



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ Ι: ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ
ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΩΝ
ΚΙΝΑΖΟΛΙΝΟΝΩΝ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ
ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥΣ ΜΕ
ΤΟ DNA

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΠΕΤΡΙΔΗ ΜΑΡΙΝΑ-ΘΕΟΔΩΡΑ

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Αναστασία Δέτση

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

| Αθήνα, 2021 |

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε κατά την περίοδο 2020 – 2021 στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ, υπό την επίβλεψη της Αναπλ. Καθ. Αναστασίας Δέτση.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Δέτση που μου έδωσε την ευκαιρία να γνωρίσω τον χώρο της συνθετικής χημείας, αποκομίζοντας πληθώρα γνώσεων κατά την ενασχόλησή μου με ένα ιδιαίτερο και πολύ ενδιαφέρον θέμα. Στο εγχείρημά μου αυτό, καίριο ρόλο κατέχει η υποψήφια διδάκτορας Μπαϊρακτάρη Μαρία, η οποία γεμάτη αισιοδοξία και όρεξη με βοήθησε σε κάθε μου βήμα. Παράλληλα, δεν θα ήθελα να παραλείψω να ευχαριστήσω θερμά ολόκληρη την ομάδα του εργαστηρίου τόσο για την συμβολή του, όσο και για την πολύ καλή συνεργασία που είχαμε. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Εργαστήριο Οργανικής Χημείας στο Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, και ιδιαίτερα την κα Φυλακτακίδου, που με την βοήθειά τους πραγματοποιήθηκαν ορισμένες εκ των αναλύσεων βιολογικής δράσης των υπό μελέτη ενώσεων.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	1
Περιεχόμενα	2
Περίληψη	6
Abstract	8
Graphical abstract.....	10
Κατάλογος Σχημάτων	11
Κατάλογος Εικόνων	13
Κατάλογος Πινάκων	17
1. Κιναζολινόνες	19
1.1. Γενικά	19
1.2. Δομή	20
1.3. Μέθοδοι σύνθεσης.....	22
1.4. Διαθέσιμα φάρμακα στην αγορά	25
1.5. Βιολογική δράση	30
2. Μικροκυματική ακτινοβολία.....	34
2.1. Γενικά	34
2.2. Ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία.....	34
2.3. Θέρμανση με χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας.....	34
2.4. Διηλεκτρικές ιδιότητες.....	36
2.5. Πλεονεκτήματα μικροκυματικής ακτινοβολίας έναντι συμβατικών μεθόδων σύνθεσης.....	37
2.6. Εφαρμογές.....	39
3. Αλληλεπίδραση ενώσεων με το DNA.....	40
3.1. Γενικά	40
3.2. Υπολογιστική μελέτη (Μοριακή μοντελοποίηση – molecular docking).....	43
3.3. Παρεμβολή (DNA intercalation)	46
3.4. Δέσμευση στη μικρή ή στη μεγάλη αύλακα (minor or major groove binding).....	48
3.5. Φαρμακευτικές ενώσεις που αλληλεπιδρούν με το DNA.....	50

3.5.1.	Μόρια παρεμβολείς (intercalating agents).....	50
3.5.2.	Μόρια δέσμευσης στη μικρή αύλακα (DNA minor groove binders) ...	53
3.5.3.	Μόρια δέσμευσης στη μεγάλη αύλακα (DNA major groove binders).	56
4.	Φωτοδιασπαστική ικανότητα ενώσεων	59
4.1.	Γενικά	59
4.2.	Φωτοδυναμική θεραπεία (PDT).....	60
4.3.	Είδη φωτοευαισθητοποιητών (Photosensitizers).....	62
5.	Σκοπός.....	67
6.	Πειραματική διαδικασία.....	68
6.1.	Τεχνικές – εξοπλισμός – μέθοδοι ταυτοποίησης.....	68
6.1.1.	Διήθηση	68
6.1.2.	Ανακρυστάλλωση.....	68
6.1.3.	Συμπύκνωση	68
6.1.4.	Εκχύλιση.....	69
6.1.5.	Θέρμανση με χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας (MW)	70
6.1.6.	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC).....	71
6.1.7.	Προσδιορισμός σημείου τήξεως.....	72
6.1.8.	Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού H – NMR.....	73
6.1.9.	Φασματομετρία μάζας (MS).....	73
6.2.	Σύνθεση.....	74
6.2.1.	2-Μεθυλο-4H-βενζο[d][1,3]οξαζιν-4-όνες	74
6.2.1.1.	Γενική μέθοδος σύνθεσης	74
6.2.1.2.	6-βρωμο-2-μεθυλο-4H-βενζο[d][1,3]οξαζιν-4-όνη.....	75
6.2.1.3.	6-χλωρο-2-μεθυλο-4H-βενζο[d][1,3]οξαζιν-4-όνη.....	75
6.2.1.4.	6-μεθοξυ-2-μεθυλο-4H-βενζο[d][1,3]οξαζιν-4-όνη	75
6.2.1.5.	6-ιωδο-2-μεθυλο-4H-βενζο[d][1,3]οξαζιν-4-όνη	76
6.2.1.6.	6,7-διμεθοξυ-2-μεθυλο-4H-βενζο[d][1,3]οξαζιν-4-όνη	76
6.2.1.7.	2-μεθυλο-4H-βενζο[d][1,3]οξαζιν-4-όνη.....	76
6.2.1.8.	2-μεθυλο-6-νιτρο-4H-βενζο[d][1,3]οξαζιν-4-όνη.....	76
6.2.2.	3-Αμινο-Κιναζολιν-4(3H)-όνες	77

6.2.2.1.	Γενική μέθοδος σύνθεσης	77
6.2.2.2.	3-αμινο-6-βρωμο-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3H)-όνη	78
6.2.2.3.	3-αμινο-6-χλωρο-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3H)-όνη	78
6.2.2.4.	3-αμινο-6-μεθοξυ-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3H)-όνη	78
6.2.2.5.	3-αμινο-6-ιωδο-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3H)-όνη	79
6.2.2.6.	3-αμινο-6,7-διμεθοξυ-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3H)-όνη	79
6.2.2.7.	3-αμινο-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3H)-όνη	79
6.2.2.8.	3-αμινο-2-μεθυλο-6-νιτρο-κιναζολιν-4(3H)-όνη	80
6.2.3.	Κιναζολινικά παράγωγα - Ακεταμίδια	81
6.2.3.1.	Γενική μέθοδος σύνθεσης Α	81
6.2.3.1.1.	<i>N</i> -(6-βρωμο-2-μεθυλο-4-οξοκιναζολιν-3(4H)-υλ) ακεταμίδιο	82
6.2.3.1.2.	<i>N</i> -(6-χλωρο-2-μεθυλο-4-οξοκιναζολιν-3(4H)-υλ) ακεταμίδιο	82
6.2.3.1.3.	<i>N</i> -(6-μεθοξυ-2-μεθυλο-4-οξοκιναζολιν-3(4H)-υλ) ακεταμίδιο	82
6.2.3.1.4.	<i>N</i> -(6-ιωδο-2-μεθυλο-4-οξοκιναζολιν-3(4H)-υλ) ακεταμίδιο	83
6.2.3.1.5.	<i>N</i> -(6,7-διμεθοξυ-2-μεθυλο-4-οξοκιναζολιν-3(4H)-υλ) ακεταμίδιο	83
6.2.3.1.6.	<i>N</i> -(2-μεθυλο-4-οξοκιναζολιν-3(4H)-υλ) ακεταμίδιο	84
6.2.3.1.7.	<i>N</i> -(2-μεθυλο-6-νιτρο-4-οξοκιναζολιν-3(4H)-υλ) ακεταμίδιο	84
6.2.3.2.	Γενική μέθοδος σύνθεσης Β	85
6.2.3.2.1.	<i>N</i> -(6-ιωδο-2-μεθυλο-4-οξοκιναζολιν-3(4H)-υλ) ακεταμίδιο	86
6.2.3.2.2.	<i>N</i> -(6,7-διμεθοξυ-2-μεθυλο-4-οξοκιναζολιν-3(4H)-υλ) ακεταμίδιο	86
6.3.	Ταυτοποίηση ενώσεων	87
6.3.1.	Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)	87
6.4.	Μελέτη βιολογικής δράσης	87
6.4.1.	Υπολογιστική μελέτη (Molecular docking)	87
6.4.2.	Τιτλοδότηση ορατού - υπεριώδους	87
6.4.3.	Φωτοβόληση ενώσεων παρουσία πλασμιδιακού DNA	89
7.	Αποτελέσματα – Συζήτηση	92
7.1.	Ταυτοποίηση ενώσεων	92
7.1.1.	Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)	92
7.1.2.	Φασματομετρία μάζας (MS)	95

7.2.	Μελέτη βιολογικής δράσης	98
7.2.1.	Υπολογιστική μελέτη (Molecular docking).....	98
7.2.2.	Τιτλοδότηση ορατού – υπεριώδους.....	102
7.2.3.	Φωτοβόληση ενώσεων παρουσία πλασμιδιακού DNA.....	106
7.2.3.1.	Φωτηβόληση UVB	106
7.2.3.2.	Φωτοβόληση UVA	108
8.	Συμπεράσματα	110
8.1.	Σύνθεση.....	110
8.2.	Βιολογική δράση	110
8.3.	Εργασία υπό εξέλιξη	111
9.	Προτάσεις για μελλοντική έρευνα	113
Παράρτημα I: Κατάλογος ενώσεων		116
Παράρτημα II: Φάσματα ^1H - NMR.....		120
Παράρτημα III: Φάσματα UV-Vis.....		127
Παράρτημα IV: Φάσματα MS		133
Βιβλιογραφία.....		135

Περίληψη

Οι κιναζολινόνες αποτελούν μια από τις σημαντικότερες κατηγορίες ετεροκυκλικών ενώσεων, με πληθώρα βιολογικών ιδιοτήτων, όπως αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις, αναλγητικές, ηρεμιστικές και άλλες.

Με την πάροδο του χρόνου, γίνονται προσπάθειες ανάπτυξης νέων φαρμακευτικών ουσιών, με ολοένα και πιο φιλικές προς το περιβάλλον μεθόδους σύνθεσης. Μια εξ αυτών είναι η χρήση τεχνικών υψηλής ενέργειας όπως θέρμανση με χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας (Microwave Assisted Organic Synthesis – MAOS), κατάλληλη για την ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών ουσιών με ταχύτερες αντιδράσεις και κατ' επέκταση μικρότερη απαιτούμενη ενέργεια, υψηλότερες αποδόσεις και αυξημένη καθαρότητα προϊόντων.

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, πραγματοποιείται σύνθεση και χαρακτηρισμός νέων βιοδραστικών κιναζολινικών παραγώγων. Συγκεκριμένα, συντέθηκαν 9 μόρια κιναζολινονών με χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας σε δύο στάδια και 7 μόρια κιναζολινικών παραγώγων με ακεταμιδομάδα με συμβατική θέρμανση. Σημειώνεται ότι, η δεύτερη μέθοδος σύνθεσης ακεταμιδίων, δηλαδή η χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας, απαιτεί βελτιστοποίηση παραγόντων, όπως αύξηση του χρόνου αντίδρασης, αλλαγή της αναλογίας των αντιδρώντων, αλλαγή της απαιτούμενης δοθείσας ενέργειας, προκειμένου να βελτιστοποιηθούν τόσο οι αποδόσεις, όσο και η καθαρότητα των προϊόντων. Εν συνεχεία, αναφέρεται ότι, σε πρώιμο στάδιο βρίσκεται η ανακάλυψη νέων υβριδικών μορίων της μορφής κιναζολινόνη – χαλκόνη και κιναζολινόνη – φαινολικά οξέα.

Επόμενος σταθμός, αποτέλεσε η αξιολόγηση της βιολογικής δράσης των παραπάνω μορίων, τόσο σε θεωρητικό επίπεδο μέσω υπολογιστικής μελέτης (molecular docking), όσο και σε πειραματικό με αξιολόγηση της ικανότητάς τους να αλληλεπιδρούν με το DNA με δύο μεθόδους: α) μέσω τιτλοδότησης ορατού – υπεριώδους (UV-Vis Titration) και β) με μελέτη της ικανότητας των ενώσεων να δρουν ως φωτοδιασπαστές στο DNA (DNA photocleavage activity). Από τα αποτελέσματα, συνδυαστικά, τόσο της υπολογιστικής μελέτης, όσο και της τιτλοδότησης ορατού – υπεριώδους, μελετώντας παράγοντες όπως η φύση της υποκατάστασης και διάφορες συγκεντρώσεις, εξάγονται συμπεράσματα ως προς τα δομικά χαρακτηριστικά των κιναζολινικών αναλόγων που οδηγούν σε ενίσχυση της δράσης. Συγκεκριμένα, ως καταλληλότεροι υποκαταστάτες – ενώσεις οδηγοί, στην περίπτωση των κιναζολινονών κρίνονται η νιτροομάδα (**3g**) και η (-H) υποκατάσταση

(3f), ενώ, στην περίπτωση των ακεταμιδίων η νιτροομάδα (4g) και η μεθόξυ ομάδα (4c).

Όσον αφορά την ικανότητα των ενώσεων να δρουν ως φωτοδιασπαστές στο DNA μέσω της μεθόδου φωτοβόλησης των ενώσεων παρουσία πλασμιδιακού DNA, και συγκεκριμένα των κιναζολινικών παραγώγων – ακεταμιδίων, ικανοποιητικά φαίνονται τα αποτελέσματα, καθώς η νιτροομάδα στον υποκαταστάτη (4g) παρουσιάζει υψηλά ποσοστά φωτοδιάσπασης και μπορεί να θεωρηθεί, ύστερα από περαιτέρω αξιολογήσεις και αναλύσεις, ως ένωση οδηγός.

Λέξεις κλειδιά: Κιναζολινόνες, κιναζολινικά παράγωγα, κιναζολιν-4(3H)-όνες, μικροκυματική ακτινοβολία, αλληλεπίδραση με το DNA, DNA παρεμβολή, φωτοδιασπαστική ικανότητα.

Abstract

Quinazolinones is one of the most important categories of heterocyclic compounds, with plenty of biological properties, such as anticancer, anti-inflammatory, analgesic and sedative among others.

Through the decades, attempts to create new pharmaceutical compounds have been made, considering more environmentally friendly methods of synthesis. One of them is the use of high energy techniques, as heating using microwave irradiation (Microwave Assisted Organic Synthesis – MAOS), capable to synthesize new pharmaceutical compounds with rapid reactions and consequently less energy required, higher yields and increased purity of products.

In the present diploma thesis, synthesis and characterization of new bioactive quinazolinone derivatives is carried out. More specifically, there are composed 9 molecules of quinazolinones with microwave irradiation in two steps and 7 molecules of quinazolinone derivatives with acetamide group by conventional method of heating. It is noted that, the second method of synthesis of acetamides, that is microwave assisted heating, requires optimization of factors, like increasing reaction time, changing the proportion of reactants, changing the required energy given, in order to optimize both the yields and the purity of the products. Then, it is reported that the discovery of new hybrid molecules of the form of quinazolinone – chalcone and quinazolinone – phenolic acids, is at an early stage.

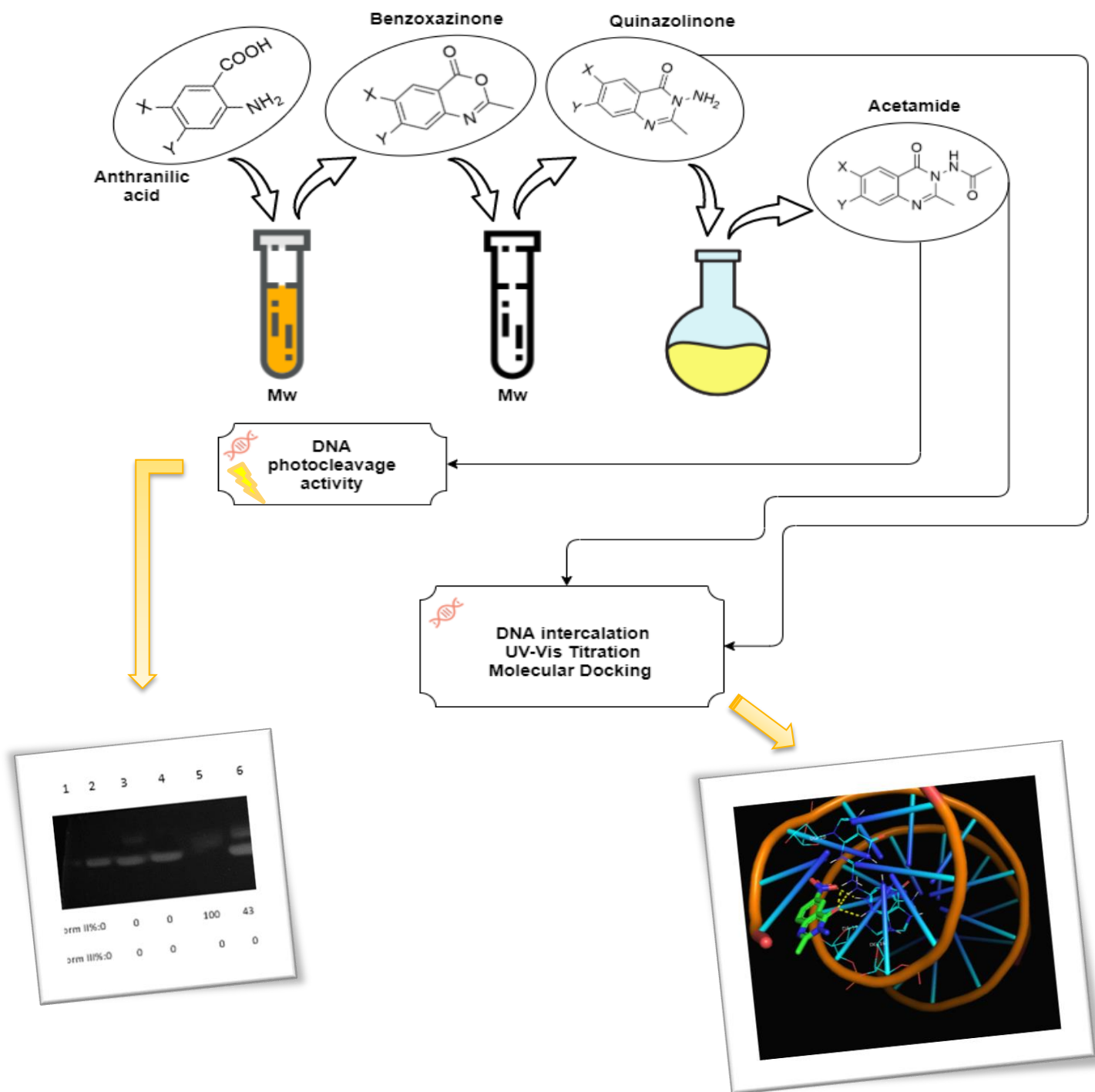
Next station, was the evaluation of the biological activity of the above molecules, both at a theoretical level through molecular docking, and at an experimental level by evaluating their ability to interact with DNA in two ways: a) through UV-Vis titration and b) with the study of DNA photocleavage activity. From the results, combined both the molecular docking and the UV-Vis titration, studying factors such as the kind of substitution and various concentrations, conclusions are exported as to the structural characteristics of quinazolinone analogues leading to enhanced action. Especially, as more appropriate substitutes – lead compounds, in case of the quinazolinones, are considered the nitro group (**3g**) and the (-H) substitution (**3f**), while, in case of the acetamides the nitro group (**4g**) and the methoxy group (**4c**).

As to the ability of the compounds to act as photosensitizers in DNA, through the method of irradiating the compounds in the presence of plasmid DNA, and especially the

quinazolinone derivatives – acetamides, the results seem to be satisfactory, as the nitro group in the substitute shows high percentages of photocleavage and can be considered, following further evaluations and analyzes, as lead compound.

Key-words: Quinazolinones, quinazolinone derivatives, quinazolin-4(3H)-one, microwave assisted heating, DNA interaction, DNA intercalation, photocleavage activity.

Graphical abstract



Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1: (Αριστερά)Κιναζολιν-4(3H)-όνη, (δεξιά) Κιναζολιν-2(1H)-όνη.....	20
Σχήμα 2: Απεικόνιση των διαφόρων ταυτομερικών μορφών της 2-μεθυλο-4(3H)κιναζολινόνης.....	21
Σχήμα 3: Αντίδραση Niementowski συμβατικά.	22
Σχήμα 4: Αντίδραση Niementowski με χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας.	22
Σχήμα 5: Συμπύκνωση ανθρανλικού οξέος με πρωτοταγείς αμίνες.	23
Σχήμα 6: Σύνθεση κιναζολιν-4(3H)-ονών με χρήση ανθρανλικού οξέος, αμινών και ορθοεστέρων.	23
Σχήμα 7: Σύνθεση μονο- και δι- υποκατεστημένων κιναζολιν-4(3H)-ονών.....	24
Σχήμα 8: Σύνθεση 2-υποκατεστημένων-2,3-διυδροκιναζολιν-4 (1H) –ονών.	24
Σχήμα 9: Δομή προφλαβίνης (αριστερά), δομή νογαλαμυκίνης (δεξιά).	46
Σχήμα 10: Παραδείγματα παρεμβολέων.	50
Σχήμα 11: Φυσική και πρωτονιωμένη μορφή ellipticine.	51
Σχήμα 12: Ακτινομυκίνη D.	51
Σχήμα 13: TAS-103.	51
Σχήμα 14: R= NO ₂ Μιτοναφίδιο, R= NH ₂ Αμοναφίδιο.....	52
Σχήμα 15: (Αριστερά) διτερκαλίνιο, (δεξιά) elinafide.	52
Σχήμα 16: (Αριστερά) εχινομυκίνη, (δεξιά) τρόπος παρεμβολής εχινομυκίνης στο DNA.	53
Σχήμα 17: Παραδείγματα διαρυλαμιδινών.....	53
Σχήμα 18: Παράγωγα διβενζιμιδαζόλης	54
Σχήμα 19: ET-743	54
Σχήμα 20: Παράγωγα πυρολο – βενζοδιαπεζινών.....	55
Σχήμα 21: Δισταμυκίνη A.....	55
Σχήμα 22: Παράγωγα πλουραμυκίνης.	56
Σχήμα 23: Παράγωγα αφλατοξίνης.	56
Σχήμα 24: Αζινομυκίνη B.	57
Σχήμα 25: Δομή λειναμυκίνης πριν και μετά την βιολογική ενεργοποίηση.....	57
Σχήμα 26: Νεοκαρζινοστατίνη.....	57
Σχήμα 27: Παράγωγα αμινογλυκοσιδών.....	58
Σχήμα 28: Παραδείγματα φωτοδιασπαστικών παραγόντων.....	60
Σχήμα 29: Παραδείγματα πορφυρινικών φωτοευαισθητοποιητών.....	63
Σχήμα 30: Παραδείγματα μη – πορφυρινικών φωτοευαισθητοποιητών.....	63

Σχήμα 31: (Αριστερά) κουρκουμίνη, (δεξιά) φουρανοκουμαρίνη.....	64
Σχήμα 32: Δομή πορφυρίνης.....	64
Σχήμα 33: Δομή φθαλοκυανίνης.....	65
Σχήμα 34: Σχηματική απεικόνιση της σύνθεσης κιναζολινονών και κιναζολινικών παραγώγων.....	67
Σχήμα 35: Δομή της 3-αμινο-6,7-διμεθοξυ-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3H)-όνης (3e).	92
Σχήμα 36: Δομή του N-(6,7-διμεθοξυ-2-μεθυλο-4-οξοκιναζολιν-3(4H)-υλ) ακεταμιδίου (4e).....	94
Σχήμα 37: Σχηματική απεικόνιση σχάσης αμιδικού δεσμού.	96
Σχήμα 38: Σχηματική απεικόνιση σχάσης αμιδικού δεσμού.	97
Σχήμα 39: Δομή της 3-αμινο-2-μεθυλο-6-νιτρο-κιναζολιν-4(3H)-όνης – 3g	98
Σχήμα 40: Δομή N-(2-μεθυλο-6-νιτρο-4-οξοκιναζολιν-3(4H)-υλ) ακεταμιδίου - 4g	100
Σχήμα 41: Δομή των κιναζολινονών που μελετήθηκαν στο πείραμα φωτοβόλησης UVB.	106
Σχήμα 42: Δομή των κιναζολινονών που μελετήθηκαν στο πείραμα φωτοβόλησης UVA.	108
Σχήμα 43: Σύνθεση υβριδικών μορίων a) με συμβατική μέθοδο θέρμανσης και b) με χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας από ακεταμίδιο και βενζαλδεΐδη.....	112
Σχήμα 44: Σύνθεση ιμινών με χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας από κιναζολινόνη και βενζαλδεΐδη.	112
Σχήμα 45: Πιθανές ενώσεις αναστολείς κατά του Sars-CoV-2.....	114

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: <i>Dichroa febrifuga</i>	19
Εικόνα 2: Απεικόνιση διαφόρων βιολογικών δράσεων των κιναζολινονών. ⁴	30
Εικόνα 3: Διπολικά μόρια που προσπαθούν να ευθυγραμμιστούν με ταλαντευόμενα ηλεκτρικά στοιχεία. ⁹	35
Εικόνα 4: Φορτισμένα σωματίδια διαλύματος που ακολουθούν το εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο. ⁹	36
Εικόνα 5: Σύγκριση συμβατικής μεθόδου θέρμανσης με θέρμανση μέσω μικροκυματικής ακτινοβολίας. ¹⁰	38
Εικόνα 6: (Α) εξωτερική συναρμογή στην μεγάλη αύλακα, (Β) εξωτερική συναρμογή στην μικρή αύλακα, (C) εσωτερική παρεμβολή.	41
Εικόνα 7: (Αριστερά) Σχηματική απεικόνιση των δύο διαμορφώσεων του DNA (-Α και -Β). (Δεξιά) Σχηματική απεικόνιση του δότη/αποδέκτη δεσμού υδρογόνου στην μικρή και μεγάλη αύλακα, αντίστοιχα.	42
Εικόνα 8: Βασικές εφαρμογές της μοριακής μοντελοποίησης (molecular docking). ¹⁶ ...	45
Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση προφλαβίνης και νογαλμυκίνης. ¹³	47
Εικόνα 10: Γραφική αναπαράσταση των δύο μηχανισμών (type I, type II) φωτοδυναμικής θεραπείας. ²⁷	61
Εικόνα 11: Νανοσωλήνας άνθρακα.....	65
Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση διήθησης.	68
Εικόνα 13: Περιστροφικός εξατμιστήρας (Rotavapor R-114/Waterbath B-480 – Buchi).69	
Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση εκχύλισης.	70
Εικόνα 15: Αντιδραστήρας μικροκυμάτων.	71
Εικόνα 16: TLC.....	72
Εικόνα 17: Όργανο προσδιορισμού σημείου τήξεως (Συσκευή Gallenkamp).....	72
Εικόνα 18: Φασματόμετρο μάζας.....	73
Εικόνα 19:Εσωτερική παρεμβολή (αριστερά), εξωτερική συναρμογή (δεξιά).....	88
Εικόνα 20: Μορφή I (αριστερά), μορφή II (κέντρο), μορφή III (δεξιά) του πλασμιδιακού DNA αντίστοιχα. ³²	90
Εικόνα 21: Διαδικασία φωτοβόλησης παρουσία πλασμιδιακού DNA.	91
Εικόνα 22: Φάσμα πρωτονίου ¹ H NMR της 3-αμινο-6,7-διμεθοξυ-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3H)-όνης (3e) (600 MHz, DMSO-d ₆)	93

Εικόνα 23: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR του N-(6,7-διμεθοξυ-2-μεθυλο-4-οξοκινναζολιν-3(4H)-υλ) ακεταμιδίου (4e) (600 MHz, DMSO- d_6) – Μικροκυματική μέθοδος σύνθεσης.	94
Εικόνα 24: Φάσμα MS της 3-αμινο-6-μεθοξυ-2-μεθυλο-κινναζολιν-4(3H)-όνης (3c).	95
Εικόνα 25: Φάσμα MS του N-(6-βρωμο-2-μεθυλο-4-οξοκινναζολιν-3(4H)-υλ) ακεταμιδίου (4a).....	96
Εικόνα 26: Φάσμα MS του N-(6-μεθοξυ-2-μεθυλο-4-οξοκινναζολιν-3(4H)-υλ) ακεταμιδίου (4c).....	97
Εικόνα 27: Σχηματική απεικόνιση της δέσμησης της 3g στην κρυσταλλική δομή του DNA που απεικονίζει την σταθεροποίησή της στην μικρή αύλακα. (a) Απεικόνιση της δομής του DNA και της 3g ως κινούμενα σχέδια, (b) Απεικόνιση της δομής του DNA και της 3g ως σφαίρες, (c) θέση σύνδεσης της 3g από μια οπτική πάνω από τον άξονα της έλικας, (d) απεικόνιση των δεσμών υδρογόνου με κίτρινες διακεκομμένες γραμμές και των νουκλεοτιδίων.	99
Εικόνα 28: Σχηματική απεικόνιση της δέσμησης του 4g στην κρυσταλλική δομή του DNA που απεικονίζει της σταθεροποίησή του στην μικρή αύλακα. (a) Απεικόνιση της δομής του DNA και του 4g ως κινούμενα σχέδια, (b) Απεικόνιση της δομής του DNA και του 4g ως σφαίρες, (c) θέση σύνδεσης του 4g από μια οπτική πάνω από τον άξονα της έλικας, (d) απεικόνιση των δεσμών υδρογόνου με κίτρινες διακεκομμένες γραμμές και των νουκλεοτιδίων.	100
Εικόνα 29: Φάσμα UV-Vis της 3f , με αύξηση της συγκέντρωσης του DNA παρατηρείται αύξηση της απορρόφησης και μετατόπιση προς μεγαλύτερα μήκη κύματος.	103
Εικόνα 30:Φάσμα UV-Vis της 3c	104
Εικόνα 31: Φάσμα UV-Vis της 4c	104
Εικόνα 32: Φάσμα UV-Vis της 3g , με αύξηση της συγκέντρωσης του DNA παρατηρείται αύξηση της απορρόφησης.....	105
Εικόνα 33: Φάσμα UV-Vis της 4g , με αύξηση της συγκέντρωσης του DNA παρατηρείται αύξηση της απορρόφησης.....	105
Εικόνα 34.....	107
Εικόνα 35.....	109
Εικόνα 36: Σχηματική απεικόνιση μετατροπής της αμινομάδας σε ακετυλομάδα.....	111
Εικόνα 37: Δομές και λογική για το σχεδιασμό των 2-φαινυλκινναζολιν-4 (3H)-όνη-τριυδροξυφαινυλο Schiff βάσεων για την θεραπεία της COVID-19.	115

Εικόνα 38: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR της 3-αμινο-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3H)-όνης (300 MHz,	120
Εικόνα 39: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR του N-(2-μεθυλο-4-οξοκιναζολιν-3(4H)-υλ) ακεταμιδίου (300 MHz, CDCl_3).	120
Εικόνα 40: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR της 3-αμινο-6-βρωμο-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3H)-όνης (600 MHz, DMSO-d_6)	121
Εικόνα 41: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR της 3-αμινο-2-μεθυλο-6-νιτρο-κιναζολιν-4(3H)-όνης (600 MHz, DMSO-d_6)	122
Εικόνα 42: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR του N-(2-μεθυλο-6-νιτρο-4-οξοκιναζολιν-3(4H)-υλ) ακεταμιδίου (600 MHz, DMSO-d_6)	122
Εικόνα 43: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR της 3-αμινο-6-ιωδο-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3H)-όνης (600 MHz, DMSO-d_6)	123
Εικόνα 44: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR του N-(6-ιωδο-2-μεθυλο-4-οξοκιναζολιν-3(4H)-υλ) ακεταμιδίου (600 MHz, DMSO-d_6)	123
Εικόνα 45: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR της 3-αμινο-6,7-διμεθοξυ-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3H)-όνης (600 MHz, DMSO-d_6).....	124
Εικόνα 46: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR του N-(6,7-διμεθοξυ-2-μεθυλο-4-οξοκιναζολιν-3(4H)-υλ) ακεταμιδίου (600 MHz, DMSO-d_6) – Συμβατική μέθοδος σύνθεσης.	125
Εικόνα 47: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR του N-(6,7-διμεθοξυ-2-μεθυλο-4-οξοκιναζολιν-3(4H)-υλ) ακεταμιδίου (600 MHz, DMSO-d_6) – Μικροκυματική μέθοδος σύνθεσης... ..	125
Εικόνα 48: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR της 3-αμινο-6-χλωρο-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3H)-όνης (600 MHz, DMSO-d_6)	126
Εικόνα 49: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR του N-(6-χλωρο-2-μεθυλο-4-οξοκιναζολιν-3(4H)-υλ) ακεταμιδίου (600 MHz, DMSO-d_6).	126
Εικόνα 50: Φάσμα UV-Vis της 3-αμινο-6-βρωμο-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3H)-όνης για διάφορες συγκεντρώσεις CT-DNA.....	127
Εικόνα 51: Φάσμα UV-Vis της 3-αμινο-6-χλωρο-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3H)-όνης για διάφορες συγκεντρώσεις CT-DNA.....	127
Εικόνα 52:Φάσμα UV-Vis της 3-αμινο-6-μεθοξυ-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3H)-όνης για διάφορες συγκεντρώσεις CT-DNA.....	128
Εικόνα 53: Φάσμα UV-Vis της 3-αμινο-6-ιωδο-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3H)-όνης για διάφορες συγκεντρώσεις CT-DNA.....	128
Εικόνα 54: Φάσμα UV-Vis της 3-αμινο-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3H)-όνης για διάφορες συγκεντρώσεις CT-DNA.	129

Εικόνα 55: Φάσμα UV-Vis της 3-αμινο-2-μεθυλο-6-νιτρο-κιναζολιν-4(3H)-όνης για διάφορες συγκεντρώσεις CT-DNA.....	129
Εικόνα 56: Φάσμα UV-Vis του N-(6-βρωμο-2-μεθυλο-4-οξοκιναζολιν-3(4H)-υλ)ακεταμιδίου για διάφορες συγκεντρώσεις CT-DNA.	130
Εικόνα 57.: Φάσμα UV-Vis του N-(6-χλωρο-2-μεθυλο-4-οξοκιναζολιν-3(4H)-υλ)ακεταμιδίου για διάφορες συγκεντρώσεις CT-DNA.	130
Εικόνα 58:Φάσμα UV-Vis του N-(6-μεθοξυ-2-μεθυλο-4-οξοκιναζολιν-3(4H)-υλ)ακεταμιδίου για διάφορες συγκεντρώσεις CT-DNA.	131
Εικόνα 59:Φάσμα UV-Vis του N-(6-ιωδο-2-μεθυλο-4-οξοκιναζολιν-3(4H)-υλ)ακεταμιδίου για διάφορες συγκεντρώσεις CT-DNA.....	131
Εικόνα 60:Φάσμα UV-Vis του N-(2-μεθυλο-4-οξοκιναζολιν-3(4H)-υλ)ακεταμιδίου για διάφορες συγκεντρώσεις CT-DNA.....	132
Εικόνα 61: Φάσμα UV-Vis του N-(2-μεθυλο-6-νιτρο-4-οξοκιναζολιν-3(4H)-υλ)ακεταμιδίου για διάφορες συγκεντρώσεις CT-DNA.	132
Εικόνα 62: Φάσμα MS της 3-αμινο-6-μεθοξυ-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3H)-όνης.....	133
Εικόνα 63: Φάσμα MS του N-(6-βρωμο-2-μεθυλο-4-οξοκιναζολιν-3(4H)-υλ)ακεταμιδίου.	133
Εικόνα 64: Φάσμα MS του N-(6-μεθοξυ-2-μεθυλο-4-οξοκιναζολιν-3(4H)-υλ)ακεταμιδίου.	134

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Κυριότερες κατηγορίες κινολονών.	20
Πίνακας 2: Διαθέσιμα φάρμακα κινολονών στην αγορά.	26
Πίνακας 3: Παραδείγματα κινολονών με βιολογικές δράσεις.	32
Πίνακας 4: Αποτελέσματα ανάλυσης μοριακής μοντελοποίησης (molecular docking).	101
Πίνακας 5: Δεδομένα ανάλυσης των υπό μελέτη ενώσεων από την μέθοδο τιτλοδότησης ορατού – υπεριώδους.	102
Πίνακας 6: Φωτοβόληση UVB.	107
Πίνακας 7: Φωτοβόληση UVA.	108

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Κιναζολινόνες

1.1. Γενικά

Οι ετεροκυκλικές ενώσεις αποτελούν σημαντική πηγή έρευνας σε ποικίλους τομείς χημείας, όπως η οργανική, η φαρμακευτική και η αναλυτική. Στη φαρμακευτική βιομηχανία, περισσότερο από το 75% των διαθέσιμων και μη φαρμάκων έχουν ετεροκυκλικά μέρη στις δομές τους. Στη βιβλιογραφία, αναφέρεται ότι, οι 4-(3H)-κιναζολινόνες, με διάφορες υποκαταστάσεις, σχετίζονται άμεσα με ένα ευρύ φάσμα βιολογικών ιδιοτήτων, όπως υπνωτικών, ηρεμιστικών, αναλγητικών, αντιβακτηριδιακών, αντιφλεγμονωδών, αντικαρκινικών και πολλών άλλων.

