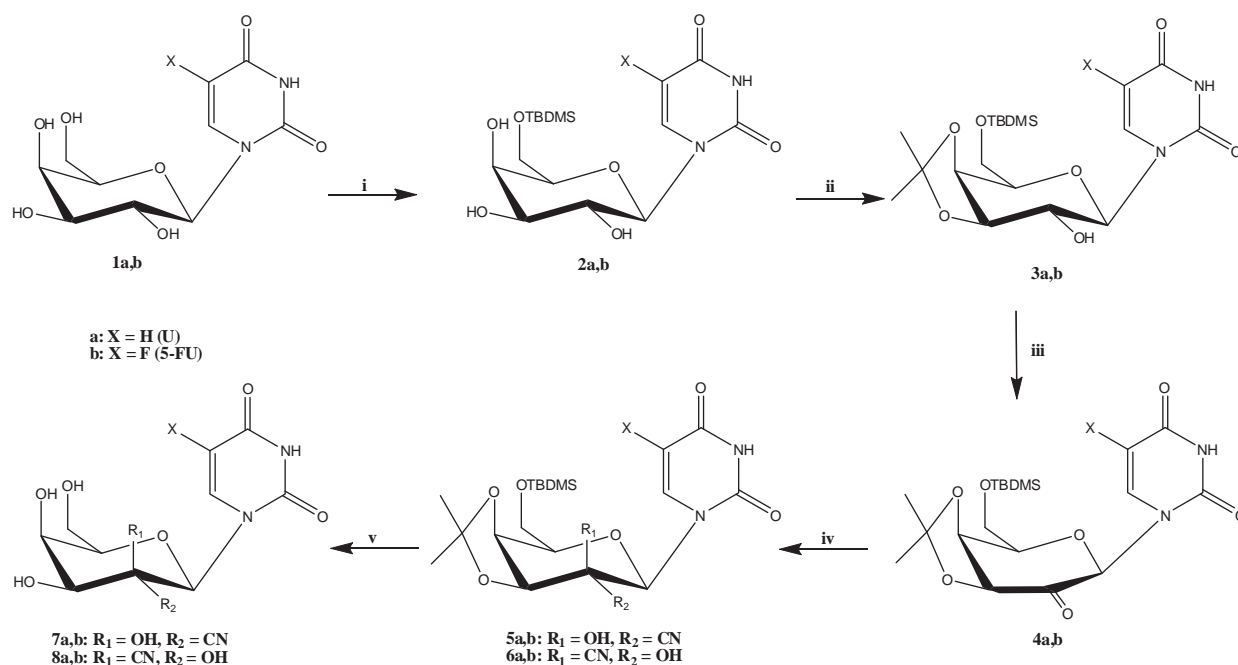
Pyranosyl nucleosides are undoubtedly one of the most important modifications of natural nucleosides, offering promising avenues in the development of potential antitumor,^{16,17} antiviral,^{18,19} antioxidant,²⁰ and antimicrobial²¹ agents. In our previous investigations, we demonstrated that insertion of the cyano functional group at the 3'-C- or 4'-C-position of the pyranose ring, leads to derivatives endowed with significant cytostatic activity against different cancer cell lines.^{22,23}

With the above applications in mind and in order to: (i) better understand the cyano substituent position effect on the properties of this class of analogues and (ii) promote an efficient way to pharmacologically active spiro branched-chain nucleosides, we found it of particular interest to further extend our studies toward the preparation of 2'-C-cyano pyrimidine pyranonucleosides as potential useful synthons for 2'-spiro pyranonucleosides bearing a 4-amino-1,2-oxathiole-2,2-dioxide ring. The chemical synthesis and biological activity of these compounds are presented herein.

Our synthetic approach was focused on the preparation of 2'-C-cyano pyranonucleosides of uracil **5a,6a** and 5-fluorouracil **5b,6b** as key intermediates (Scheme 1). Commercially available 1,2,3,4,6-penta-O-acetyl-D-galactopyranose was condensed with the proper pyrimidine base to give, after deacetylation, the β-galactopyranonucleosides of uracil **1a**²⁴ and 5-fluorouracil **1b**.²⁵ Selective protection of the primary hydroxyl group of **1a** and **1b** with *t*-butyldimethylsilyl chloride (TBDMSCl) followed by acetalation,

* Corresponding author. Tel.: +30 2410 565285; fax: +30 2410 565290.

E-mail address: dkom@bio.uth.gr (D. Komiotis).



Scheme 1. Reagents and conditions: (i) TBDMSCl, pyridine, DMAP, **2a**: 85%, **2b**: 83%; (ii) acetone, 2,2-dimethoxypropane, *p*-toluenesulfonic acid, **3a**: 86%, **3b**: 85%; (iii) PDC, Ac₂O, dry CH₂Cl₂, **4a**: 80%, **4b**: 83%; (iv) H₂O, Et₂O, NaCN, NaHCO₃, **5a**: 28% and **6a**: 52%, **5b**: 25% and **6b**: 56%; (v) TFA 90% in MeOH, **7a**: 74%, **7b**: 74%, **8a**: 79%, **8b**: 78%.

furnished the partially protected derivatives **3a,b**, which upon oxidation²⁶ gave the 2'-ketonucleosides **4a,b**. Reaction of **4a,b** with sodium cyanide (NaCN),²³ afforded a chromatographically separable mixture of the two possible 2'-cyanohydrin epimers **5a,b** and **6a,b** in an approximate 1:2 ratio, respectively, contrary to previously published stereospecific preparation of 3'-C- and 4'-C-cyano pyranonucleosides.^{22,23} The proposed structures of compounds **5a,b** and **6a,b** were established by comparison of their ¹H NMR spectra and were assigned as talopyranosyl and galactopyranosyl analogues, respectively, based on the deshielding effect of the adjacent cyano group^{27–29} over H-1' which appeared at lower field in **5a,b** than in **6a,b** ($\Delta\delta = 0.42$ and 0.31 ppm, respectively). This suggests that H-1' and the cyano group in **5a,b** are on the same side of the plane. The stereochemistry of C-2' was further confirmed by NOE measurements performed on pyranosyl analogue **6b**, as depicted in Figure 1. The mutual NOE enhancements observed between the free OH group of galactopyranosyl derivative **6b** and H-1', show that these protons are on the same side of the ring system. In contrast, no effect was observed between the 2'-OH hydroxyl proton and the H-1' on talopyranosyl analogue **5b**, when either 2'-OH group or H-1' was irradiated. Finally, deprotection of analogues **5a,b** and **6a,b** using trifluoroacetic acid (TFA) gave the desired nucleosides **7a,b** and **8a,b**, in good yields (74–79%).

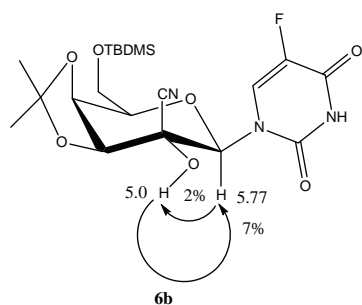
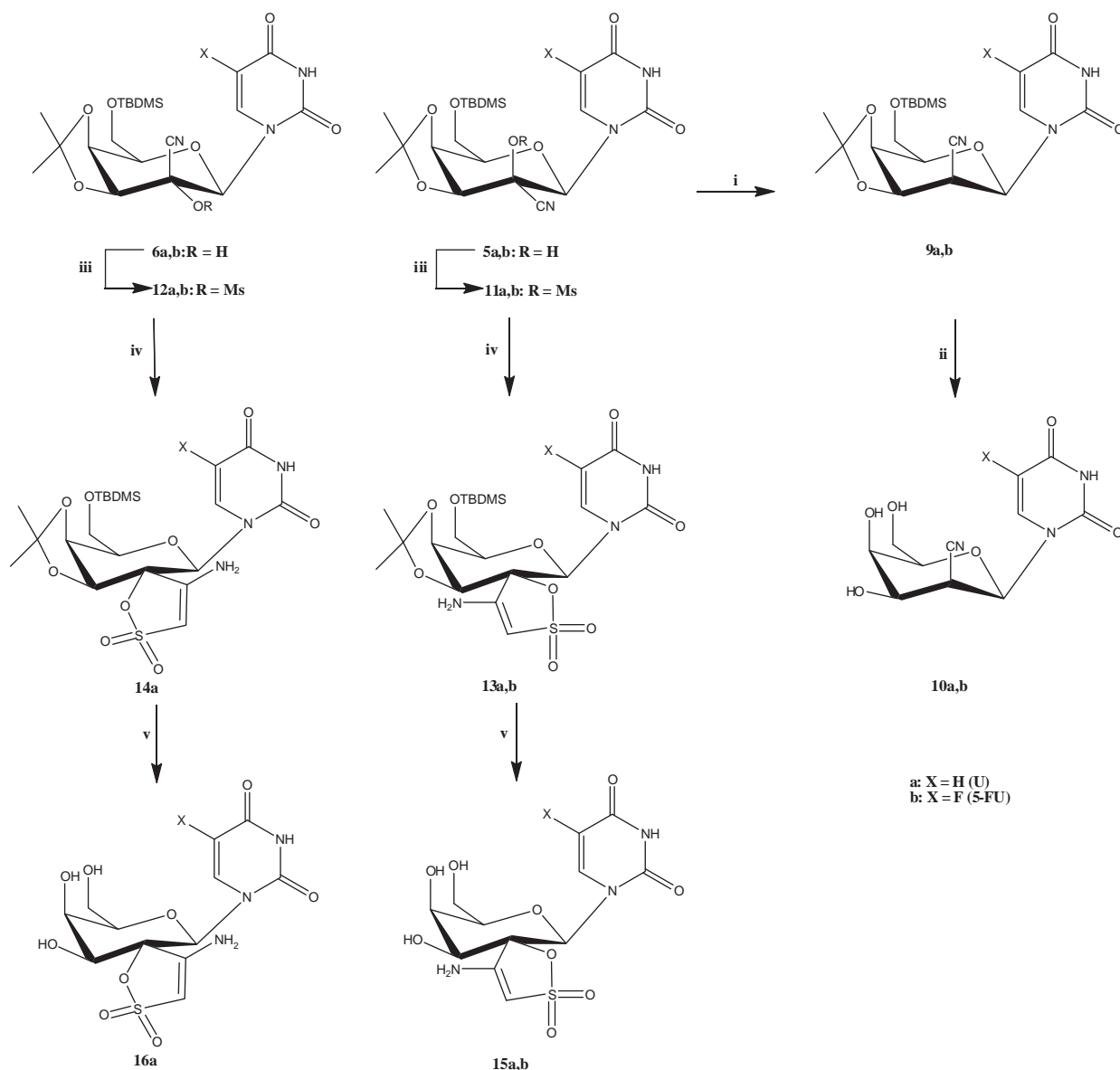


Figure 1. NOEs observed for compound **6b**.