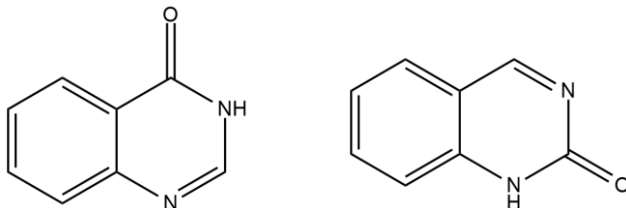
Η κιναζολιν-4(3H)-όνη – γνωστή και ως βενζο-1,3-διαζίνη – και τα παράγωγά της αποτελούν μια σημαντική ομάδα συντηγμένων ετεροκυκλικών ενώσεων, που απαντώνται σε περισσότερα από 200 φυσικά αλκαλοειδή, τα οποία έχουν απομονωθεί από ποικίλες οικογένειες του φυτικού και ζωικού βασιλείου και από μικροοργανισμούς όπως *Bacillus cereus*, *Bouchardatia neurococca*, *Dichroa febrifuga* και *Peganum nigellastrum*. Το όνομα κιναζολινόνη (Γερμανικά: Chinazolin) προτάθηκε για πρώτη φορά για την ένωση αυτή από τον Weddige, ο οποίος παρατήρησε ότι επρόκειτο για ισομερική μορφή των ενώσεων της κινόξαλης και της κινολίνης. Παρότι η κιναζολίνη συντίθεται, σε καλές αποδόσεις, με οξείδωση της 3,4-διυδροκιναζολίνης με αλκαλικό φερρικυανιούχο κάλιο από το 1903, μετά από το 1950 άρχισε να αναπτύσσεται το ενδιαφέρον για αυτή την κατηγορία ενώσεων, ύστερα από την αποσαφήνιση μιας αλκαλοειδούς κιναζολινόνης – της 3-[β-κετο-γ-(3-υδροξυ-2-πιπεριδυλ)-προπυλ]-4-κιναζολινόνη –. Το παράγωγο αυτό της κιναζολινόνης απομονώθηκε από το παραδοσιακό κινέζικο φυτό *Dichroa febrifuga* (Εικόνα 1), και κρίθηκε αποτελεσματικό κατά της ελονοσίας.^{1,2,3}



Εικόνα 1: *Dichroa febrifuga*.

1.2. Δομή

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι κιναζολινόνες είναι ετεροκυκλικές χημικές ενώσεις με δύο συνδεδεμένους αρωματικούς δακτυλίους, με δύο άτομα αζώτου ενσωματωμένα και έναν οξειδωμένο άνθρακα με κετο οξυγόνο. Υπάρχουν δύο δομικά ισομερή, η 2-κιναζολινόνη, με την ομάδα υδροξυλίου στην θέση 2, και η 4-κιναζολινόνη, με την ομάδα υδροξυλίου στην θέση 4 του δακτυλίου κιναζολίνης, γειτονικά με ένα άτομο ετεροκυκλικού αζώτου (Σχήμα 1). Σημειώνεται ότι το 4-ισομερές είναι το πιο κοινό.



Σχήμα 1: (Αριστερά)Κιναζολιν-4(3H)-όνη, (δεξιά) Κιναζολιν-2(1H)-όνη.

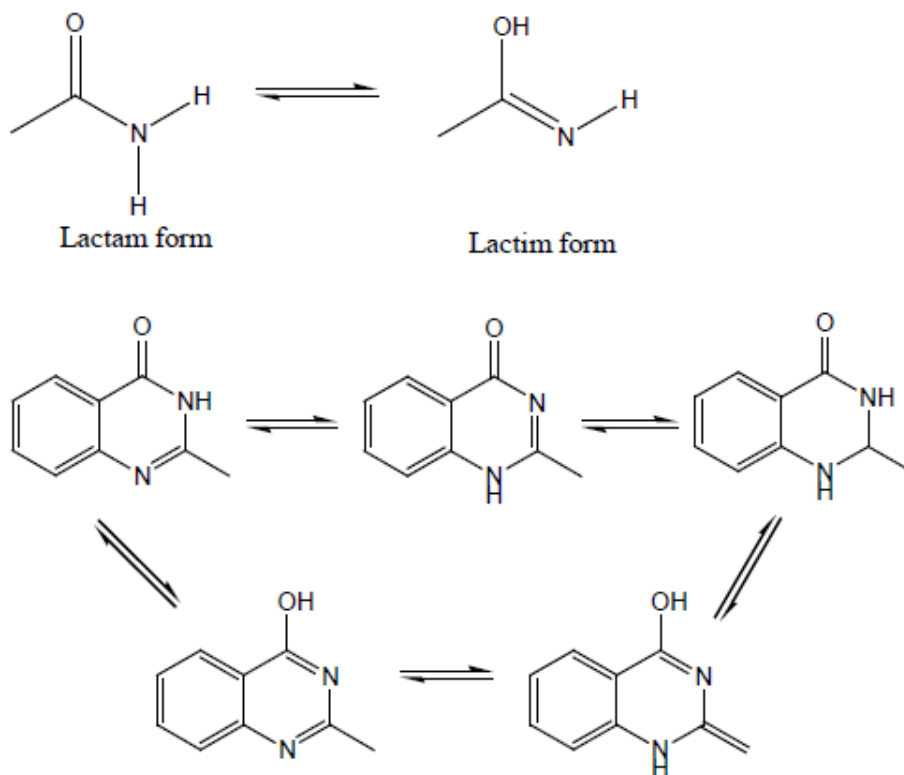
Οι κυριότερες υποκατηγορίες με βάση τους υποκαταστάτες στις κιναζολινόνες είναι (Πίνακας 1) :

Πίνακας 1: Κυριότερες κατηγορίες κιναζολινονών.

♦ 2-υποκατεστημένες-4(3H)-κιναζολινόνες	
♦ 3-υποκατεστημένες-4(3H)-κιναζολινόνες	
♦ 4-υποκατεστημένες-κιναζολίνες	
♦ 2,3-υποκατεστημένες-4(3H)-κιναζολινόνες	

Μεταξύ των τεσσάρων δομών κιναζολίνης, οι 4(3H)-κιναζολινόνες είναι οι πιο διαδεδομένες, είτε ως ενδιάμεσα, είτε ως φυσικά προϊόντα σε ποικίλες βιοσυνθετικές τεχνικές. Γεγονός που οφείλεται μερικώς στην προερχόμενη δομή από τα ανθρανιλικά, ενώ, η 2(1H)-κιναζολινόνη αποτελεί, κυρίως, προϊόν ανθρανιλονιτριλίου ή βενζαμίδης με νιτρίλια. Μέσω της διαδικασίας της αυτοξείδωσης της κιναζολίνης καθίσταται δυνατή ή μετατροπή της στην αντίστοιχη 4(3H)-κιναζολινόνη.

Παρόλο που η χημεία της κιναζολινόνης θεωρείται γνωστή και σταθερή, ανακαλύπτονται συνεχώς διάφορες παραλλαγές στην δομή της. Για παράδειγμα, παρατηρείται η ταυτομερής αλληλεπίδραση λακτάμης – λακτίμης, συνήθως όταν η 4(3H)-κιναζολινόνη που περιέχει μεθύλιο στην θέση 3 υποβάλλεται σε χλωρίωση με POCl_3 χάνοντας την ομάδα μεθυλίου, ή όταν η ομάδα του μεθυλίου βρίσκεται στην θέση 2 το ταυτομερικό αποτέλεσμα επεκτείνεται στην δημιουργία ενός εξωτερικού άνθρακα μεθυλενίου (Σχήμα 2). Άμεσο αποτέλεσμα των εκτεταμένων ταυτομερών αντιδράσεων, είναι η αύξηση της αντιδραστικότητας των υποκατεστημένων 4(3H)-κιναζολινονών. Προκύπτει, επομένως, το συμπέρασμα ότι οι κιναζολινόνες, σε συνδυασμό με την σταθερότητα του συστήματος του δακτυλίου, θεωρούνται προνομιακές δομές για την ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών ουσιών.¹



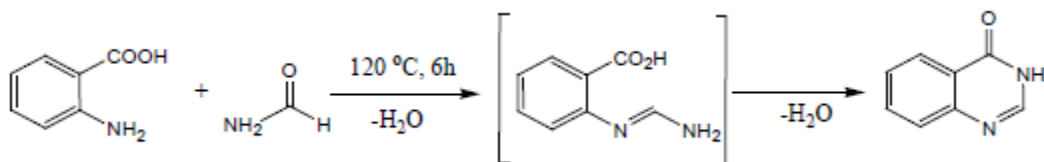
Σχήμα 2: Απεικόνιση των διαφόρων ταυτομερικών μορφών της 2-μεθυλο-4(3H)κιναζολινόνης.

1.3. Μέθοδοι σύνθεσης

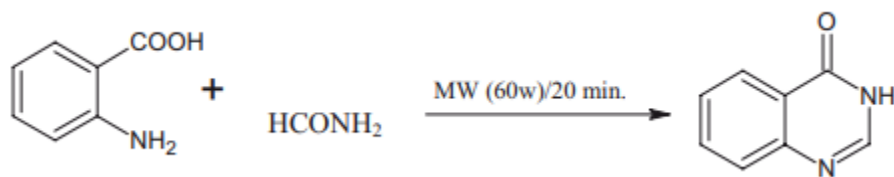
Η πρώτη αναφερόμενη σύνθεση κιναζολινόνης πραγματοποιήθηκε το 1869, από ανθρανλικό οξύ και κυανίδιο σε αιθανόλη, δημιουργώντας την 2-αιθοξυ-4(3H)-κιναζολινόνη. Η πλειοψηφία των μεθόδων σύνθεσης των 4-(3H)-κιναζολινονών χρησιμοποιεί ανθρανλικό οξύ ή ένα εκ των λειτουργικών παραγώγων του ως παρασκευαστικό υλικό. Η κιναζολιν-4-όνη συντίθεται με την εισαγωγή της ομάδας κέτο στον δακτύλιο πυριμιδίνης της κιναζολίνης. Βασιζόμενοι σε αυτόν τον παράγοντα, οι μέθοδοι σύνθεσης παρατίθενται ως εξής:

- ♦ **Συμπύκνωση ανθρανλικού οξέος με αμίδια οξέος:**

Η δημιουργία 4-(3H)κιναζολινονών μπορεί να επιτευχθεί με θέρμανση του ανθρανλικού οξέος σε ανοιχτό δοχείο και περίσσεια φορμαμίδιου στους 120 °C. Η αντίδραση περιλαμβάνει απομάκρυνση του νερού και ολοκληρώνεται μέσω ενός ενδιάμεσου ο-αμιδοβενζαμίδιου (Σχήμα 3). Η μέθοδος αυτή, είναι γνωστή ως σύνθεση Niementowski. Ωστόσο, ο Besson et al. την τροποποίησε, με στόχο την βελτίωση της απόδοσης και του χρόνου αντίδρασης χρησιμοποιώντας τεχνικές ακτινοβολίας μικροκυμάτων (Σχήμα 4).^{1,4}



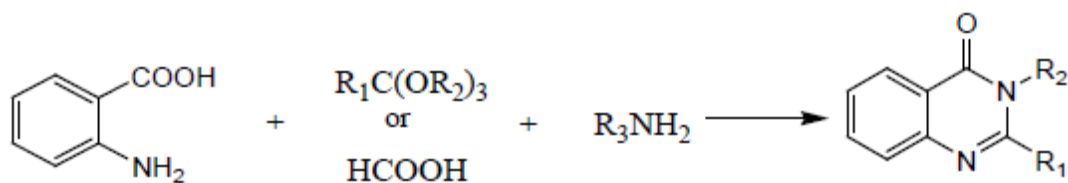
Σχήμα 3: Αντίδραση Niementowski συμβατικά.



Σχήμα 4: Αντίδραση Niementowski με χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας.

- ♦ **Συμπύκνωση N-ακυλανθρανλικών οξέων με πρωτοταγείς αμίνες:**

Οι κιναζολινόνες μπορούν, επιπλέον, να συντεθούν απευθείας από το αντίστοιχο N-ακυλανθρανλικό οξύ με θέρμανση με αμμωνία ή οποιαδήποτε υποκατεστημένη αμίνη. Συγκεκριμένα, μέσω αυτής της μεθόδου έχουν παρασκευαστεί οι 2-μεθυλ-3-ακυλ-6-νιτρο-4(3H)κιναζολινόνες από N-ακυλ-5-νιτροανθρανλικό οξύ και μια μορφή πρωτοταγών αμινών (Σχήμα 5).¹

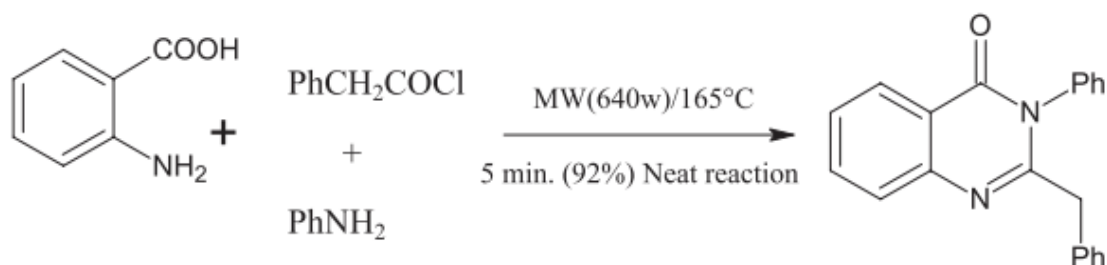


Σχήμα 5: Συμπύκνωση ανθρανιλικού οξέος με πρωτοταγείς αμίνες.

Ορισμένες επιπρόσθετες μέθοδοι σύνθεσης κιναζολινονών με χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας είναι:

- ♦ **Σύνθεση κιναζολιν-4(3H)-ονών με χρήση ανθρανιλικού οξέος, αμινών και ορθοεστέρων:**

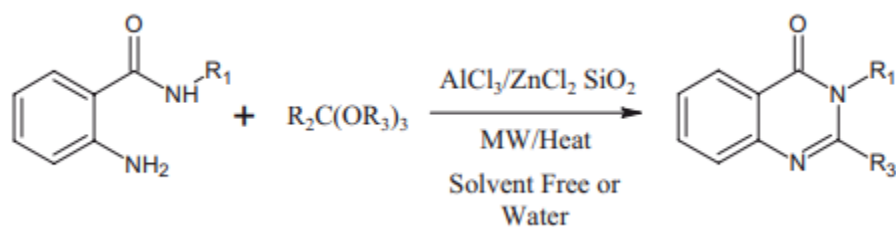
Υπό μη μεταβαλλόμενες συνθήκες, αναπτύχθηκε η μέθοδος αυτή από τους Dandia et al. και Liu et al. (Σχήμα 6). Επίσης, εύκολη και ιδιαίτερα «πράσινη» χημική διαδικασία κρίνεται η σύνθεση 2,4(1H,3H)-κιναζολινιδιονίων.⁴



Σχήμα 6: Σύνθεση κιναζολιν-4(3H)-ονών με χρήση ανθρανιλικού οξέος, αμινών και ορθοεστέρων.

- ♦ **Σύνθεση μονο- και δι- υποκατεστημένων κιναζολιν-4(3H)-ονών:**

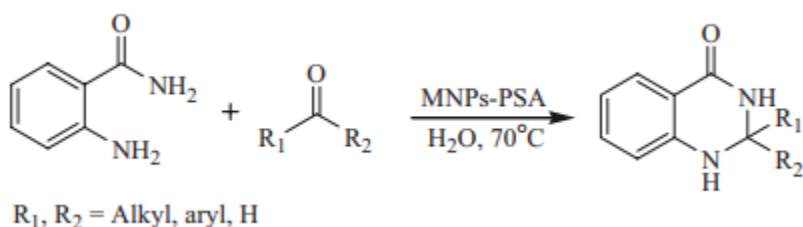
Οι Dabiri και Mostafa ανέπτυξαν μια ταχεία και αποτελεσματική διαδικασία για τη σύνθεση μονο- και δι- υποκατεστημένων κιναζολιν-4(3H)-ονών παρουσία μείγματος $\text{AlCl}_3 - \text{ZnCl}_2$, καταλυόμενο από silica gel, απουσία διαλύτη ή νερού (Σχήμα 7).⁴



Σχήμα 7: Σύνθεση μονο- και δι- υποκατεστημένων κιναζολιν-4(3H)-ονών.

♦ **Σύνθεση 2-υποκατεστημένων-2,3-διυδροκιναζολιν-4 (1H) –ονών:**

Μια αποτελεσματική και φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος αποτελεί η σύνθεση 2-υποκατεστημένων-2,3-διυδροκιναζολιν-4(1H)–ονών, από άμεση κυκλοσυμπύκνωση ανθρανιλαμίδης με αλδεΐδες και κετόνες, χρησιμοποιώντας N-προπυλοσουλφαμικό οξύ και καταλύτη μαγνητικό Fe_3O_4 , ως εύκολα ανακυκλώσιμος νανοκαταλύτης σε πολύ καλές αποδόσεις (Σχήμα 8). Βασικά πλεονεκτήματα του καταλύτη αυτού είναι π γρήγορος, απλός και αποτελεσματικός διαχωρισμός του με χρήση ενός κατάλληλου εξωτερικού μαγνήτη, ο οποίος ελαχιστοποιεί την απώλεια του καταλύτη κατά την διάρκεια του διαχωρισμού και μπορεί εύκολα να επαναχρησιμοποιηθεί. Η μέθοδος αυτή, δεν απαιτεί τη χρήση οποιουδήποτε επιπρόσθετου αντιδραστηρίου ή καταλύτη, δεν παράγει απόβλητα, ενισχύοντας, έτσι, τον «πράσινο» και οικονομικό χαρακτήρα της. Ο πιθανός συνδυασμός με χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας οδηγεί σε αυξημένους ρυθμούς αντίδρασης, υψηλότερες αποδόσεις καθαρού προϊόντος και ευκολότερη επεξεργασία.⁴



Σχήμα 8: Σύνθεση 2-υποκατεστημένων-2,3-διυδροκιναζολιν-4 (1H) –ονών.

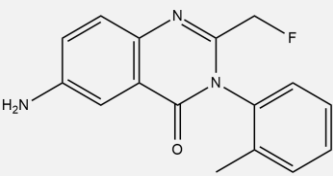
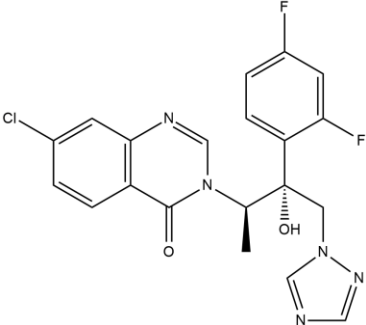
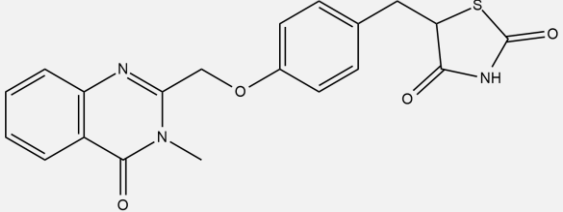
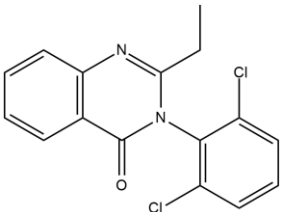
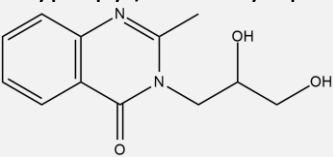
1.4. Διαθέσιμα φάρμακα στην αγορά

Οι παρενέργειες και η αναποτελεσματικότητα ορισμένων αντιβακτηριακών φαρμάκων που κυκλοφορούν στην αγορά, έχει οδηγήσει τους επιστήμονες στην ανάπτυξη νέων παραγόντων με ευρύ αντιμικροβιακό φάσμα. Επιπλέον, καθίσταται επιτακτική ανάγκη εξάλειψη της μικροβιακής αντοχής, έναντι συμβατικών αντιμικροβιακών παραγόντων, όπως επίσης, η ελαχιστοποίηση των παρενεργειών των υπαρχόντων φαρμάκων.

Οι κινολονίνες περιέχουν φαρμακοφόρες ομάδες, ιδιαίτερα σημαντικές ως προς τις θεραπευτικές τους ιδιότητες. Ως εκ τούτου, έχει συντεθεί μεγάλος αριθμός κινολονινών, οι οποίες έχουν αξιολογηθεί ως προς τις ποικίλες βιολογικές τους δράσεις. Άμεσο συμπέρασμα της γρήγορης ανάπτυξης των μορίων των κινολονινών, είναι η ύπαρξη περισσότερων νεοσυντιθέμενων παραγώγων στο μέλλον.

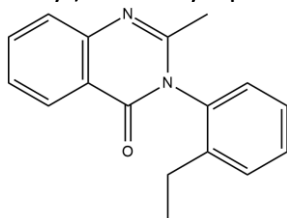
Το πρώτο διαθέσιμο φάρμακο κινολονίνης στο εμπόριο – η μεθακαλόνη – χρησιμοποιείται για την ηρεμιστική και υπνωτική του δράση από το 1951. Μέχρι στιγμής, υπάρχει σημαντικός αριθμός παραγώγων κινολονίνης, των οποίων έχει κατοχυρωθεί η πατέντα τους και είναι διαθέσιμα στην αγορά ως πιθανά φάρμακα για διάφορες ασθένειες. Στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 2) αναφέρονται ορισμένα φάρμακα κινολονίνης που κυκλοφορούν στο εμπόριο με την αντίστοιχη θεραπευτική τους ιδιότητα.¹

Πίνακας 2: Διαθέσιμα φάρμακα κιναζολινόνης στην αγορά.

Ένωση	Ονοματολογία κατά IUPAC - Δομή	Δράση
Afloqualone	6-amino-2-(fluoromethyl)-3-(2-methylphenyl) quinazolin-4-one 	Καταπραϋντική, υπνωτική, αντικαρκινική, με παράγοντες κατά του άγχους
Albaconazole	7-chloro-3-[(2R,3R)-3-(2,4-difluorophenyl)-3-hydroxy-4-(1,2,4-triazol-1-yl)butan-2-yl]quinazolin-4-one 	Αντιμυκητιακή
Balaglitazone	5-[[4-[(3,4-dihydro-3-methyl-4-oxo-2-quinazolinyl) methoxy] phenyl]methyl]-2,4-thiazolidinedione 	Πολλαπλασιαστής υπεροξεισωμάτων, κατά του διαβήτη
Cloroqualone	3-(2,6-Dichlorophenyl)-2-ethyl-4-quinazolinone 	Καταπραϋντική, αντιβηχική
Diproqualone	3-(2,3-dihydroxypropyl)-2-methyl-quinazolin-4-one 	Αγχολυτική, αναλγητική, αντισταμινική, κατά της ρευματοειδούς αρθρίτιδας

Etaqualone

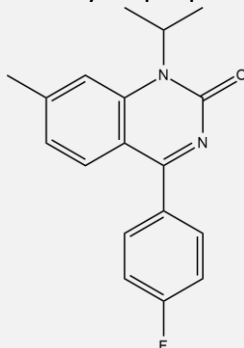
3-(2-ethylphenyl)-2-methyl-quinazolin-4-one



Καταστολή του νευρικού συστήματος

Fluproquazone

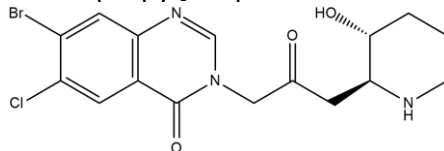
4-(4-fluorophenyl)-7-methyl-1-propan-2-ylquinazolin-2-one



Αντιπυρετική, μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη

Halofuginone

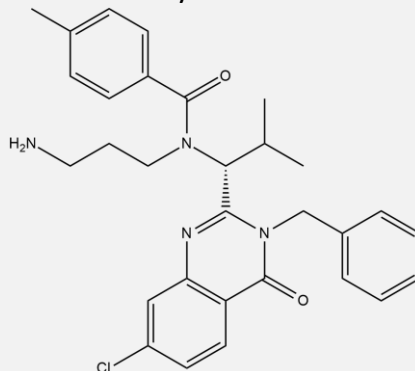
7-Bromo-6 chloro-3-[3-[(2S,3R)-3-hydroxy-2-piperidinyl]-2-oxopropyl]-4-quinazolinone



Κοκκιδιοστατική, αντικαρκινική, κατά των διαφόρων αυτοάνοσων νοσημάτων

Ispinesib

N-(3-aminopropyl)-N-[(1R)-1-[7-chloro-3,4-dihydro-4-oxo-3-(phenylmethyl)-2-quinazoliny]-2-methylpropyl]-4-methyl-benzamide

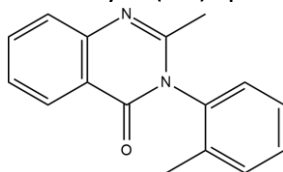


Αντικαρκινική

Methaqualone

2-methyl-3-o-tolyl-4(3H)-quinazolinone

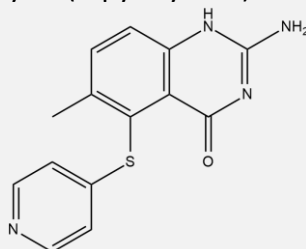
Υπνωτική



Nolatrexed

2-Amino-6-methyl-5-(4-pyridylthio)-1H-quinazolin-4-one

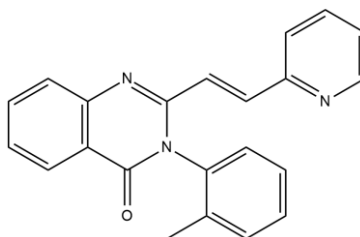
Αναστολέας θυμιδυλικής
συνθάσης, Αντικαρκινική



Piriqualone

3-(2-methylphenyl)-2-[(E)-2-pyridin-2-ylethenyl]quinazolin-4-one

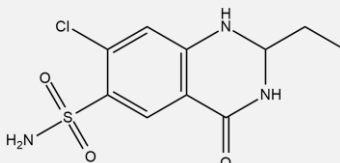
Αντισπασμωδική



Quinethazone

7-chloro-2-ethyl-4-oxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazoline-6-sulfonamide

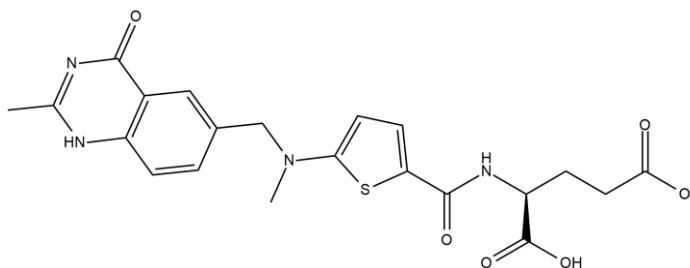
Αντιυπερτασική



Raltitrexed

N-[(5-{methyl[(2-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinazolin-6-yl)methyl]amino}-2-thienyl)carbonyl]-L-glutamic acid

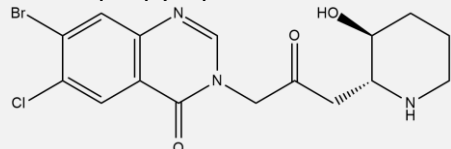
Αντικαρκινική



Tempostat

7-bromo-6-chloro-3-[3-[(2R,3S)-3-hydroxy-2-piperidyl]-2-oxopropyl]quinazolin-4-one

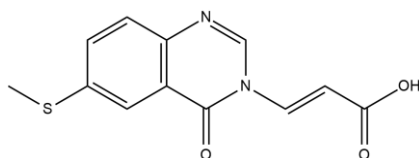
Αναστολή της εναπόθεσης κολλαγόνου



Tiacrilast

(E)-3-[6-(Methylthio)-4-oxoquinazolin-3(4H)-yl]propenoic acid

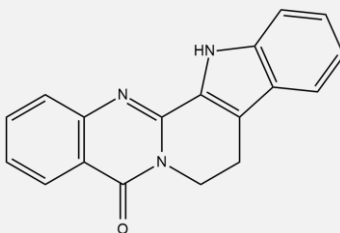
Αντιαλλεργική



Rutaecarpine

8,13-Dihydroindolo[2',3':3,4]pyrido[2,1-b]quinazolin-5(7H)-one

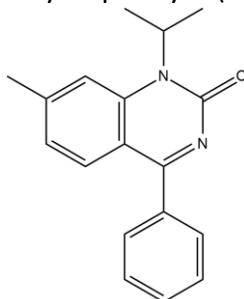
Κατά του Alzheimer



Proquazone

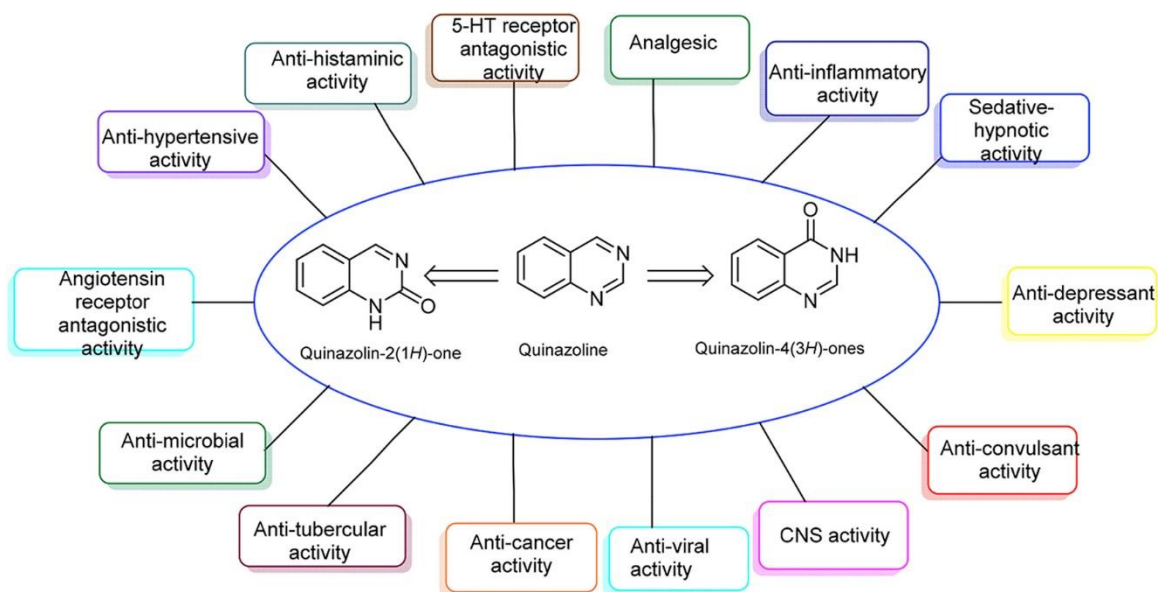
1-Isopropyl-7-methyl-4-phenyl-2(1H)-quinazolinone

Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη



1.5. Βιολογική δράση

Η ετεροκυκλική δομή των ενώσεων απαντάται συχνά στον τομέα της φαρμακευτικής χημείας, ευθυνόμενη για ποικίλες βιολογικές – θεραπευτικές ιδιότητες. Οι κιναζολινόνες, σε φαρμακολογικό επίπεδο, κι ιδιαίτερα η κιναζολιν-4-όνη, αποτελούν μια από τις σημαντικότερες κατηγορίες ετεροκυκλικών ενώσεων με πληθώρα βιολογικών δράσεων (Εικόνα 2). Η σταθερότητα του πυρήνα των κιναζολινονών αποτελεί εναρκτήριο κίνητρο για την εισαγωγή διαφόρων βιοδραστικών τμημάτων σε αυτόν, και κατ' επέκταση για την ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών ουσιών.



Εικόνα 2: Απεικόνιση διαφόρων βιολογικών δράσεων των κιναζολινονών.⁴

Ορισμένες εκ των βιολογικών δράσεων είναι οι εξής:

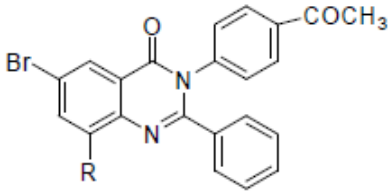
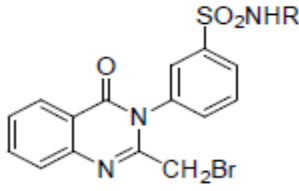
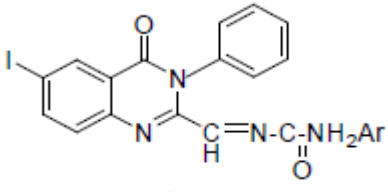
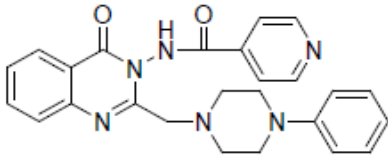
- i. Αναλγητική
- ii. Αντιφλεγμονώδης
- iii. Αντιεπιληπτική
- iv. Ηρεμιστική
- v. Υπνωτική
- vi. Αντιική
- vii. Αντικαρκινική
- viii. Αντι-φυματιώδης
- ix. Αντιϊσταμινική
- x. Αντιυπερτασική

- xi. Αντιμικροβιακή
- xii. Αντιοξειδωτική
- xiii. Άλλες δραστηριότητες του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ)
- xiv. Ανταγωνιστική δράση του υποδοχέα της αγγειοτασίνης
- xv. Ανταγωνιστική δράση του υποδοχέα της 5-υδροξυ-τροπταμίνης⁵

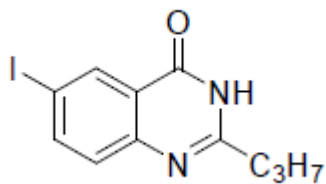
Η ανακάλυψη νέων θεραπευτικών παρεμβολών του DNA για την θεραπεία του καρκίνου αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους στόχους της σύγχρονης ιατρικής. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση της δοξορουβικίνης, όπου απομονώθηκε αρχικά από το βακτήριο *Streptomyces peucetius*, και είναι ευρέως χρησιμοποιούμενο αντιβιοτικό της ομάδας των αντικαρκινικών παραγόντων της ανθρακυκλίνης. Ο ακριβής μηχανισμός δράσης της περιλαμβάνει την παρεμβολή της μεταξύ των ζευγών βάσεων της διπλής έλικας του DNA, προκαλώντας μονόκλωνες και δίκλωνες θραύσεις, αποτρέποντας, τελικά, την αντιγραφή του DNA και συνεπώς τη σύνθεση πρωτεϊνών.⁶

Στον επόμενο πίνακα (Πίνακας 3) παρατίθενται μερικά παραδείγματα κιναζολινονών με τις αντίστοιχες θεραπευτικές τους ιδιότητες.²

Πίνακας 3: Παραδείγματα κιναζολινονών με βιολογικές δράσεις.

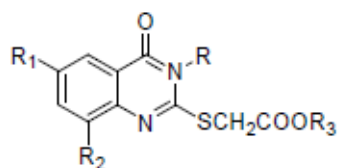
<p>Παράγωγα 2-φαινυλ-4(3H) κιναζολινόνης</p>	 <p>R=H or Br</p>	<p>Αντιφλεγμονώδη και αναλγητική δράση</p>
<p>Παράγωγα N-(πυριμιδιν-2-υλ- βενζολοφουλφοναμίδιο) κιναζολιν-4(3H)-όνης</p>	 <p>R=H, Cl, Br</p>	<p>Αντιφλεγμονώδη και αναλγητική δράση</p>
<p>Παράγωγα τριαζολο[4,3-a]- κιναζολιν-7-όνης</p>	 <p>Ar=H, CH₃, C₂H₅, C₆H₅</p>	<p>Αντιβακτηριδιακή και αντιμυκητιακή δράση</p>
<p>Παράγωγα πιπεραζινο-κιναζολιν- 4-όνης</p>		<p>Αντιβακτηριδιακή και αντιική δράση</p>

6-ιωδο-2-προπυλο-
4(3H)-κιναζολινόνη



Αντιοξειδωτική
δράση

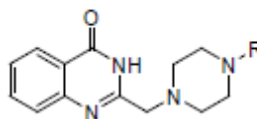
Παράγωγα
3H-κιναζολιν-4-όνης



Αντισπασμωδική
δράση

R=CH₃, C₂H₅, C₆H₅
R₁, R₂=H, Br, Cl
R₃=not substituted or substituted

Κιναζολινικά παράγωγα



Αντικαρκινική
δράση

R
a= H,
b=Acetyl,
c=Propionyl,
d= Isobutryl,
e=Heptanoyl,
f=Ethyl

2. Μικροκυματική ακτινοβολία

2.1. Γενικά

Οι ανάγκες για χρήση υλικών και μεθόδων φιλικών προς το περιβάλλον ώθησαν την οργανική σύνθεση, έναν από τους μεγαλύτερους και σημαντικότερους τομείς στην χημεία, στην ανάπτυξη και βελτίωση νέων τεχνολογιών σύνθεσης, όπως φωτοχημικών, ηλεκτροχημικών και ενζυμικών. Μία ακόμη από αυτές τις τεχνολογίες είναι η θέρμανση των χημικών αντιδράσεων μέσω μικροκυματικής ακτινοβολίας, ένα χρήσιμο εργαλείο για γρήγορες και αποτελεσματικές αντιδράσεις σύνθεσης που εφαρμόζεται για πρώτη φορά στην χημική σύνθεση το 1986.⁷

2.2. Ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία

Η μικροκυματική ακτινοβολία αποτελεί μια μορφή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στο εύρος συχνοτήτων 0,3 – 300 GHz και σε μήκη κύματος από 1 mm έως 1 m, επομένως κατατάσσεται μεταξύ των συχνοτήτων των υπερύθρων και ραδιοκυμάτων. Σημειώνεται ότι, τόσο οι φούρνοι μικροκυμάτων οικιακής χρήσης όσο και εκείνοι που προορίζονται ως αντιδραστήρες χημικής σύνθεσης λειτουργούν με συχνότητα 2,45 GHz και μήκος κύματος 12,25 cm, προκειμένου να αποφευχθούν τυχόν παρεμβολές στις τηλεπικοινωνίες και στις συχνότητες κινητού τηλεφώνου. Τα μικροκύματα δεν δύναται να προκαλέσουν χημικές αντιδράσεις με άμεση απορρόφηση ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας, διότι η ενέργεια είναι αρκετά χαμηλή για την διάσπαση των μοριακών δεσμών, εν αντιθέσει με την υπεριώδη και ορατή ακτινοβολία.⁸

2.3. Θέρμανση με χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας

Δεν αποκρίνονται όλα τα υλικά θετικά στην θέρμανση μικροκυμάτων, έτσι ανάλογα με την αντίδρασή τους διακρίνονται στις εξής κατηγορίες:

- Υλικά διαπερατά στα μικροκύματα (π.χ. θείο)
- Υλικά που αντανακλούν τα μικροκύματα (π.χ. χαλκός)
- Υλικά που απορροφούν τα μικροκύματα (π.χ. νερό)

Τα σημαντικότερα εκ των παραπάνω υλικών είναι αυτά που απορροφούν τα μικροκύματα μέσω δύο διαφορετικών μηχανισμών, δηλαδή: μέσω διπολικής πόλωσης και ιοντικής αγωγιμότητας.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα μικροκύματα είναι ηλεκτρομαγνητικά κύματα τα οποία αποτελούνται από ένα ηλεκτρικό και ένα μαγνητικό πεδίο. Η αλληλεπίδραση του ηλεκτρικού πεδίου με την μήτρα καλείται διπολική πόλωση. Προκειμένου μια ουσία να

είναι ικανή να παράγει θερμότητα στην περίπτωση που ακτινοβολείται με μικροκύματα θα πρέπει να διαθέτει διπολική ροπή. Όταν εκτίθεται σε συχνότητες μικροκυμάτων, τα δίπολα του δείγματος ευθυγραμμίζονται με το εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Εικόνα 3). Ενώ αυτό παρουσιάζει διακυμάνσεις, το δίπολο προσπαθεί να επανευθυγραμμιστεί με το εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο, με αποτέλεσμα η ενέργεια να μετατρέπεται σε μορφή θερμότητας μέσω μοριακής τριβής και απώλειας διηλεκτρικού. Η ποσότητα θερμότητας που παράγεται σχετίζεται άμεσα με την ικανότητα της μήτρας να ευθυγραμμιστεί με την συχνότητα του εφαρμοζόμενου πεδίου. Στην περίπτωση όπου ο χρόνος για να ευθυγραμμιστεί το δίπολο (ακτινοβολία υψηλής συχνότητας) ή για να επαναπροσανατολιστεί πολύ γρήγορα με το εφαρμοζόμενο πεδίο (ακτινοβολία χαμηλής συχνότητας) δεν επαρκεί, τότε δεν παρατηρείται θέρμανση. Η κατανομημένη συχνότητα των 2.45 GHz που χρησιμοποιείται σε όλα τα εμπορικά συστήματα βρίσκεται μεταξύ αυτών των δύο ακραίων τιμών και παρέχει στο μοριακό δίπολο χρόνο να ευθυγραμμιστεί στο πεδίο, χωρίς να ακολουθήσει ακριβώς το εναλλασσόμενο πεδίο.



Εικόνα 3: Διπολικά μόρια που προσπαθούν να ευθυγραμμιστούν με ταλαντευόμενα ηλεκτρικά στοιχεία.⁹

Ως εκ τούτου, καθώς το δίπολο επαναπροσανατολίζεται για να ευθυγραμμιστεί με το ηλεκτρικό πεδίο, το ηλεκτρικό πεδίο έχει ξεκινήσει να αλλάζει, δημιουργώντας μια διαφορά φάσης μεταξύ του πεδίου και του διπόλου. Αυτή η διαφορά φάσης έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια ενέργειας από το δίπολο σε μορφή μοριακής τριβής και συγκρούσεων, προκαλώντας τελικά διηλεκτρική θέρμανση. Συνοπτικά, η ενέργεια πεδίου μεταφέρεται στο μέσο και η ηλεκτρική ενέργεια μετατρέπεται σε κινητική ή θερμική ενέργεια και τελικά σε θερμότητα. Τονίζεται ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ ακτινοβολίας μικροκυμάτων και μορίων πολικού διαλύτη που παρατηρείται όταν η συχνότητα της ακτινοβολίας αντιστοιχεί περίπου στη συχνότητα της διαδικασίας περιστροφικής χαλάρωσης δεν είναι φαινόμενο κβαντικού συντονισμού. Οι μεταβάσεις μεταξύ των κβαντισμένων περιστροφικών ζωνών δεν εμπλέκονται και η μεταφορά

ενέργειας δεν είναι ιδιότητα συγκεκριμένου μορίου, αλλά το αποτέλεσμα ενός συλλογικού φαινομένου που περιλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος. Η θερμότητα παράγεται από δυνάμεις τριβής που αναπτύσσονται μεταξύ των πολικών μορίων, των οποίων η περιστροφική ταχύτητα αυξάνεται με την σύζευξη με την ακτινοβολία μικροκυμάτων.

Ο δεύτερος κύριος μηχανισμός θέρμανσης είναι ο μηχανισμός ιοντικής αγωγιμότητας. Κατά την διάρκεια της ιοντικής αγωγής, καθώς τα διαλυμένα φορτισμένα σωματίδια σε ένα δείγμα (συνήθως ιόντα) ταλαντεύονται εμπρός και πίσω υπό την επίδραση του πεδίου μικροκυμάτων, συγκρούονται με τα γειτονικά μόρια ή άτομα (Εικόνα 4). Αυτή η σ' συγκρουση προκαλεί διέγερση ή κίνηση, δημιουργώντας τελικά θερμότητα.^{8,10,9}



Εικόνα 4: Φορτισμένα σωματίδια διαλύματος που ακολουθούν το εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο.⁹

2.4. Διηλεκτρικές ιδιότητες

Τα χαρακτηριστικά θέρμανσης ενός συγκεκριμένου υλικού υπό συνθήκες ακτινοβολίας μικροκυμάτων εξαρτώνται από τις διηλεκτρικές ιδιότητές του. Η ικανότητα μιας ουσίας να μετατρέπει την ηλεκτρομαγνητική ενέργεια σε θερμότητα, σε δεδομένη συχνότητα και θερμοκρασία καθορίζεται από την λεγόμενη εφαπτομένη απώλειας, $\tan \delta$. Ο παράγοντας απώλειας εκφράζεται από το πηλίκο, $\tan \delta = \frac{\epsilon''}{\epsilon'}$, όπου ϵ'' είναι η απώλεια διηλεκτρικού, ενδεικτική της απόδοσης με την οποία η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία μετατρέπεται σε θερμότητα, και ϵ' είναι η διηλεκτρική σταθερά που περιγράφει την ικανότητα των μορίων να πολώνονται από το ηλεκτρικό πεδίο. Για μια αντίδραση απαιτείται διαλύτης με υψηλή τάση για αποτελεσματική απορρόφηση και κατ' επέκταση για γρήγορη θέρμανση.

Γενικά, οι διαλύτες μπορούν να ταξινομηθούν ως υψηλής ($\tan \delta > 0.5$), μεσαίας ($\tan \delta = 0.1 - 0.5$) και χαμηλής ($\tan \delta < 0.1$) απορρόφησης μικροκυμάτων. Άλλοι κοινοί διαλύτες χωρίς μόνιμη διπολική ροπή, όπως ο τετραχλωράνθρακας και το βενζόλιο είναι

περισσότερο ή λιγότερο διαπερατοί στα μικροκύματα. Πρέπει να τονιστεί ότι η χαμηλή τιμή του $\tan \delta$ δεν αποκλείει την χρήση ενός συγκεκριμένου διαλύτη σε μια αντίδραση που θερμαίνεται μέσω μικροκυματικής ακτινοβολίας. Δεδομένου ότι είτε τα υποστρώματα είτε ορισμένα αντιδραστήρια / καταλύτες είναι πολικά, οι συνολικές διηλεκτρικές ιδιότητες του μέσου αντίδρασης στις περισσότερες των περιπτώσεων θα επιτρέπουν επαρκή θέρμανση με μικροκύματα. Επιπρόσθετα, πολικά πρόσθετα όπως αλκοόλες ή ιοντικά υγρά μπορούν να προστεθούν σε μίγματα αντίδρασης χαμηλής απορρόφησης, προκειμένου να αυξηθεί τελικά το επίπεδο απορρόφησης του μέσου. Σημειώνεται ότι οι τιμές εφαλτομένης απώλειας εξαρτώνται τόσο από την συχνότητα όσο και από την θερμοκρασία.

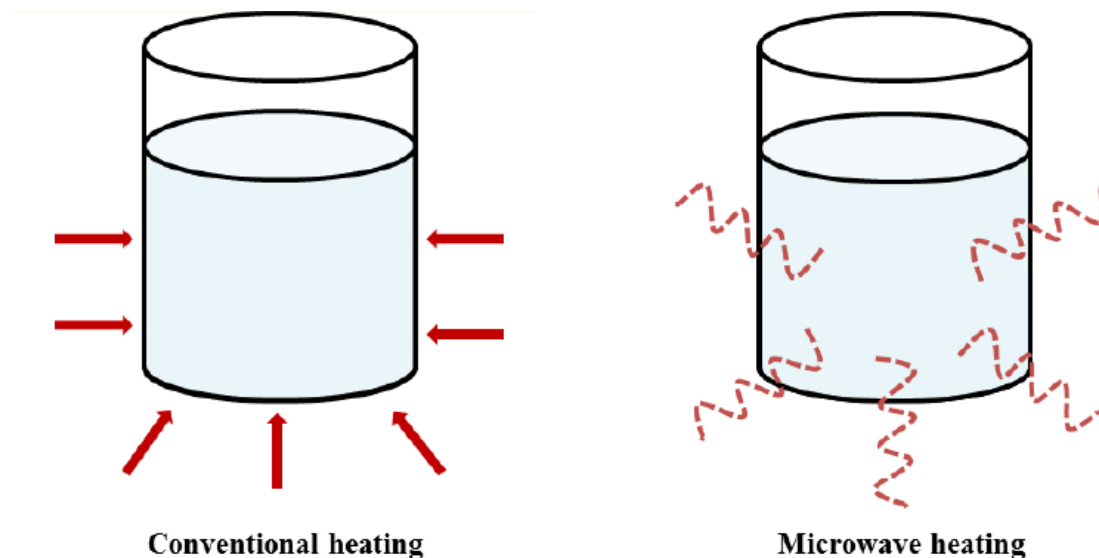
Η αλληλεπίδραση της ακτινοβολίας μικροκυμάτων με την ύλη χαρακτηρίζεται από τρεις διαφορετικές διαδικασίες: απορρόφηση, μετάδοση και ανάκλαση. Υψηλά διηλεκτρικά υλικά, όπως οι πολικοί οργανικοί διαλύτες, οδηγούν σε ισχυρή απορρόφηση μικροκυμάτων και κατ' επέκταση σε ταχεία θέρμανση του μέσου. Αντίθετα, τα μη πολικά υλικά εμφανίζουν μικρές αλληλεπιδράσεις με τη μικροκυματική ακτινοβολία, με αποτέλεσμα να ευνοείται η χρήση τους ως δομικά υλικά σε αντιδράσεις. Εάν η ακτινοβολία μικροκυμάτων αντανακλάται από την επιφάνεια του υλικού, δεν υπάρχει καμία ή υπάρχει αμελητέα σύζευξη ενέργειας στο σύστημα. Αύξηση θερμοκρασίας παρατηρείται οριακά στο υλικό, ιδιαίτερα σε μέταλλα με υψηλή αγωγιμότητα.^{8,11}

2.5. Πλεονεκτήματα μικροκυματικής ακτινοβολίας έναντι συμβατικών μεθόδων σύνθεσης

Η χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας για την διεξαγωγή αντιδράσεων δύναται να επιφέρει πληθώρα θετικών επιδράσεων. Αρχικά, τα μικροκύματα αυξάνουν την αναπαραγωγισιμότητα των αντιδράσεων, καθώς επιταχύνουν τον ρυθμό της αντίδρασης και επιτυγχάνουν μεγαλύτερες αποδόσεις και καθαρότερα προϊόντα. Μέσω επιλεκτικής και ομοιόμορφης θέρμανσης η ενέργεια που καταναλώνεται είναι πολύ χαμηλότερη έναντι της αντίστοιχης των συμβατικών μεθόδων θέρμανσης, ενισχύοντας με αυτόν τον τρόπο τον πράσινο χαρακτήρα της μεθόδου.

Η θέρμανση με χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας διαφέρει από την συμβατική θέρμανση από πολλές απόψεις. Αρχικά, η συμβατική σύνθεση περιλαμβάνει την χρήση ενός κλιβάνου ή λουτρού λαδιού που θερμαίνει τα τοιχώματα των αντιδραστήρων. Για να επιτευχθεί η θερμοκρασία – στόχος στον πυρήνα του δείγματος απαιτείται περισσότερος χρόνος, με αποτέλεσμα η μέθοδος να χαρακτηρίζεται αργή και

αναποτελεσματική όσον αφορά την μεταφορά ενέργειας στο σύστημα αντίδρασης. Από την άλλη πλευρά, σε έναν αντιδραστήρα μικροκυμάτων η μικροκυματική ακτινοβολία διεισδύει μέσα στο υλικό και η θερμότητα παράγεται απευθείας μέσω αλληλεπίδρασης του υλικού με την ακτινοβολία (Εικόνα 5). Όσον αφορά το ενεργειακό μέρος, η ενέργεια μεταφέρεται μόνον στα συστατικά της αντίδρασης που είναι ευαίσθητα στην πόλωση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την βελτίωση της ενεργειακής απόδοσης, μειώνοντας την ανάγκη θέρμανσης των δοχείων ή ολόκληρης της συσκευής θέρμανσης. Η ικανότητα της ενέργειας να κατευθύνεται σε συγκεκριμένα μέρη του συστήματος, όπως μεταλλικά σωματίδια, πιθανόν να μειώνει ή ακόμα και να εξαλείφει την ανάγκη για διαλύτες, με προφανή οικονομικά και περιβαλλοντικά οφέλη. Εν συνεχεία, η άμεση θέρμανση οδηγεί σε αύξηση της θερμοκρασίας του δείγματος ταχύτερα απ' ό,τι με συμβατικές μεθόδους, και συχνά έχουν ως αποτέλεσμα εντελώς διαφορετική κινητική. Επιπλέον, η θέρμανση μέσω μικροκυματικής ακτινοβολίας μπορεί να εφαρμοστεί σε ένα δείγμα από μια απομακρυσμένη πηγή μέσω ενός κυματοδηγού που επιτρέπει την επεξεργασία σε επικίνδυνα περιβάλλοντα.^{10,12}



Εικόνα 5: Σύγκριση συμβατικής μεθόδου θέρμανσης με θέρμανση μέσω μικροκυματικής ακτινοβολίας.¹⁰

2.6. Εφαρμογές

Η εφαρμογή της μικροκυματικής ακτινοβολίας στην χημική σύνθεση προκαλεί την επιτάχυνσή της, δηλαδή ταχύτερες αντιδράσεις, υψηλότερες αποδόσεις και αυξημένη καθαρότητα των προϊόντων. Επιπλέον, χάριν στην διαθεσιμότητα αντιδραστήρων μικροκυμάτων μεγάλης χωρητικότητας οι αποδόσεις των πειραμάτων αυξάνονται, χωρίς να απαιτείται αλλαγή ορισμένων παραμέτρων της αντίδρασης. Η σύνθεση μέσω μικροκυματικής ακτινοβολίας ενδείκνυται για την ανακάλυψη νέων φαρμακευτικών ουσιών – σκευασμάτων.

Η οργανική σύνθεση με την βοήθεια των μικροκυμάτων ήταν η πρώτη, και μία από τις πιο ερευνημένες εφαρμογές της μικροκυματικής ακτινοβολίας στις χημικές αντιδράσεις. Βιβλιογραφικά διαφαίνεται ότι μεγάλο εύρος οργανικών αντιδράσεων έχουν πραγματοποιηθεί με επιτυχία. Ορισμένες από αυτές είναι οι αντιδράσεις Diels-Alder, Ene, Heck, Suzuki, Mannich, υδρογόνωσης της [β]-λακτάμης, υδρόλυσης, αφυδάτωσης, εστεροποίησης, εποξείδωσης, συμπύκνωσης, κυκλοποίησης, προστασίας και αποπροστασίας, κ.λπ.. Επομένως, η οργανική σύνθεση μέσω μικροκυματικής ακτινοβολίας γίνεται ευρέως χρησιμοποιούμενη στην φαρμακευτική βιομηχανία, ιδίως στην ανάπτυξη και βελτίωση των φαρμακευτικών ουσιών. Στην φάση αυτή, οι χημικοί χρησιμοποιούν ποικίλες συνθετικές τεχνικές για την ανάπτυξη υποψήφιων φαρμάκων από μόρια οδηγούς. Σύμφωνα με τις συνθήκες αντίδρασης, αντιδράσεις οργανικής σύνθεσης μπορούν να διεξαχθούν στις ακόλουθες τεχνικές:

- Οργανική σύνθεση με μικροκύματα σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης
- Οργανική σύνθεση με μικροκύματα σε συνθήκες υψηλής πίεσης
- Οργανική σύνθεση με μικροκύματα χωρίς προσθήκη διαλυτών

Επιπλέον, η μικροκυματική ακτινοβολία μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε περιπτώσεις σύνθεσης ανόργανων ενώσεων, προϊόντων νανοτεχνολογίας, πολυμερών και ραδιοφαρμακευτικών προϊόντων.¹⁰

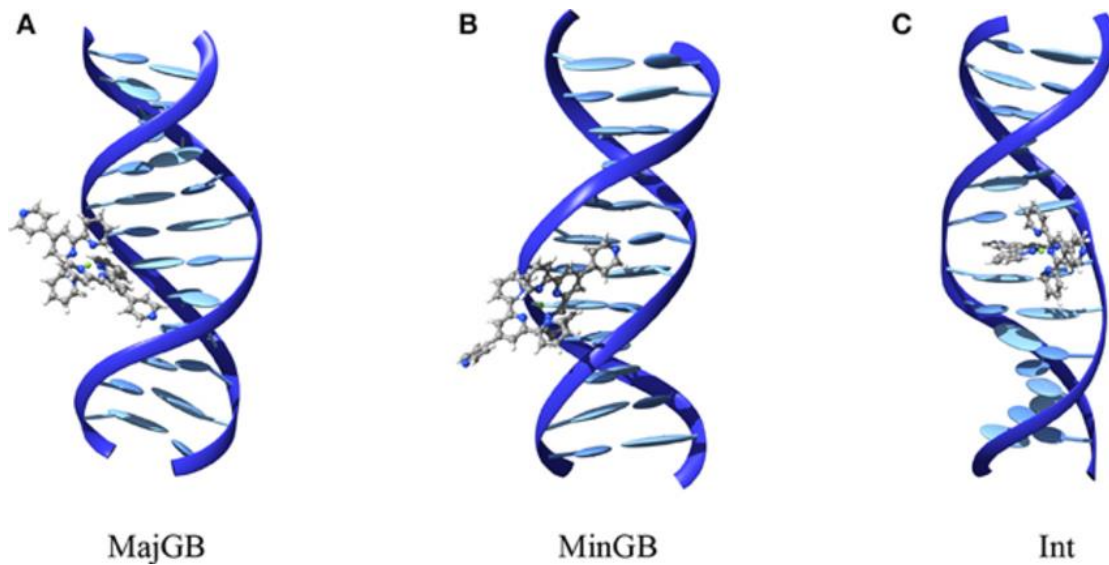
3. Αλληλεπίδραση ενώσεων με το DNA

3.1. Γενικά

Το δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ είναι ιδιαίτερα σημαντικό καθότι μεταφέρει γενετικές πληροφορίες και καθοδηγεί τη βιολογική σύνθεση πρωτεϊνών και ενζύμων μέσω της διαδικασίας αντιγραφής και μεταγραφής των γενετικών πληροφοριών σε ζωντανά κύτταρα. Μελέτες σχετικές με την αλληλεπίδραση ορισμένων μικρών μορίων έχουν αναγνωριστεί ως ένα από τα βασικά θέματα των τελευταίων δεκαετιών. Αποτελούν χρήσιμα εργαλεία για την κατανόηση των δομικών ιδιοτήτων του DNA, των πιθανών μεταλλάξεων των γονιδίων, της προέλευσης ορισμένων ασθενειών, του μηχανισμού δράσης αντικαρκινικών φαρμάκων και, ως εκ τούτου, για το σχεδιασμό νέων και αποτελεσματικότερων φαρμακευτικών ουσιών για την αντιμετώπιση γενετικών ασθενειών.

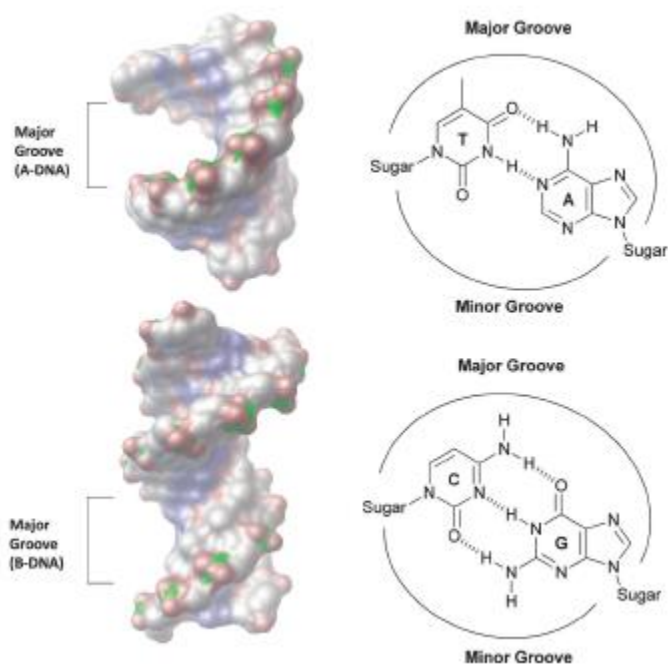
Ο αποκλεισμός της οδού που σχετίζεται με την ασθένεια σε πρώιμο στάδιο κρίνεται καθοριστικός για την διακοπή της σύνθεσης της εισερχόμενης πρωτεΐνης. Σημειώνεται πως, διατίθενται ένας ικανοποιητικός αριθμός μορίων παρεμβολής ως αντικαρκινικός, αντιπαρασιτικός και αντιμικροβιακός παράγοντας (π.χ. βρωμιούχο αιθίδιο, προφλαβίνη, κ.α.) που ασκεί την βιολογική του απόκριση μέσω αλληλεπίδρασης με το δίκλωνο DNA αναστέλλοντας τις διαδικασίες μεταγραφής, αντιγραφής και των επιδιορθωτικών μηχανισμών.

Τα αντικαρκινικά φάρμακα αλληλεπιδρούν με το DNA με πολλούς διαφορετικούς τρόπους, όπως παρεμβολή, μη ομοιοπολική σύνδεση στην αύλακα, ομοιοπολική σύνδεση, διάσπαση του DNA και ενσωμάτωση νουκλεοτιδίου – αναλόγου (Εικόνα 6). Ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης του DNA με την φαρμακευτική ουσία είναι η θερμοδυναμική σταθερότητα και οι αλλαγές στις λειτουργικές ιδιότητες του DNA. Η αλληλεπίδραση των αντικαρκινικών φαρμάκων με το DNA εμφανίζεται κυρίως με τρεις διαφορετικούς τρόπους. Πρώτον, μέσω του ελέγχου των μεταγραφικών παραγόντων και των πολυμερασών στο οποίο η ουσία αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που συνδέονται με το DNA. Δεύτερον, μέσω σύνδεσης του RNA είτε με την διπλή έλικα του DNA προκειμένου να σχηματιστούν δομές τριπλής έλικας νουκλεϊκού οξέος, είτε με έκθεση των υβριδίων DNA-RNA που σχηματίζουν μονόκλωνο DNA και πιθανώς να επεμβαίνουν στην μεταγραφική δραστηριότητα. Τρίτον, μέσω σύνδεσης μικρών αρωματικών μορίων προσδέματος σε διπλές ελικοειδείς δομές DNA. Η σύνδεση μικρών μορίων με το DNA, με την σειρά της, περιλαμβάνει ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση με το αρνητικά φορτισμένο νουκλεϊκό οξύ με δομή φωσφορικού σακχάρου, παρεμβολή επίπεδων συστημάτων αρωματικού δακτυλίου μεταξύ ζευγών βάσεων, και αλληλεπιδράσεις στην μικρή και μεγάλη αύλακα του DNA.



Εικόνα 6: (A) εξωτερική συναρμογή στην μεγάλη αύλακα, (B) εξωτερική συναρμογή στην μικρή αύλακα, (C) εσωτερική παρεμβολή.

Το δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) συντίθεται από νουκλεοτιδικές βάσεις (αδενίνη, θυμίνη, γουανίνη και κυτοσίνη) συνδεδεμένες με σάκχαρα μέσω φωσφοδιεστερικών δεσμών. Όταν οι συμπληρωματικοί κλώνοι του DNA συνδέονται με ενδομοριακές δυνάμεις σχηματίζεται η διπλή έλικα του DNA, μεγάλου μήκους και μικρής διαμέτρου, η οποία μπορεί να αποκτήσει διάφορες διαμορφώσεις, όπως μορφή -A, -B ή -Z. Η επικρατέστερη μορφή παρουσιάζεται στην εικόνα 7 (μορφή -B), η οποία έχει μία χαρακτηριστική φαρδιά, μακριά μεγάλη αύλακα και μια στενή, μακριά μικρή αύλακα. Σημειώνεται ότι, ποικίλες αλληλεπιδράσεις συμβαίνουν μεταξύ των πρωτεϊνών και του DNA προκειμένου να ικανοποιηθούν βασικές βιολογικές διεργασίες, όπως η μεταγραφή. Η προσπάθεια ανάπτυξης μικρών μορίων αναστολέων της μεταγραφής καθιστά απαραίτητη την κατανόηση του τρόπου αλληλεπίδρασης αυτών των μικρών μορίων με το DNA.



Εικόνα 7: (Αριστερά) Σχηματική απεικόνιση των δύο διαμορφώσεων του DNA (-A και -B). (Δεξιά) Σχηματική απεικόνιση του δότη/αποδέκτη δεσμού υδρογόνου στην μικρή και μεγάλη αύλακα, αντίστοιχα.

Οι δύο κύριοι τρόποι αλληλεπίδρασης των μικρών μορίων με το DNA είναι μέσω ομοιοπολικής και μη ομοιοπολικής σύνδεσης. Η ομοιοπολική σύνδεση επιτυγχάνεται μέσω μεταλλο-παρεμβολών, δηλαδή συνδυασμό οργανικών ενώσεων και ενώσεων συντονισμού μεταβατικών μετάλλων, οι οποίοι αλληλεπιδρούν με το DNA δρώντας ανασταλτικά σε δύο κατευθύνσεις – συντονισμό και παρεμβολή μετάλλων. Αντιθέτως, η σύνδεση και η παρεμβολή στην αύλακα είναι η επικρατέστερη και μη αντιστρέψιμη μορφή μη ομοιοπολικής σύνδεσης μικρών μορίων στο DNA. Η σύνδεση των μορίων στη μικρή αύλακα παίρνει την μορφή σχήματος ημισελήνου, συμπληρωματικό του σχήματος της αύλακας, ευνοώντας την ανάπτυξη δεσμών van der Waals και δεσμών υδρογόνου. Τονίζεται ότι η πρόσδεση των ενώσεων στην μικρή αύλακα έναντι της μεγάλης προτιμάται καθώς τα μόρια εφαρμόζουν καλύτερα. Η παρεμβολή διαφόρων φαρμακευτικών ουσιών στο DNA, όπου ένα τμήμα του μορίου παρεμβάλλεται μεταξύ των γειτονικών βάσεων του DNA, είναι μια πολύ γνωστή διαδικασία αναστολής διαφόρων οδών και λειτουργιών του DNA.

Αν και, το DNA ως φαρμακευτικός στόχος, έχει μεγάλη θεραπευτική αξία, μόνο λίγα λογισμικά είναι διαθέσιμα για την αναπαράσταση των συνδέσεων DNA-υποκαταστάτη συγκριτικά με αυτών των πρωτεϊνών-υποκαταστάτη. Ορισμένα λογισμικά είναι το GOLD, GLIDE, DNA Ligand Docking, AUTODOCK, DOCK και CDOCKER. Αναφέρεται πως δεν

μπορούν να χρησιμοποιηθούν όλα τα παραπάνω λογισμικά για τον χειρισμό νουκλεϊκών οξέων, ιδιαίτερα των διασπαστών DNA. Έχουν σημειωθεί αρκετές μελέτες μοντελοποίησης για συστήματα DNA διασπαστών μέσω του AUTODOCK, ωστόσο, με δομές DNA που έχουν προσχηματισμένες θέσεις παρεμβολής, δηλαδή αφαιρώντας τον υποκαταστάτη από το σύμπλοκο. Περιορισμένες είναι οι βάσεις δεδομένων των DNA διασπαστών, περιορίζοντας κατ' επέκταση το εύρος των μελετών σε ορισμένες δομές / αλληλουχίες DNA.^{13,14,15}

3.2. Υπολογιστική μελέτη (Μοριακή μοντελοποίηση – molecular docking)

Τις τελευταίες δεκαετίες λόγω της ισχυρής τεχνολογικής ανάπτυξης αλλά και των ταυτόχρονων δυσκολιών στις πειραματικές μελέτες έχει εξελιχθεί αρκετά ο κλάδος της μοριακής μοντελοποίησης. Η πειραματική απεικόνιση και ανάλυση διαφόρων ενώσεων μοριακών στόχων με σκοπό τον σχηματισμό πλατφόρμων ελέγχου, χρήσιμων στις βιολογικές μελέτες, κρίνεται μια χρονοβόρος και δαπανηρή διαδικασία, τόσο για την δημιουργία όσο και για την συντήρησή τους. Λαμβάνοντας υπόψιν τις ραγδαίες τεχνολογικές εξελίξεις και την ταχεία αύξηση δομικών, χημικών και βιολογικών διαθέσιμων δεδομένων στους ολοένα και αυξανόμενους θεραπευτικούς στόχους είναι απολύτως κατανοητή η σημαντικότητα της χρήσης *in silico* προσεγγίσεων, όπως η χημειοπληροφορική, η μοριακή μοντελοποίηση και η τεχνητή νοημοσύνη. Πράγματι, η εφαρμογή *in silico* μεθόδων καθιστά δυνατό τον εικονικό σχηματισμό εκατομμυρίων ενώσεων, μειώνοντας τόσο τον απαιτούμενο χρόνο και το αρχικό κόστος, όσο και αυξάνοντας τις πιθανότητες εύρεσης των επιθυμητών υποψήφιων φαρμάκων. Μέχρι στιγμής, υπάρχουν αρκετές διαθέσιμες τεχνικές μοντελοποίησης προκειμένου να διευκολυνθεί ο ερευνητικός τομέας της φαρμακευτικής, εκ των οποίων οι περισσότερες ταξινομούνται σε μεθόδους βασιζόμενες στη δομή και μεθόδους βασιζόμενες στους δεσμούς.

Οι μέθοδοι που βασίζονται στη δομή στηρίζονται σε πληροφορίες που αντλούνται από την τρισδιάστατη δομή του μορίου και επιτρέπουν την κατάταξη των μορίων σύμφωνα με την δομική και ηλεκτρονιακή συμπληρωματικότητα των δεσμών της ένωσης – στόχου. Υπό αυτές τις συνθήκες η μοριακή μοντελοποίηση είναι μία από τις δημοφιλέστερες και πιο επιτυχημένες *in silico* μεθόδους, που συμβάλει στην πρόβλεψη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων και των βιολογικών στόχων. Σε ένα ευρύτερο πλαίσιο η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται αρχικά με την πρόβλεψη του μοριακού προσανατολισμού ενός δεσμού αποδέκτη, και στη συνέχεια εκτιμώντας την συμπληρωματικότητά του μέσω βαθμολογικής κλίμακας.

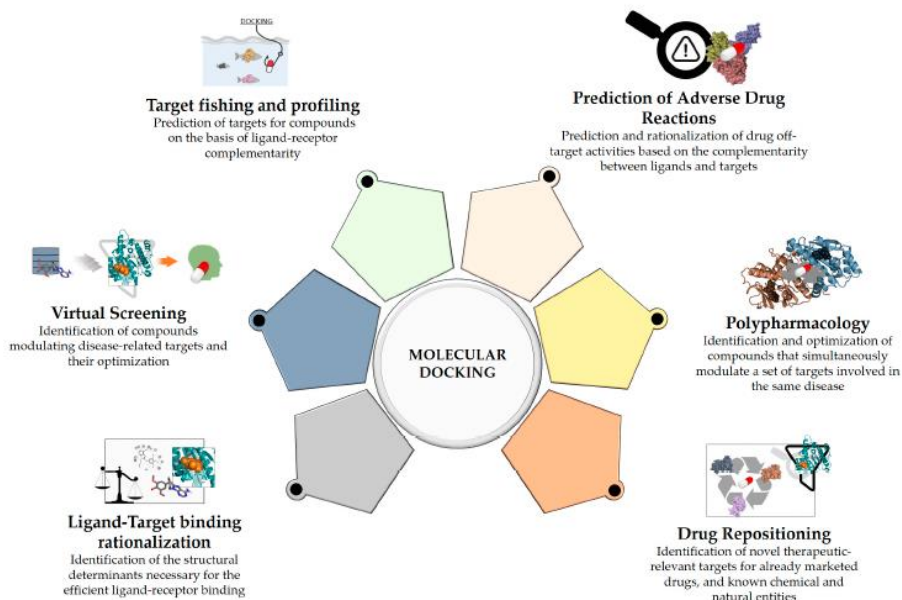
Σταδιακά, προκύπτει το συμπέρασμα ότι η μοντελοποίηση είναι ένα σημαντικό και χρήσιμο εργαλείο στην κατανόηση και μελέτη διαφόρων χημικών ενώσεων, καθώς

επίσης και στον τρόπο με τον οποίο αλληλεπιδρούν με τους μοριακούς στόχους, προκειμένου τελικά να αναπτυχθούν και να συντεθούν νέες φαρμακευτικές ουσίες.

Ορισμένοι από τους μείζονες περιορισμούς που χαρακτηρίζουν την μοντελοποίηση είναι η περιορισμένη δειγματοληψία τόσο του προσδέματος όσο και του υποδοχέα, και η χρήση βαθμολογικών κλιμάκων, οι οποίες πολύ συχνά παρέχουν αποτελέσματα που δεν σχετίζονται με τα πειραματικά δεδομένα. Ωστόσο, η εφαρμογή της μοντελοποίησης περιορίζεται σε βιολογικούς στόχους για τους οποίους οι κρυσταλλικές δομές είναι γνωστές. Για την παράκαμψη αυτού του περιορισμού έχουν υιοθετηθεί αρκετές προσεγγίσεις, όπως για παράδειγμα η σύνθεση ομόλογων μοντέλων παραγόμενων από δομικά πρότυπα με υψηλά επίπεδα ομόλογων ακολουθιών. Επιπλέον, αυτές οι μέθοδοι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν παράλληλα με μοριακή δυναμική για περαιτέρω επικύρωση και τελειοποίηση των *in silico* συμπλόκων. Ωστόσο, η πρόσφατη πρόοδος στη δομική βιολογία και τον προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής, που σταδιακά αυξάνει την προσβασιμότητα σε πειραματικά παραγόμενα σύμπλοκα, θα μετριάσει αυτό το ζήτημα.