In an effort to further explore structure–activity relationships of this series of compounds, the synthesis of the 2'-C-cyano-2'-deoxy derivatives **10a,b** was also accomplished (Scheme 2). Phenoxythiocarbonylation of **5a,b** or **6a,b**, followed by deoxygenation with tris(trimethylsilyl)silane [(Me₃Si)₃SiH]³⁰ in the presence of 2,2'-azobis(isobutyronitrile) (AIBN), and subsequent deprotection with TFA led to the formation of the 2'-C-cyano-2'-deoxy derivatives **10a,b**. ¹H NMR data obtained for the newly synthesized nucleosides **10a,b** ($J_{1',2'} = 2.6$ and 1.7 Hz, respectively) revealed an axial/equatorial relationship between H-1' and H-2', and thus an axial-oriented cyano group. This demonstrated that deoxygenation of 2'-C-cyanohydrins occurs in a stereospecific manner, in accordance with the approach of the hydrogen atom from the less hindered side of the molecule.^{22,23}

Finally, the cyanohydrins **5a,b** and **6a,b** were used as starting materials for the synthesis of the desired 2'-spiro pyrimidine pyranonucleosides **13–16**, as outlined in Scheme 2. Their reaction with mesyl chloride (MsCl) in pyridine furnished the corresponding 2'-C-cyano-2'-O-mesyl derivatives **11a,b** and **12a,b**. Subsequent treatment of the cyanomesyl nucleosides **11a,b** and **12a** with 8-diazabicycloundec-7-ene (DBU)³¹ in the presence of acetonitrile (CH₃CN) furnished the 2'-spiro derivatives **13a,b** and **14a**, respectively, in fair to good yields (60–74%), while only decomposition products were recovered upon treatment of 5-fluorouracil analogue **12b** either with DBU or cesium carbonate. The cyclization step of spiro derivatives **13a,b** and **14a** most likely involves abstraction of the acidic proton from the mesylate group, followed by nucleophilic attack of the resulting carbanion at the nitrile carbon atom.^{31,32} The formation of the spiroaminooxathiole dioxide ring in the aforementioned compounds was evident by the disappearance in their ¹H NMR spectra of the characteristic signal at 3.28–3.24 ppm assigned to the mesyl group and the presence of two new singlets at 6.02–5.35 ppm corresponding to NH₂-4'' and at 6.04–5.43 ppm assigned to H-3''. In agreement, the IR spectra of the newly synthesised compounds **13a,b** and **14a**, exhibited characteristic absorption bands at 3320–3455 cm⁻¹ assigned to the stretching vibrations of the NH₂ group. In the final step, deprotection of **13a,b** and **14a** under mild acidic conditions,



Scheme 2. Reagents and conditions: (i) phenyl chlorothionoformate, Et₃N, DMAP, CH₃CN, 0 °C; then (Me₃Si)₃SiH, AIBN, toluene, 100 °C, **9a**: 70% from **5a** or 67% from **6a**, **9b**: 64% from **5b** or 67% from **6b**, (two steps); (ii) TFA 90% in MeOH, **10a**: 74%, **10b**: 79%; (iii) MsCl, pyridine, **11a**: 69%, **11b**: 68%, **12a**: 69%, **12b**: 59%; (iv) DBU, CH₃CN, **13a**: 60%, **13b**: 74%, **14a**: 70%; (v) CH₂Cl₂, methanolic hydrogen chloride, **15a**: 58%, **15b**: 59%, **16a**: 67%.

performed by methanolic hydrogen chloride,^{33,34} resulted in removal of both silyl and isopropylidene groups to deliver the target nucleosides **15a,b** and **16a**, respectively.

The cytostatic activity of 2'-C-cyano **7a,b**, **8a,b**, 2'-C-cyano-2'-deoxy **10a,b**, 2'-spiro pyranonucleosides **13a,b**, **14a** and their unprotected derivatives **15a,b**, **16a** was determined against murine leukemia L1210, human CD4⁺ T-lymphocyte (CEM) and human cervix carcinoma HeLa cell cultures (Table 1). Whereas the uracil derivatives (a-series of compounds) showed rather poor if any cytostatic activity, several 5-fluorouracil derivatives (b-series) showed pronounced antiproliferative activity. In particular, the 2'-C-cyano (up or down)-2'-hydroxy derivatives **7b** and **8b** showed a cytostatic activity profile identical to that of the free base 5-fluorouracil (5-FU). The three other 5-FU derivatives, that is, the 2'-C-cyano(up)-2'-deoxynucleoside analogue **10b** and the 2'-spironucleoside analogues **13b** and **15b** were devoid of significant cytostatic activity (Table 1). The pronounced cytostatic activity of **7b** and **8b** can be due to intrinsic instability of the compounds (spontaneously releasing 5-FU upon cell culture exposure)

Table 1
Cytostatic activity of test compounds against tumor cell proliferation in cell culture

Compound	IC ₅₀ ^a (μM)		
	L1210	CEM	HeLa
7a	>250	>250	>250
8a	>250	>250	>250
10a	>250	>250	>250
13a	30 ± 10	22 ± 1	28 ± 12
14a	111 ± 3	110 ± 2	87 ± 2
15a	>250	>250	>250
16a	>250	>250	≥ 250
7b	0.79 ± 0.45	16 ± 4	0.60 ± 0.04
8b	0.68 ± 0.11	20 ± 6	0.65 ± 0.23
10b	34 ± 1	112 ± 6	22 ± 2
13b	23 ± 2	24 ± 1	16 ± 5
15b	88 ± 13	>250	49 ± 6
F-Uracil	0.33 ± 0.17	18 ± 5	0.54 ± 0.12

^a 50% inhibitory concentration.

and/or to enzymatic cleavage by serum proteins and/or intracellular enzymes. The presence of a TBDMS group at the 6'-position of the molecules (i.e., **13a**, **13b**) seems to provoke an increased cytostatic activity of the compounds.

In conclusion, we have accomplished the stereoselective synthesis of 2'-C-cyano pyranonucleosides bearing 5-fluorouracil and uracil, along with the preparation of their 2'-deoxy derivatives. We further utilized the cyanohydrins as excellent templates for the synthesis of novel 2'-spiro nucleosides, via a convenient strategy, involving the intramolecular cyclocondensation of their corresponding cyanomesylates. The target nucleosides were tested for their inhibitory effects on the proliferation of murine leukemia (L1210), human lymphocyte (CEM), and human cervix carcinoma (HeLa) cell cultures. Several 5-fluorouracil derivatives showed a pronounced cytostatic activity, comparable to the parent compound, 5-FU.

1. Experimental

1.1. General procedure

Melting points were recorded in a Mel-Temp apparatus and are uncorrected. Thin layer chromatography (TLC) was performed on Merck precoated 60F₂₅₄ plates. Reactions were monitored by TLC on silica gel, with detection by UV light (254 nm) or by charring with sulfuric acid. Flash chromatography was performed using silica gel (240–400 mesh, Merck). Microanalyses were performed on a Perkin-Elmer 2400-II Analyzer. ¹H NMR spectra were recorded at 300 MHz on a Bruker AVANCE^{III} 300 spectrometer and ¹³C NMR spectra at 75.5 MHz on the same spectrometer, using chloroform-*d* (CDCl₃), dimethyl sulfoxide-*d*₆ (DMSO-*d*₆). Chemical shifts are reported in parts per million (δ) downfield from tetramethylsilane (TMS) as internal standard. UV-Vis spectra were recorded on a PG T70 UV-Vis spectrometer and mass spectra were obtained on a Thermo Quest Finnigan AQA Mass Spectrometer (electrospray ionization). Optical rotations were measured using an Autopol I polarimeter. Infrared spectra were obtained with a Thermo Scientific Nicolet IR100 FT-IR spectrometer. Dichloromethane (CH₂Cl₂) was distilled from phosphorus pentoxide and stored over 4 Å molecular sieves. CH₃CN and toluene were distilled from calcium hydride and stored over 3 Å molecular sieves. Pyridine was stored over potassium hydroxide pellets. All reactions sensitive to oxygen or moisture were carried out under nitrogen atmosphere using oven-dried glassware.