Οι *in silico* μέθοδοι, συμπεριλαμβανομένη και αυτή της μοριακής δυναμικής, έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για την εξερεύνηση των διαμορφώσεων των υπό εξέταση ενώσεων, δεσμών και συμπλόκων, έχοντας ως αποτέλεσμα την καλύτερη περιγραφή της δυναμικής συμπεριφοράς των συμπλόκων και την βελτίωση των αποτελεσμάτων μοντελοποίησης.

Παρότι η ανάπτυξη μεθόδων και τεχνικών μοντελοποίησης πραγματοποιήθηκε πρωτίστως για την διερεύνηση της μοριακής αναγνώρισης μεταξύ μεγάλων και μικρών μορίων, πλέον, συμβάλει στην συνεχή ανακάλυψη και βελτιστοποίηση των φαρμακευτικών ουσιών. Επιπλέον, οι τεχνικές μοντελοποίησης επιτρέπουν την κατανόηση των σχέσεων μεταξύ διαφορετικών μοριακών στόχων που πιθανώς εμπλέκονται σε μία ασθένεια – δράση, γεγονός που έχει μεγάλη σημασία και συνάφεια στην πολυφαρμακολογία και στην σύγχρονη ανακάλυψη φαρμακευτικών ουσιών (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Βασικές εφαρμογές της μοριακής μοντελοποίησης (molecular docking).¹⁶

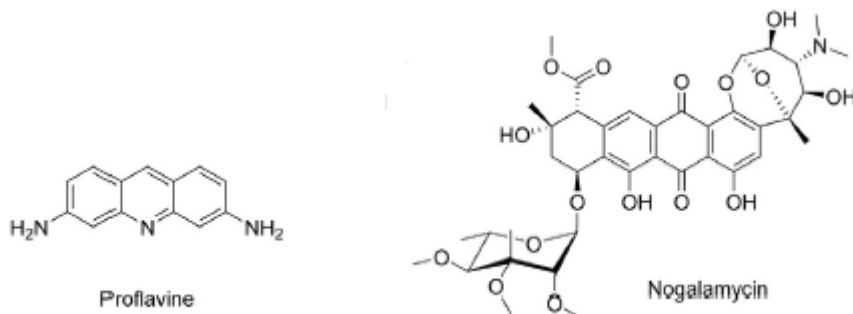
Ειδικότερα, η χρήση αυτής της τεχνικής έχει διευρυνθεί προς νέους ορίζοντες ανακάλυψης φαρμακευτικών ουσιών, τροφοδοτείται από την συνεχή βελτίωση αλγορίθμων και από την αύξηση της προσβασιμότητας στους ερευνητές πληροφοριών σχετικές με τους δεσμούς και τις ενώσεις – στόχους. Για παράδειγμα, χάρη στη βελτιωμένη ταχύτητα και δυναμική πρόβλεψης, η μοριακή μοντελοποίηση έχει ενσωματωθεί σε πρωτόκολλα ταυτοποίησης μεγάλης κλίμακας, όπως α) θέσεων δέσμευσης πρωτεϊνών, β) νέοι μοριακοί στόχοι γνωστών συνδέσμων, γ) πιθανές ανεπιθύμητες ενέργειες φαρμάκων και δ) δεσμοί με νέους ενεργούς χημειότυπους έναντι ενός δεδομένου στόχου ή ενός συνόλου επιθυμητών στόχων.¹⁶

Η μοντελοποίηση με χρήση πρωτεϊνικών μορίων είναι ένα ισχυρό εργαλείο για την μελέτη και βοηθά στην κατανόηση των αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνικών μορίων. Υψίστης σημασίας είναι η ανίχνευση των ιδανικότερων θέσεων πρόσδεσης και η σωστή κατάταξη των σημαντικών δεσμών. Η μοριακή μοντελοποίηση έχει δύο βασικές απαιτήσεις, πρώτον διαθέσιμα δεδομένα αναφορικά με την δομή του μακρομορίου στόχου (πρωτεΐνης ή νουκλεϊκού οξέος) και του υποψήφιου προσδέματος, και δεύτερον, μια διαδικασία εκτίμησης της αλληλεπίδρασης μεταξύ τους. Το RSCB Protein Data Bank (PDB), αποτελεί την κύρια πηγή μακρομορίων για μελέτες μοντελοποίησης. Οι υποψήφιες ενώσεις στις διαδικασίες μοντελοποίησης συνήθως είναι μικρά μόρια. Μετά την ανάπτυξη της συνδυαστικής χημείας υπήρξε ταχεία αύξηση του αριθμού των διαθέσιμων χημικών βιβλιοθηκών, κάτι το οποίο αύξησε την ζήτηση για ταχεία και φθηνή ανάπτυξη τρόπων για μελέτη των αλληλεπιδράσεων με τους πρωτεϊνικούς στόχους. Ο αυξανόμενος αριθμός καταχωρίσεων PDB και χημικών δεδομένων, σε

συνδυασμό με την έντονη επιθυμία για πρόβλεψη των μορφών σύνδεσης και της μεταξύ τους συγγένειας, έχει οδηγήσει σε ευρεία αποδοχή της χρήσης των μεθόδων τεχνητής μοντελοποίησης. Ποικίλοι αλγόριθμοι τεχνικών μοντελοποίησης είναι διαθέσιμοι για την πρόβλεψη και αξιολόγηση των δεσμών που αναπτύσσονται στην εκάστοτε περίπτωση. Πρακτικά η εφαρμογή των μεθόδων αυτών απαιτεί την ύπαρξη αλγορίθμων για συγκεκριμένους υποκαταστάτες για την εύρεση των διαθέσιμων θέσεων πρόσδεσης.¹⁷

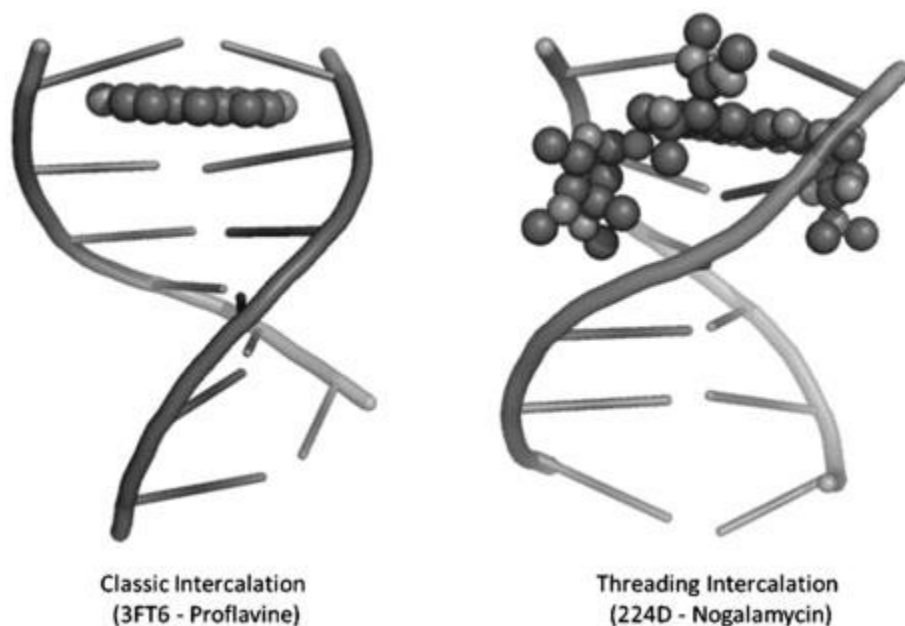
3.3. Παρεμβολή (DNA intercalation)

Οι παρεμβαλλόμενες ουσίες, συνήθως, περιέχουν επίπεδους πολυαρωματικούς δακτυλίους και κατιονικούς υποκαταστάτες. Δύο τύποι μορίων παρεμβολής είναι γνωστοί, οι ενδοπαρεμβολείς και οι παρεμβολείς σπειρώματος. Η προφλαβίνη είναι ένα απλοποιημένο παράδειγμα ενός κλασσικού παρεμβολέα, που όπως φαίνεται από την δομή του χαρακτηρίζεται από επίπεδα αρωματικά συστήματα που οδηγούν στην ενδοπαρεμβολή (Σχήμα 9).



Σχήμα 9: Δομή προφλαβίνης (αριστερά), δομή νογαλαμυκίνης (δεξιά).

Η νογαλαμυκίνη ανήκει στους παρεμβολείς σπειρώματος έχοντας πλευρικές ομάδες κατά μήκος του μακρού άξονα παρεμβολής, τμήμα που επεκτείνει τη δέσμευση του DNA από παρεμβολή σε κύρια ή δευτερεύουσα σύνδεση στην αύλακα (Εικόνα 9). Οι παρεμβολείς διακρίνονται, επίσης, με βάση τον προσανατολισμό του παρεμβαλλόμενου τμήματος σε σχέση με τα ζεύγη βάσεων του DNA. Και σε αυτόν τον διαχωρισμό, η προφλαβίνη και η νογαλαμυκίνη αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα.¹³



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση προφλαβίνης και νογαλμυκίνης.¹³

Η DNA παρεμβολή είναι η εισαγωγή ενός μικρού προσδέματος ή θραύσματος μεταξύ δύο γειτονικών ζευγών βάσεων στον κλώνο του DNA, σχηματίζοντας κλειστές σταθερές δομές. Ως αποτέλεσμα, η δημιουργία σημαντικών μεταβολών στην διπλή έλικα του DNA. Για να πραγματοποιηθεί η παρεμβολή, η αλυσίδα του DNA επιμηκύνεται μειώνοντας την ελικοειδή περιστροφή της, προκαλώντας ελαφρώς τοπική παραμόρφωση – ξετύλιγμα - του DNA. Αυτή η μεταβολή στην δομή και στις μηχανικές ιδιότητες του DNA διαταράσσει πληθώρα βιολογικών λειτουργιών, όπως αντιγραφή, μεταγραφή, μετάφραση και επιδιόρθωση του DNA, με αποτέλεσμα τελικά, τον πιθανό κυτταρικό θάνατο. Για τον λόγο αυτό, η εισαγωγή προσδεμάτων ή παρεμβολέων μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην σύνθεση και βελτίωση αντικαρκινικών φαρμακευτικών ουσιών.

Οι DNA παρεμβολείς είναι κυρίως πολυκυκλικοί, αρωματικοί και επίπεδοι. Η παρεμβολή τους με το DNA θεωρείται συγκεκριμένη περίπτωση αρωματικών αλληλεπιδράσεων στοίβαξης, όπου η ενέργεια διασποράς έχει σημαντικό ρόλο. Έχουν σημειωθεί αρκετές πειραματικές και θεωρητικές μελέτες στα συστήματα παρεμβολής. Μέχρι στιγμής, οι περισσότεροι από τους υπολογισμούς βασίζονται σε εμπειρικές ή ημι-εμπειρικές μεθόδους και είναι λίγες οι περιπτώσεις μελετών *ab initio*. Η βασικότερη αιτία αυτού είναι το γεγονός ότι το μέγεθος των συστημάτων παρεμβολής είναι συνήθως μεγάλο, και μέθοδοι όπως η θεωρία διαταραχών Moller – Pleset (MP2) και το συζευγμένο σύμπλεγμα (CCSD (T)) δεν είναι πρακτικές. Το μεγάλο μέγεθος των συστημάτων παρεμβολής μπορεί να αντικατοπτρίζεται σε δύο πτυχές. Πρώτον, τα μόρια παρεμβολής έχουν συνήθως πλευρικές αλυσίδες διαφόρων μεγεθών. Για να καλυφθούν οι ιδιότητες σύνδεσης, απαιτείται τουλάχιστον ένας παρεμβολέας και ένα ζεύγος βάσεων DNA.

Οποιοσδήποτε συνδυασμός μικρότερος από αυτόν δεν θα αποφέρει το επιθυμητό αποτέλεσμα. Δεύτερον, η διαδικασία της παρεμβολής μπορεί να επηρεαστεί από παράγοντες όπως υγρασία, αναδίπλωση του DNA και εντροπικά φαινόμενα. Υπό αυτές τις συνθήκες, αρκετές θεωρητικές μελέτες βασίζονται στις εμπειρικές μεθόδους με τα πλεονεκτήματά τους. Οι θερμοδυναμικές διεργασίες δύναται να προσομοιωθούν υπολογιστικά, π.χ. μέσω μοριακής δυναμικής. Ωστόσο, η ακρίβεια των αποτελεσμάτων εξαρτάται από τις εμπειρικές ιδιότητες που σε μεγάλο βαθμό εξαρτώνται από το σύστημα. Προκειμένου να αποκτηθούν πιο αξιόπιστες πληροφορίες για την διαδικασία της DNA παρεμβολής, είναι επιθυμητή η ανάπτυξη μιας αποτελεσματικότερης υπολογιστικής μεθόδου.¹⁸

3.4. Δέσμευση στη μικρή ή στη μεγάλη αύλακα (minor or major groove binding)

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, υπάρχουν δύο τρόποι δέσμευσης των μικρών μορίων στο DNA, ομοιοπολικά και μη ομοιοπολικά. Η ομοιοπολική αλληλεπίδραση προκαλεί μόνιμη αλλαγή στο DNA, ενώ, η μη ομοιοπολική προέρχεται από αναστρέψιμη αλληλεπίδραση με το DNA. Οι τέσσερις διαφορετικοί τρόποι αλληλεπίδρασης των προσδεμάτων μη ομοιοπολικά με το DNA είναι μέσω παρεμβολής, ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης με τον φωσφοδιεστερικό δεσμό, αλληλεπίδρασης των ζευγών βάσεων με την μικρή αύλακα και αλληλεπίδρασης των ζευγών βάσεων με την μεγάλη αύλακα. Παράλληλα, αναφέρεται ότι υπάρχουν τέσσερα πιθανά μοτίβα αναγνώρισης της μεγάλης αύλακας, και δύο της μικρής.

Η εκλεκτικότητα για μια αλληλουχία DNA από ένα μόριο για τον σχηματισμό συμπλόκου μπορεί να ακολουθηθεί από ομοιοπολική αλληλεπίδραση, μη ομοιοπολική αλληλεπίδραση ή και τα δύο. Η εξειδίκευση που προκύπτει από την ομοιοπολική αλληλεπίδραση οφείλεται στον ταχύτερο ρυθμό αντίδρασης με το σημείο – στόχο του DNA, ύστερα από μια αρχική προσπάθεια σύνδεσης μη ομοιοπολικά. Αντιθέτως, συγκεκριμένες μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις επιτρέπουν πολύπλοκους σχηματισμούς σε συγκεκριμένες θέσεις – στόχους και εξαρτώνται, κυρίως, από την σταθερά ισορροπίας του προσδέματος στη θέση του DNA. Έτσι, υπάρχει ένα φάσμα πιθανών συνδυασμών σύνδεσης.

Η αναγνώριση της μικρής αύλακας του DNA από μικρά μόρια είναι ευρέως μελετημένη με τα χρόνια, σε αντίθεση με αυτήν στην μεγάλη αύλακα. Ορισμένα παραδείγματα φυσικών προϊόντων που στοχεύουν στην μικρή αύλακα είναι η χρωμομυκίνη, η D-ακτινομυκίνη και η νετροψίνη. Ωστόσο, υπάρχουν πολλά βιολογικά μακρομόρια, όπως πρωτεΐνες, όπου αλληλεπιδρούν επιλεκτικά με ποικιλία δεσμών υδρογόνου του δότη / αποδέκτη στην μεγάλη αύλακα, αποδεικνύοντας ότι η μεγάλη αύλακα μπορεί να είναι

έναν εξαιρετικά ελκυστικός στόχος φαρμακευτικών ουσιών. Οι πρωτεΐνες, γενικά, αναγνωρίζουν τους δότες και τους αποδέκτες των δεσμών υδρογόνου, καθώς επίσης και υδρόφοβες ομάδες μεθυλίου.

Οι ενώσεις που αλληλεπιδρούν εξωτερικά στην μικρή αύλακα του DNA, αποτελούν μια σημαντική κατηγορία αντικαρκινικών παραγόντων. Ορισμένες από αυτές τις ενώσεις σχηματίζουν μη ομοιοπολικά σύμπλοκα με το DNA, ενώ άλλες που το δεσμεύουν προκαλούν διάσπαση της δομής του. Η μικρή αύλακα της διπλής έλικας B-DNA αποτελεί σημείο μεγάλου ενδιαφέροντος για την ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών ουσιών, λόγω του ότι έχει χαρακτηριστεί κατάλληλη θέση για μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις, μεγάλης αλληλουχίας, για υψηλό αριθμό μικρών μορίων. Οι ενώσεις που συνδέονται εξωτερικά στην μικρή αύλακα του DNA είναι μια από τις πιο διαδεδομένες κατηγορίες ενώσεων με υψηλό επίπεδο εξειδίκευσης της αλληλουχίας και με ποικίλες βιολογικές δράσεις. Συγκεκριμένα, χαρακτηρίζονται ως αντιπρωτοζωικές, αντιικές και αντιβακτηριακές. Το μεγαλύτερο μέρος της έρευνας, όμως, είναι επικεντρωμένο στην ανάπτυξη αντικαρκινικών παραγόντων.

Όλες οι ιδιότητες σύνδεσης αυτών των παραγόντων που έχουν μελετηθεί, παρέχουν πληροφορίες σχετικές με τα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά που συμβάλλουν στην επιλεκτικότητα σύνδεσης. Η ύπαρξη πειραματικών τεχνικών, κατάλληλων για τον προσδιορισμό της επιλεκτικότητας σύνδεσης του DNA, επί παραδείγματι, αποτύπωμα και διάσπαση συγγένειας, σε συνδυασμό με την υψηλή ανάλυση του ορισμού των δομικών λεπτομερειών σύνδεσης σε τέτοιες αλληλουχίες μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων X, NMR και μοριακής μοντελοποίησης, έχουν διευκολύνει την κατανόηση των αλληλεπιδράσεων του DNA και των χημικών αντιδράσεων που πραγματοποιούνται σε αυτό. Η γνώση αυτών των διαφόρων τεχνικών έχει επιτρέψει την σύνθεση εξειδικευμένων μορίων – στόχων, με σημαντικές ιδιότητες, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*.

Παρότι θεωρούνταν ότι τα προσδέματα στην μικρή αύλακα δεν είχαν κάποια κλινική αξία λόγω σημαντικής τοξικότητας, νέες μελέτες ανατρέπουν αυτήν την αντίληψη, ορίζοντας τις χημικές και βιολογικές πτυχές των πρόσφατα συντεθειμένων ενώσεων, λίγες μόνο από αυτές έχουν δείξει αντικαρκινική δραστηριότητα και έχουν επιτύχει σε κλινικές δοκιμές. Τα μόρια αυτά έχουν αποδεδειγμένη αντικαρκινική δράση κατά πολλών μορφών όγκων, όπως λευχαιμιών, σαρκωμάτων, μελανωμάτων, καρκίνων των μαστών και καρκίνων των ωοθηκών. Κρίνεται σημαντικό να αναφερθεί ότι, για να χαρακτηριστεί μια ένωση αποτελεσματική ως αντικαρκινικός παράγοντας, θα πρέπει να συνδέεται στην μικρή αύλακα ομοιοπολικά, ώστε να προκαλούνται μη αναστρέψιμες αλλαγές στο DNA. Πέραν των θεραπευτικών ιδιοτήτων, ορισμένα κρίνονται χρήσιμα και σε άλλες πτυχές της έρευνας, όπως στην ανάλυση χρωμοσωμάτων. Ενώσεις που στοχεύουν στην μικρή αύλακα μπορούν να αναστείλουν την χρωμοσωμική συμπύκνωση στην μίτωση, όπως επίσης και να αλλάξουν την επίδραση της έκφρασης των γονιδίων. Τα προσδέματα στην

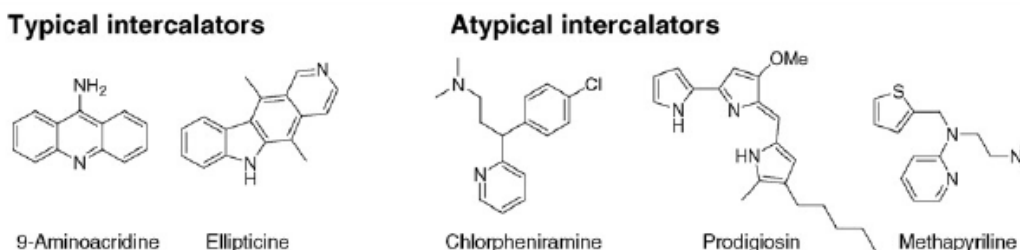
μικρή αύλακα που έχουν χαρακτηριστεί μέχρι τώρα, διακρίνονται για το υψηλό επίπεδο εξειδίκευσης της αλληλουχίας. Από την δεκαετία του 1930, οι διαρυλαμιδίνες είναι γνωστό ότι είναι αποτελεσματικές στην θεραπεία τόσο της τρυπανοσωμίας, όσο και της λείσμανιάσης.

Η αναγνώριση της μεγάλης αύλακας του DNA από πρωτεΐνες χρησιμοποιεί την διακύμανση του δεσμού υδρογόνου του δότη/αποδέκτη, κάνοντας ορατή την διάκριση των ζευγών βάσεων του DNA. Κρίνεται απαραίτητη η ανάπτυξη τεχνικών αναστολής των πρωτεϊνών, μέσω των αλληλεπιδράσεων των ειδικών ενώσεων με το DNA.¹⁹²⁰²¹

3.5. Φαρμακευτικές ενώσεις που αλληλεπιδρούν με το DNA

3.5.1. Μόρια παρεμβολείς (intercalating agents)

Παρότι η παρεμβολή έχει συνδεθεί με τυπικά μόρια που περιέχουν συντηγμένες δομές δι/τρικυκλικού δακτυλίου, μη τυπικοί παρεμβολείς, απουσία συντηγμένων δακτυλίων είναι πιθανό να θεωρηθούν περισσότερο διαδεδομένοι και αποτελεσματικοί (Σχήμα 10). Η πλειοψηφία των παρεμβολέων DNA χρησιμοποιείται ως αντικαρκινικός, αντινεοπλασματικός, αντιβιοτικός και αντιμυκητιασικός παράγοντας. Ωστόσο, δεν χαρακτηρίζονται όλοι οι παρεμβολείς ως γονιδιοτοξικοί. Βασική προϋπόθεση για τον χαρακτηρισμό αυτό, είναι η παρουσία βασικών, κατιονικών ή ηλεκτροφιλικών λειτουργικών ομάδων.²²²³

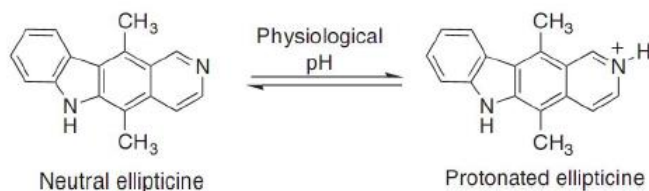


Σχήμα 10: Παραδείγματα παρεμβολέων.

Παρακάτω παρατίθενται ορισμένα παραδείγματα παρεμβολέων DNA:

- ♦ (*Ellipticine* – (Σχήμα 11))

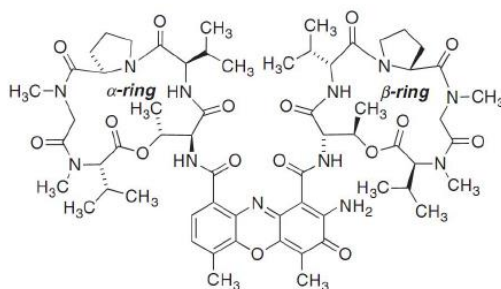
Αλκαλοειδές που απομονώνεται από τα φύλλα της *Ochrosia elliptica* και των φυτών *Aprocynaceae*, βασίζεται στο σύστημα πυριδοκαρβαζόλης και εμφανίζει ευρύ φάσμα αντικαρκινικής δραστηριότητας.²⁴



Σχήμα 11: Φυσική και πρωτονιωμένη μορφή ellipticine.

♦ *Ακτινομυκίνη D (Actinomycin D - (Σχήμα 12))*

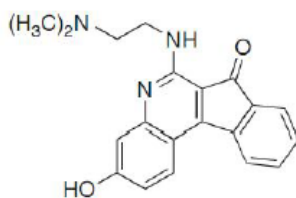
Η ακτινομυκίνη D ανήκει στην οικογένεια των ενώσεων ακτινομυκίνης και απομονώνεται από διάφορα στελέχη *Streptomyces*. Περιέχει ένα χρωμοφόρο μόριο φαινοξαζίνης που συνδέεται με δύο κυκλικά διπεπτίδια, που περιέχουν πέντε υπολείμματα αμινοξέων. Κύριες βιολογικές της δράσεις είναι η θεραπεία σαρκωμάτων, στερεών όγκων παιδικής ηλικίας, καρκίνων των γεννητικών κυττάρων και χοριοκαρκινωμάτων.²⁴



Σχήμα 12: Ακτινομυκίνη D.

♦ *Συντηγμένες ενώσεις κινολίνης (Fused quinoline compounds)*

Το TAS-103 (Σχήμα 13) είναι ένας αναστολέας διπλής τοποϊσομεράσης I και II με αξιοσημείωτη αποτελεσματικότητα έναντι διαφόρων μεταστατικών καρκίνων των πνευμόνων, και γενικά κατά του καρκίνου.²⁴

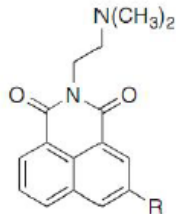


Σχήμα 13: TAS-103.

♦ *Ναφθαλιμίδια και παρόμοιες ενώσεις (Naphthalimides and related compounds)*

Παράγωγα ναφθαλιμιδίου, όπως το μιτοναφίδιο και το αμιναφίδιο (Σχήμα 14) που φέρουν αμινοακυλική πλευρική αλυσίδα παρουσιάζουν ενδιαφέρουσα κυτταροτοξική

δραστηριότητα, η οποία οφείλεται στις παρεμβολές και την αναστολή της τοποϊσομεράσης II.²⁴



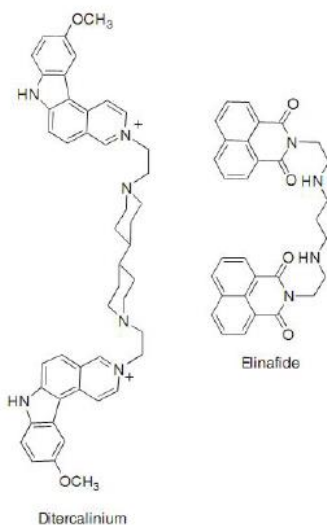
Σχήμα 14: R= NO₂ Μιτοναφίδιο, R= NH₂ Αμωναφίδιο

- ♦ *Διτερκαλίνιο (Ditercalinium)*

Το διτερκαλίνιο (Σχήμα 15) προέρχεται από το ελλειπτίνιο και προκαλεί αναστολή των ενζύμων που εντοπίζουν και επιδιορθώνουν το ελαττωματικό DNA.²⁴

- ♦ *(Elinafide)*

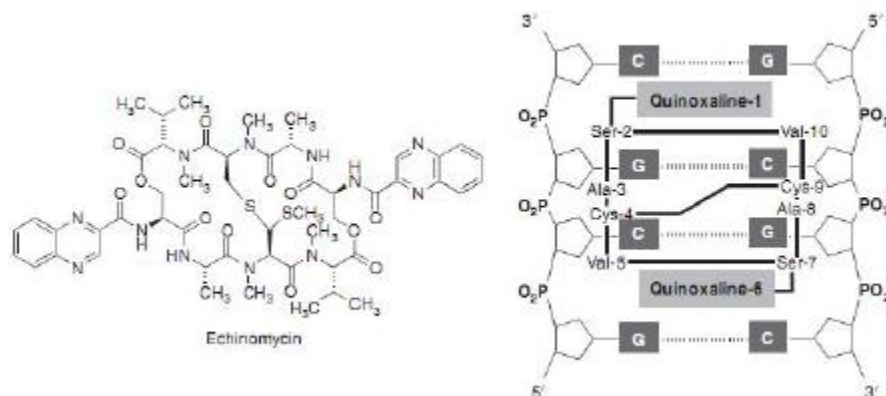
Το elinafide (Σχήμα 15) προέρχεται από το φαρμακοφόρο τμήμα της ναφθαλιμίδης και παρουσιάζει ιδιαίτερη αντικαρκινική δράση.²⁴



Σχήμα 15: (Αριστερά) διτερκαλίνιο, (δεξιά) elinafide.

- ♦ *Εχινομυκίνη (Echinomycin)*

Η εχινομυκίνη είναι ένα αντικαρκινικό αντιβιοτικό, που απομονώνεται από το *S. echinatus*. Στο σχήμα 16 αναπαρίσταται και ο τρόπος παρεμβολής στο DNA.²⁴

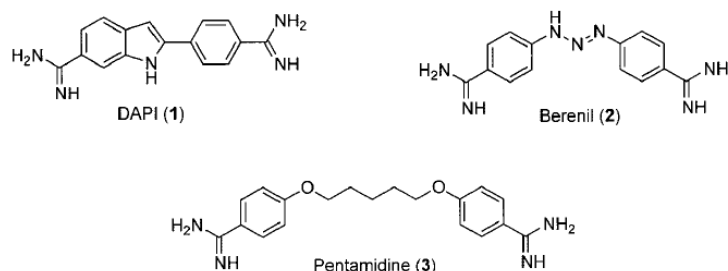


Σχήμα 16: (Αριστερά) εχινόμυκίνη, (δεξιά) τρόπος παρεμβολής εχινόμυκίνης στο DNA.

3.5.2. Μόρια δέσμευσης στη μικρή αύλακα (DNA minor groove binders)

- ♦ Διαρυλαμιδίνες (*Diarylamidines*)

Γνωστή από το 1930 είναι η αποτελεσματικότητα των διαρυλαμιδινών (Σχήμα 17) στη θεραπεία πρωτοζωικών παθήσεων, όπως η τρυπανοσωμίαση και η λείσμανίαση.^{19,20}

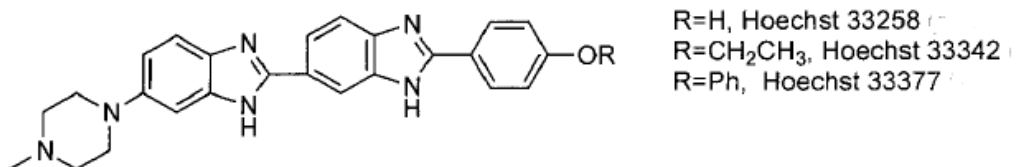


Σχήμα 17: Παραδείγματα διαρυλαμιδινών.

- ♦ Διβενζιμιδαζόλη (*Bis – benzimidazoles*)

Μια ενδιαφέρουσα ομάδα παραγόντων δέσμευσης στην μικρή αύλακα είναι η συνθετική διβενζιμιδαζόλη. Σημειώνεται ότι, παράγωγα όπως η Hoechst 33258 – Ribenzimol καθίστανται έντονα φθορίζοντα όταν συνδέονται με το DNA, καθώς επίσης, προσφέρουν ένα πρότυπο προστασίας έναντι της διάσπασης του DNA. Ανάλογα της Hoechst 33258, ύστερα από μικρές δομικές τροποποιήσεις, είναι η Hoechst 33342 και η Hoechst 33377 (Σχήμα 18). Οι παράγοντες αυτοί εμφανίζουν μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα λόγω της ικανότητάς τους να διαπερνούν την κυτταρική και την

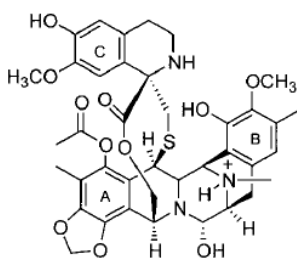
πυρηνική μεμβράνη, με αποτέλεσμα την συσσώρευσή τους στον πυρήνα και την επερχόμενη αναστολή της δέσμευσης των ρυθμιστικών πρωτεϊνών.^{19,20}



Σχήμα 18: Παράγωγα διβενζιμιδαζόλης .

♦ *Εκτενασκιδίνη (Ecteinascidin)*

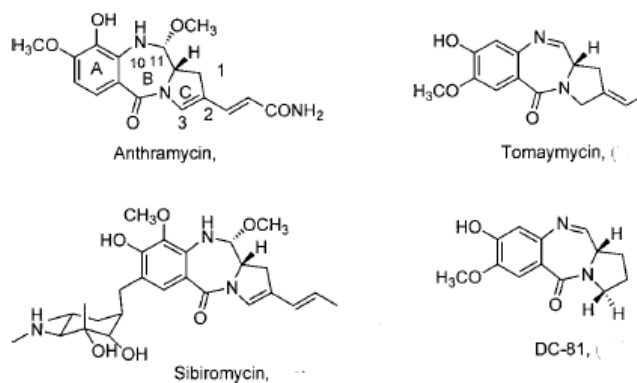
Η αλκαλοειδής τετραϋδροϊσοκινολίνη εκτενασκιδίνη-743 (ET-743, (Σχήμα 19)) παράγεται από θαλάσσιο χιτώνα της Καραϊβικής *Ecteinascidia turbinate*, και αποτελεί έναν πολλά υποσχόμενο και ισχυρό αντικαρκινικό παράγοντα.^{19,20}



Σχήμα 19: ET-743

♦ *Ανθραμυκίνη (Anthramycin)*

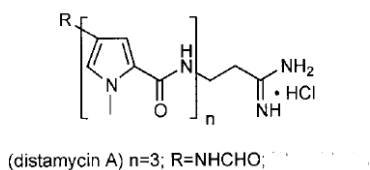
Το 1963 ανακαλύφθηκε μια νέα κατηγορία φυσικών ενώσεων που ονομάζεται πυρολοβενζοδιαζεπίνες (PBDs). Οι ενώσεις αυτές απομονώθηκαν, χαρακτηρίστηκαν και συντέθηκαν από διάφορες ομάδες, αποδεικνύοντας ότι: (α) τα PBD συνδέονται με δίκλωνο DNA, αλλά όχι με το RNA και (β) σχηματίζεται ομοιοπολικός δεσμός μεταξύ της φαρμακοφόρου ένωσης και του DNA . Τα πιο σημαντικά και ενδιαφέροντα παράγωγα της κατηγορίας αυτής είναι, η ανθραμυκίνη, η τομαμυκίνη, η σιβηρομυκίνη και η DC-81 (Σχήμα 20).^{19,20}



Σχήμα 20: Παράγωγα πυρολο - βενζοδιαπεζινών.

♦ Δισταμυκίνη (*Distamycin*)

Η πεπτιδική τριπυρρόλη, δισταμυκίνη Α (Σχήμα 21), είναι ένας φυσικός αντιβιοτικός παράγοντας, που απομονώθηκε το 1962 από τις καλλιέργειες του *Streptomyces distallicus*, με ενδιαφέρουσες αντιβακτηριακές και αντιϊκές δράσεις, χωρίς, ωστόσο, αντικαρκινικές ιδιότητες. Οι πιο σημαντικές αντιϊκές επιδράσεις στρέφονται κατά ιών που περιέχουν DNA (απλός έρπης, ζωογόνος έρπης και ιός εμβολίου), ενώ στερείται δραστηριότητας έναντι του ιού RNA. Επιπλέον, η δισταμυκίνη βρέθηκε να έχει αντιπρωτοζωική δράση, ιδιαίτερα έναντι ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών του *Plasmodium falciparum*.^{19,20}

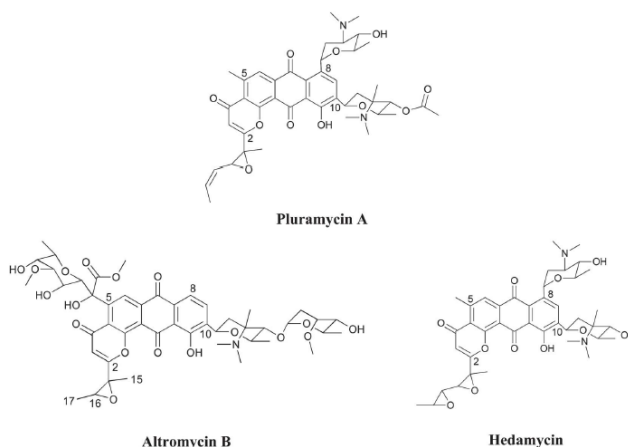


Σχήμα 21: Δισταμυκίνη Α.

3.5.3. Μόρια δέσμευσης στη μεγάλη αύλακα (DNA major groove binders)

- ♦ Πλουραμυκίνη (*Pluramycin*)

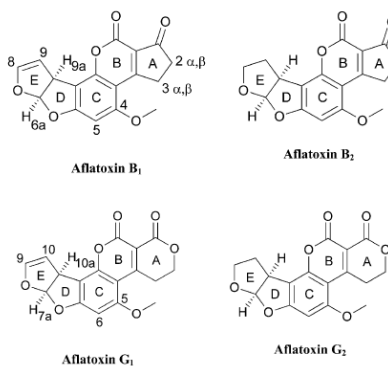
Τα ισχυρότερα μόρια αυτής της κατηγορίας φυσικών προϊόντων, με αντικαρκινική και αντιβιοτική δράση είναι η αλτρομυκίνη Β και η εδαμυκίνη (Σχήμα 22).²¹



Σχήμα 22: Παράγωγα πλουραμυκίνης.

- ♦ Αφλατοξίνη (*Aflatoxin*)

Σε αυτή την κατηγορία ενώσεων, παρατηρούνται ορισμένες δομικές ομοιότητες με τις πλουραμυκίνες στο σύστημα του συντηγμένου δακτυλίου. Σύμφωνα με πειραματικά δεδομένα NMR έχει διαπιστωθεί ότι η αφλατοξίνη Β1, Β2, G1 και G2 (Σχήμα 23) παρεμβάλλεται στην μορφή Β του DNA.²¹

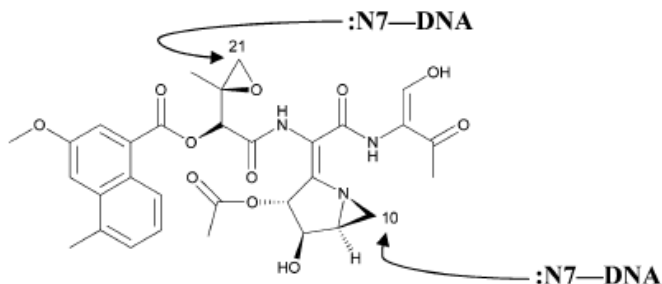


Σχήμα 23: Παράγωγα αφλατοξίνης.

- ♦ Αζινομυκίνη (*Azinomycin*)

Η αζινομυκίνη Β (Σχήμα 24), είναι μια φυσική ένωση που απομονώθηκε πρώτα από το *Streptomyces sahachiroi*, ενώ αργότερα απομονώθηκε από ένα άλλο στέλεχος

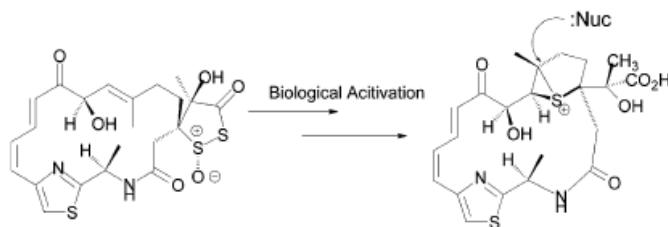
Streptomyces, το *S. griseofuscus*. Η ένωση αυτή αλληλεπιδρά με την διπλή έλικα του DNA, σχηματίζοντας διασταυρούμενους συνδέσμους.²¹



Σχήμα 24: Αζινομυκίνη Β.

♦ *Λειναμυκίνη (Leinamycin)*

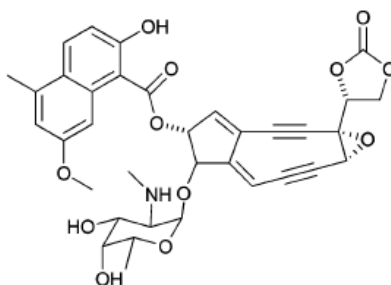
Στα τέλη της δεκαετίας του 1980, η λειναμυκίνη (Σχήμα) απομονώθηκε από το *Streptomyces*. Η λειναμυκίνη υφίσταται βιολογική ενεργοποίηση προτού εμφανίσει αλκυλιωτικές ιδιότητες (Σχήμα 25).²¹



Σχήμα 25: Δομή λειναμυκίνης πριν και μετά την βιολογική ενεργοποίηση.

♦ *Νεοκαρζινοστατίνη (Neocarzinostatin)*

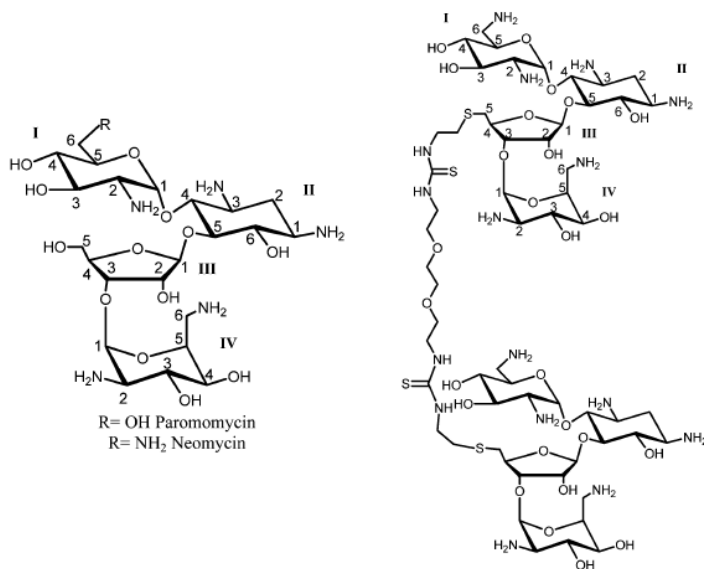
Η νεοκαρζινοστατίνη, αρχικά, απομονώθηκε ως μη ομοιοπολικός δεσμός σε μια πρωτεΐνη. Το βιολογικά ενεργό χρωμοφόρο τμήμα της νεοκαρζινοστατίνης (Σχήμα 26) συγκαταλέγεται στην κατηγορία των αντικαρκινικών αντιβιοτικών.²¹



Σχήμα 26: Νεοκαρζινοστατίνη.

♦ Αμινογλυκοσίδες (Aminoglycosides)

Οι αμινογλυκοσίδες είναι αντιβιοτικά αμινοσάκχαρα που συνδέονται μέσω γλυκοσιδικών δεσμών. Η μη αρωματική φύση των δομών, όπως η νεομυκίνη και η παρομυκίνη (Σχήμα 27), περιορίζει την δέσμευσή τους στην αύλακα του DNA, ωστόσο με τις κατάλληλες χημικές τροποποιήσεις η πρόσδεση, τελικά, καθίσταται εφικτή.²¹



Σχήμα 27: Παράγωγα αμινογλυκοσιδών.

4. Φωτοδιασπαστική ικανότητα ενώσεων

4.1. Γενικά

Η φωτοχημειοθεραπεία και η φωτοδυναμική θεραπεία θεωρούνται ελάχιστα επεμβατικές μορφές θεραπείας, συγκριτικά με συνήθεις θεραπείες διαφόρων ειδών καρκίνων και άλλων μη κακοηθών ασθενειών, όπως η χημειοθεραπεία και η ακτινοθεραπεία. Συνήθως, εξαρτώνται από την διέγερση μιας χημικής ουσίας, η οποία καλείται «φωτοευαισθητοποιητής», η οποία απορροφά ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος και κατ' επέκταση ενεργοποιεί μια σειρά αντιδράσεων, ικανών να καταστρέψουν τους βιολογικούς στόχους, είτε προσωρινά, είτε μόνιμα. Γενικότερα, στην φαρμακευτική, η αλληλεπίδραση διαφόρων ενώσεων με το DNA κρίνεται πολύ σημαντική τόσο για τον προσδιορισμό του μηχανισμού δράσης τους, όσο και για την ανάπτυξη και τον σχεδιασμό νέων φαρμάκων.

Η αποτελεσματικότητα των θεραπειών δεν εξαρτάται μόνο από τις ιδιότητες του φωτοευαισθητοποιητή, αλλά και από τα χαρακτηριστικά της ακτινοβολημένης περιοχής και του μήκους κύματος της ακτινοβολίας. Συγκεκριμένα παρατηρείται χρήση:

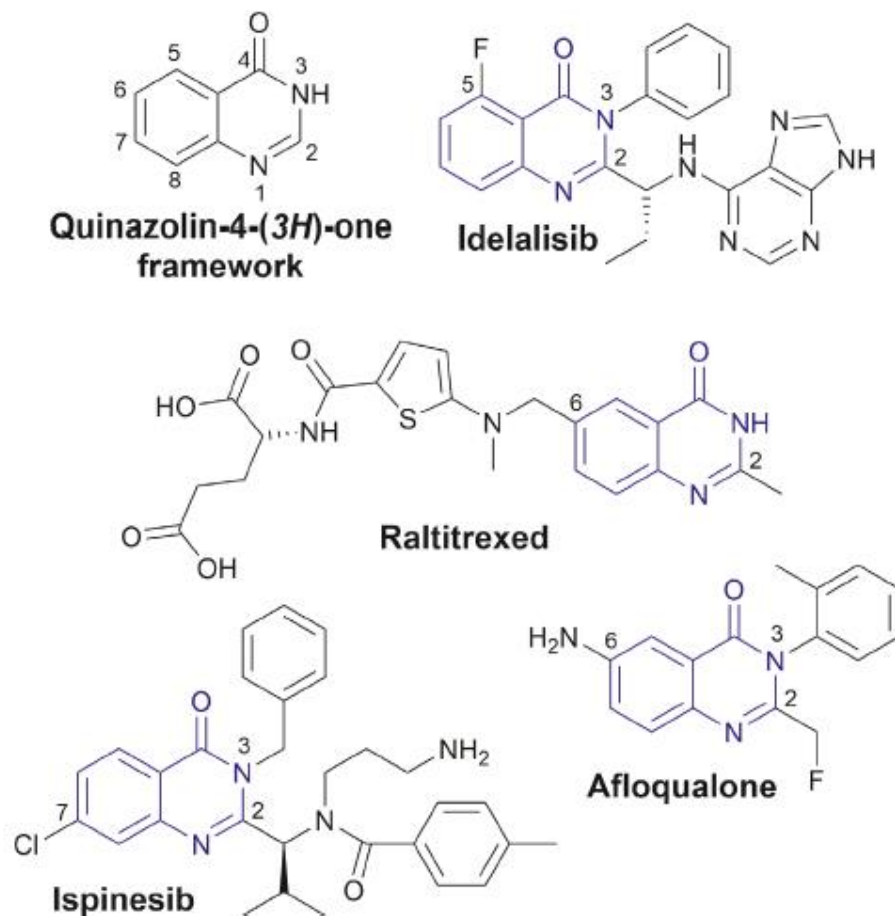
- UVC από 100 έως 290 nm
- UVB από 290 έως 315 nm
- UVA από 315 έως 400 nm
- ορατού φωτός από 400 έως 800 nm

Σημειώνεται πως εκτεταμένη εφαρμογή στην δερματολογία έχει η ακτινοβολία UVA, UVB και συνδυασμός αυτών. Μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα αναφέρονται στην θεραπεία της ψωρίασης, της λεύκης, της παλαμο-πελματιαίας φλύκταινας, της πιτυρίασης και άλλων. Η ορατή περιοχή του φάσματος φωτός χρησιμοποιείται για την φωτοδυναμική θεραπεία πολλαπλών ακτινικών κερατοζών, της νόσου του Bowen, του μελανώματος και της ακμής.

Πληθώρα οργανικών ενώσεων έχουν αναγνωριστεί ως φωτοδιασπαστικοί παράγοντες του DNA, μερικές εκ των οποίων είναι κινολίνες, παράγωγα φαινυλδροξυλαμίνης, οξίμες, παράγωγα πυραζόλης και άλλα. Οι κινολίνες, θεωρούνται «προνομακές» δομές και αντιπροσωπεύουν την φαρμακευτική χημεία. Χρησιμοποιούνται ως δομικά στοιχεία για περίπου 150 φυσικά αλκαλοειδή, όπως επίσης, κυκλοφορούν τουλάχιστον 10 φάρμακα στο εμπόριο έχοντας ως φαρμακοφόρο τμήμα την κινολίνη, όπως η αφλοκαλόνη. Ως αποτέλεσμα των παραπάνω προσεγγίσεων είναι οι ποικίλες βιολογικές δράσεις, όπως αντιφλεγμονώδης, αντικαρκινική, αντιμικροβιακή, αντιυπερτασική κ.ά.

Παρότι η φωτοσταθερότητα των φαρμακευτικών ουσιών θεωρείται σημαντική για την αποφυγή διαφόρων παρενεργειών, η φωτοευαισθησία είναι απαραίτητη για την επιτυχία των φωτοθεραπευτικών εφαρμογών. Στη βιβλιογραφία, αναφέρονται αρκετά

παραδείγματα κιναζολινονών που δρουν ως φωτοδιασπαστικοί παράγοντες (Σχήμα 28), εκ των οποίων πολύ σημαντικό είναι αυτό της αφλοκαλόνης. «Afloqualone» είναι ένα μυοχαλαρωτικό φάρμακο του κεντρικού νευρικού συστήματος, που προκαλεί φωτοευαίσθητες δερματικές αντιδράσεις.²⁵²⁶



Σχήμα 28: Παραδείγματα φωτοδιασπαστικών παραγόντων.

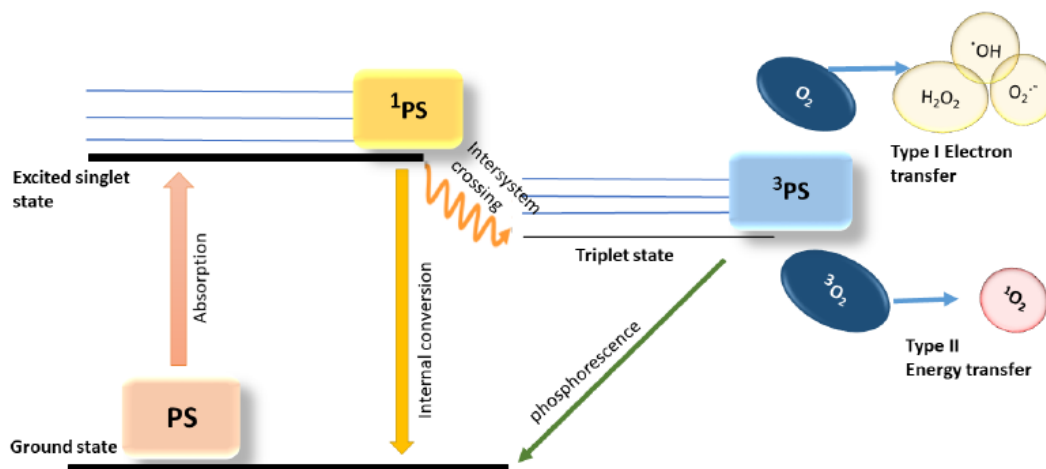
4.2. Φωτοδυναμική θεραπεία (PDT)

Η φωτοδυναμική θεραπεία (PDT) είναι μια σύγχρονη και μη επεμβατική μορφή θεραπείας, που χρησιμοποιείται για ποικίλες ογκολογικές παθήσεις, όπως και συνδυαστικά με άλλου είδους θεραπείες σε πολλούς τομείς της ιατρικής (π.χ. δερματολογία, γυναικολογία, ουρολογία).

Η φωτοδυναμική θεραπεία βασίζεται στην τοπική ή συστηματική εφαρμογή μιας φωτοευαίσθητης ένωσης – του φωτοευαισθητοποιητή – η οποία συσσωρεύεται έντονα στους παθολογικούς ιστούς. Όπως προαναφέρθηκε, οι φωτοευαισθητοποιητές απορροφούν φως κατάλληλου μήκους κύματος, ενεργοποιώντας την διαδικασία

διάσπασης μέρους του DNA. Χαρακτηρίζεται ως ανώδυνη, απλή μορφή θεραπείας και κατάλληλη προς τους ασθενείς λόγω της επιλεκτικής της δράσης. Εκτός από τις παραδοσιακές εφαρμογές, η χρήση ηλεκτροφόρησης και νανοφορέων θεωρείται ότι βελτιστοποιεί την δράση των φωτοευαισθητοποιητών, έχοντας ως αποτέλεσμα καλύτερες αποδόσεις της θεραπείας.

Υπάρχουν δύο μηχανισμοί φωτοδυναμικής θεραπείας (εικόνα 10), οι οποίοι βασίζονται στην αμοιβαία αλληλεπίδραση τριών μη τοξικών συστατικών, του φωτοευαισθητοποιητή, του φωτός κατάλληλου μήκους κύματος και του διαλυμένου οξυγόνου στα κύτταρα. Το πρώτο στάδιο και στους δύο μηχανισμούς είναι παρόμοιο, ο φωτοευαισθητοποιητής, αφού εισέλθει σε κελί, ακτινοβολείται και μετατρέπεται από την απλή κατάσταση βασικής ενέργειας σε διεγερμένη λόγω της απορρόφησης φωτονίων. Μέρος της ενέργειας ακτινοβολείται με την μορφή κβαντικού φθορισμού, ενώ η εναπομένουσα οδηγεί το μόριο του φωτοευαισθητοποιητή στην διεγερμένη κατάσταση – την καλύτερη, θεραπευτική μορφή της ένωσης –.



Εικόνα 10: Γραφική αναπαράσταση των δύο μηχανισμών (type I, type II) φωτοδυναμικής θεραπείας.²⁷

Στη συνέχεια, αναφορικά με τον πρώτο μηχανισμό (type I), στην κατάσταση τριπλής διέγερσης, ο φωτοευαισθητοποιητής είναι ικανός να μεταφέρει ενέργεια στα βιομόρια. Μεταξύ της διεγερμένης κατάστασης του φωτοευαισθητοποιητή και του καρκινικού ιστού (υποστρώματος), μεταφέρεται ένα υδρογόνο ή ένα ηλεκτρόνιο, σχηματίζοντας τελικά ελεύθερες και ανιοντικές ρίζες τόσο του φωτοευαισθητοποιητή, όσο και του υποστρώματος. Τα ηλεκτρόνια, αλληλεπιδρώντας με μόρια οξυγόνου, οδηγούν στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Η πληθώρα των αντιδράσεων αυτών,

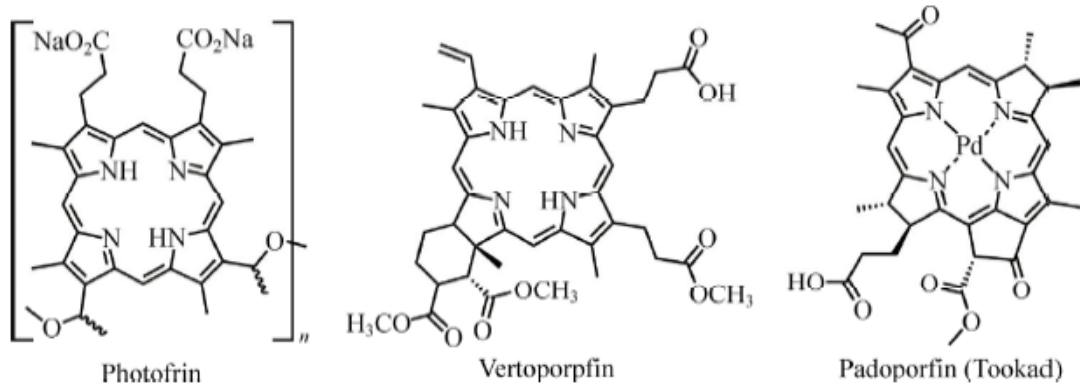
προκαλεί τελικά το οξειδωτικό στρες και κατ' επέκταση την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων.

Από την άλλη, στον δεύτερο μηχανισμό (type II), η μετάβαση του φωτοευαισθητοποιητή στην διεγερμένη κατάσταση οδηγεί στην μεταφορά ενέργειας απευθείας στο μόριο του οξυγόνου. Η διαδικασία αυτή είναι πιθανή, καθώς τόσο οι φωτοευαισθητοποιητές, όσο και τα μόρια του οξυγόνου έχουν τα ίδια spin. Κατ' αυτόν τον τρόπο, δημιουργούνται διεγερμένα σωματίδια οξυγόνου, με εξαιρετικά ισχυρές οξειδωτικές ιδιότητες.

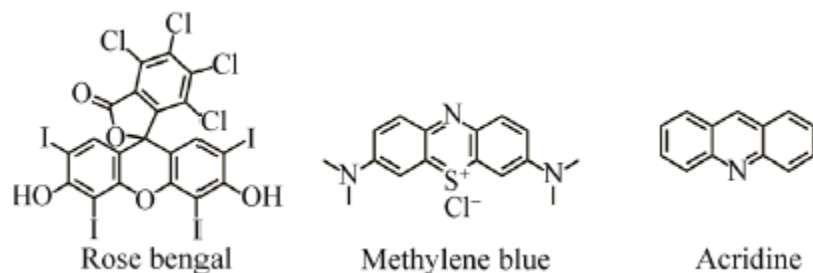
Αν και ο δεύτερος μηχανισμός θεωρείται σημαντικότερη διαδικασία αναλογιζόμενοι την αποτελεσματικότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας, η συμβολή και των δύο μηχανισμών εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Όπως για παράδειγμα, από την συγκέντρωση του οξυγόνου, την διηλεκτρική σταθερά, το pH και την δομή του φωτοευαισθητοποιητή.

4.3. Είδη φωτοευαισθητοποιητών (Photosensitizers)

Ως φωτοευαισθητοποιητές ορίζονται τα μόρια τα οποία ενεργοποιούνται με την απορρόφηση φωτός συγκεκριμένης ακτινοβολίας και μήκους κύματος, και προκαλούν φωτοχημικές ή φωτοφυσικές αντιδράσεις. Ένας ενεργοποιημένος φωτοευαισθητοποιητής μεταφέρει ενέργεια στο μοριακό οξυγόνο προκειμένου να παραχθούν δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), υπεύθυνες για την καταστροφή των κυττάρων – στόχων. Αρκετοί φωτοευαισθητοποιητές είναι παράγωγα πορφυρινών. Οι πορφυρίνες είναι τετραπυρρολικές έγχρωμες μακροκυκλικές ενώσεις και εμφανίζονται ευρέως στην φύση. Ορισμένοι εκ των φωτοευαισθητοποιητών με βάση την πορφυρίνη που χρησιμοποιούνται σε κλινικό επίπεδο είναι τα Photofrin, Padorporfin και Vertoporfin (Σχήμα 29). Από την άλλη ορισμένα παραδείγματα μη – πορφυρινικών, πιθανών φωτοευαισθητοποιητών περιλαμβάνουν το μπλε του μεθυλενίου, το τριαντάφυλλο βεγγάλη και διάφορες χρωστικές ακριδίνης (Σχήμα 30).²⁸



Σχήμα 29: Παραδείγματα πορφυρινικών φωτοευαισθητοποιητών.



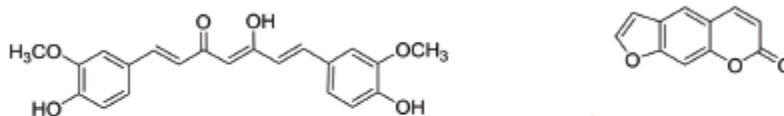
Σχήμα 30: Παραδείγματα μη - πορφυρινικών φωτοευαισθητοποιητών.

Τα ιδανικά χαρακτηριστικά ενός φωτοευαισθητοποιητή είναι:

- ♦ Υψηλός βαθμός καθαρότητας
- ♦ Σταθερότητα σε θερμοκρασία δωματίου
- ♦ Φωτοευαισθησία μόνο σε συγκεκριμένο μήκος κύματος
- ♦ Υψηλή φωτοχημική αντιδραστικότητα – η μέγιστη απορρόφηση πρέπει να παρατηρείται από 600 έως 800 nm –
- ♦ Οι ζώνες απορρόφησης δεν πρέπει να αλληλεπικαλύπτονται με αντίστοιχες ζώνες άλλων ουσιών, συμπεριλαμβανομένων των ενδογενών χρωστικών όπως η μελατονίνη, η αιμοσφαιρίνη και η οξυαιμοσφαιρίνη
- ♦ Ελάχιστη κυτταροτοξικότητα στο σκοτάδι
- ♦ Εύκολη διαλυτότητα στους ιστούς του σώματος
- ♦ Υψηλή επιλεκτικότητα στους νεοπλασματικούς ιστούς – η απομάκρυνση του φωτοευαισθητοποιητή από πληγείσες περιοχές πρέπει να γίνεται αργά, ενώ από υγιείς περιοχές γρήγορα, για την ελαχιστοποίηση φωτοτοξικών παρενεργειών
- ♦ Φθηνή και απλή σύνθεση

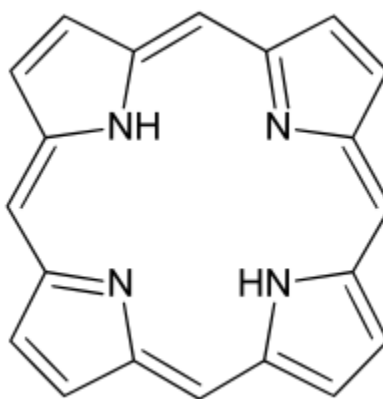
- ♦ Εύκολη διαθεσιμότητα²⁹

Οι φωτοευαισθητοποιητές διακρίνονται στους φυσικούς και τους χημικούς. Υπάρχουν αρκετές ενώσεις απομονωμένες από φυτά και άλλους οργανισμούς, που δρουν ως φωτοευαισθητοποιητές και απορροφούν ορατό φως ή UVA. Η ποικιλία των ενώσεων αυτών δεν μπορεί να περιοριστεί και να καθοριστεί πλήρως, καθότι συνεχώς ανακαλύπτονται καινούργιες ενώσεις με την ιδιότητα αυτή. Χαρακτηριστικά παραδείγματα φυσικών φωτοευαισθητοποιητών είναι οι κουμαρίνες, οι φουρανοκουμαρίνες, οι βενζοφουράνες, οι ανθρακινόνες, η κουρκουμίνη και παράγωγα φλαβονοειδών (Σχήμα 31).

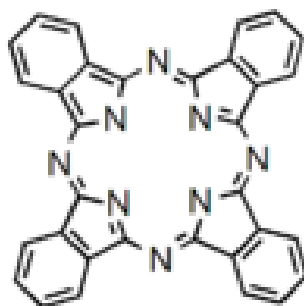


Σχήμα 31: (Αριστερά) κουρκουμίνη, (δεξιά) φουρανοκουμαρίνη.

Όσον αφορά τους χημικούς φωτοευαισθητοποιητές, απαντώνται τόσο οργανικοί, όσο και ανόργανοι. Σημειώνεται ότι από την πρώτη εφαρμογή μέχρι σήμερα υπάρχουν τρεις γενιές φωτοευαισθητοποιητών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα μικρών, οραγνικών, χημικών φωτοευαισθητοποιητών είναι οι πορφυρίνες (1^η γενιά) (Σχήμα 32) και οι φθαλοκυανίνες (2^η γενιά) (Σχήμα 33).

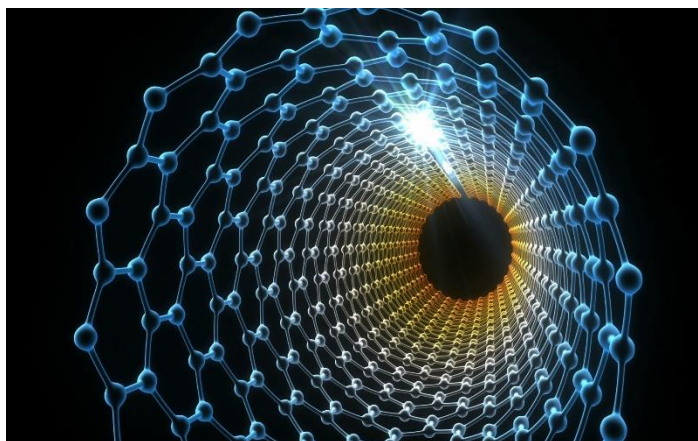


Σχήμα 32: Δομή πορφυρίνης.



Σχήμα 33: Δομή φθαλοκυανίνης.

Τέλος, αναφέρεται ότι ο κλάδος της νανοτεχνολογίας έχει σημαντικό αντίκτυπο στην ανακάλυψη νέων φωτοευαισθητοποιητών. Σύμφωνα με μελέτες, τα νανοσωματίδια είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά ως αντικαρκινικοί παράγοντες, ενώ μερικά από αυτά εμφανίζουν και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Στην φωτοδυναμική θεραπεία, χρησιμοποιούνται ευρέως νανοσωματίδια χρυσού, νανοσωματίδια πυριτίου και νανοσωλήνες άνθρακα (Εικόνα 11).²⁷²⁸³⁰

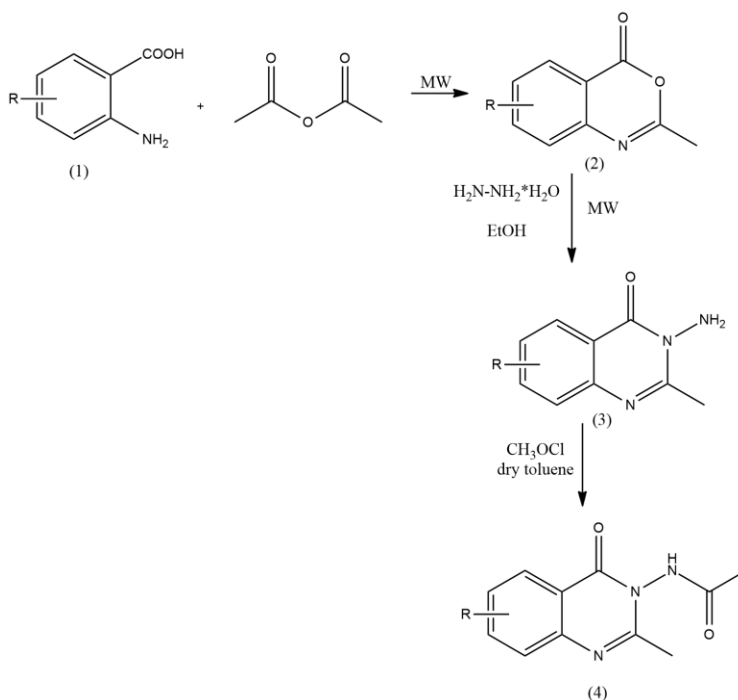


Εικόνα 11: Νανοσωλήνας άνθρακα.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η σύνθεση κιναζολινικών παραγώγων – ακεταμιδίων, με στόχο τόσο την μελέτη της DNA παρεμβολής και της φωτοδιασπαστικής δράσης, όσο και για μετέπειτα αξιοποίησή τους για τη σύνθεση υβριδικών μορίων της μορφής κιναζολινόνη – χαλκόνη και κιναζολινόνη – φαινολικά οξέα. Αρχικά, θα πραγματοποιηθεί η σύνθεση νέων υποκατεστημένων κιναζολινονών με χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας σε δύο στάδια. Συγκεκριμένα, πρώτα θα συντεθεί το μόριο βενζοξαζινόνης (2) και μετέπειτα, το αντίστοιχο μόριο κιναζολινόνης (3). Εν συνεχεία, θα πραγματοποιηθεί η σύνθεση των κιναζολινικών παραγώγων (4) χρησιμοποιώντας συμβατικό τρόπο θέρμανσης (ελαιόλουτρο), ενώ ταυτόχρονα, θα επιχειρηθεί βελτιστοποίηση της μεθόδου με χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας (Σχήμα 34).



Σχήμα 34: Σχηματική απεικόνιση της σύνθεσης κιναζολινονών και κιναζολινικών παραγώγων.

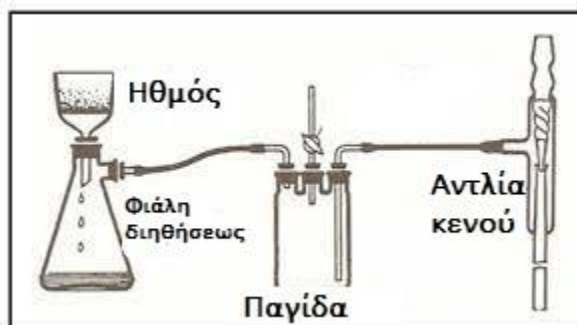
Τέλος, επιχειρείται η σύνθεση ορισμένων μιμών, τόσο μετά τη σύνθεση κιναζολινονών με χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας, όσο και μετά τη σύνθεση κιναζολινικών παραγώγων με συμβατικό τρόπο. Τα νέα μόρια, θα χαρακτηριστούν δομικά με φασματοσκοπικές τεχνικές και θα μελετηθεί η βιολογική τους δράση όσον αφορά την ικανότητά τους να δρουν ως παρεμβολείς και φωτοδιασπαστές στο DNA.

6. Πειραματική διαδικασία

6.1. Τεχνικές – εξοπλισμός – μέθοδοι ταυτοποίησης

6.1.1. Διήθηση

Διήθηση καλείται η μέθοδος διαχωρισμού στερεών αιωρούμενων σωματιδίων από ένα ρευστό μέσω διαβίβασής του από στρώμα πορώδους υλικού (ηθμός). Συγκεκριμένα, εφαρμόζεται διήθηση υπό κενό με την χρήση αντλίας κενού και παγίδας, ώστε να αποτρέπονται πιθανές επιμολύνσεις του διηθήματος σε περίπτωση αναρρόφησης. Εφόσον στο διήθημα παρατηρηθεί επιπλέον ποσότητα στερεού η διαδικασία επαναλαμβάνεται (Εικόνα 12).³⁵



Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση διήθησης.

6.1.2. Ανακρυστάλλωση

Ανακρυστάλλωση ονομάζεται η διαδικασία καθαρισμού στερεών προϊόντων μιας αντίδρασης, βασισμένη στην διαφορετική διαλυτότητα αυτών σε έναν διαλύτη πριν και μετά από την θέρμανσή τους. Η προς καθαρισμό ουσία διαλύεται σ' ένα θερμό διαλυτικό μέσο και σχηματίζεται το κορεσμένο διάλυμα της, το οποίο αφήνεται να ψυχθεί προκειμένου η ένωση να αποβληθεί με την μορφή κρυστάλλων. Η επιλογή του διαλύτη γίνεται έτσι ώστε να μην αντιδρά με την ένωση, να είναι πτητικός για την εύκολη απομάκρυνσή του κατά την ξήρανση, να παρουσιάζει μεγάλο βαθμό διαλυτότητας κοντά στο σημείο ζέσης και μικρό σε θερμοκρασία δωματίου, και τέλος, οι ανεπιθύμητες προσμίξεις να είναι διαλυτές τόσο εν θερμώ όσο και εν ψυχρώ.^{36,37}

6.1.3. Συμπύκνωση

Συμπύκνωση καλείται η διαδικασία παραλαβής στερεού απομακρύνοντας τον διαλύτη από το διάλυμα με την βοήθεια ενός περιστροφικού εξατμιστήρα (Εικόνα 13). Σε αυτόν εφαρμόζονται συνθήκες κενού, η σφαιρική φιάλη τοποθετείται σε θερμό υδατόλουτρο έτσι ώστε ο διαλύτης να εξατμιστεί και τελικά να γίνει παραλαβή του στερεού.



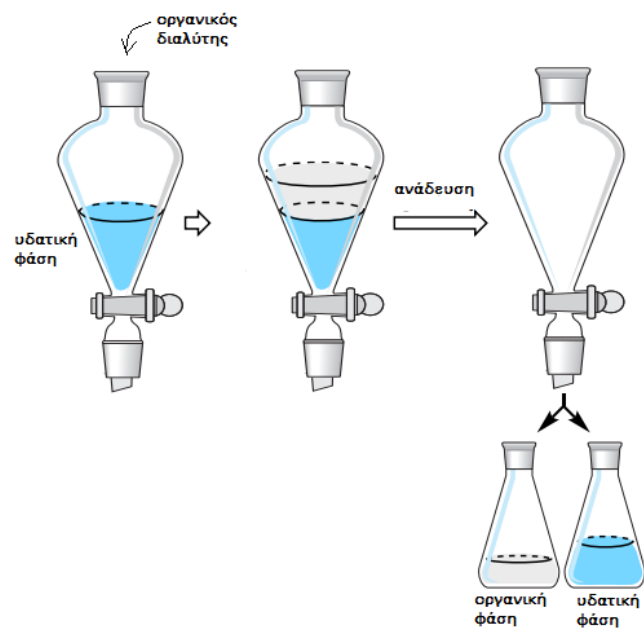
Εικόνα 13: Περιστροφικός εξατμιστήρας (Rotavapor R-114/Waterbath B-480 – Buchi).

6.1.4. Εκχύλιση

Η εκχύλιση αφορά την διαδικασία παραλαβής ουσιών από ένα υδατικό τους διάλυμα σε κάποιον οργανικό διαλύτη και στηρίζεται στην διαφορά διαλυτότητας των ουσιών, σε δοσμένη θερμοκρασία και πίεση, με τον συγκεκριμένο διαλύτη. Αποτελεί κατάλληλη τεχνική για την απομόνωση ουσιών από διαλύματα ή στερεά μίγματα, για διαχωρισμό ουσιών, αλλά και για απομάκρυνση ανεπιθύμητων προσμίξεων.