1.2. Synthesis of 1-(2'-C-cyano- β -D-talopyranosyl)uracil (**7a**) and 1-(2'-C-cyano- β -D-galactopyranosyl)uracil (**8a**)

1.2.1. 1-(6'-O-*t*-Butyldimethylsilyl- β -D-galactopyranosyl)uracil (**2a**)

To a stirred solution of **1a** (4.11 g, 15.0 mmol) in pyridine (75.0 mL) were added successively TBDMSCl (3.39 g, 22.5 mmol) and a catalytic amount of 4-dimethylaminopyridine (DMAP). The reaction mixture was stirred for 30 min at 0 °C under nitrogen and then at room temperature for 5 h. After, the reaction mixture was quenched with MeOH and evaporated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography (EtOAc–MeOH, 9:1), to give **2a** (4.97 g, 85%) as a colorless oil. $[\alpha]_D^{22} +2$ (c 0.2, MeOH); $R_f = 0.52$ (EtOAc–MeOH, 8:2); UV (MeOH): λ_{max} 258 nm (ϵ 7286); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 11.07 (br s, 1H, NH), 7.63 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.1$ Hz, H-6), 5.68 (d, 1H, H-5), 5.34 (d, 1H, $J_{1,2'} = 9.1$ Hz, H-1'), 5.27 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz, OH), 5.01 (s, 1H, OH), 4.58 (d, 1H, $J = 6.1$ Hz, OH), 3.76–3.49 (m, 6H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6a',b'), 0.83 (s, 9H, *t*-Bu), 0.02, 0.01 (2s, 6H, 2Si-CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 163.3, 151.1, 141.4,

102.2, 83.2, 78.2, 75.9, 74.0, 68.7, 62.7, 26.1, 18.3, –4.9. Anal. Calcd for C₁₆H₂₈N₂O₇Si: C, 49.47; H, 7.26; N, 7.21. Found: C, 49.71; H, 7.43; N, 7.02. ESIMS m/z 389.18 [M+H⁺].

1.2.2. 1-(6'-O-*t*-Butyldimethylsilyl-3',4'-O-isopropylidene- β -D-galactopyranosyl)uracil (**3a**)

To a stirred suspension of **2a** (4.97 g, 12.8 mmol) in anhydrous acetone (226.0 mL) and 2,2-dimethoxypropane (12.7 mL) was added *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.46 g, 2.4 mmol). After 3 h the resulting solution was neutralized with triethylamine (Et₃N) so pH did not exceed 7. The solution was concentrated and the residue was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂–MeOH, 9.5:0.5), to give **3a** (4.72 g, 86%) as a white solid, mp 205–207 °C. $[\alpha]_D^{22} +42$ (c 0.6, CDCl₃); $R_f = 0.47$ (CH₂Cl₂–MeOH, 9:1); UV (CDCl₃): λ_{max} 259 nm (ϵ 4831); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 9.43 (br s, 1H, NH), 7.41 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.2$ Hz, H-6), 5.74 (d, 1H, $J_{1,2'} = 8.0$ Hz, H-1'), 5.57 (d, 1H, H-5), 4.32–4.26 (m, 2H, H-3', H-4'), 4.07 (dt, 1H, $J_{4',5'} = 1.4$ Hz, $J_{5',6a'} = J_{5',6b'} = 6.4$ Hz, H-5'), 3.89–3.78 (m, 2H, H-6a',b'), 3.72 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 5.8$ Hz, H-2'), 1.53, 1.37 (2s, 6H, 2CH₃), 0.88 (s, 9H, *t*-Bu), 0.06, 0.05 (2s, 6H, 2Si-CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 163.1, 151.0, 139.9, 110.1, 102.9, 82.9, 78.9, 76.3, 72.9, 71.9, 61.8, 28.0, 25.8, 18.3, –5.3, –5.4. Anal. Calcd for C₁₉H₃₂N₂O₇Si: C, 53.25; H, 7.53; N, 6.54. Found: C, 53.32; H, 7.43; N, 6.72. ESIMS m/z 429.22 [M+H⁺].

1.2.3. 1-(6'-O-*t*-Butyldimethylsilyl-3',4'-O-isopropylidene- β -D-lyxo-hexopyranosyl-2'-ulose)uracil (**4a**)

A mixture of **3a** (4.72 g, 11.0 mmol), pyridinium dichromate (PDC) (4.93 g, 13.1 mmol) and Ac₂O (3.10 mL, 32.7 mmol) was stirred in dry CH₂Cl₂ (110.0 mL) for 6 h, under nitrogen at room temperature. Purification by flash chromatography (EtOAc–hexane, 5:5) gave **4a** (3.75 g, 80%) as a white solid, mp 153–155 °C. $[\alpha]_D^{22} -80$ (c 1.0, CDCl₃); $R_f = 0.45$ (EtOAc–hexane, 6:4); UV (CDCl₃): λ_{max} 257 nm (ϵ 11296); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.72 (br s, 1H, NH), 7.10 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.2$ Hz, H-6), 6.21 (s, 1H, H-1'), 5.77 (d, 1H, H-5), 4.71–4.67 (m, 2H, H-3', H-4'), 4.32 (dt, 1H, $J_{4',5'} = 0.7$ Hz, $J_{5',6a'} = J_{5',6b'} = 6.7$ Hz, H-5'), 3.89 (d, 2H, H-6a',b'), 1.45, 1.41 (2s, 6H, 2CH₃), 0.89 (s, 9H, *t*-Bu), 0.08, 0.07 (2s, 6H, 2Si-CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 198.5, 162.5, 150.2, 141.0, 111.2, 103.0, 82.2, 77.8, 77.1, 75.9, 61.3, 27.4, 25.8, 25.7, 18.3, –5.4, –5.5. Anal. Calcd for C₁₉H₃₀N₂O₇Si: C, 53.50; H, 7.09; N, 6.57. Found: C, 53.69; H, 7.13; N, 6.41. ESIMS m/z 427.21 [M+H⁺].

1.2.4. 1-(6'-O-*t*-Butyldimethylsilyl-2'-C-cyano-3',4'-O-isopropylidene- β -D-talopyranosyl)uracil (**5a**) and 1-(6'-O-*t*-butyldimethylsilyl-2'-C-cyano-3',4'-O-isopropylidene- β -D-galactopyranosyl)uracil (**6a**)

A mixture of **4a** (3.75 g, 8.80 mmol), H₂O (130.0 mL), Et₂O (260.0 mL), NaHCO₃ (1.48 g, 17.6 mmol) and NaCN (430 mg, 8.80 mmol) was stirred vigorously at room temperature for 72 h. The organic phase was separated, and the aqueous phase was washed with Et₂O. The combined ether phases were dried over Na₂SO₄, filtered, and evaporated to dryness. The residue was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂–EtOAc, 7:3).

The fastest moving fractions afforded **5a** (1.12 g, 28%) as a white foam. $[\alpha]_D^{22} -18$ (c 0.6, CDCl₃); $R_f = 0.30$ (CH₂Cl₂–EtOAc, 7:3); UV (CDCl₃): λ_{max} 259 nm (ϵ 9500); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 9.13 (br s, 1H, NH), 7.52 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.2$ Hz, H-6), 6.54 (br s, 1H, 2'-OH), 6.15 (s, 1H, H-1'), 5.72 (d, 1H, H-5), 4.57–4.53 (m, 2H, H-3', H-4'), 4.42 (t, 1H, $J_{5',6a'} = J_{5',6b'} = 6.5$ Hz, H-5'), 3.78 (d, 2H, H-6a',b'), 1.59, 1.38 (2s, 6H, 2CH₃), 0.89 (s, 9H, *t*-Bu), 0.07, 0.06 (2s, 6H, 2Si-CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 162.6, 150.1, 141.5, 116.4, 110.7, 102.2, 79.4, 76.1, 74.0, 71.6, 71.2, 62.6, 26.1, 25.7, 24.8, 18.1, –5.4, –5.6. Anal. Calcd for C₂₀H₃₁N₃O₇Si: C, 52.96; H, 6.89; N, 9.26. Found: C, 52.88; H, 6.93; N, 9.17. ESIMS m/z 454.20 [M+H⁺].

The slowest moving fractions afforded **6a** (2.08 g, 52%) as a white foam. $[\alpha]_D^{22} +24$ (c 0.5, CDCl₃); $R_f = 0.18$ (CH₂Cl₂–EtOAc, 7:3); UV (CDCl₃): λ_{max} 258 nm (ϵ 3883); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 10.06 (br s, 1H, NH), 7.45 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.2$ Hz, H-6), 6.15 (br s, 1H, 2'-OH), 5.84 (d, 1H, H-5), 5.73 (s, 1H, H-1'), 4.52 (d, 1H, $J_{3,4'} = 5.9$ Hz, H-3'), 4.43 (dd, 1H, $J_{4,5'} = 2.8$ Hz, H-4'), 4.28–4.24 (m, 1H, H-5'), 4.01–3.89 (m, 2H, H-6a',b'), 1.74, 1.39 (2s, 6H, 2CH₃), 0.89 (s, 9H, *t*-Bu), 0.08, 0.07 (2s, 6H, 2Si-CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 162.0, 150.7, 141.6, 116.8, 111.2, 102.4, 80.1, 75.7, 73.7, 71.9, 69.8, 62.1, 26.4, 25.9, 24.3, 18.2, –5.4, –5.6. Anal. Calcd for C₂₀H₃₁N₃O₇Si: C, 52.96; H, 6.89; N, 9.26. Found: C, 52.80; H, 6.96; N, 9.32. ESIMS m/z 454.21 [M+H⁺].