Στην περίπτωση της εκχύλισης, κατάλληλοι κρίνονται οι διαλύτες με μικρή διαλυτότητα στην άλλη φάση, χαμηλό σημείο ζέσης και εκλεκτικότητα ώστε να διαλύουν μόνο την επιθυμητή ένωση και όχι τις υπόλοιπες προσμίξεις. Ορισμένοι από τους συνηθέστερους διαλύτες είναι ο διαιθυλαιθέρας, ο πετρελαϊκός αιθέρας και ο οξικός αιθυλεστέρας.

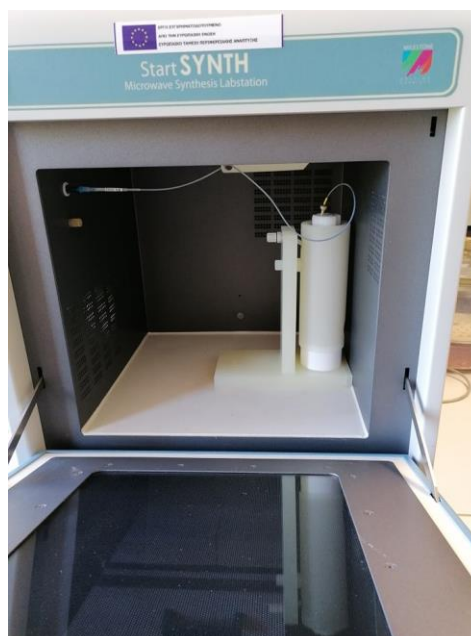
Η εκχύλιση πραγματοποιείται μέσα σε διαχωριστική χοάνη όπου τα δύο υγρά ανακατεύονται με ισχυρή ανάδευση, αφήνονται σε ηρεμία και διαχωρίζονται. Μετά από κάθε ανάδευση κρίνεται σημαντική η εκτόνωση της πίεσης που αναπτύσσεται μέσα στη χοάνη, προτού συνεχιστεί η διαδικασία της εκχύλισης.³⁶



Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση εκχύλισης.

6.1.5. Θέρμανση με χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας (MW)

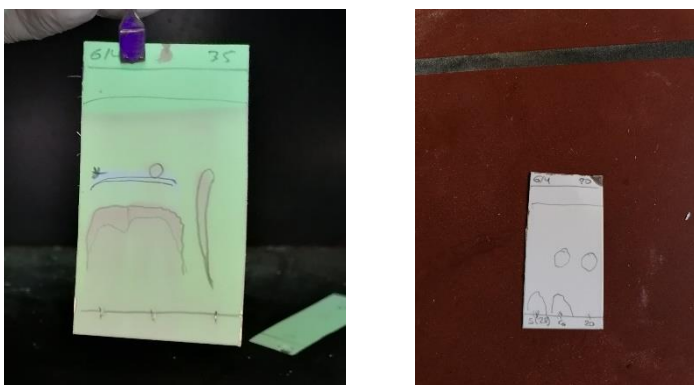
Οι αντιδράσεις με χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας πραγματοποιούνται με την συσκευή « Start SYNTH- Microwave Synthesis Labstation» (Εικόνα 15), και το δοχείο αντίδρασης είναι τύπου QUARTZ Q20SPER. Τα βασικά χαρακτηριστικά της μεθόδου έχουν αναλυθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο (βλ. κεφάλαιο 2).



Εικόνα 15: Αντιδραστήρας μικροκυμάτων.

6.1.6. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση του σχηματισμού του επιθυμητού τελικού προϊόντος. Αποτελείται από μια στατική και μια κινητή φάση. Ως στατική φάση ορίζεται μια στρώση προσροφητικού υλικού, όπως διοξειδίου του πυριτίου, οξειδίου του αργιλίου ή κυτταρίνης, πάνω σε μια πλάκα από γυαλί, πλαστικό ή φύλλο αργιλίου. Τα προς ανάλυση δείγματα – ενώσεις τοποθετούνται ξεχωριστά στην πλάκα ως κηλίδες (spots) και υπάρχει επιπλέον μια κηλίδα που περιέχει όλα τα δείγματα (co – spot). Η πλάκα εμβαπτίζεται σε κλειστό δοχείο που περιέχει μίγμα πετρελαϊκού αιθέρα και οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 6:4 ή 8,5:1,5, ανάλογα με την πολικότητα των ενώσεων, και αποτελεί την κινητή φάση. Το μίγμα διαλυτών καθώς κινείται παρασύρει τις ενώσεις και ανάλογα με τις πολικότητες τους τελικά τις διαχωρίζει. Ακολουθεί έκθεση της πλάκας σε UV ακτινοβολία προκειμένου να σημειωθούν τα σημεία που έχουν φτάσει οι ενώσεις και τα οποία είναι μοναδικά για καθεμία από αυτές. Σκόπιμος κρίνεται και ο μετέπειτα εμποτισμός με PMA (Phosphomolybdic acid) για την παρατήρηση πιθανών χρωματισμών των σημειωθέντων σημείων.



Εικόνα 16: TLC

6.1.7. Προσδιορισμός σημείου τήξεως

Σημείο τήξης ονομάζεται η θερμοκρασία στην οποία αλλάζει φάση μια καθαρή ουσία, μεταβαίνοντας από την στερεά στην υγρή κατάσταση. Σημειώνεται πως η θερμοκρασία στην οποία συμβαίνει η τήξη εξαρτάται από την πίεση. Συνήθως, η θερμοκρασία τήξης μιας ουσίας αναφέρεται σε κανονικές συνθήκες πίεσης.

Τυχόν προσμίξεις τείνουν να μεταβάλλουν την τιμή του σημείου τήξεως, γι' αυτό αποτελεί και μια μέθοδο ελέγχου της καθαρότητας των ουσιών. Οι καθαρές ουσίες έχουν συνήθως ένα εύρος τήξης ενός ή δύο βαθμών, ενώ αντίθετα, η παρουσία ανεπιθύμητων προσμίξεων αυξάνει αυτό το θερμοκρασιακό εύρος.



Εικόνα 17: Όργανο προσδιορισμού σημείου τήξεως (Συσκευή Gallenkamp).

6.1.8. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού H – NMR

Η φασματομετρία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) αποτελεί μέθοδο ταυτοποίησης των διαφόρων ενώσεων καθώς είναι μια μορφή φασματομετρίας απορρόφησης, όπου το δείγμα που βρίσκεται σε υψηλό μαγνητικό πεδίο απορροφά ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία στην περιοχή των ραδιοκυμάτων και οι προσανατολισμένοι πυρήνες των ατόμων από την κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας μεταβαίνουν στην κατάσταση υψηλότερης ενέργειας με αναστροφή του σπιν. Εφόσον πραγματοποιηθεί αυτή η αναστροφή, οι πυρήνες έχουν συντονισθεί με την εφαρμοζόμενη ακτινοβολία, εξού και ο όρος «συντονισμός». Η συχνότητα απορρόφησης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας που παρατηρείται από την αλληλεπίδρασή της με τους πυρήνες του αναλύτη, είναι χαρακτηριστική για κάθε πυρήνα, με αποτέλεσμα η μέθοδος NMR να αποτελεί μια αποτελεσματική μέθοδο τόσο για την ταυτοποίηση της δομής οργανικών ενώσεων, όσο και για τον ποσοτικό προσδιορισμό τους και για το χημικό περιβάλλον των πυρήνων των ατόμων στα μόρια των χημικών ενώσεων.

6.1.9. Φασματομετρία μάζας (MS)

Η φασματομετρία μάζας αποτελεί μια μέθοδο παραγωγής ιόντων σε αέρια φάση από τα μόρια ενός δείγματος, το μετέπειτα διαχωρισμό τους σύμφωνα με τον λόγο της μάζας m προς το φορτίο τους z (m/z) και τέλος, την ανίχνευσή τους. Από την μέτρηση της μάζας του ιονιζόμενου μορίου προκύπτει το μοριακό βάρος και από τα διάφορα θραύσματα του μορίου που ταυτοποιούνται, προκύπτουν συμπεράσματα ως προς τη δομή της υπό μελέτη ένωσης.

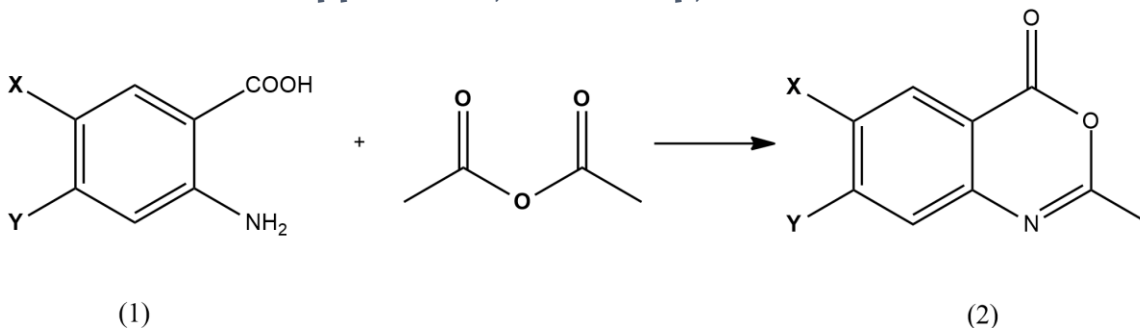


Εικόνα 18: Φασματομέτρο μάζας.

6.2. Σύνθεση

6.2.1. 2-Μεθυλο-4*H*-βενζο[d][1,3]οξαζιν-4-όνες

6.2.1.1. Γενική μέθοδος σύνθεσης

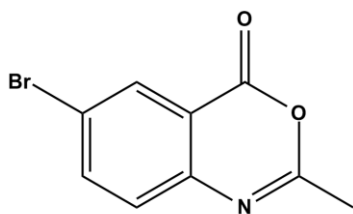


1a: X=Br, Y=H
1b: X=Cl, Y=H
1c: X=OCH₃, Y=H
1d: X=I, Y=H
1e: X=OCH₃, Y=OCH₃
1f: X=H, Y=H
1g: X=NO₂, Y=H

2a: X=Br, Y=H
2b: X=Cl, Y=H
2c: X=OCH₃, Y=H
2d: X=I, Y=H
2e: X=OCH₃, Y=OCH₃
2f: X=H, Y=H
2g: X=NO₂, Y=H

Σε κατάλληλο δοχείο – γυάλινο σωλήνα που χρησιμοποιείται στις αντιδράσεις με χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας εισάγεται ποσότητα του εκάστοτε ανθρανλικού οξέος και κατάλληλη ποσότητα οξικού ανυδρίτη για κάθε αντίδραση. Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιείται το πείραμα είναι 250W, 140 – 150 °C και συνεχής ανάδευση για 22-23 λεπτά. Μετά την αντίδραση το δείγμα ψύχεται και παρατηρείται σταδιακός σχηματισμός στερεών κρυστάλλων. Ακολουθεί διήθηση, έκπλυση με πετρελαϊκό αιθέρα και παραλαβή του στερεού. Ο έλεγχος της πορείας της αντίδρασης πραγματοποιείται με ανάλυση χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (χρησιμοποιούμενο σύστημα διαλυτών πετρελαϊκός αιθέρας – οξικός αιθυλεστέρας σε αναλογία 6:4).

6.2.1.2. 6-βρωμο-2-μεθυλο-4*H*-βενζο[d][1,3]οξαζιν-4-όνη



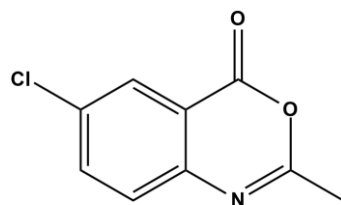
(2a)

Παρασκευάζεται ακολουθώντας την γενική μέθοδο και χρησιμοποιώντας 2,09 mmol (452 mg) 2-αμινο-5-βρωμοβενζοϊκού οξέος.

Απόδοση: 75 %

Σημείο τήξης: 181-183 °C

6.2.1.3. 6-χλωρο-2-μεθυλο-4*H*-βενζο[d][1,3]οξαζιν-4-όνη



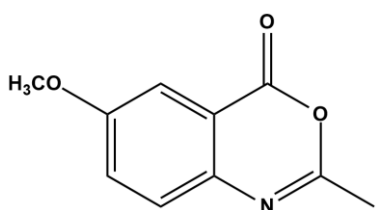
(2b)

Παρασκευάζεται ακολουθώντας την γενική μέθοδο και χρησιμοποιώντας 5,27 mmol (905 mg) 2-αμινο-5-χλωροβενζοϊκού οξέος.

Απόδοση: 80 %

Σημείο τήξης: 120-122 °C

6.2.1.4. 6-μεθοξυ-2-μεθυλο-4*H*-βενζο[d][1,3]οξαζιν-4-όνη



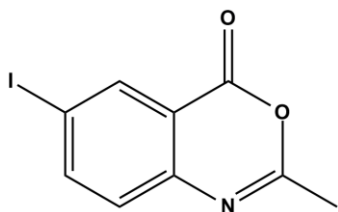
(2c)

Παρασκευάζεται ακολουθώντας την γενική μέθοδο και χρησιμοποιώντας 11,96 mmol (2000 mg) 2-αμινο-5-μεθοξυβενζοϊκού οξέος.

Απόδοση: 82 %

Σημείο τήξης: 111-114 °C

6.2.1.5. 6-ιωδο-2-μεθυλο-4*H*-βενζο[d][1,3]οξαζιν-4-όνη



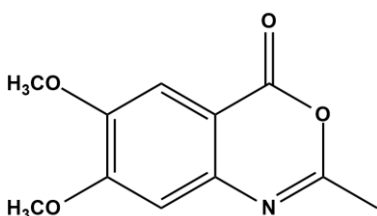
(2d)

Παρασκευάζεται ακολουθώντας την γενική μέθοδο και χρησιμοποιώντας 3,43 mmol (902 mg) 2-αμινο-5-ιωδοβενζοϊκού οξέος.

Απόδοση: 83 %

Σημείο τήξης: 152-153 °C

6.2.1.6. 6,7-διμεθοξυ-2-μεθυλο-4*H*-βενζο[d][1,3]οξαζιν-4-όνη



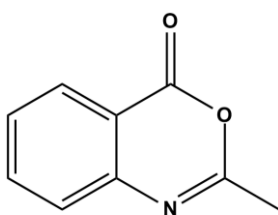
(2e)

Παρασκευάζεται ακολουθώντας την γενική μέθοδο και χρησιμοποιώντας 10,13 mmol (1500 mg) 2-αμινο-4,5-διμεθοξυβενζοϊκού οξέος.

Απόδοση: 82 %

Σημείο τήξης: 186 – 188 °C

6.2.1.7. 2-μεθυλο-4*H*-βενζο[d][1,3]οξαζιν-4-όνη



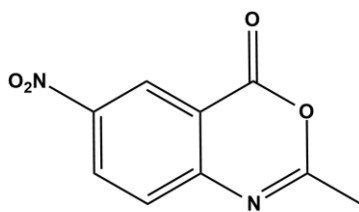
(2f)

Παρασκευάζεται ακολουθώντας την γενική μέθοδο και χρησιμοποιώντας 29,17 mmol (4000 mg) ανθρανιλικού οξέος.

Απόδοση: 56 %

Σημείο τήξης: 78-79 °C

6.2.1.8. 2-μεθυλο-6-νιτρο-4*H*-βενζο[d][1,3]οξαζιν-4-όνη



(2g)

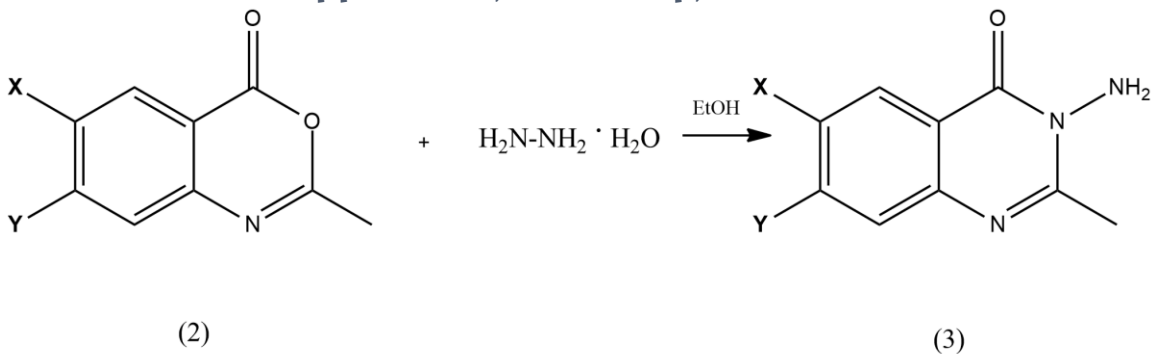
Παρασκευάζεται ακολουθώντας την γενική μέθοδο και χρησιμοποιώντας 4,94 mmol (899,7 mg) 2-αμινο-5-νιτροβενζοϊκού οξέος.

Απόδοση: 88%

Σημείο τήξης: 186-190 °C

6.2.2. 3-Αμινο-Κιναζολιν-4(3H)-όνες

6.2.2.1. Γενική μέθοδος σύνθεσης

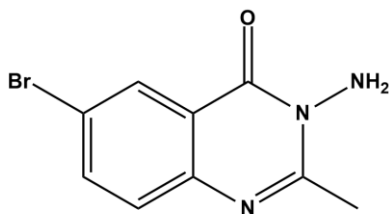


2a: X=Br, Y=H
2b: X=Cl, Y=H
2c: X=OCH₃, Y=H
2d: X=I, Y=H
2e: X=OCH₃, Y=OCH₃
2f: X=H, Y=H
2g: X=NO₂, Y=H

3a: X=Br, Y=H
3b: X=Cl, Y=H
3c: X=OCH₃, Y=H
3d: X=I, Y=H
3e: X=OCH₃, Y=OCH₃
3f: X=H, Y=H
3g: X=NO₂, Y=H

Σε κατάλληλο δοχείο – γυάλινο σωλήνα εισάγεται ποσότητα της εκάστοτε βενζοξαζινόνης μαζί με την κατάλληλη ποσότητα ένυδρης υδραζίνης και διαλύτη αιθανόλη. Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιείται το πείραμα είναι 250W, 140 – 150 °C και συνεχής ανάδευση για 27-37 λεπτά, ανάλογα με την αντίδραση. Μετά την αντίδραση το δείγμα ψύχεται και παρατηρείται σταδιακός σχηματισμός στερεού. Ακολουθεί διήθηση και έκπλυση με παγωμένη αιθανόλη. Ο έλεγχος της πορείας της αντίδρασης πραγματοποιείται με ανάλυση χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (χρησιμοποιούμενο σύστημα διαλυτών πετρελαϊκός αιθέρας – οξικός αιθυλεστέρας σε αναλογία 6:4). Τέλος, πραγματοποιείται ανακρυστάλλωση με διαλύτη αιθανόλη για περαιτέρω καθαρισμό των προϊόντων.

6.2.2.2. 3-αμινο-6-βρωμο-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3H)-όνη



(3a)

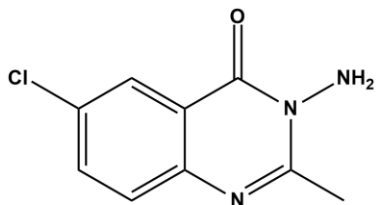
Παρασκευάζεται σύμφωνα με την γενική μέθοδο χρησιμοποιώντας 1,28 mmol (308 mg) 6-βρώμο-2-μέθυλ-4H-βενζο[d][1,3]οξαζιν-4-όνης και 3,85 mmol (193 mg) ένυδρης υδραζίνης.

Απόδοση: 75 %

Σημείο τήξης: 187-189 °C

¹H NMR (DMSO-d₆, 600 MHz): δ (ppm) 8.17 (d, 1H, ArH₅), 7.92-7.90(dd, J₁=8.7 Hz, J₂=2.34 Hz, 1H, ArH₇), 7.56-7.54(d, J=8.7, 1H, ArH₈), 5.83(s, 2H, NH₂), 2.57(s, 3H, CH₃)

6.2.2.3. 3-αμινο-6-χλωρο-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3H)-όνη



(3b)

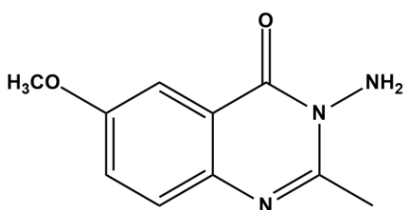
Παρασκευάζεται σύμφωνα με την γενική μέθοδο χρησιμοποιώντας 4 mmol (782 mg) 6-χλώρο-2-μέθυλ-4H-βενζο[d][1,3]οξαζιν-4-όνης και 11,99 mmol (600 mg) ένυδρης υδραζίνης.

Απόδοση: 47 %

Σημείο τήξης: 174-175 °C

¹H NMR (DMSO-d₆, 600 MHz): δ(ppm) 8.03 (d, J= 2.28 Hz, 1H, H₅), 7.80 (dd, J= 8.7, 2.4 Hz, 1H, H₇), 7.63 (d, J= 8.76 Hz, 1H, H₈), 5.84 (s, 2H, NH₂), 2.58 (s, 3H, CH₃), λ_{max}=274nm

6.2.2.4. 3-αμινο-6-μεθοξυ-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3H)-όνη



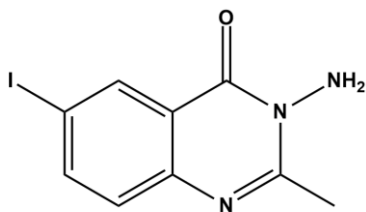
(3c)

Παρασκευάζεται σύμφωνα με την γενική μέθοδο χρησιμοποιώντας 9,76 mmol (1867 mg) 6-μέθοξυ-2-μέθυλ-4H-βενζο[d][1,3]οξαζιν-4-όνης και 29,29 mmol (1466 mg) ένυδρης υδραζίνης.

Απόδοση: 25 %

Σημείο τήξης: 191 – 194 °C

6.2.2.5. 3-αμινο-6-ιωδο-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3H)-όνη



(3d)

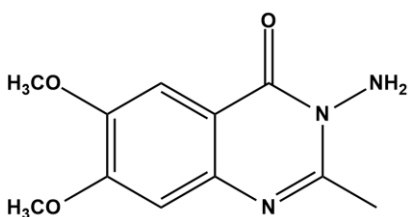
Παρασκευάζεται σύμφωνα με την γενική μέθοδο χρησιμοποιώντας 2,86 mmol (821 mg) 6-ιωδο-2-μέθυλ-4H-βενζο[d][1,3]οξαζιν-4-όνης και 5,71 mmol (286 mg) ένυδρης υδραζίνης.

Απόδοση: 75 %

Σημείο τήξης: 186-187 °C

¹H NMR (DMSO-d₆, 600MHz): δ(ppm) 8.36 (d, J=2.1 Hz, 1H, H₅), 8.04 (dd, J= 8.6, 2.1 Hz, 1H, H₇), 7.39 (d, J=8.6 Hz, 1H, H₈), 5.8238 (s, 2H, NH₂), 2.56 (s, 3H, CH₃), λ_{max}=279 nm

6.2.2.6. 3-αμινο-6,7-διμεθοξυ-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3H)-όνη



(3e)

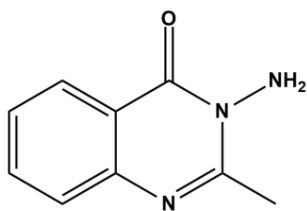
Παρασκευάζεται σύμφωνα με την γενική μέθοδο χρησιμοποιώντας 8,23 mmol (1820 mg) 6,7-διμέθοξυ-2-μέθυλ-4H-βενζο[d][1,3]οξαζιν-4-όνης και 16,45 mmol (824 mg) ένυδρης υδραζίνης.

Απόδοση: 50 %

Σημείο τήξης: 216 – 217 °C

¹H NMR (DMSO-d₆, 600 MHz): δ(ppm) 7.38 (s, 1H, H₅), 7.00 (s, 1H, H₈), 5.77 (s, 2H, NH₂), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 2.54 (s, 3H, CH₃), λ_{max}= 310.0 nm

6.2.2.7. 3-αμινο-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3H)-όνη



(3f)

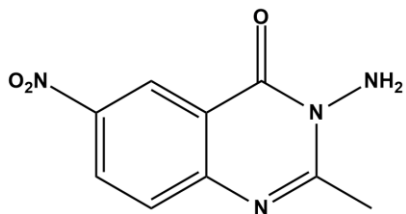
Παρασκευάζεται σύμφωνα με την γενική μέθοδο χρησιμοποιώντας 34,39 mmol (5543 mg) 2-μέθυλο-4H-βενζο[d][1,3]οξαζιν-4-όνης και 103,18 mmol (5165 mg) ένυδρης υδραζίνης.

Απόδοση: 36%

Σημείο τήξης: 142-143 °C

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ(ppm) 8.08 (d, 1H, H₅), 7.63- 7.61 (m, 2H), 7.36-7.31 (m, 1H), 5.15 (s, 2H, NH₂), 2.66 (s, 3H, CH₃), λ_{max}=273.2 nm

6.2.2.8. 3-αμινο-2-μεθυλο-6-νιτρο-κιναζολιν-4(3H)-όνη



(3g)

Παρασκευάζεται σύμφωνα με την γενική μέθοδο χρησιμοποιώντας 1.7497 mmol (360.7 mg) 2-μέθυλο-6-νιτρο-4H-βενζο[d][1,3]οξαζιν-4-όνης και 5.2491 mmol ένυδρης υδραζίνης.

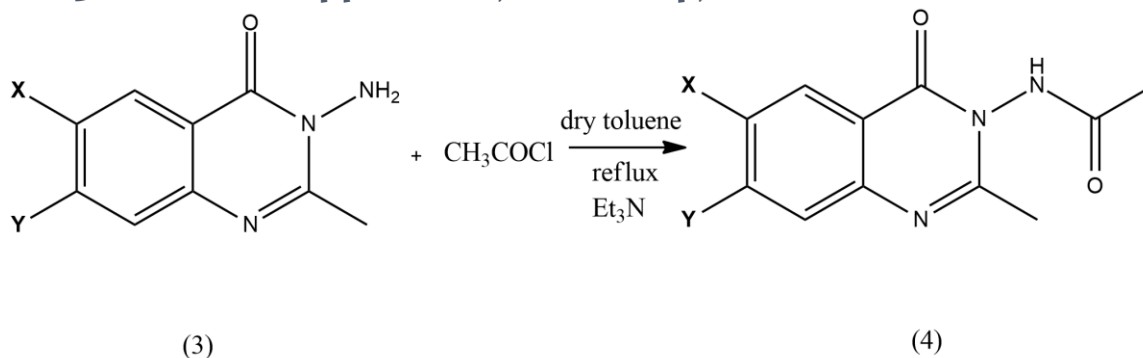
Απόδοση: 94 %

Σημείο τήξης: 178-180 °C

^1H NMR (DMSO $-\text{d}_6$, 600 MHz): δ (ppm) 8.79 (d, $J=2.28$ Hz, 1H, H₅), 8.49 (dd, $J=9.06$, 2.4 Hz, 1H, H₇), 7.78 (d, $J=8.94$ Hz, 1H, H₈), 5.92 (s, 2H, NH₂), 2.64 (s, 3H, CH₃); $\lambda_{\text{max}}=325.8$ nm

6.2.3. Κιναζολινικά παράγωγα - Ακεταμίδια

6.2.3.1. Γενική μέθοδος σύνθεσης Α

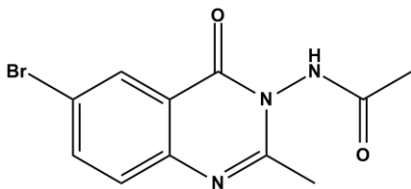


3a: X=Br, Y=H
3b: X=Cl, Y=H
3c: X=OCH₃, Y=H
3d: X=I, Y=H
3e: X=OCH₃, Y=OCH₃
3f: X=H, Y=H
3g: X=NO₂, Y=H

4a: X=Br, Y=H
4b: X=Cl, Y=H
4c: X=OCH₃, Y=H
4d: X=I, Y=H
4e: X=OCH₃, Y=OCH₃
4f: X=H, Y=H
4g: X=NO₂, Y=H

Σε σφαιρική φιάλη εισάγεται ποσότητα της εκάστοτε κιναζολινόνης μαζί με την ανάλογη ποσότητα ξηρού τολουολίου και αφήνεται λίγα λεπτά για ανάδευση. Στην συνέχεια προστίθενται το ακετυλοχλωρίδιο και σταγόνες τριαιθυλαμίνης. Η αντίδραση αφήνεται στους 110 °C για 24 ώρες. Ο έλεγχος της πορείας της αντίδρασης πραγματοποιείται με ανάλυση χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (χρησιμοποιούμενο σύστημα διαλυτών πετρελαϊκός αιθέρας – οξικός αιθυλεστέρας σε αναλογία 6:4). Ακολουθεί είτε εκχύλιση και εξάτμιση του διαλύτη (οξικός αιθυλεστέρας), είτε διήθηση με διαιθυλεθέρα για την παραλαβή του προϊόντος. Τέλος, πραγματοποιείται ανακρυστάλλωση με διαλύτη αιθανόλη για τον περαιτέρω καθαρισμό του.

6.2.3.1.1. *N*-(6-βρωμο-2-μεθυλο-4-οξοκιναζολιν-3(4*H*))-υλ) ακεταμίδιο



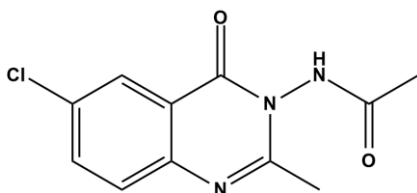
(4a)

Παρασκευάζεται κατά την γενική μέθοδο χρησιμοποιώντας 4,8 mmol (1229 mg) 3-αμινο-6-βρωμο-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3*H*)-όνη, 9,7 mmol (2,5 mL) ακετυλοχλωρίδιο και 24,2 mL τολουόλιο.

Απόδοση: 79 %

Σημείο τήξης: 228-230 °C

6.2.3.1.2. *N*-(6-χλωρο-2-μεθυλο-4-οξοκιναζολιν-3(4*H*))-υλ) ακεταμίδιο



(4b)

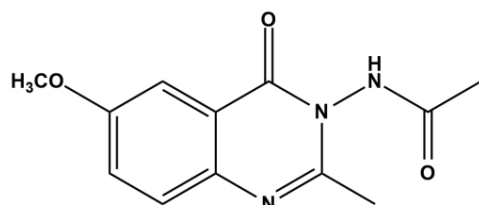
Παρασκευάζεται κατά την γενική μέθοδο χρησιμοποιώντας 0,7 mmol (150 mg) 3-αμινο-6-χλωρο-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3*H*)-όνη, 1,4 mmol (0,11 mL) ακετυλοχλωρίδιο και 3,6 mL τολουόλιο.

Απόδοση: 45 %

Σημείο τήξης: 206-208 °C

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300MHz): δ (ppm) 11.09 (s, 1H, NHCO), 8.04 (d, *J*=2.4 Hz, 1H, H₅), 7.90-7.86 (dd, *J*₁=2.4 Hz, *J*₂=8.7 Hz, 1H, H₇), 7.67 (d, *J*= 8.7 Hz, 1H, H₈), 2.38 (s, 3H, COCH₃), 2.11 (s, 3H, CH₃)

6.2.3.1.3. *N*-(6-μεθοξυ-2-μεθυλο-4-οξοκιναζολιν-3(4*H*))-υλ) ακεταμίδιο



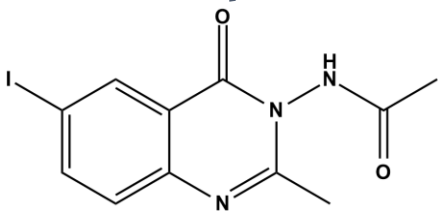
(4c)

Παρασκευάζεται κατά την γενική μέθοδο χρησιμοποιώντας 1,9 mmol (390 mg) 3-αμινο-6-μεθοξυ-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3*H*)-όνη, 3,8 mmol (0,3 mL) ακετυλοχλωρίδιο και 9,5 mL τολουόλιο.

Απόδοση: 72 %

Σημείο τήξης: 216-218 °C

6.2.3.1.4. *N*-(6-ιωδο-2-μεθυλο-4-οξοκιναζολιν-3(4*H*)-υλ) ακεταμίδιο



(4d)

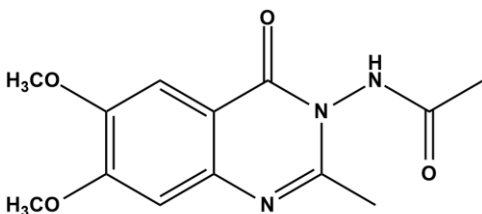
Παρασκευάζεται κατά την γενική μέθοδο χρησιμοποιώντας 0,5 mmol (150 mg) 3-αμινο-6-ιωδο-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3*H*)-όνη, 1,0 mmol (0,08 mL) ακετυλοχλωρίδιο και 2,5 mL τολουόλιο.

Απόδοση: 37 %

Σημείο τήξης: 182-184 °C

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300MHz): δ (ppm) 11.17 (s, 1H, NHCO), 8.79 (d, *J*=1.8 Hz, 1H, H₅), 8.15-8.12 (dd, *J*₁=1.8 Hz, *J*₂=8.4 Hz, 1H, H₇), 7.44 (d, *J*= 8.7 Hz, 1H, H₈), 2.37 (s, 3H, COCH₃), 2.10 (s, 3H, CH₃)

6.2.3.1.5. *N*-(6,7-διμεθοξυ-2-μεθυλο-4-οξοκιναζολιν-3(4*H*)-υλ) ακεταμίδιο



(4e)

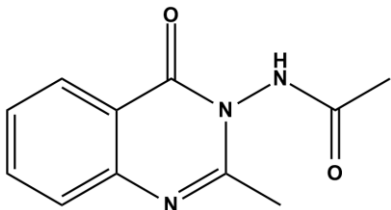
Παρασκευάζεται κατά την γενική μέθοδο χρησιμοποιώντας 0,6 mmol (150 mg) 3-αμινο-6,7-διμεθοξυ-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3*H*)-όνη, 1,3 mmol (0,1 mL) ακετυλοχλωρίδιο και 3,2 mL τολουόλιο.

Απόδοση: 70 %

Σημείο τήξης: 222-225 °C

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ(ppm) 11.11 (s, 1H, NHCO), 7.39 (s, 1H, H₅), 7.16 (s, 1H, H₈), 3.91 (s, 3H, OCH₃), 3.87 (s, 3H, OCH₃), 2.38 (s, 3H, CH₃), 2.10 (s, 3H, CH₃), λ_{max}= 310.8 nm

6.2.3.1.6. *N*-(2-μεθυλο-4-οξοκινναζολιν-3(4*H*)-υλ)ακεταμίδιο



(4f)

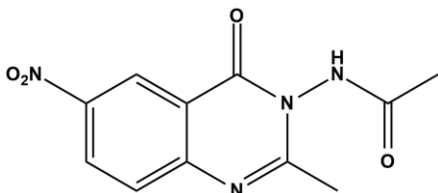
Παρασκευάζεται κατά την γενική μέθοδο χρησιμοποιώντας 4,6 mmol (800 mg) 3-αμινο-2-μεθυλοκινναζολιν-4(3*H*)-όνη, 9,1 mmol (0,7 mL) ακετυλοχλωρίδιο και 22,8 mL τολουόλιο.

Απόδοση: 87 %

Σημείο τήξης: 224-226 °C

¹H NMR (CDCl₃, 300MHz): δ (ppm) 8.80 (s, 1H, NHCO), 8.19 (d, J= 7.8 Hz, 1H, H₅), 7.76 (t, J=8.1 Hz, 1H), 7.65 (d, J= 8.4Hz, 1H), 7.45 (t, J=7.5 Hz, 1H), 2.54 (s, 3H, COCH₃), 2.26 (s, 3H, CH₃)

6.2.3.1.7. *N*-(2-μεθυλο-6-νιτρο-4-οξοκινναζολιν-3(4*H*)-υλ)ακεταμίδιο



(4g)

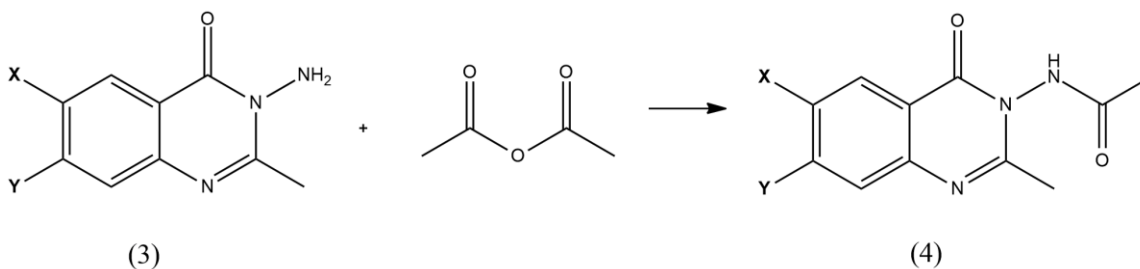
Παρασκευάζεται κατά την γενική μέθοδο χρησιμοποιώντας 0,9 mmol (200 mg) 3-αμινο-2-μεθυλο-6-νιτρο-κινναζολιν-4(3*H*)-όνη, 1,8 mmol (0,14 mL) ακετυλοχλωρίδιο και 4,5 mL τολουόλιο.