1.2.5. 1-(2'-C-Cyano-β-D-talopyranosyl)uracil (7a)

The protected nucleoside **5a** (0.37 g, 0.82 mmol) was dissolved in 4.1 mL of 90% TFA in MeOH. The solution was stirred for 10 min at room temperature and then concentrated under reduced pressure, in order to remove traces of TFA. The residue was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂–MeOH, 9:1), to give **7a** (0.18 g, 74%) as a white foam. $[\alpha]_D^{22} -6$ (c 0.1, MeOH); $R_f = 0.24$ (CH₂Cl₂–MeOH, 8.5:1.5); UV (MeOH): λ_{max} 257 nm (ϵ 5362); IR (KBr, cm⁻¹): 2225 (CN); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 11.40 (br s, 1H, NH), 7.66 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.2$ Hz, H-6), 7.58 (s, 1H, H-1'), 6.34 (d, 1H, $J = 5.2$ Hz, OH), 6.24 (s, 1H, OH), 5.63 (d, 1H, H-5), 5.26 (d, 1H, $J = 4.3$ Hz, OH), 4.71 (t, 1H, $J = 4.3$ Hz, OH), 4.18–4.93 (m, 4H, H-3', H-4', H-5', H-6a'), 4.42 (dd, 1H, $J_{5,6b'} = 5.3$ Hz, $J_{6a',6b'} = 11.3$ Hz, H-6b'); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.5 MHz): δ 163.1, 150.6, 142.9, 118.9, 101.2, 80.6, 73.6, 73.3, 72.4, 63.4, 56.9. Anal. Calcd for C₁₁H₁₃N₃O₇: C, 44.15; H, 4.38; N, 14.04. Found: C, 44.29; H, 4.31; N, 14.20. ESIMS m/z 300.09 [M+H⁺].

1.2.6. 1-(2'-C-Cyano-β-D-galactopyranosyl)uracil (8a)

Uracil derivative **8a** was synthesized from **6a** by the similar procedure as described for **7a**. It was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂–MeOH, 9:1), to give **8a** (0.36 g, 79%) as a white foam. $[\alpha]_D^{22} +14$ (c 0.3, MeOH); $R_f = 0.23$ (CH₂Cl₂–MeOH, 8.5:1.5); UV (MeOH): λ_{max} 257 nm (ϵ 4032); IR (KBr, cm⁻¹): 2250 (CN); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 11.19 (br s, 1H, NH), 7.69 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.2$ Hz, H-6), 7.08 (s, 1H, H-1'), 5.82 (d, 1H, $J = 2.7$ Hz, OH), 5.75 (d, 1H, H-5), 5.59 (s, 1H, OH), 4.93 (s, 1H, OH), 4.71 (t, 1H, $J = 4.7$ Hz, OH), 3.87–3.58 (m, 5H, H-3', H-4', H-5', H-6a',b'); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.5 MHz): δ 163.2, 149.9, 140.2, 117.6, 101.5, 80.1, 79.6, 67.3, 66.2, 60.9, 36.8. Anal. Calcd for C₁₁H₁₃N₃O₇: C, 44.15; H, 4.38; N, 14.04. Found: C, 44.49; H, 4.56; N, 13.96. ESIMS m/z 300.10 [M+H⁺].

1.3. Synthesis of 1-(2'-C-cyano-2'-deoxy-β-D-talopyranosyl)uracil (10a)

1.3.1. 1-(6'-O-*t*-Butyldimethylsilyl-2'-C-cyano-2'-deoxy-3',4'-O-isopropylidene-β-D-talopyranosyl)uracil (9a)

Phenyl chlorothionoformate (0.17 mL, 1.2 mmol) was added to a solution of **5a** or **6a** (0.37 g, 0.82 mmol), DMAP (0.04 g, 0.3 mmol), and Et₃N (0.17 mL, 1.2 mmol) in CH₃CN (12.0 mL) under nitrogen at 0 °C. The mixture was stirred for 1 h and then diluted with AcOEt. The whole was washed with H₂O and the separated organic phase was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. The residue was coevaporated two times with toluene and then was dissolved in toluene (12.0 mL). (Me₃Si)₃SiH (0.34 mL, 1.1 mmol) was added to the above solution containing AIBN (0.08 g, 0.5 mmol) at 90 °C under nitrogen. After being heated for 50 min, the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂–MeOH, 9.8:0.2) to give **9a** (0.25 g, 70% from **5a** or 0.24 g, 67% from **6a**) as a colorless oil. $[\alpha]_D^{22} +54$ (c 0.3, CDCl₃); $R_f = 0.33$ (CH₂Cl₂–MeOH, 9.8:0.2); UV (CDCl₃): λ_{max} 257 nm (ϵ 4773); ¹H

NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.78 (br s, 1H, NH), 7.23 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.3$ Hz, H-6), 5.79 (d, 1H, H-5), 5.55 (d, 1H, $J_{1,2'} = 2.7$ Hz, H-1'), 4.57 (dd, 1H, $J_{2,3'} = 7.1$ Hz, $J_{3,4'} = 5.7$ Hz, H-3'), 4.29 (dd, 1H, $J_{4,5'} = 2.9$ Hz, H-4'), 4.11–3.89 (m, 3H, H-5', H-6a',b'), 3.65 (dd, 1H, H-2'), 1.74, 1.39 (2s, 6H, 2CH₃), 0.89 (s, 9H, *t*-Bu), 0.10, 0.09 (2s, 6H, 2Si-CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 161.6, 150.7, 141.0, 116.8, 110.9, 102.7, 80.1, 75.7, 73.4, 71.3, 62.6, 36.8, 26.1, 25.6, 24.8, 18.2, –5.4, –5.6. Anal. Calcd for C₂₀H₃₁N₃O₆Si: C, 54.90; H, 7.14; N, 9.60. Found: C, 54.78; H, 7.11; N, 9.82. ESIMS m/z 438.22 [M+H⁺].

1.3.2. 1-(2'-C-Cyano-2'-deoxy-β-D-talopyranosyl)uracil (10a)

Uracil derivative **10a** was synthesized from **9a** by the similar procedure as described for **7a**. It was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂–MeOH, 9:1), to give **10a** (0.12 g, 74%) as a white foam. $[\alpha]_D^{22} +6$ (c 0.2, MeOH); $R_f = 0.27$ (CH₂Cl₂–MeOH, 8.5:1.5); UV (MeOH): λ_{max} 258 nm (ϵ 6229); IR (KBr, cm⁻¹): 2250 (CN); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 11.48 (br s, 1H, NH), 7.70 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.2$ Hz, H-6), 5.74–5.69 (m, 2H, H-5, OH), 5.66 (d, 1H, $J_{1,2'} = 2.6$ Hz, H-1'), 4.86 (d, 1H, $J = 2.8$ Hz, OH), 4.76 (t, 1H, $J = 5.3$ Hz, OH), 4.01–3.65 (m, 5H, H-3', H-4', H-5', H-6a',b'), 3.47 (dd, 1H, $J_{2,3'} = 5.3$ Hz, H-2'); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.5 MHz): δ 163.2, 149.9, 140.2, 117.6, 101.5, 80.0, 79.6, 67.3, 66.2, 60.9, 36.9. Anal. Calcd for C₁₁H₁₃N₃O₆: C, 46.65; H, 4.63; N, 14.84. Found: C, 46.78; H, 4.58; N, 14.76. ESIMS m/z 284.09 [M+H⁺].

1.4. Synthesis of [1-(β-D-talopyranosyl)uracil]-2'-spiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxathiole-2'',2''-dioxide) (15a) and [1-(β-D-galactopyranosyl)uracil]-2'-spiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxathiole-2'',2''-dioxide) (16a)

1.4.1. 1-(6'-O-*t*-Butyldimethylsilyl-2'-C-cyano-3',4'-O-isopropylidene-2'-O-mesyl-β-D-talopyranosyl)uracil (11a)

The cyanohydrin **5a** (0.37 g, 0.82 mmol) was dissolved in dry pyridine (4.0 mL) and mesyl chloride (0.32 mL, 4.1 mmol) was added. The mixture was stirred at 5–8 °C for 48 h, poured into ice and water, and extracted with chloroform (2 × 15 mL). The combined extracts were washed with 1 N HCl (15 mL), aqueous sodium hydrogen carbonate (15 mL), and brine (15 mL), dried over anhydrous sodium sulfate, filtered, and evaporated to dryness. The residue was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂–MeOH, 9.8:0.2) to give **11a** (0.30 g, 69%) as a colorless oil. $[\alpha]_D^{22} -3$ (c 0.2, CDCl₃); $R_f = 0.52$ (CH₂Cl₂–MeOH, 9.5:0.5); UV (CDCl₃): λ_{max} 256 nm (ϵ 9053); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.47 (br s, 1H, NH), 7.49 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.3$ Hz, H-6), 6.65 (s, 1H, H-1'), 5.80 (d, 1H, H-5), 5.03 (d, 1H, $J_{3,4'} = 6.9$ Hz, H-3'), 4.65 (dd, 1H, $J_{4,5'} = 1.4$ Hz, H-4'), 4.33 (dt, 1H, $J_{5,6a'} = J_{5,6b'} = 6.5$ Hz, H-5'), 3.83–3.79 (m, 2H, H-6a',b'), 3.26 (s, 3H, CH₃SO₂), 1.69, 1.41 (2s, 6H, 2CH₃), 0.89 (s, 9H, *t*-Bu), 0.07, 0.06 (2s, 6H, 2Si-CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 161.6, 150.6, 138.6, 112.4, 112.3, 103.1, 81.5, 79.8, 79.0, 78.4, 72.6, 61.4, 40.3, 25.8, 25.7, 25.1, 18.3, –5.3, –5.4. Anal. Calcd for C₂₁H₃₃N₃O₉SSi: C, 47.44; H, 6.26; N, 7.90. Found: C, 47.32; H, 6.30; N, 7.97. ESIMS m/z 532.16 [M+H⁺].

1.4.2. 1-(6'-O-*t*-Butyldimethylsilyl-2'-C-cyano-3',4'-O-isopropylidene-2'-O-mesyl-β-D-galactopyranosyl)uracil (12a)

The cyanomesylate **12a** was synthesized from **6a** by the similar procedure as described for **11a**. It was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂–MeOH, 9.8:0.2) to give **12a** (0.56 g, 69%) as a colorless oil. $[\alpha]_D^{22} +26$ (c 0.5, CDCl₃); $R_f = 0.45$ (CH₂Cl₂–MeOH, 9.5:0.5); UV (CDCl₃): λ_{max} 256 nm (ϵ 9647); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.64 (br s, 1H, NH), 7.68 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.3$ Hz, H-6), 5.92 (s, 1H, H-1'), 5.83 (d, 1H, H-5), 4.79 (d, 1H, $J_{3,4'} = 6.1$ Hz, H-3'), 4.50 (dd, 1H, $J_{4,5'} = 2.7$ Hz, H-4'), 4.24 (dt, 1H, $J_{5,6a'} = J_{5,6b'} = 6.4$ Hz, H-5'), 4.01–3.89 (m, 2H, H-6a',b'), 3.24 (s, 3H, CH₃SO₂), 1.77, 1.42 (2s,

6H, 2CH₃), 0.89 (s, 9H, *t*-Bu), 0.08, 0.07 (2s, 6H, 2Si-CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 161.7, 150.3, 138.9, 112.9, 112.4, 103.4, 81.8, 79.9, 78.7, 78.6, 72.5, 61.3, 40.2, 25.9, 25.8, 25.0, 18.3, -5.3, -5.4. Anal. Calcd for C₂₁H₃₃N₃O₉SSi: C, 47.44; H, 6.26; N, 7.90. Found: C, 47.51; H, 6.19; N, 7.82. ESIMS *m/z* 532.18 [M+H⁺].

1.4.3. [1-(6'-*O*-*t*-Butyldimethylsilyl-3',4'-*O*-isopropylidene-β-D-talopyranosyl)uracil]-2'-spiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxathiole-2'',2''-dioxide) (13a)

A solution of **11a** (0.3 g, 0.6 mmol) in dry acetonitrile (6.0 mL) was treated with DBU (0.09 mL, 0.6 mmol), and the mixture was stirred at room temperature for 36 h. The solution was neutralized with acetic acid and the solvent was evaporated to dryness. The residue was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂-MeOH, 9.5:0.5) to give **13a** (0.18 g, 60%) as a white foam. [α]_D²² -6 (c 0.4, CDCl₃); R_f = 0.38 (CH₂Cl₂-MeOH, 9.5:0.5); UV (CDCl₃): λ_{max} 253 nm (ε 3429); IR (KBr, cm⁻¹): 3420, 3320 (NH₂), 1665 (C=C-N); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 10.29 (br s, 1H, NH), 7.56 (d, 1H, J_{5,6} = 8.2 Hz, H-6), 6.49 (s, 1H, H-1'), 6.02 (br s, 2H, NH₂-4''), 5.79 (d, 1H, H-5), 5.43 (s, 1H, H-3'), 4.65 (d, 1H, J_{3',4'} = 7.5 Hz, H-3'), 4.48 (d, 1H, H-4'), 4.35 (t, 1H, J_{5',6a'} = J_{5',6b'} = 4.4 Hz, H-5'), 3.84 (d, 2H, H-6a',b'), 1.57, 1.37 (2s, 6H, 2CH₃), 0.92 (s, 9H, *t*-Bu), 0.10, 0.08 (2s, 6H, 2Si-CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 163.9, 153.4, 151.8, 140.4, 112.5, 103.5, 89.1, 83.0, 79.9, 77.3, 75.7, 73.1, 62.5, 25.9, 25.6, 24.6, 17.9, -5.5, -5.8. Anal. Calcd for C₂₁H₃₃N₃O₉SSi: C, 47.44; H, 6.26; N, 7.90. Found: C, 47.62; H, 6.34; N, 7.84. ESIMS *m/z* 532.20 [M+H⁺].

1.4.4. [1-(6'-*O*-*t*-Butyldimethylsilyl-3',4'-*O*-isopropylidene-β-D-galactopyranosyl)uracil]-2'-spiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxathiole-2'',2''-dioxide) (14a)

Spiro derivative **14a** was synthesized from **12a** by the similar procedure as described for **13a**. It was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂-MeOH, 9.5:0.5) to give **14a** (0.39 g, 70%) as a white foam. [α]_D²² +6 (c 0.5, CDCl₃); R_f = 0.37 (CH₂Cl₂-MeOH, 9.5:0.5); UV (CDCl₃): λ_{max} 257 nm (ε 8611); IR (KBr, cm⁻¹): 3455, 3360 (NH₂), 1650 (C=C-N); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 10.94 (br s, 1H, NH), 7.88 (d, 1H, J_{5,6} = 8.1 Hz, H-6), 6.27 (s, 1H, H-1'), 6.04 (s, 1H, H-3'), 5.43 (d, 1H, H-5), 5.35 (br s, 2H, NH₂-4''), 4.61-4.52 (m, 2H, H-3',H-4'), 4.43 (t, 1H, J_{5',6a'} = J_{5',6b'} = 6.1 Hz, H-5'), 3.91-3.81 (m, 2H, H-6a',b'), 1.59, 1.41 (2s, 6H, 2CH₃), 0.91 (s, 9H, *t*-Bu), 0.09 (s, 6H, 2Si-CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 164.7, 151.6, 150.3, 141.4, 110.6, 100.5, 92.9, 83.2, 79.3, 75.7, 73.3, 71.4, 61.8, 26.2, 25.7, 24.9, 18.1, -5.5, -5.6. Anal. Calcd for C₂₁H₃₃N₃O₉SSi: C, 47.44; H, 6.26; N, 7.90. Found: C, 47.52; H, 6.39; N, 7.78. ESIMS *m/z* 532.19 [M+H⁺].

1.4.5. [1-(β-D-Talopyranosyl)uracil]-2'-spiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxathiole-2'',2''-dioxide) (15a)

To a solution of **13a** (0.17 g, 0.32 mmol) in dry CH₂Cl₂ (1.0 mL) was added methanolic hydrogen chloride (2.5 mL), which was obtained from acetyl chloride (0.2 mL) in dry MeOH (5.0 mL) at 0 °C. After completion of the reaction (6 h), the mixture was diluted with MeOH, and treated with an excess of NaHCO₃. The resulting mixture was filtered through Celite and the solvent was evaporated to dryness. The residue was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂-MeOH, 8:2) to give **15a** (0.07 g, 58%) as a white foam. [α]_D²² -26 (c 0.1, DMSO); R_f = 0.22 (CH₂Cl₂-MeOH, 8:2); UV (DMSO): λ_{max} 260 nm (ε 10206); IR (KBr, cm⁻¹): 3420, 3330 (NH₂), 1655 (C=C-N); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 11.23 (br s, 1H, NH), 7.50 (d, 1H, J_{5,6} = 8.2 Hz, H-6), 6.67 (br s, 2H, NH₂-4''), 6.34 (s, 1H, H-1'), 6.18 (br s, 2H, 2OH), 5.58 (d, 1H, H-5), 5.46 (s, 1H, H-3''), 4.72 (br s, 1H, OH), 4.13-3.59 (m, 5H, H-3', H-4', H-5', H-6a',b'); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.5 MHz): δ 163.2, 154.4, 150.5, 142.4, 101.6, 91.3, 86.4, 79.5, 75.4, 73.3, 66.1, 58.4. Anal. Calcd

for C₁₂H₁₅N₃O₉S: C, 38.20; H, 4.01; N, 11.14. Found: C, 38.29; H, 3.92; N, 11.19. ESIMS *m/z* 378.08 [M+H⁺].

1.4.6. [1-(β-D-Galactopyranosyl)uracil]-2'-spiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxathiole-2'',2''-dioxide) (16a)

Spiro derivative **16a** was synthesized from **14a** by the similar procedure as described for **15a**. It was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂-MeOH, 8:2) to give **16a** (0.18 g, 67%) as a white foam. [α]_D²² +36 (c 0.1, DMSO); R_f = 0.21 (CH₂Cl₂-MeOH, 8:2); UV (DMSO): λ_{max} 260 nm (ε 8426); IR (KBr, cm⁻¹): 3400, 3380 (NH₂), 1620 (C=C-N); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 11.19 (br s, 1H, NH), 7.65 (d, 1H, J_{5,6} = 8.2 Hz, H-6), 7.26 (br s, 2H, NH₂-4''), 6.53 (br s, 1H, OH), 5.97 (s, 1H, H-1'), 5.92 (br s, 1H, OH), 5.58 (m, 2H, H-5, H-3''), 4.73 (br s, 1H, OH), 4.21-3.61 (m, 5H, H-3', H-4', H-5', H-6a',b'); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.5 MHz): δ 162.9, 152.8, 150.7, 140.8, 101.8, 92.2, 91.4, 82.2, 81.2, 72.3, 68.7, 60.6. Anal. Calcd for C₁₂H₁₅N₃O₉S: C, 38.20; H, 4.01; N, 11.14. Found: C, 38.46; H, 4.11; N, 11.25. ESIMS *m/z* 378.06 [M+H⁺].