Απόδοση: 80 %

Σημείο τήξης: 242-244 °C

¹H NMR (DMSO-d₆, 300MHz): δ (ppm) 11.24 (s, 1H, NHCO), 8.79 (d, J=2.4 Hz, 1H, H₅), 8.60-8.56 (dd, J₁=2.4 Hz, J₂=8.7 Hz, 1H, H₇), 7.85 (d, J= 9 Hz, 1H, H₈), 2.45 (s, 3H, COCH₃), 2.13 (s, 3H, CH₃)

6.2.3.2. Γενική μέθοδος σύνθεσης Β



3d: X=I, Y=H

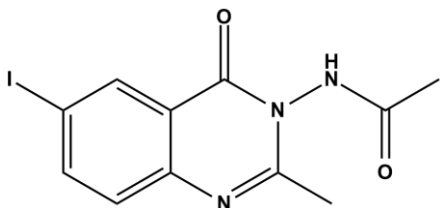
3e: X=OCH₃, Y=OCH₃

4d: X=I, Y=H

4e: X=OCH₃, Y=OCH₃

Σε κατάλληλο δοχείο – γυάλινο σωλήνα που χρησιμοποιείται στις αντιδράσεις με χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας εισάγεται ποσότητα της εκάστοτε κιναζολινόνης μαζί με την κατάλληλη ποσότητα οξικού ανυδρίτη. Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιείται το πείραμα είναι 250W, 140 – 150 °C και συνεχής ανάδευση για 47 λεπτά. Μετά την αντίδραση το δείγμα ψύχεται και παρατηρείται σταδιακός σχηματισμός στερεού. Ακολουθεί διήθηση και έκπλυση με παγωμένη αιθανόλη. Ο έλεγχος της πορείας της αντίδρασης πραγματοποιείται με ανάλυση χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (χρησιμοποιούμενο σύστημα διαλυτών πετρελαϊκός αιθέρας – οξικός αιθυλεστέρας σε αναλογία 6:4). Τέλος, πραγματοποιείται ανακρυστάλλωση με διαλύτη αιθανόλη για περαιτέρω καθαρισμό των προϊόντων.

6.2.3.2.1. *N*-(6-ιωδο-2-μεθυλο-4-οξοκιναζολιν-3(4*H*)-υλ) ακεταμίδιο



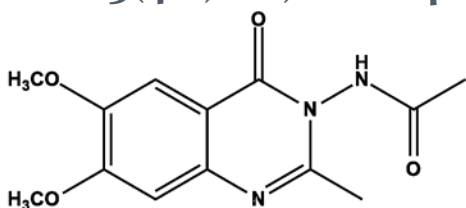
(4d)

Παρασκευάζεται κατά την γενική μέθοδο χρησιμοποιώντας 0.663 mmol (200 mg) 3-αμινο-6-ιωδο-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3*H*)-όνη και 4 mL οξικού ανυδρίτη.

Απόδοση: 25 %

Σημείο τήξης: 158-161 °C

6.2.3.2.2. *N*-(6,7-διμεθοξυ-2-μεθυλο-4-οξοκιναζολιν-3(4*H*)-υλ) ακεταμίδιο



(4e)

Παρασκευάζεται κατά την γενική μέθοδο χρησιμοποιώντας 0.85 mmol (200 mg) 3-αμινο-6,7-διμεθοξυ-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3*H*)-όνη και 4 mL οξικού ανυδρίτη.

Απόδοση: 60%

Σημείο τήξης: 219 – 221 °C

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ(ppm) 7.42 (s, 1H, H₅), 7.20 (s, 1H, H₈), 3.93 (s, 3H, OCH₃), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 2.36 (s, 3H, CH₃), λ_{max}= 312.4 nm

6.3. Ταυτοποίηση ενώσεων

6.3.1. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πραγματοποιείται με χρήση του οργάνου Varian Gemini 600 MHz. Οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων δίνονται σε ppm και των σταθερών συζεύξεως J σε Hz αντίστοιχα. Η πολλαπλότητα των σημάτων στα φάσματα περιγράφεται ως εξής:

- s (singlet – απλό)
- d (doublet – διπλό)
- t (triplet – τριπλό)
- q (quartet – τετραπλό)
- m (multiplet – πολλαπλό)
- br (broad – ευρύ)

Για την διαδικασία της ταυτοποίησης απαιτείται διάλυση 6-10 mg της εκάστοτε ένωσης σε κατάλληλο δευτεριωμένο διαλύτη. Συνήθως, ως διαλύτης φάσματος ^1H NMR χρησιμοποιείται είτε δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO - d_6), είτε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3). Τέλος, η ανάλυση των επιθυμητών ενώσεων διεξάγεται σε φασματογράφο 300 και 600 MHz.

6.4. Μελέτη βιολογικής δράσης

6.4.1. Υπολογιστική μελέτη (Molecular docking)

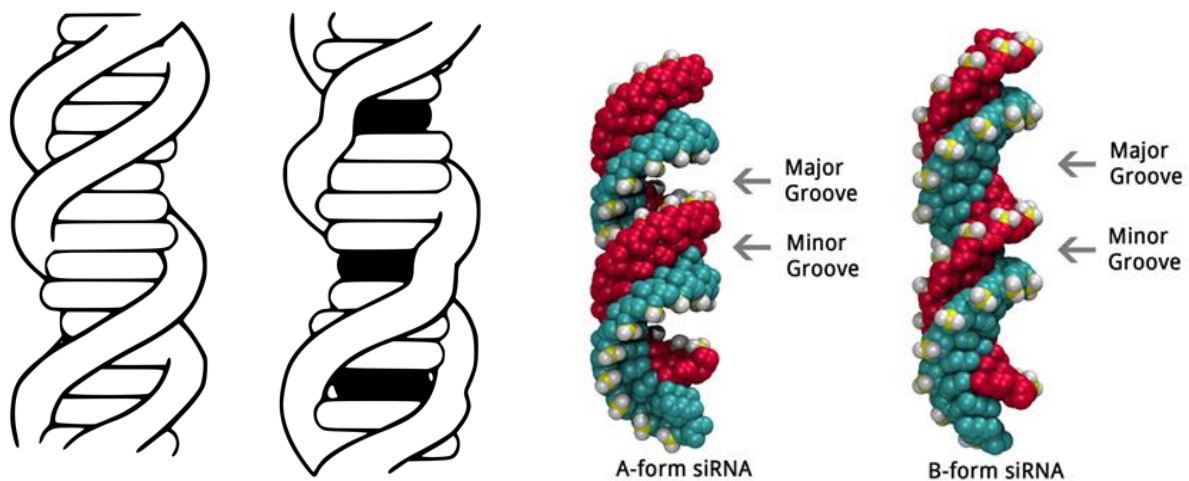
Η υπολογιστική μελέτη του τρόπου αλληλεπίδρασης των ενώσεων με το DNA πραγματοποιείται μέσω της κρυσταλλικής δομής του DNA (PDB ID: 1bna), η οποία παραλαμβάνεται από το RSCB Protein Data Bank (PDB). Οι ενώσεις σχεδιάζονται με χρήση του προγράμματος HyperChem 7.0 software (version 7.0, Hypercube, Inc, Gainesville, FL, USA, www.hyper.com). Η βελτιστοποίηση των παραμέτρων σύνδεσης πραγματοποιείται μέσω του AutoDock Vina software (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA), εφαρμόζοντας εμπειρική λειτουργία ελεύθερης ενέργειας. Σημειώνεται ότι μέσω του AutoDock Tools προστίθενται μόνο πολικά υδρογόνα στο DNA. Τέλος, για την απεικόνιση των παραπάνω χρησιμοποιείται το λογισμικό PyMol. Το όνομα και ο αριθμός των νουκλεοτιδίων σχεδιάζονται σύμφωνα με το λογισμικό αυτό.

6.4.2. Τιτλοδότηση ορατού - υπεριώδους

Όπως αναφέρεται και στο κεφάλαιο 3 η αλληλεπίδραση των ενώσεων με το DNA προκαλεί δομικές αλλαγές σε αυτό, με αποτέλεσμα το μερικό ξετύλιγμα της έλικας και την επιμήκυνση του μορίου, δημιουργώντας εμφανείς αλλαγές στην υδροδυναμική συμπεριφορά του πολυμερούς όπως μεταβολή του ιζώδους και αλλαγή της

ηλεκτροφορητικής ευκινησίας. Η φασματοσκοπία απορρόφησης UV χρησιμοποιείται προκειμένου να ληφθούν πληροφορίες σχετικά με την ύπαρξη οποιασδήποτε αλληλεπίδρασης των ενώσεων με το CT - DNA (Calf Thymus) και τον βαθμό της επίδρασής τους σε αυτό μέσω της σταθεράς αλληλεπίδρασης K_b .³¹

Η αλληλεπίδραση της εξεταζόμενης ένωσης με το μόριο του DNA προκαλεί μεταβολές στην ένταση απορρόφησης της UV ακτινοβολίας ή/και μετατοπίσεις στο μήκος κύματος λ_{max} . Συγκεκριμένα, κατά την εσωτερική παρεμβολή της ένωσης στο DNA παρατηρείται μείωση της απορρόφησης (υποχρωμία) με ταυτόχρονη μετατόπισή της σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (βαθυχρωμία ή ερυθρή μετατόπιση). Αντίθετα, στην περίπτωση δέσμευσης της ένωσης στην εξωτερική επιφάνεια του DNA (external binding ή groove binding) παρατηρείται υπερχρωμία. Τονίζεται πως σε ορισμένες περιπτώσεις η υπερχρωμία φανερώνει την καταστροφή δεσμών υδρογόνου μεταξύ των βάσεων και κατ' επέκταση της δευτεροταγούς δομής του DNA. Επιπλέον, η μετατόπιση της θέσης του λ_{max} αναδεικνύει την σταθεροποίηση ή μη της έλικας του DNA ύστερα από αλληλεπίδραση με την ένωση. Συγκεκριμένα, η βαθυχρωμία ή ερυθρή μετατόπιση (red - shift) φανερώνει την σταθεροποίηση της ελικοειδούς δομής του DNA, ενώ η υποχρωμία ή κυανή μετατόπιση (blue - shift), δηλαδή η μετατόπιση προς μικρότερα μήκη κύματος, δείχνει την αποσταθεροποίηση της έλικας του DNA.



Εικόνα 19:Εσωτερική παρεμβολή (αριστερά), εξωτερική συναρμογή (δεξιά).

Αρχικά, για την εφαρμογή της μεθόδου παρασκευάζεται ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (10 mM), διαλύοντας 605,7 mg Tris σε 500 mL υπερκάθαρου νερού. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στα 7,4 με χρήση σταγόνων HCl (10% v/v).

Στη συνέχεια, παρασκευάζεται διάλυμα DNA διαλύοντας ίνες φυσικού DNA από θύμο αδένα βοοειδούς (CT - DNA) σε 1 mg/mL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (10 mM) και αναδεύοντας το τελικό διάλυμα για 24 ώρες στους 4 °C. Η συγκέντρωση του διαλύματος DNA ανά νουκλεοτίδιο υπολογίζεται μέσω φασματοσκοπίας απορρόφησης από το

πηλίκου της απορρόφησης του διαλύματος στα 260 nm προς τον συντελεστή μοριακής απορρόφησης της κορυφής στα 260 nm, που είναι $6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Ο λόγος της UV απορρόφησης στα 260:280 nm είναι 1,8-1,9:1, γεγονός που υποδηλώνει ότι το DNA είναι ελεύθερο πρωτεϊνών. Το διάλυμα μπορεί να διατηρηθεί στο ψυγείο για επαναχρησιμοποίηση έως και 1 εβδομάδα.

Τα κινολογινικά παράγωγα (**4a – 4g**) που εξετάζονται διαλύονται σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) συγκέντρωσης 10 mM και αραιώνονται με το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl σε τελική συγκέντρωση 10 μM . Κρατώντας σταθερή την συγκέντρωση της εξεταζόμενης ένωσης, μεταβάλλεται η συγκέντρωση του CT - DNA, λαμβάνοντας τιμές από 0 έως 100 μM . Η εκάστοτε σειρά δειγμάτων επωάζεται για 5 και για 30 λεπτά πριν την μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο. Από τα δεδομένα που προκύπτουν, μελετώνται οι μεταβολές που συμβαίνουν στα φάσματα UV (200 - 400nm) διαλύματος της ένωσης με την προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων του CT-DNA και καταγράφονται οι μεταβολές της απορρόφησης, αλλά και, της τιμής του λ_{max} .

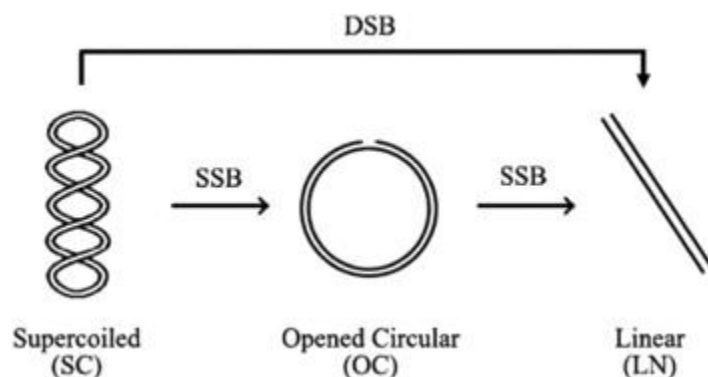
Από τις προαναφερθείσες μεταβολές εξάγονται αξιόπιστα συμπεράσματα αναφορικά με το είδος της αλληλεπίδρασης. Η σταθερά αλληλεπίδρασης, K_b , προσδιορίζεται από το λόγο της τεταγμένης επί της αρχής προς την κλίση της ευθείας ελαχίστων τετραγώνων που προσδιορίζεται σε διαγράμματα του λόγου συναρτήσει της συγκέντρωσης DNA σύμφωνα με την εξίσωση Benesi - Hildebrand:

$$\frac{1}{A_f - A_{obs}} = \frac{1}{A_f - A_{fc}} + \frac{K_b}{(A_f - A_{fc}) * [DNA]}$$

όπου K_b η σταθερά αλληλεπίδρασης της ένωσης με το DNA, A_f η απορρόφηση της ελεύθερης ένωσης, A_{obs} η παρατηρούμενη απορρόφηση της δεσμευμένης ένωσης και A_{fc} η απορρόφηση κορεσμού.³¹

6.4.3. Φωτοβόληση ενώσεων παρουσία πλασμιδιακού DNA

Η φωτοδιασπαστική ικανότητα του DNA εξετάζεται με χρήση υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA (pBR322) με φωτοβόληση με υπεριώδη ακτινοβολία (312nm ή 365nm) ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος. Μέσω της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 1% καθίσταται δυνατή η παρατήρηση της διάσπασης του DNA ύστερα από την προσθήκη της ένωσης. Οι μορφές στις οποίες διακρίνεται το πλασμιδιακό DNA είναι η Μορφή I, δηλαδή το υπερελικομένο DNA, η οποία με σχάσεις στον έναν κλώνο μετατρέπεται σε Μορφή II - κυκλικό DNA, ενώ με σχάσεις του διπλού κλώνου προκύπτει η Μορφή III - γραμμικό DNA. Σημειώνεται ότι εκτεταμένη σχάση του διπλού κλώνου οδηγεί, τελικά, σε κατακερματισμό του DNA.



Εικόνα 20: Μορφή I (αριστερά), μορφή II (κέντρο), μορφή III (δεξιά) του πλασμιδιακού DNA αντίστοιχα.³²

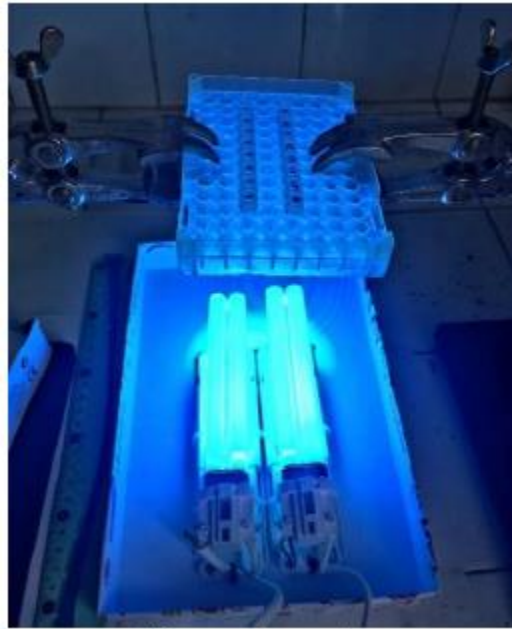
Αρχικά, παρασκευάζεται ρυθμιστικό διάλυμα Tris 25mM, διαλύοντας 6 mg σκόνης 2-αμινο-2-(υδροξυμεθυλο)-1,3-προπανοδιόλης (Trizma base) σε 20 mL αποστειρωμένου νερού (διάλυμα A), ενώ ακολουθεί αραιώση μέχρι τελικής συγκέντρωσης 25 μ M σε τελικό όγκο 20 mL και pH 6,8.

Ακολουθεί παρασκευή διαλύματος TBE (Tris Boric EDTA) 10 X και 1X. Σε 700 mL αποστειρωμένου νερού προστίθενται 108 g Tris, 55 g βορικού οξέος και 40 mL EDTA 0,5 M. Το διάλυμα αναδεύεται έως ότου γίνει διαυγές και κατόπιν πραγματοποιείται μέτρηση και πιθανή ρύθμιση του pH. Αφότου συμπληρωθεί η υπόλοιπη ποσότητα νερού μέχρι τον όγκο του ενός λίτρου, ακολουθεί φιλτράρισμα με χαρτί whatman. Για το διάλυμα TBE 1X γίνεται αραιώση 1:10 με τελικό όγκο 1 L, επομένως σε 900 mL απιονισμένου νερού προστίθενται 100 mL TBE 10X.

Στην συνέχεια, παρασκευάζεται πήκτωμα αγαρόζης 1% χρησιμοποιώντας σκόνη αγαρόζης (Invitrogen). Συγκεκριμένα, 500 mg αγαρόζης διαλύονται σε 50 mL διαλύματος TBE 1X με θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων για ένα λεπτό. Εφόσον το διάλυμα γίνει διαυγές, ψύχεται και προστίθενται σε αυτό 5 μ L βρωμιούχου αιθιδίου (αραιώση 1:10.000). Τέλος, για την σταθεροποίηση του διαλύματος χρησιμοποιείται κατάλληλο εκμαγείο στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.

Οι ενώσεις διαλύονται σε DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο) σε αρχική συγκέντρωση 5 mM, η οποία αραιώνεται σε τελική συγκέντρωση 500 μ M.

Για την διαδικασία της φωτοβόλησης σχηματίζονται διαλύματα τελικού όγκου 20 μ L, που περιέχουν 2 μ L της εκάστοτε ουσίας, 1 μ L από 500 ng πλασμιδιακού DNA και 17 μ L διαλύματος Tris, και τοποθετούνται σε φιαλίδια. Ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος, η διαδικασία της φωτοβόλησης πραγματοποιείται με υπεριώδη ακτινοβολία 312 nm ή 365 nm. Αναλυτικά, στα 312 nm η φωτοβόληση πραγματοποιείται σε ύψος 15 cm και για χρονικό διάστημα 30 λεπτών, ενώ, στα 365 nm πραγματοποιείται σε ύψος 10 cm και για χρονικό διάστημα 2 ωρών.



Εικόνα 21: Διαδικασία φωτοβόλησης παρουσία πλασμιδιακού DNA.

Προτού ξεκινήσει η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, τα διαλύματα φυγοκεντρούνται για 1 λεπτό στις 2000 στροφές, επωάζονται για 30 λεπτά στους 37 °C και φυγοκεντρούνται εκ νέου για 1 λεπτό στις 2000 στροφές. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων για 1 ώρα στα 70 W. Τέλος, φυγοκεντρούνται και πάλι για 1 λεπτό στις 2000 στροφές και προστίθενται στο κάθε φιαλίδιο 4 μ L χρωστικής Orange Loading Dye 6 X (Fermentas).

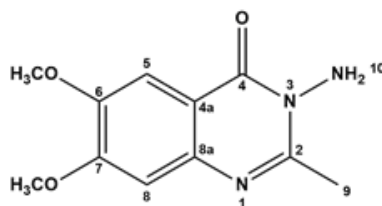
Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, η πηκτή αγαρόζης φωτογραφίζεται από ειδική κάμερα με ακτινοβολία UV. Η επεξεργασία των εικόνων γίνεται μέσω του προγράμματος "Image J", επιλέγοντας τις ζητούμενες ζώνες και έπειτα από κατάλληλη διαδικασία ορίζεται η ένταση της εκάστοτε ζώνης. Τέλος, υπολογίζεται το ποσοστό μετατροπής της μορφής I στην μορφή II και III του DNA.

7. Αποτελέσματα – Συζήτηση

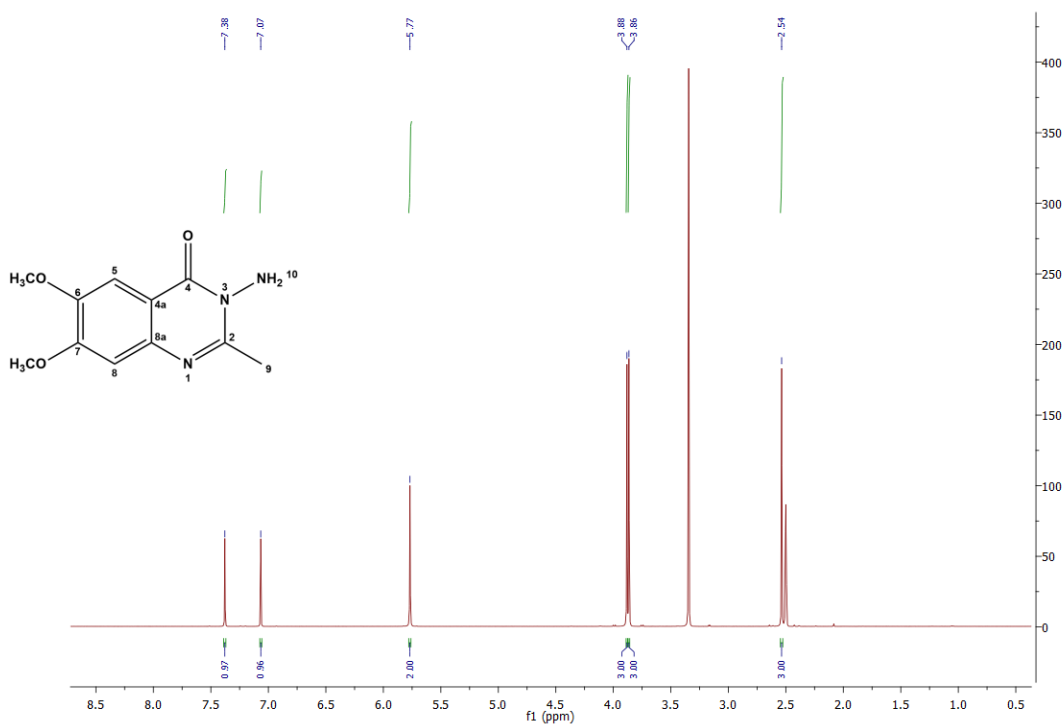
7.1. Ταυτοποίηση ενώσεων

7.1.1. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

Η ταυτοποίηση των ενώσεων και ο χαρακτηρισμός της δομής των νέων παραγώγων **3a – 3g** και **4a – 4g** πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία ^1H NMR, σε φασματογράφο NMR 300 MHz και 600 MHz. Στην συγκεκριμένη ενότητα αναλύεται ο τρόπος ταυτοποίησης χρησιμοποιώντας ως αντιπροσωπευτικά παραδείγματα την 3-αμινο-6,7-διμεθοξυ-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3H)-όνης (**3e**) και το αντίστοιχο ακεταμίδιο **4e**.



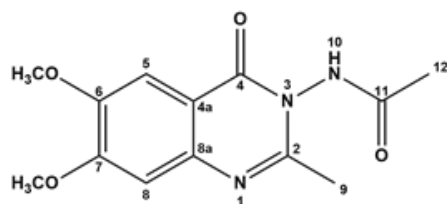
Σχήμα 35: Δομή της 3-αμινο-6,7-διμεθοξυ-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3H)-όνης (**3e**).



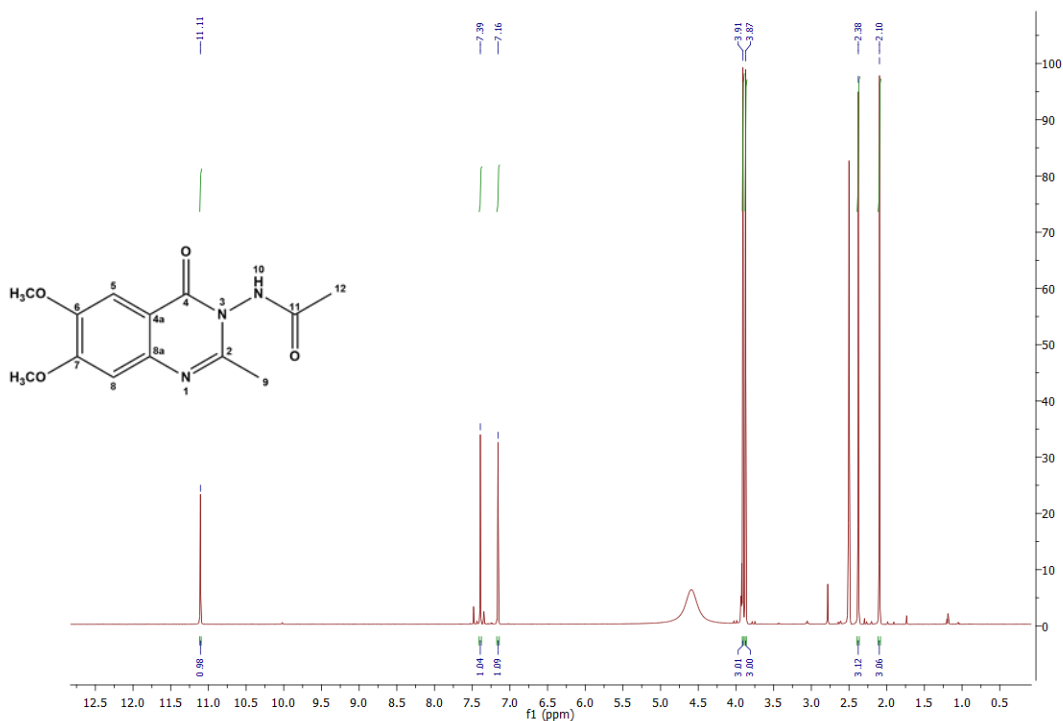
Εικόνα 22: Φάσμα πρωτονίου ¹H NMR της 3-αμινο-6,7-διμεθοξυ-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3H)-όνης (3e) (600 MHz, DMSO-d₆)

Στην Εικόνα 22 παρουσιάζεται το φάσμα πρωτονίου ¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) της ένωσης σε δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO-d₆).

Στα υψηλότερα πεδία του φάσματος, αναμένεται να εμφανιστούν τα πιο προστατευμένα πρωτόνια. Συγκεκριμένα, παρατηρούνται τα τρία ισοδύναμα πρωτόνια της ομάδας του μεθυλίου της θέσης 2 με μια απλή κορυφή στα 2.54 ppm, ενώ, στα 3.86 και 3.88 ppm με δύο απλές κορυφές εμφανίζονται τα πρωτόνια των δυο μεθοξυ ομάδων. Στη συνέχεια, ως λιγότερο προστατευμένα εμφανίζονται τα πρωτόνια της αμινομάδας με μια απλή κορυφή στα 5.77 ppm. Τέλος, στα χαμηλά πεδία του φάσματος, τα πιο αποπροστατευμένα πρωτόνια της ένωσης εμφανίζονται στην περιοχή 7.00 – 7.38 ppm και αντιστοιχούν στα αρωματικά πρωτόνια της ένωσης. Πιο συγκεκριμένα, στα 7.00 ppm εμφανίζεται μια απλή κορυφή που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο, και αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης C-8. Στα 7.38 ppm εμφανίζεται μια απλή κορυφή που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο, και αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης C-5.



Σχήμα 36: Δομή του N-(6,7-διμεθοξυ-2-μεθυλο-4-οξοκινναζολιν-3(4H)-υλ) ακεταμιδίου (4e).



Εικόνα 23: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR του N-(6,7-διμεθοξυ-2-μεθυλο-4-οξοκινναζολιν-3(4H)-υλ) ακεταμιδίου (4e) (600 MHz, DMSO-d_6) – Συμβατική μέθοδος σύνθεσης.

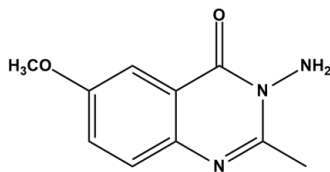
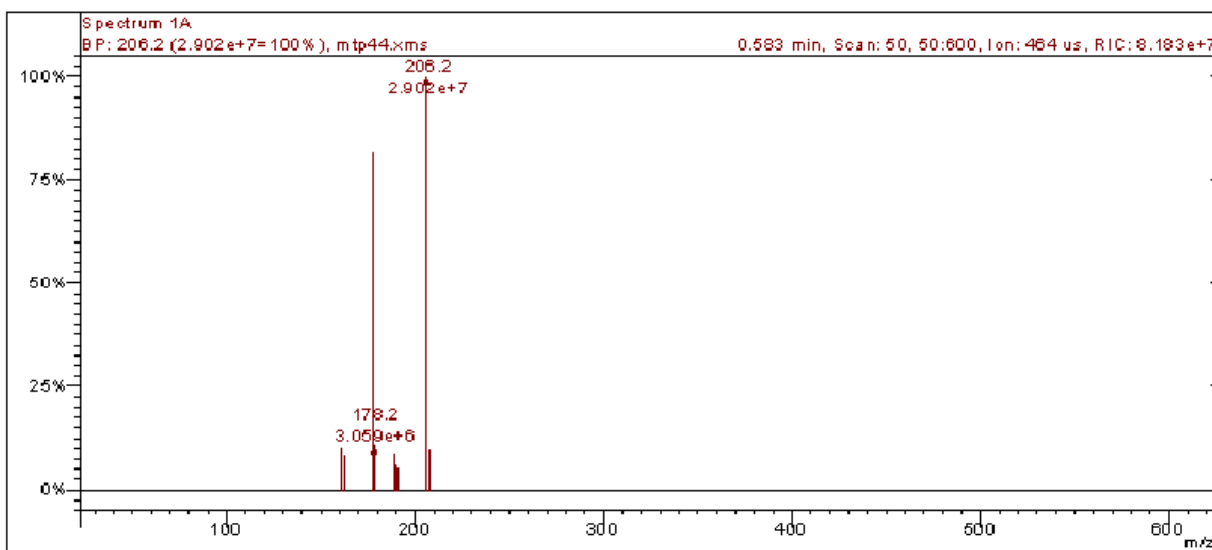
Στην Εικόνα 23 παρουσιάζεται το φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) της ένωσης σε δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO-d_6).

Στα υψηλότερα πεδία του φάσματος, αναμένεται να εμφανιστούν τα πιο προστατευμένα πρωτόνια. Συγκεκριμένα, παρατηρούνται τα τρία ισοδύναμα πρωτόνια της ομάδας του μεθυλίου της θέσης 2 με μια απλή κορυφή στα 2.10 ppm και τα τρία ισοδύναμα πρωτόνια του μεθυλίου της ακετυλομάδας της θέσης 12 στα 2.38 ppm. Στη συνέχεια, στα 3.91 και 3.87 ppm με δύο απλές κορυφές εμφανίζονται τα πρωτόνια των δυο μεθοξυ ομάδων. Τέλος, στα χαμηλά πεδία του φάσματος, στην περιοχή 7.16 – 7.39 ppm εμφανίζονται τα πιο αποπροστατευμένα πρωτόνια που αντιστοιχούν στα αρωματικά πρωτόνια της ένωσης. Πιο συγκεκριμένα, στα 7.16 ppm εμφανίζεται μια απλή κορυφή

που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης C-8. Στα 7.39 ppm εμφανίζεται μια απλή κορυφή που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης C-5. Τέλος, ως πιο αποπροστατευμένο πρωτόνιο παρουσιάζεται το πρωτόνιο του αμιδικού δεσμού, που εμφανίζεται με μια απλή κορυφή στα 11.11 ppm.

7.1.2. Φασματομετρία μάζας (MS)

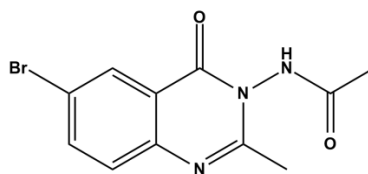
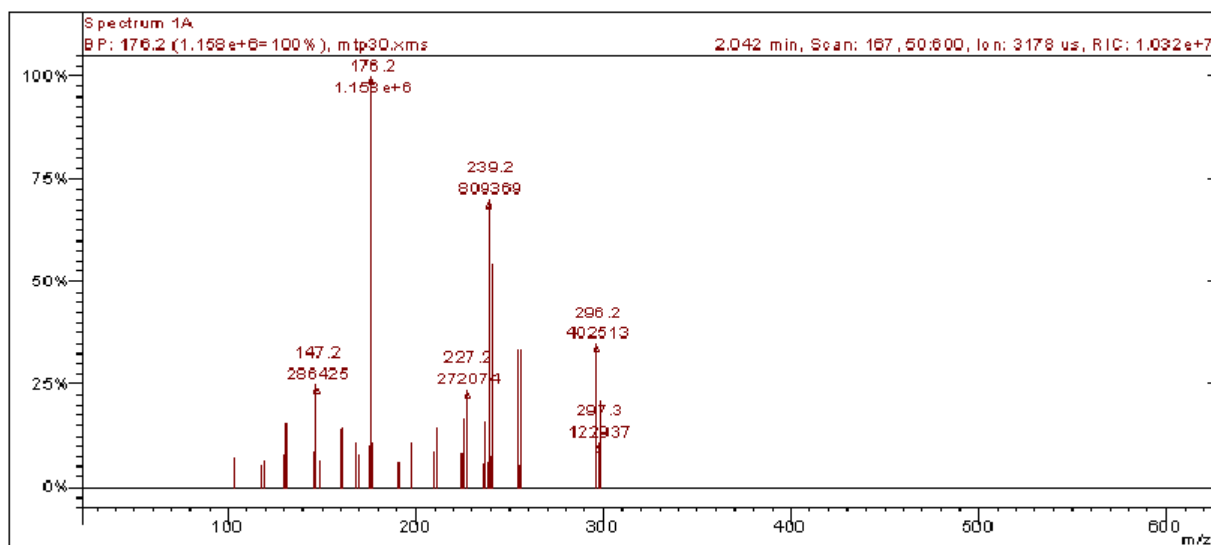
Μια ακόμη μέθοδος ταυτοποίησης της δομής των οργανικών ενώσεων είναι η φασματομετρία μάζας. Για την πλήρη ταυτοποίηση των ενώσεων **3c**, **4a** και **4c** αναλύονται τα φάσματα μάζας τους.



(3c)

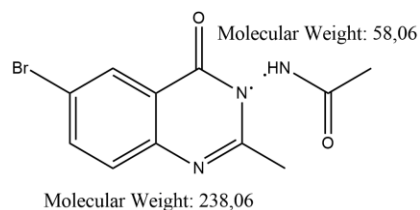
Εικόνα 24: Φάσμα MS της 3-αμινο-6-μεθοξυ-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3H)-όνης (3c).

Το φάσμα του μορίου **3c** εμφανίζεται στην Εικόνα 24. Το **3c** έχει μοριακό βάρος 205.21 g/mol. Εμφανίζεται μια κορυφή με m/z 206 [M+1]⁺ 100% όπου αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν και στο ιόν βάσης, τα οποία σε αυτή την περίπτωση ταυτίζονται.