1.5. Synthesis of 1-(2'-*C*-cyano-β-D-talopyranosyl)-5-fluorouracil (7b) and 1-(2'-*C*-cyano-β-D-galactopyranosyl)-5-fluorouracil (8b)

1.5.1. 1-(6'-*O*-*t*-Butyldimethylsilyl-β-D-galactopyranosyl)-5-fluorouracil (2b)

5-Fluorouracil derivative **2b** was synthesized from **1b** by the similar procedure as described for **1a**. It was purified by flash chromatography (EtOAc-MeOH, 9:1) to give **2b** (5.06 g, 83%) as a white solid, mp 136-138 °C. [α]_D²² +7 (c 0.5, MeOH); R_f = 0.60 (EtOAc-MeOH, 8:2); UV (MeOH): λ_{max} 267 nm (ε 4579); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 11.75 (br s, 1H, NH), 8.01 (d, 1H, J_{6,F5} = 7.1 Hz, H-6), 5.33 (d, 1H, J_{1',2'} = 9.0 Hz, H-1'), 5.18 (d, 1H, J = 2.9 Hz, OH), 4.79 (s, 1H, OH), 4.35 (d, 1H, J = 7.4 Hz, OH), 3.82-3.51 (m, 6H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6a',b'), 0.86 (s, 9H, *t*-Bu), 0.03, 0.02 (2s, 6H, 2Si-CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 157.4, 149.9, 140.5, 126.0, 83.6, 78.3, 73.7, 68.9, 68.8, 62.6, 26.2, 18.5, -4.8. Anal. Calcd for C₁₆H₂₇FN₂O₇Si: C, 47.28; H, 6.70; N, 6.89. Found: C, 47.34; H, 6.82; N, 6.96. ESIMS *m/z* 407.15 [M+H⁺].

1.5.2. 1-(6'-*O*-*t*-Butyldimethylsilyl-3',4'-*O*-isopropylidene-β-D-galactopyranosyl)-5-fluorouracil (3b)

5-Fluorouracil derivative **3b** was synthesized from **2b** by the similar procedure as described for **2a**. It was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂-MeOH, 9.5:0.5) to give **3b** (4.70 g, 85%) as a white solid, mp 94-96 °C. [α]_D²² +20 (c 0.5, CDCl₃); R_f = 0.50 (CH₂Cl₂-MeOH, 9:1); UV (CDCl₃): λ_{max} 267 nm (ε 4452); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 9.15 (br s, 1H, NH), 7.51 (d, 1H, J_{6,F5} = 5.9 Hz, H-6), 5.57 (d, 1H, J_{1',2'} = 7.9 Hz, H-1'), 4.33-4.26 (m, 2H, H-3', H-4'), 4.07 (dt, 1H, J_{4',5'} = 2.1 Hz, J_{5',6a'} = J_{5',6b'} = 6.3 Hz, H-5'), 3.92-3.80 (m, 2H, H-6a',b'), 3.74 (dd, 1H, J_{2',3'} = 6.1 Hz, H-2'), 1.56, 1.38 (2s, 6H, 2CH₃), 0.90 (s, 9H, *t*-Bu), 0.08, 0.07 (2s, 6H, 2Si-CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 156.9, 149.7, 140.7, 124.3, 110.2, 83.2, 78.5, 76.2, 72.8, 71.8, 61.8, 27.9, 25.8, 18.3, -5.3, -5.4. Anal. Calcd for C₁₉H₃₁FN₂O₇Si: C, 51.10; H, 7.00; N, 6.27. Found: C, 50.92; H, 7.17; N, 6.21. ESIMS *m/z* 447.21 [M+H⁺].

1.5.3. 1-(6'-*O*-*t*-Butyldimethylsilyl-3',4'-*O*-isopropylidene-β-D-lyxo-hexopyranosyl-2'-ulose)-5-fluorouracil (4b)

5-Fluorouracil derivative **4b** was synthesized from **3b** by the similar procedure as described for **4a**. It was purified by flash chromatography (EtOAc-hexane, 5:5) to give **4b** (3.87 g, 83%) as a white solid, mp 155-157 °C. [α]_D²² -2 (c 0.3, CDCl₃); R_f = 0.50 (EtOAc-hexane, 6:4); UV (CDCl₃): λ_{max} 264 nm (ε 13813); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.46 (br s, 1H, NH), 7.19 (d, 1H,

$J_{6,F5} = 5.7$ Hz, H-6), 6.15 (s, 1H, H-1'), 4.71–4.68 (m, 2H, H-3', H-4'), 4.31 (t, 1H, $J_{5',6a'} = J_{5',6b'} = 6.7$ Hz, H-5'), 3.89 (d, 2H, H-6a',b'), 1.48, 1.42 (2s, 6H, 2CH₃), 0.91 (s, 9H, *t*-Bu), 0.09 (s, 6H, 2Si-CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 198.0, 156.2, 148.9, 140.6, 128.6, 111.4, 82.7, 77.7, 76.4, 76.3, 61.4, 27.3, 26.0, 25.8, 18.3, -5.4, -5.5. Anal. Calcd for C₁₉H₂₉FN₂O₇Si: C, 51.34; H, 6.58; N, 6.30. Found: C, 51.42; H, 6.72; N, 6.22. ESIMS *m/z* 445.20 [M+H⁺].

1.5.4. 1-(6'-*O*-*t*-Butyldimethylsilyl-2'-*C*-cyano-3',4'-*O*-isopropylidene- β -D-talopyranosyl)-5-fluorouracil (**5b**) and 1-(6'-*O*-*t*-butyldimethylsilyl-2'-*C*-cyano-3',4'-*O*-isopropylidene- β -D-galactopyranosyl)-5-fluorouracil (**6b**)

The cyanohydrins **5b** and **6b** were synthesized from **4b** by the similar procedure as described for **5a** and **6a**. The residue was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂–EtOAc, 7:3).

The fastest moving fractions afforded **5b** (1.03 g, 25%) as a white foam. $[\alpha]_D^{22} +2$ (c 0.6, CDCl₃); $R_f = 0.41$ (CH₂Cl₂–EtOAc, 7:3); UV (CDCl₃): λ_{max} 261 nm (ϵ 7775); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.72 (br s, 1H, NH), 7.55 (d, 1H, $J_{6,F5} = 5.3$ Hz, H-6), 6.08 (s, 1H, H-1'), 5.78 (br s, 1H, 2'-OH), 4.56–4.48 (m, 2H, H-3', H-4'), 4.42 (dt, 1H, $J_{4',5'} = 1.9$ Hz, $J_{5',6a'} = J_{5',6b'} = 6.5$ Hz, H-5'), 3.81–3.79 (m, 2H, H-6a',b'), 1.62, 1.39 (2s, 6H, 2CH₃), 0.90 (s, 9H, *t*-Bu), 0.08, 0.07 (2s, 6H, 2Si-CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 157.4, 148.7, 139.8, 127.0, 116.5, 111.5, 79.2, 75.6, 73.6, 71.5, 70.6, 62.1, 26.4, 25.8, 24.1, 18.3, -5.4, -5.6. Anal. Calcd for C₂₀H₃₀FN₃O₇Si: C, 50.94; H, 6.41; N, 8.91. Found: C, 50.81; H, 6.52; N, 8.85. ESIMS *m/z* 472.19 [M+H⁺].

The slowest moving fractions afforded **6b** (2.29 g, 56%) as a white foam. $[\alpha]_D^{22} +7$ (c 0.2, CDCl₃); $R_f = 0.27$ (CH₂Cl₂–EtOAc, 7:3); UV (CDCl₃): λ_{max} 263 nm (ϵ 13813); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 9.47 (br s, 1H, NH), 7.85 (d, 1H, $J_{6,F5} = 6.1$ Hz, H-6), 5.77 (s, 1H, H-1'), 5.00 (br s, 1H, 2'-OH), 4.52 (d, 1H, $J_{3',4'} = 6.3$ Hz, H-3'), 4.43 (dd, 1H, $J_{4',5'} = 2.6$ Hz, H-4'), 4.22–4.18 (m, 1H, H-5'), 4.02–3.88 (m, 2H, H-6a',b'), 1.73, 1.41 (2s, 6H, 2CH₃), 0.91 (s, 9H, *t*-Bu), 0.10, 0.09 (2s, 6H, 2Si-CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 157.3, 149.0, 139.9, 126.3, 116.7, 111.6, 79.3, 75.3, 73.7, 71.2, 70.8, 62.3, 26.5, 25.4, 24.6, 18.2, -5.4, -5.6. Anal. Calcd for C₂₀H₃₀FN₃O₇Si: C, 50.94; H, 6.41; N, 8.91. Found: C, 51.03; H, 6.44; N, 8.97. ESIMS *m/z* 472.21 [M+H⁺].

1.5.5. 1-(2'-*C*-Cyano- β -D-talopyranosyl)-5-fluorouracil (**7b**)

5-Fluorouracil derivative **7b** was synthesized from **5b** by the similar procedure as described for **7a**. It was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂–MeOH, 9:1) to give **7b** (0.17 g, 74%) as a white foam. $[\alpha]_D^{22} -2$ (c 0.4, MeOH); $R_f = 0.29$ (CH₂Cl₂–MeOH, 8.5:1.5); UV (MeOH): λ_{max} 266 nm (ϵ 3192); IR (KBr, cm⁻¹): 2240 (CN); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 11.98 (br s, 1H, NH), 7.80 (d, 1H, $J_{6,F5} = 7.2$ Hz, H-6), 7.62 (s, 1H, H-1'), 6.36 (d, 1H, $J = 5.6$ Hz, OH), 6.21 (s, 1H, OH), 5.28 (d, 1H, $J = 4.8$ Hz, OH), 4.72 (t, 1H, $J = 5.2$ Hz, OH), 4.07–3.92 (m, 4H, H-3', H-4', H-5', H-6a'), 3.64 (dd, 1H, $J_{5',6b'} = 5.7$ Hz, $J_{6a',6b'} = 12.8$ Hz, H-6b'); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.5 MHz): δ 157.3, 149.6, 140.8, 124.7, 118.6, 82.7, 80.4, 73.9, 72.6, 68.2, 60.6. Anal. Calcd for C₁₁H₁₂FN₃O₇: C, 41.65; H, 3.81; N, 13.25. Found: C, 41.54; H, 3.76; N, 13.35. ESIMS *m/z* 318.08 [M+H⁺].

1.5.6. 1-(2'-*C*-Cyano- β -D-galactopyranosyl)-5-fluorouracil (**8b**)

5-Fluorouracil derivative **8b** was synthesized from **6b** by the similar procedure as described for **7a**. It was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂–MeOH, 9:1) to give **8b** (0.40 g, 78%) as a white foam. $[\alpha]_D^{22} +8$ (c 0.2, MeOH); $R_f = 0.29$ (CH₂Cl₂–MeOH, 8.5:1.5); UV (MeOH): λ_{max} 266 nm (ϵ 6595); IR (KBr, cm⁻¹): 2235 (CN); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 11.89 (br s, 1H, NH), 7.81 (d, 1H, $J_{6,F5} = 7.0$ Hz, H-6), 7.04 (s, 1H, H-1'), 5.74 (s, 1H, OH), 5.60 (s, 1H, OH), 4.85 (s, 1H, OH), 4.66 (s, 1H, OH), 3.91–3.61

(m, 5H, H-3', H-4', H-5', H-6a',b'); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.5 MHz): δ 159.3, 150.4, 140.7, 128.8, 117.9, 101.2, 81.1, 76.4, 68.3, 66.8, 61.2. Anal. Calcd for C₁₁H₁₂FN₃O₇: C, 41.65; H, 3.81; N, 13.25. Found: C, 41.62; H, 3.90; N, 13.39. ESIMS *m/z* 318.10 [M+H⁺].

1.6. Synthesis of 1-(2'-*C*-cyano-2'-deoxy- β -D-talopyranosyl)-5-fluorouracil (**10b**)

1.6.1. 1-(6'-*O*-*t*-Butyldimethylsilyl-2'-*C*-cyano-2'-deoxy-3',4'-*O*-isopropylidene- β -D-talopyranosyl)-5-fluorouracil (**9b**)

5-Fluorouracil derivative **9b** was synthesized from **5b** or **6b** by the similar procedure as described for **9a**. It was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂–MeOH, 9.8:0.2) to give **9b** (0.21 g, 64% from **5b** or 0.22 g, 67% from **6b**) as a colorless oil. $[\alpha]_D^{22} -2$ (c 0.2, CDCl₃); $R_f = 0.36$ (CH₂Cl₂–MeOH, 9.8:0.2); UV (CDCl₃): λ_{max} 264 nm (ϵ 4259); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 9.01 (br s, 1H, NH), 7.83 (d, 1H, $J_{6,F5} = 5.9$ Hz, H-6), 5.59 (d, 1H, $J_{1',2'} = 1.8$ Hz, H-1'), 4.59 (t, 1H, $J_{2',3'} = J_{3',4'} = 6.5$ Hz, H-3'), 4.30 (dd, 1H, $J_{4',5'} = 2.4$ Hz, H-4'), 4.10–3.89 (m, 3H, H-5', H-6a',b'), 3.67 (dd, 1H, H-2'), 1.74, 1.39 (2s, 6H, 2CH₃), 0.90 (s, 9H, *t*-Bu), 0.10 (s, 6H, 2Si-CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 157.3, 148.9, 141.0, 127.2, 116.5, 111.3, 79.4, 75.8, 73.5, 71.6, 62.1, 36.9, 26.2, 25.3, 24.9, 18.2, -5.4, -5.6. Anal. Calcd for C₂₀H₃₀FN₃O₆Si: C, 52.73; H, 6.64; N, 9.22. Found: C, 52.60; H, 6.72; N, 9.33. ESIMS *m/z* 456.22 [M+H⁺].

1.6.2. 1-(2'-*C*-Cyano-2'-deoxy- β -D-talopyranosyl)-5-fluorouracil (**10b**)

5-Fluorouracil derivative **10b** was synthesized from **9b** by the similar procedure as described for **10a**. It was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂–MeOH, 9:1) to give **10b** (0.11 g, 79%) as a white foam. $[\alpha]_D^{22} -40$ (c 0.2, MeOH); $R_f = 0.33$ (CH₂Cl₂–MeOH, 8.5:1.5); UV (MeOH): λ_{max} 264 nm (ϵ 7366); IR (KBr, cm⁻¹): 2220 (CN); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 12.15 (br s, 1H, NH), 7.92 (d, 1H, $J_{6,F5} = 7.0$ Hz, H-6), 5.77 (br s, 1H, OH), 5.66 (d, 1H, $J_{1',2'} = 1.7$ Hz, H-1'), 4.96 (d, 1H, $J = 3.9$ Hz, OH), 4.85 (t, 1H, $J = 5.5$ Hz, OH), 3.99–3.61 (m, 5H, H-3', H-4', H-5', H-6a',b'), 3.49 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 5.3$ Hz, H-2'); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.5 MHz): δ 158.4, 149.8, 140.3, 127.9, 118.9, 81.6, 76.7, 75.0, 73.2, 65.1, 37.8. Anal. Calcd for C₁₁H₁₂FN₃O₆: C, 43.86; H, 4.02; N, 13.95. Found: C, 43.94; H, 4.13; N, 13.73. ESIMS *m/z* 302.10 [M+H⁺].

1.7. Synthesis of [1-(β -D-talopyranosyl)-5-fluorouracil]-2'-spiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxathiole-2'',2''-dioxide) (**15b**)

1.7.1. 1-(6'-*O*-*t*-Butyldimethylsilyl-2'-*C*-cyano-3',4'-*O*-isopropylidene-2'-*O*-mesyl- β -D-talopyranosyl)-5-fluorouracil (**11b**)

The cyanomesylate **11b** was synthesized from **5b** by the similar procedure as described for **11a**. It was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂–MeOH, 9.8:0.2) to give **11b** (0.27 g, 68%) as a colorless oil. $[\alpha]_D^{22} +2$ (c 0.2, CDCl₃); $R_f = 0.54$ (CH₂Cl₂–MeOH, 9.5:0.5); UV (CDCl₃): λ_{max} 263 nm (ϵ 8012); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.16 (br s, 1H, NH), 7.53 (d, 1H, $J_{6,F5} = 6.2$ Hz, H-6), 6.62 (s, 1H, H-1'), 5.05 (d, 1H, $J_{3',4'} = 6.8$ Hz, H-3'), 4.66 (dd, 1H, $J_{4',5'} = 1.4$ Hz, H-4'), 4.34 (dt, 1H, $J_{5',6a'} = J_{5',6b'} = 6.2$ Hz, H-5'), 3.84–3.82 (m, 2H, H-6a',b'), 3.28 (s, 3H, CH₃SO₂), 1.69, 1.42 (2s, 6H, 2CH₃), 0.91 (s, 9H, *t*-Bu), 0.09 (s, 6H, 2Si-CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 156.4, 149.2, 140.7, 123.6, 112.9, 112.3, 81.1, 80.2, 78.8, 78.4, 72.7, 61.4, 39.9, 25.8, 25.7, 24.9, 18.4, -5.3, -5.4. Anal. Calcd for C₂₁H₃₂FN₃O₉SSi: C, 45.89; H, 5.87; N, 7.64. Found: C, 45.71; H, 5.96; N, 7.54. ESIMS *m/z* 550.17 [M+H⁺].

1.7.2. 1-(6'-O-*t*-Butyldimethylsilyl-2'-C-cyano-3',4'-O-isopropylidene-2'-O-mesyl-β-D-galactopyranosyl)-5-fluorouracil (**12b**)

The cyanomesylate **12b** was synthesized from **6b** by the similar procedure as described for **11a**. It was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂–MeOH, 9.8:0.2) to give **12b** (0.52 g, 59%) as a colorless oil. $[\alpha]_D^{22} +12$ (c 0.3, CDCl₃); $R_f = 0.48$ (CH₂Cl₂–MeOH, 9.5:0.5); UV (CDCl₃): λ_{max} 262 nm (ϵ 3678); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.59 (br s, 1H, NH), 7.75 (d, 1H, $J_{6,F5} = 5.9$ Hz, H-6), 5.93 (s, 1H, H-1'), 4.81 (d, 1H, $J_{3',4'} = 6.1$ Hz, H-3'), 4.50 (dd, 1H, $J_{4',5'} = 2.3$ Hz, H-4'), 4.23–4.18 (m, 1H, H-5'), 4.02–3.89 (m, 2H, H-6a',b'), 3.26 (s, 3H, CH₃SO₂), 1.77, 1.43 (2s, 6H, 2CH₃), 0.90 (s, 9H, *t*-Bu), 0.09 (s, 6H, 2Si-CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 156.5, 149.2, 140.8, 123.6, 112.9, 112.4, 81.8, 79.8, 78.6, 78.5, 72.5, 61.3, 40.2, 25.9, 25.8, 24.9, 18.3, –5.4, –5.5. Anal. Calcd for C₂₁H₃₂FN₃O₉SSi: C, 45.89; H, 5.87; N, 7.64. Found: C, 45.82; H, 5.94; N, 7.73. ESIMS m/z 550.15 [M+H⁺].

1.7.3. [1-(6'-O-*t*-Butyldimethylsilyl-3',4'-O-isopropylidene-β-D-talopyranosyl)-5-fluorouracil]-2'-spiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxathiole-2'',2''-dioxide) (**13b**)

Spiro derivative **13b** was synthesized from **11b** by the similar procedure as described for **13a**. It was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂–MeOH, 9.5:0.5) to give **13b** (0.20 g, 74%) as a white foam. $[\alpha]_D^{22} -22$ (c 0.5, CDCl₃); $R_f = 0.40$ (CH₂Cl₂–MeOH, 9.5:0.5); UV (CDCl₃): λ_{max} 265 nm (ϵ 7399); IR (KBr, cm⁻¹): 3410, 3360 (NH₂), 1620 (C=C–N); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 10.61 (br s, 1H, NH), 7.68 (d, 1H, $J_{6,F5} = 6.0$ Hz, H-6), 6.47 (s, 1H, H-1'), 5.86 (br s, 2H, NH₂-4''), 5.45 (s, 1H, H-3''), 4.65 (d, 1H, $J_{3',4'} = 7.5$ Hz, H-3''), 4.48 (d, 1H, H-4''), 4.36 (t, 1H, $J_{5',6a'} = J_{5',6b'} = 4.6$ Hz, H-5''), 3.86 (d, 2H, H-6a',b'), 1.58, 1.38 (2s, 6H, 2CH₃), 0.93 (s, 9H, *t*-Bu), 0.12, 0.10 (2s, 6H, 2Si-CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 157.9, 153.2, 150.5, 141.3, 124.8, 112.6, 89.4, 82.9, 80.4, 77.3, 75.7, 72.9, 62.6, 25.9, 25.6, 24.6, 18.7, –5.6, –5.7. Anal. Calcd for C₂₁H₃₂FN₃O₉SSi: C, 45.89; H, 5.87; N, 7.64. Found: C, 45.99; H, 5.81; N, 7.70. ESIMS m/z 550.19 [M+H⁺].

1.7.4. [1-(β-D-Talopyranosyl)-5-fluorouracil]-2'-spiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxathiole-2'',2''-dioxide) (**15b**)

Spiro derivative **15b** was synthesized from **13b** by the similar procedure as described for **15a**. It was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂–MeOH, 8:2) to give **15b** (0.08 g, 59%) as a white foam. $[\alpha]_D^{22} -12$ (c 0.1, DMSO); $R_f = 0.24$ (CH₂Cl₂–MeOH, 8:2); UV (DMSO): λ_{max} 263 nm (ϵ 2532); IR (KBr, cm⁻¹): 3450, 3320 (NH₂), 1655 (C=C–N); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 11.61 (br s, 1H, NH), 7.69 (d, 1H, $J_{6,F5} = 7.3$ Hz, H-6), 6.69 (s, 1H, H-1'), 6.32 (br s, 2H, NH₂-4''), 6.19 and 6.15 (2 br s, 2H, 2OH), 5.47 (s, 1H, H-3''), 4.66 (br s, 1H, OH), 4.16–3.59 (m, 5H, H-3', H-4', H-5', 6-a',b''); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.5 MHz): δ 162.3, 158.7, 150.4, 140.8, 126.5, 90.8, 86.2, 79.1, 75.2, 70.4, 66.5, 62.5. Anal. Calcd for C₁₂H₁₄FN₃O₉S: C, 36.46; H, 3.57; N, 10.63. Found: C, 36.52; H, 3.68; N, 10.78. ESIMS m/z 396.05 [M+H⁺].

1.8. Antiproliferative assays

The cytostatic effects of the test compounds on murine leukemia cells (L1210), human T-lymphocyte cells (CEM), and human cervix carcinoma cells (HeLa) were evaluated as follows: an appropriate number of cells suspended in growth medium were allowed to proliferate in 200 μL-wells of 96-well-microtiter plates in the presence of variable amounts of test compounds at 37 °C in a humidified CO₂-controlled atmosphere. After 48 h (L1210), 72 h (CEM), or 96 h (HeLa), the number of cells was counted in a Coulter

counter. The IC₅₀ value was defined as the compound concentration required to inhibit cell proliferation by 50%.

Acknowledgments

This work was supported in part by the Postgraduate Programmes 'Biotechnology-Quality assessment in Nutrition and the Environment', 'Application of Molecular Biology-Molecular Genetics-Molecular Markers', Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly. The biological experiments were supported by the KU Leuven (GOA 10/014). We are grateful to Mrs. Lizette van Berckelaer, Mrs. Leentje Persoons and Mrs. Frieda De Meyer for excellent technical assistance.

References

- Jordheim, L. P.; Durantel, D.; Zoulim, F.; Dumontet, C. *Nat. Rev. Drug Disc.* **2013**, *12*, 447–464.
- Galmarini, C. M.; Mackey, J. R.; Dumontet, C. *Lancet Oncol.* **2002**, *3*, 415–424.
- De Clercq, E. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1438–1450.
- Manta, S.; Kiritis, C.; Dimopoulou, A.; Parmenopoulou, V.; Kollatos, N.; Tsoinisi, A.; Komiotis, D. *Anti-Infect. Agents* **2014**, *12*.
- Galmarini, C. M.; Mackey, J. R.; Dumontet, C. *Leukemia* **2001**, *15*, 875–890.
- Ichikawa, E.; Kato, K. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 385–423.
- Li, N.-S.; Lu, J.; Piccirilli, J. A. *Org. Prep. Proced. Int.* **2010**, *42*, 191–283.
- Camarasa, M. J.; Diaz-Ortiz, A.; Calvo-Mateo, A.; De las Heras, F. G.; Balzarini, J.; De Clercq, E. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1732–1738.
- Azuma, A.; Nakajima, Y.; Nishizono, N.; Minakawa, N.; Suzuki, M.; Hanaoka, K.; Kobayashi, T.; Tanaka, M.; Sasaki, T.; Matsuda, A. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 4183–4189.
- Camarasa, M. J.; Pérez-Pérez, M. J.; San-Félix, A.; Balzarini, J.; De Clercq, E. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 2721–2727.
- Bonache, M. C.; Chamorro, C.; Velázquez, S.; De Clercq, E.; Balzarini, J.; Barrios, F. R.; Gago, F.; Camarasa, M. J.; San-Félix, A. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6653–6660.
- Boivin, T. L. B. *Tetrahedron* **1987**, *43*, 3309–3362.
- Tronchet, J. M. J.; Kovacs, I.; Seman, M.; Dilda, P.; De Clercq, E.; Balzarini, J. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2000**, *19*, 775–794.
- De Castro, S.; Peromingo, M. T.; Naensens, L.; Andrei, G.; Snoeck, R.; Balzarini, J.; Velázquez, S.; Camarasa, M. J. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 5823–5832.
- Moura, M.; Josse, S.; Nguyen Van Nhen, A.; Fournier, C.; Duverlie, G.; Castelain, S.; Soriano, E.; Marco-Contelles, J.; Balzarini, J.; Postel, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 5046–5056.
- Tsoukala, E.; Manta, S.; Kiritis, C.; Komiotis, D. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2012**, *12*, 255–275.
- Dimopoulou, A.; Manta, S.; Kiritis, C.; Gkaragkouni, D. N.; Papisotiriou, I.; Balzarini, J.; Komiotis, D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 1330–1333.
- Verheggen, I.; Van Aerschot, A.; Toppet, S.; Snoeck, R.; Janssen, G.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Herdewijn, P. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2033–2040.
- Verheggen, I.; Van Aerschot, A.; Van Meervelt, L.; Rozenski, J.; Wiebe, L.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Balzarini, J.; Claes, P.; De Clercq, E.; Herdewijn, P. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 826–835.
- Spanou, C.; Manta, S.; Komiotis, D.; Dervishi, A.; Kouretas, D. *Int. J. Mol. Sci.* **2007**, *8*, 695–704.
- Haouz, A.; Vanheusden, V.; Munier-Lechman, H.; Froeyen, M.; Herdewijn, P.; Van Galenbergh, S.; Delarue, M. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 4963–4971.
- Kiritis, C.; Manta, S.; Parmenopoulou, V.; Balzarini, J.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 5668–5674.
- Kiritis, C.; Manta, S.; Parmenopoulou, V.; Dimopoulou, A.; Kollatos, N.; Papisotiriou, I.; Balzarini, J.; Komiotis, D. *Carbohydr. Res.* **2012**, *364*, 8–14.
- Kondo, T.; Goto, T. *Agric. Biol. Chem.* **1971**, *35*, 625–628.
- Haeckel, R.; Weber, K.; Germann, C.; Haberkorn, U.; Zeisler, S.; Eisenbarth, J.; Wiessler, M.; Oberdorfer, F. *J. Labelled Comp. Rad.* **1996**, *38*, 1061–1070.
- Agelis, G.; Tzioumaki, N.; Botič, T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 5448–5456.
- Abraham, R. J.; Reid, M. *Magn. Reson. Chem.* **2000**, *38*, 570–579.
- Martin, N. H.; Nance, K. H. *J. Mol. Graph. Model.* **2002**, *21*, 51–56.
- Rouillard, M.; Geribaldi, S.; Khazarian, J.; Azzaro, M. *Org. Magn. Reson.* **1980**, *13*, 323–327.
- Chatgililoglu, C.; Lalevée, J. *Molecules* **2012**, *17*, 527–555.
- Velázquez, S.; Jimeno, M. L.; Camarasa, M. J.; Balzarini, J. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 11013–11022.
- Perez-Perez, M. J.; Camarasa, M. J.; Diaz-Ortiz, A.; San-Félix, A.; De las Heras, F. G. *Carbohydr. Res.* **1991**, *216*, 399–411.
- Khan, A. T.; Mondal, E. *Synlett* **2003**, 694–698.
- Tzioumaki, N.; Tsoukala, E.; Manta, S.; Kiritis, C.; Balzarini, J.; Komiotis, D. *Carbohydr. Res.* **2011**, *346*, 328–333.