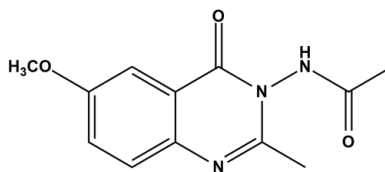
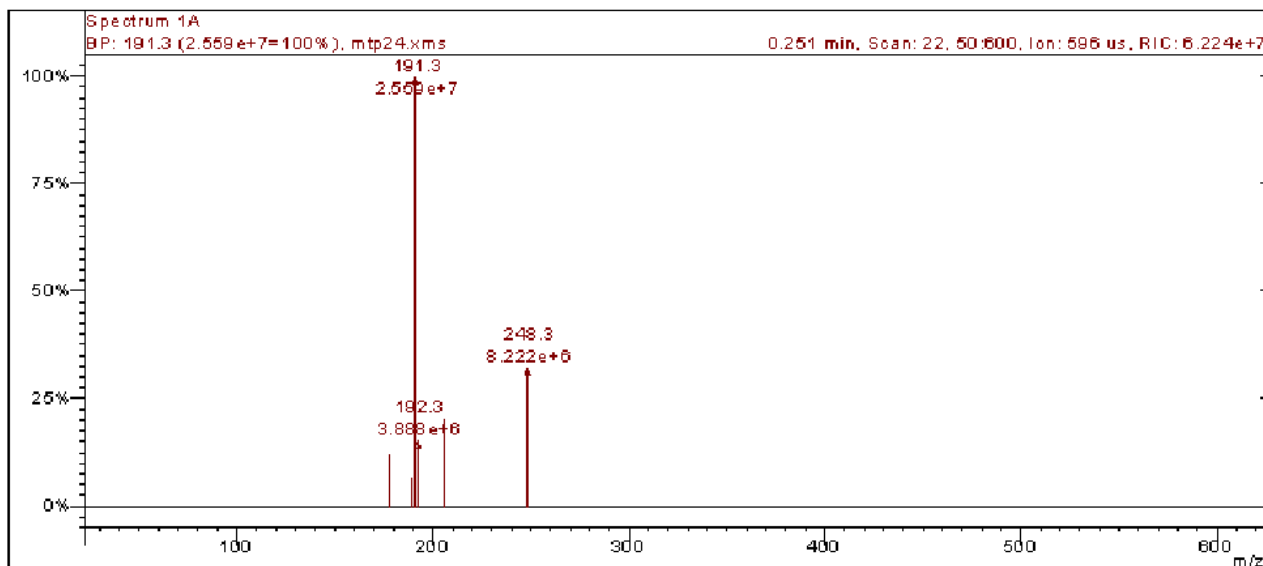
(4a)

Εικόνα 25: Φάσμα MS του N-(6-βρωμο-2-μεθυλο-4-οξοκιναζολιν-3(4H)-υλ) ακεταμιδίου (4a).



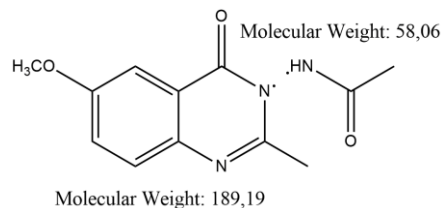
Σχήμα 37: Σχηματική απεικόνιση σχάσης αμιδικού δεσμού.

Το φάσμα του μορίου **4a** εμφανίζεται στην Εικόνα 25. Το **4a** έχει μοριακό βάρος 296.12 g/mol. Παρατηρούνται δύο κορυφές m/z 296 [M]⁺ 25% και m/z 298 [M+2]⁺ 35%, οι οποίες αντιστοιχούν στο μοριακό ιόν της ένωσης. Οι κορυφές αυτές, υποδηλώνουν την παρουσία ενός ατόμου βρωμίου σε αυτό, δεδομένου ότι το Br απαντάται στη φύση με δύο ισότοπα (⁷⁹Br και ⁸¹Br) σε αφθονία 50:50. Επιπλέον, παρατηρούνται δύο κορυφές m/z 236 [M - CH₃CONH]⁺ και m/z 238 [M + 2H - CH₃CONH]⁺ σε αναλογία 60:60, οι οποίες αντιστοιχούν στα θραύσματα που προκύπτουν από την σχάση του δεσμού αζώτου - αζώτου στην θέση C-3 (Σχήμα 37).



(4c)

Εικόνα 26: Φάσμα MS του N-(6-μεθοξυ-2-μεθυλο-4-οξοκινναζολιν-3(4H)-υλ) ακεταμιδίου (4c).



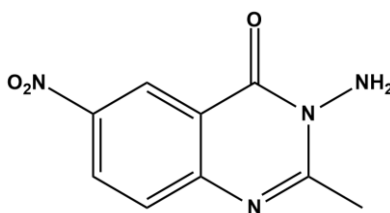
Σχήμα 38: Σχηματική απεικόνιση σχάσης αμιδικού δεσμού.

Το φάσμα του μορίου **4c** εμφανίζεται στην Εικόνα 26. Το **4c** έχει μοριακό βάρος 247.25 g/mol. Μια κορυφή με m/z 248 $[M+1]^*$ 30%, αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν, ενώ, η κορυφή με m/z 191 $[M + 2H - CH_3CONH]^*$ 100% αντιστοιχεί στο ιόν βάσης, η οποία αντιστοιχεί στα θραύσματα που προκύπτουν από την σχάση του αμιδικού δεσμού της ένωσης (Σχήμα 38).

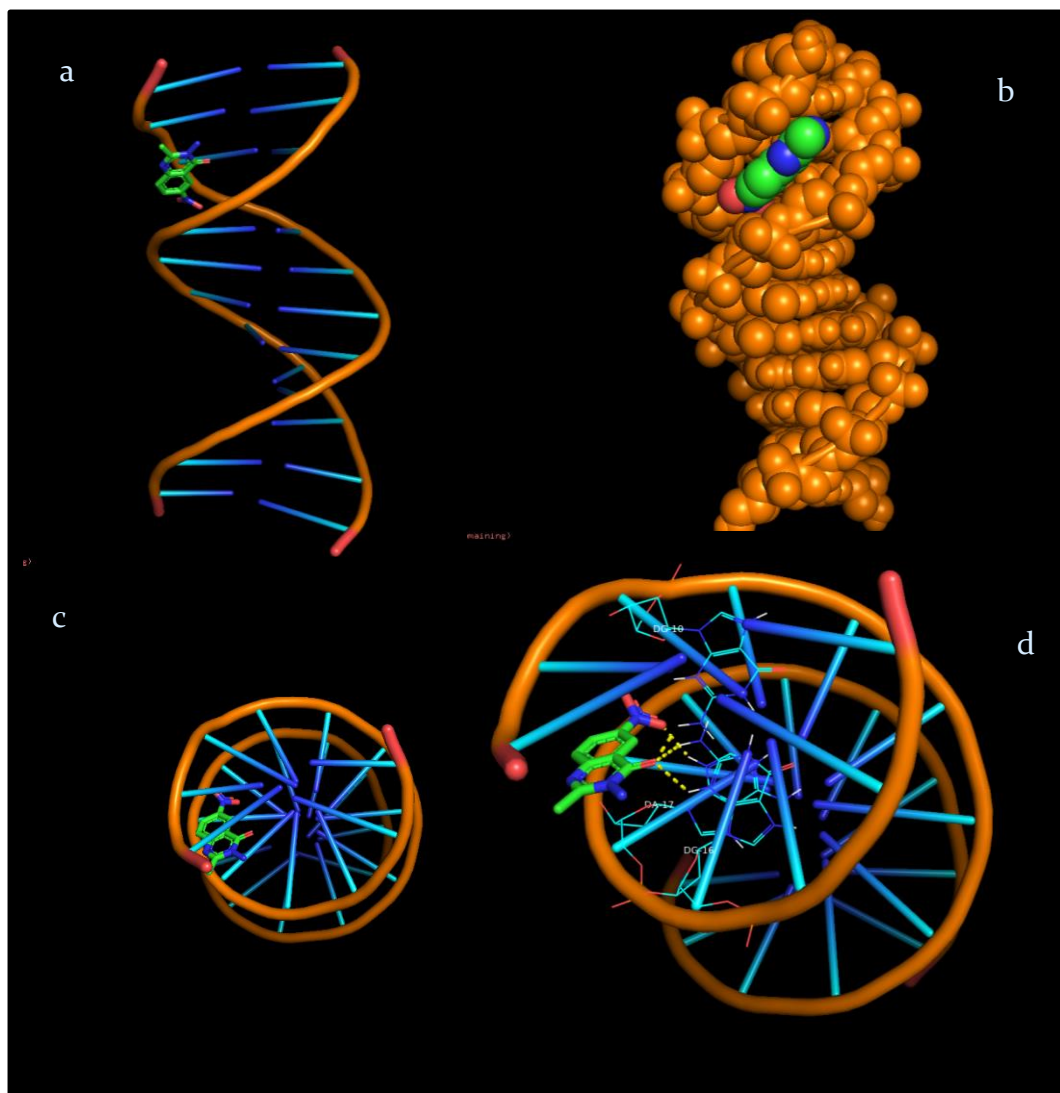
7.2. Μελέτη βιολογικής δράσης

7.2.1. Υπολογιστική μελέτη (Molecular docking)

Στην Εικόνα 27, παρουσιάζεται η δέσμευση της 3-αμινο-2-μεθυλο-6-νιτρο-κιναζολιν-4(3H)-όνης (**3g**) (Σχήμα 39) στην κρυσταλλική δομή του DNA, απεικονίζοντας την σταθεροποίησή της στην μικρή αύλακα (minor groove) του DNA. Η μικρή αύλακα όντας μικρότερη σε μέγεθος από την μεγάλη πλεονεκτεί στην δέσμευση μικρών μορίων. Οι περισσότερες εκ των αντικαρκινικών και φαρμακευτικών ουσιών είναι μικρά μόρια, με αποτέλεσμα η μικρή αύλακα να καθίσταται πολύ σημαντική ως κύρια θέση δέσμευσής τους. Η σταθεροποίηση του συμπλόκου επιτυγχάνεται με το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου (Εικόνα 28), πολικών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Από τους τέσσερις δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των νουκλεοτιδίων DA-17, DG-10 και DG-16, τρεις δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται μεταξύ του οξυγόνου της καρβonyλομάδας και των πουρινών των αζωτούχων βάσεων των νουκλεοτιδίων DA-17, DG-10 και DG-16. Τέλος, σχηματίζεται ένας δεσμός υδρογόνου μεταξύ της νιτρο-ομάδας του αρωματικού δακτυλίου και της πουρίνης του νουκλεοτιδίου DA-17.



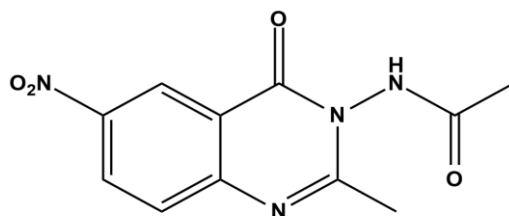
Σχήμα 39: Δομή της 3-αμινο-2-μεθυλο-6-νιτρο-κιναζολιν-4(3H)-όνης - 3g.



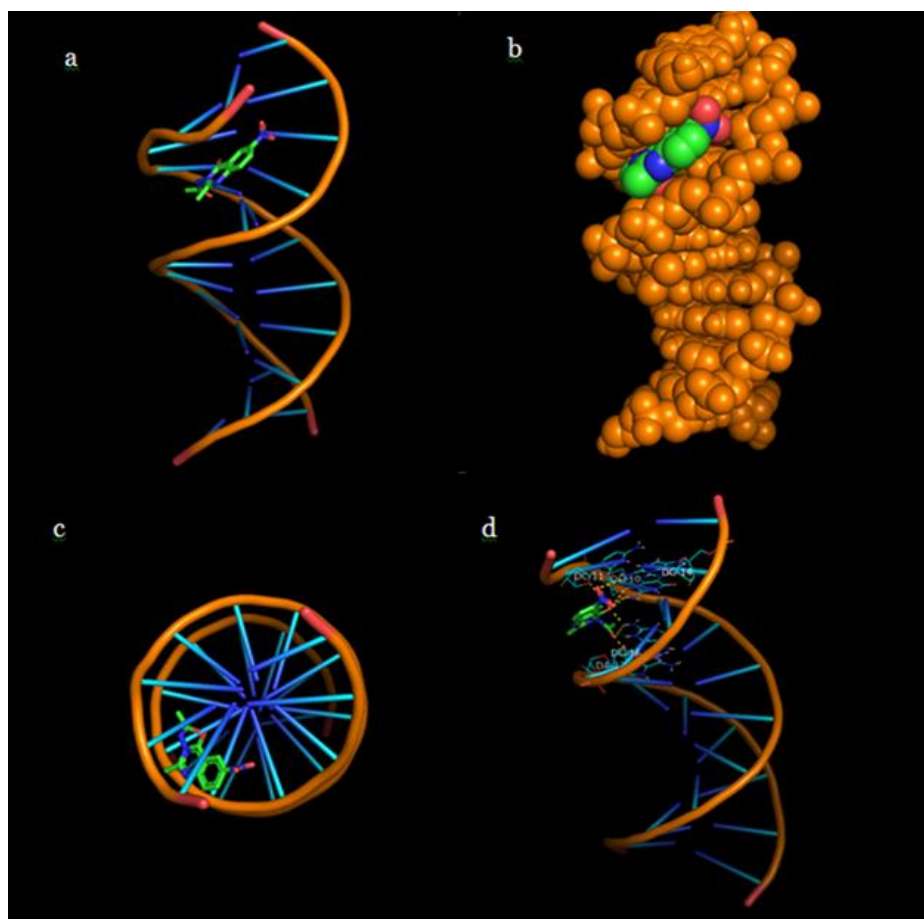
Εικόνα 27: Σχηματική απεικόνιση της δέσμησης της 3g στην κρυσταλλική δομή του DNA που απεικονίζει την σταθεροποίησή της στην μικρή αύλακα. (a) Απεικόνιση της δομής του DNA και της 3g ως κινούμενα σχέδια, (b) Απεικόνιση της δομής του DNA και της 3g ως σφαίρες, (c) θέση σύνδεσης της 3g από μια οπτική πάνω από τον άξονα της έλικας, (d) απεικόνιση των δεσμών υδρογόνου με κίτρινες διακεκομμένες γραμμές και των νουκλεοτιδίων.

Στην Εικόνα 28, παρουσιάζεται η δέσμηση του N-(2-μεθυλο-6-νιτρο-4-οξοκινολιν-3(4H)-υλ) ακεταμιδίου (**4g**) (Σχήμα 40) στην κρυσταλλική δομή του DNA, απεικονίζοντας την σταθεροποίησή του στην μικρή αύλακα του DNA. Η σταθεροποίηση του συμπλόκου επιτυγχάνεται με το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου (Εικόνα 29), πολικών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Από τους επτά δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των νουκλεοτιδίων DA-17, DC-11, DG-10, DG-14 και DG-16, τέσσερις δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται μεταξύ του οξυγόνου της καρβονυλομάδας και των πουρινών των αζωτούχων βάσεων των νουκλεοτιδίων DC-11 και DG-10. Δύο ακόμη δεσμοί υδρογόνου

σχηματίζονται μεταξύ του οξυγόνου του αμιδικού δεσμού και των πουρινών των αζωτούχων βάσεων των νουκλεοτιδίων DA-17 και DG-16. Τέλος, σχηματίζεται ένας δεσμός υδρογόνου μεταξύ της νιτρο-ομάδας του αρωματικού δακτυλίου και της πουρίνης του νουκλεοτιδίου DG-14.



Σχήμα 40: Δομή N-(2-μεθυλο-6-νιτρο-4-οξοκινναζολιν-3(4H)-υλ) ακεταμιδίου -4g.



Εικόνα 28: Σχηματική απεικόνιση της δέσμευσης του 4g στην κρυσταλλική δομή του DNA που απεικονίζει της σταθεροποίησή του στην μικρή αύλακα. (a) Απεικόνιση της δομής του DNA και του 4g ως κινούμενα σχέδια, (b) Απεικόνιση της δομής του DNA και του 4g ως σφαίρες, (c) θέση σύνδεσης του 4g από μια οπτική πάνω από τον άξονα της έλικας, (d) απεικόνιση των δεσμών υδρογόνου με κίτρινες διακεκομμένες γραμμές και των νουκλεοτιδίων.

Επιπλέον, στον Πίνακα 4 αναγράφονται τόσο η ενέργεια αλληλεπίδρασης, όσο και οι δεσμοί υδρογόνου και τα αντίστοιχα νουκλεοτίδια της εκάστοτε ένωσης.

Πίνακας 4: Αποτελέσματα ανάλυσης μοριακής μοντελοποίησης (molecular docking).

<i>Ένωση</i>	<i>Ενέργεια αλληλεπίδρασης (kcal/mol)</i>	<i>Δεσμοί υδρογόνου</i>	<i>Νουκλεοτίδια</i>
Κιναζολινόνες			
3a	-6.6	5	DC-11, DG-10, DG-16
3b	-6.6	4	DC-11, DG-10, DG-16
3c	-6.7	4	DA-5, DA-6, DC-21, DG-4
3d	-6.5	4	DC-11, DG-10, DG-16
3e	-6.8	-	-
3f	-6.1	4	DC-11, DG-10, DG-16
3g	-7.2	4	DA-17, DG-10, DG-16
Κιναζολινικά παράγωγα – Ακεταμίδια			
4a	-7.8	6	DA-17, DC-11, DG-10, DG-16
4b	-7.8	6	DA-17, DC-11, DG-10, DG-16
4c	-8.0	7	DA-17, DC-9, DC-11, DG-10, DG-16
4d	-7.7	6	DA-17, DC-11, DG-10, DG-16
4e	-8.0	7	DA-17, DC-11, DG-10, DG-16
4f	-7.5	6	DA-17, DC-11, DG-10, DG-16
4g	-8.6	7	DA-17, DC-11, DG-10, DG-14, DG-16

Συγκρίνοντας όλα τα παραπάνω, προκύπτει το συμπέρασμα ότι, τα ακεταμίδια έναντι των κινάζολινονών προβλέπεται να παρουσιάζουν μεγαλύτερη δράση, πιθανότατα λόγω του μεγαλύτερου αριθμού δεσμών υδρογόνου που φαίνεται να σχηματίζονται στα ακεταμίδια. Αναφορικά με την επίδραση των υποκαταστατών, καλύτερη δράση προβλέπεται να έχει η νιτροομάδα, καθώς εμφανίζει την υψηλότερη ενέργεια αλληλεπίδρασης και το μέγιστο αριθμό δεσμών υδρογόνου, σταθεροποιώντας ισχυρότερα την διπλή έλικα του DNA. Σημειώνεται πως η δράση αυτή ενισχύεται στο ακεταμίδιο, αφού μαζί με την ενέργεια αλληλεπίδραση αυξάνονται και ο αριθμός νουκλεοτιδίων πρόσδεσης στο DNA.

7.2.2. Τιτλοδότηση ορατού – υπεριώδους

Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης του CT-DNA με τις εκάστοτε ενώσεις, μέσω φασματοσκοπίας απορρόφησης υπεριώδους – ορατού. Στην φασματοσκοπία απορρόφησης, η υποχρωμία και η υπερχρωμία αποτελούν βασικά χαρακτηριστικά μελέτης των αλλαγών της διπλής ελικοειδούς μορφής του DNA. Λόγω των ισχυρών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων και των ζευγών βάσεων του DNA, παρατηρείται μεταβολή της απορρόφησης, έχοντας ως αποτέλεσμα την ανάδειξη της εγγύτητας του εκάστοτε μορίου στα ζεύγη βάσεων του DNA. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5), παρουσιάζονται τα δεδομένα ανάλυσης των υπό μελέτη ενώσεων.

Πίνακας 5: Δεδομένα ανάλυσης των υπό μελέτη ενώσεων από την μέθοδο τιτλοδότησης ορατού – υπεριώδους.

Ένωση	λ_{max} absent (nm)	λ_{max} present (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Υποχρωμία	Υπερχρωμία	$k_b \cdot 10^4 (M^{-1})$
Ροδαμίνη	554.2	552	2.2	44.3	-	13.59
3a	270.2	274.2	4.0	-	50.4	2.33
3b	267.2	274.0	6.8	-	71.2	2.24
3c	267.0	274.4	7.4	-	70.3	3.90
3d	274.2	274.2	0.0	-	52.3	0.82
3e	-	310.0	-	-	-	-
3f	264.0	272.0	8.0	-	77.3	9.67
3g	323.4	323.6	0.2	-	34.8	2.53
4a	268.0	268.8	0.8	-	45.7	0.81
4b	266.8	267.6	0.8	-	44.4	6.09
4c	268.0	271.8	3.8	-	70.5	9.38
4d	274.6	277.8	3.2	-	57.5	6.33

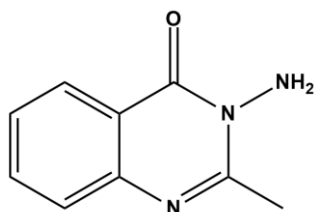
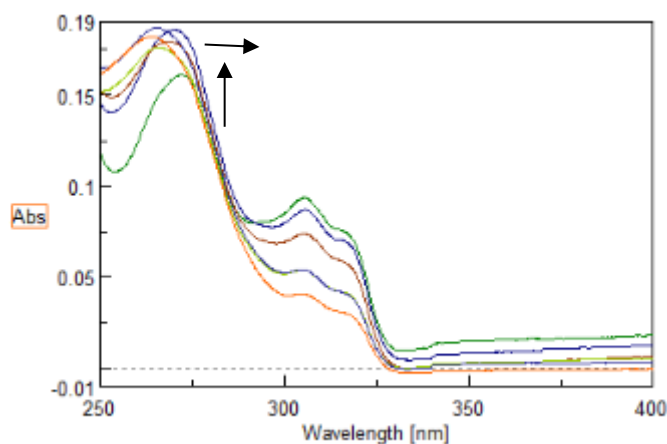
4e	-	310.8	-	-	-	-
4f	260.4	262.6	2.2	-	57.9	8.43
4g	312.6	312.4	0.2	-	62.6	4.74

λ_{\max} absent: μήκος κύματος που απορροφά η ένωση στη μέγιστη συγκέντρωση DNA

λ_{\max} present: μήκος κύματος που απορροφά η ένωση στη μηδενική συγκέντρωση DNA

k_b : σταθερά αλληλεπίδρασης της ένωσης με το DNA

Από τα στοιχεία του Πίνακα 5, εξάγεται το συμπέρασμα ότι η κιναζολινόνη **3f** εμφανίζει ισχυρότερη αλληλεπίδραση με το DNA. Εκτός από την υψηλή τιμή της σταθεράς αλληλεπίδρασης, $k_{b_{3f}} = 9.67 * 10^4 M^{-1}$, παρατηρείται αύξηση της μετατόπισης του μήκους κύματος κατά $\Delta\lambda = 8.0 nm$ (Εικόνα 29), δηλαδή ύπαρξη ερυθρής μετατόπισης και κατ' επέκταση εξωτερική παρεμβολή στη μεγάλη αύλακα του DNA.

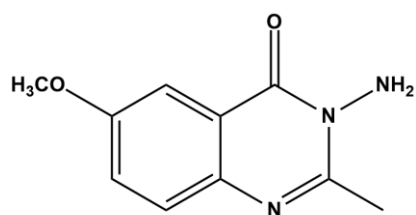
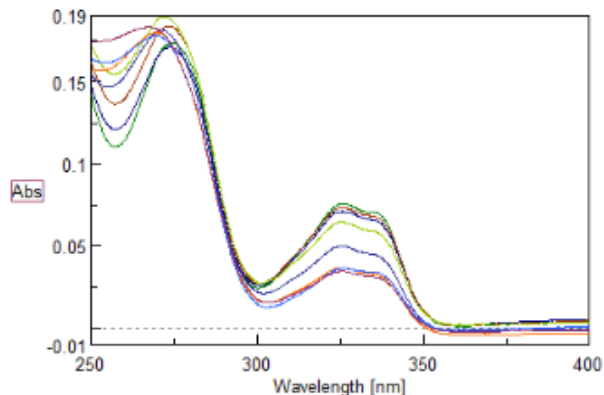


(3f)

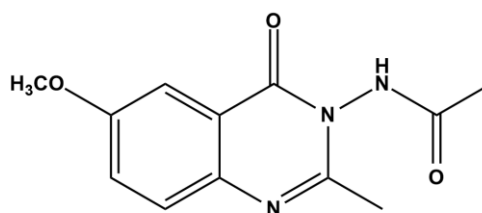
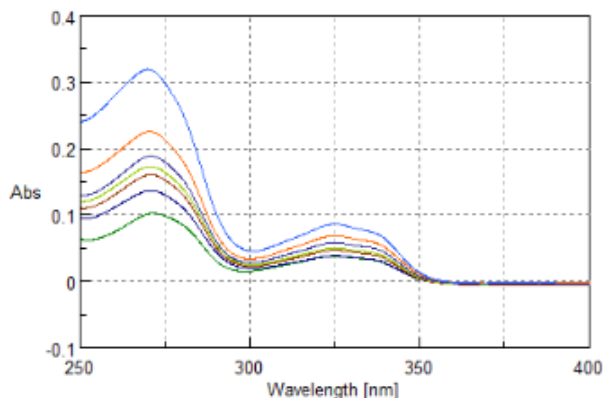
Εικόνα 29: Φάσμα UV-Vis της 3f, με αύξηση της συγκέντρωσης του DNA παρατηρείται αύξηση της απορρόφησης και μετατόπιση προς μεγαλύτερα μήκη κύματος.

Όσον αφορά την κατηγορία των ακεταμιδίων, καλύτερη δράση φαίνεται να έχει η ένωση **4c**. Ο αμιδικός δεσμός που δημιουργείται ενισχύει την δράση του μορίου ($k_{b_{4c}} = 9.38 * 10^4 M^{-1}$) (Εικόνα 31), έναντι της αντίστοιχης κιναζολινόνης (**3c**) ($k_{b_{3c}} = 3.90 * 10^4 M^{-1}$) (Εικόνα 30), γεγονός που επαληθεύεται και από την υπολογιστική μελέτη (Molecular Docking). Συγκεκριμένα, το **4c** σχηματίζει 7 δεσμούς υδρογόνου και έχει

ενέργεια αλληλεπίδρασης -8 kcal/mol , ενώ το **3c** σχηματίζει 4 δεσμούς υδρογόνου και έχει ενέργεια αλληλεπίδρασης -6.7 kcal/mol .



(3c)

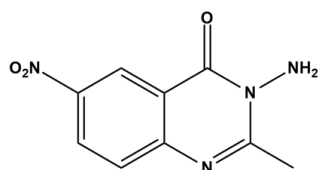
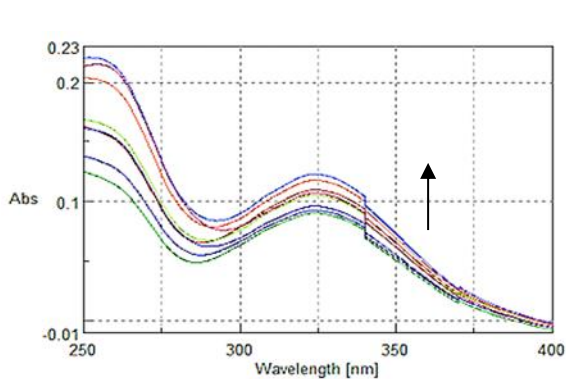


(4c)

Εικόνα 30: Φάσμα UV-Vis της 3c.

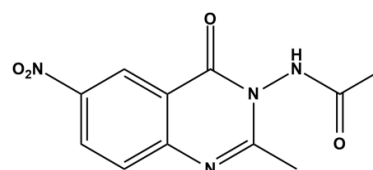
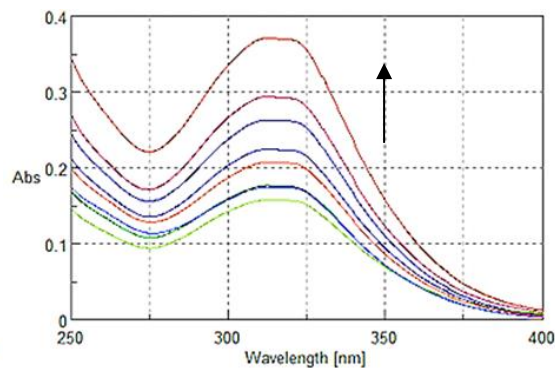
Εικόνα 31: Φάσμα UV-Vis της 4c.

Επιπλέον, συγκρίνοντας τις Εικόνες 32 και 33, οι οποίες αφορούν την 3-αμινοκινναζολινόνη (**3g**) και το αντίστοιχο ακεταμίδιο (**4g**) με νιτροομάδα ως υποκατάσταση στη θέση 6 του αρωματικού δακτυλίου, παρατηρείται μεγαλύτερη μεταβολή της απορρόφησης στο ακεταμίδιο, και κατ' επέκταση μεγαλύτερη αλληλεπίδραση. Γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τις αντίστοιχες σταθερές αλληλεπίδρασης k_b , $k_{b_{3g}} = 2.53 * 10^4 M^{-1}$ και $k_{b_{4g}} = 4.74 * 10^4 M^{-1}$. Σημειώνεται ότι, η συμπεριφορά αυτή συμφωνεί με την πρόβλεψη της υπολογιστικής μελέτης (Molecular Docking), κατά την οποία η 3-αμινοκινναζολινόνη (**3g**) και το αντίστοιχο ακεταμίδιο (**4g**) εμφανίζουν υψηλότερες ενέργειες αλληλεπίδρασης από όλα τα μόρια που εξετάστηκαν.



(3g)

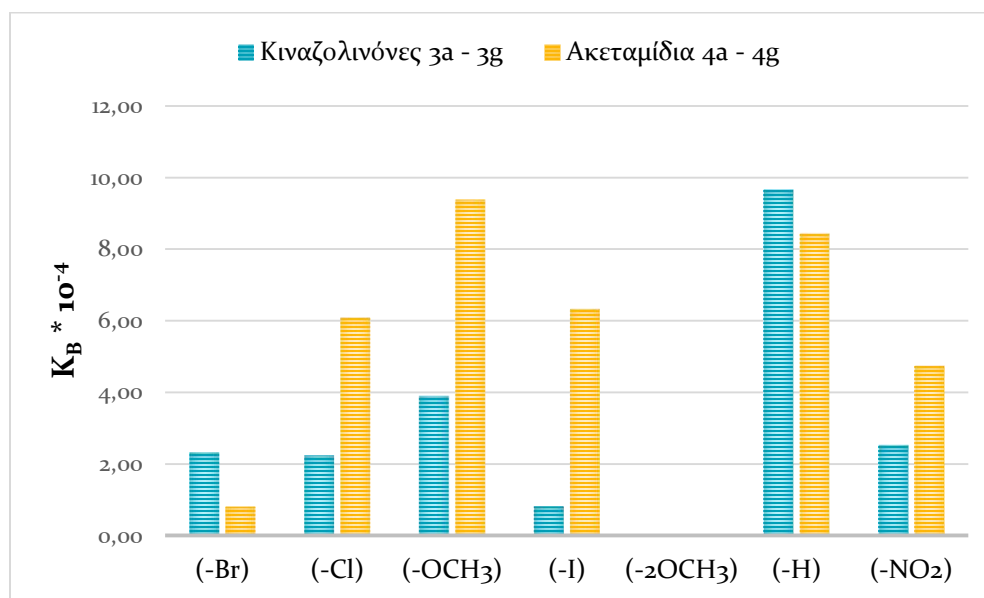
Εικόνα 32: Φάσμα UV-Vis της 3g, με αύξηση της συγκέντρωσης του DNA παρατηρείται αύξηση της απορρόφησης.



(4g)

Εικόνα 33: Φάσμα UV-Vis της 4g, με αύξηση της συγκέντρωσης του DNA παρατηρείται αύξηση της απορρόφησης.

Τέλος, μέσω του Διαγράμματος 1 παρουσιάζονται συγκριτικά οι σταθερές αλληλεπίδρασης με το DNA για όλες τις ενώσεις που εξετάστηκαν.



Διάγραμμα 1: Σύγκριση σταθερών αλληλεπίδρασης για όλες τις υποκαταστάσεις για όλες τις ενώσεις που εξετάστηκαν.

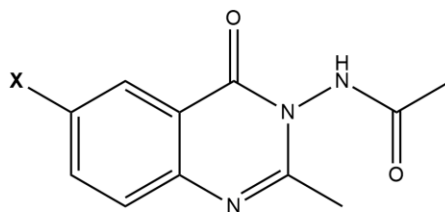
7.2.3. Φωτοβόληση ενώσεων παρουσία πλασμιδιακού DNA

Στην εφαρμογή της συγκεκριμένης μεθόδου αξιολόγησης της φωτοδιασπαστικής ικανότητας, μελετώνται τα κιναζολινικά παράγωγα – ακεταμίδια, αφενός διότι οι κιναζολινόνες έχουν μελετηθεί εκτενώς, αφετέρου διότι η απορρόφηση των ακεταμιδίων στην υπεριώδη ακτινοβολία υποδηλώνει πιθανή αλληλεπίδραση και στα συγκεκριμένα, χρησιμοποιούμενα μήκη κύματος. Σημειώνεται ότι το πλασμίδιο το οποίο χρησιμοποιείται είναι το PBR 322, και είναι σκόπιμο να αναφερθεί εκ νέου ο στόχος της διαδικασίας της φωτοβόλησης, η μελέτη, δηλαδή, της καταστροφής της υπερελικομένης μορφής του πλασμιδιακού DNA προς τον σχηματισμό κυκλικού (form II) ή γραμμικού (form III). Αναφέρεται πως κάθε πείραμα πραγματοποιείται τρεις φορές, επομένως, το τελικό συμπέρασμα προκύπτει από το μέσο όρο των αποτελεσμάτων.

7.2.3.1. Φωτηβόληση UVB

Η UVB ακτινοβολία κυμαίνεται μεταξύ 280 και 315nm. Οι συνθήκες του παρόντος πειράματος είναι στα 312 nm, σε απόσταση 15 cm και για χρονικό διάστημα 30 λεπτών. Όλες οι συγκεντρώσεις των υπό μελέτη ενώσεων είναι 500 μM.

Τα μόρια που εξετάζονται είναι τα εξής:

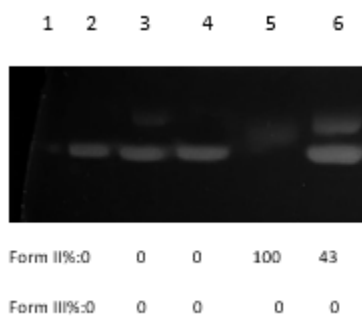


- 1) 4f: X=H
- 2) 4a: X=Br
- 3) 4b: X=Cl
- 4) 4g: X=NO₂
- 5) 4d: X=I

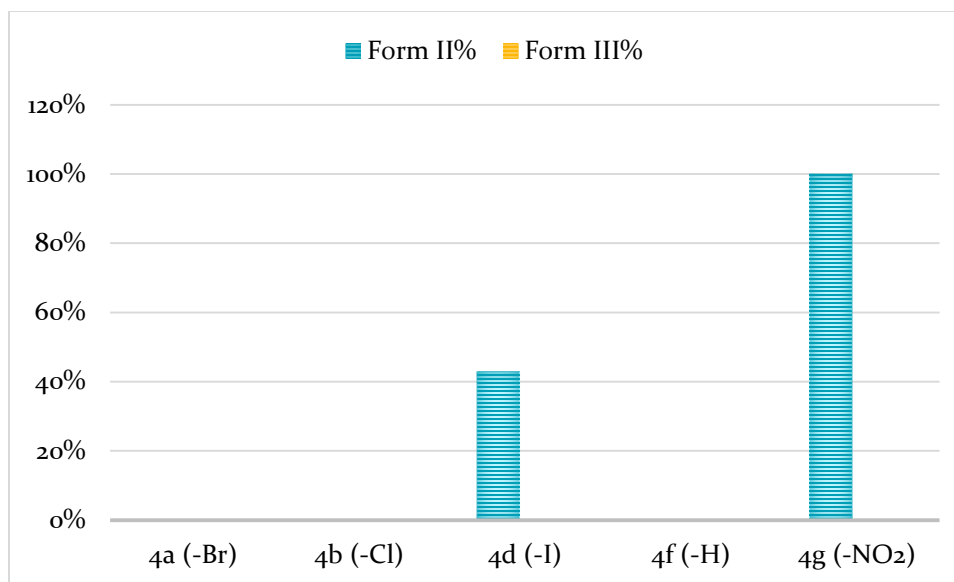
Σχήμα 41: Δομή των κιναζολινονών που μελετήθηκαν στο πείραμα φωτοβόλησης UVB.

Πίνακας 6: Φωτοβόληση UVB.

Σειρά	Περιγραφή
1	DNA+Tris+UV
2	DNA+ 500μM 4f
3	DNA+ 500μM 4a
4	DNA+ 500μM 4b
5	DNA+ 500μM 4g
6	DNA+ 500μM 4d



Εικόνα 34



Διάγραμμα 2: Αποτελέσματα φωτοβόλησης UVB(312 nm).

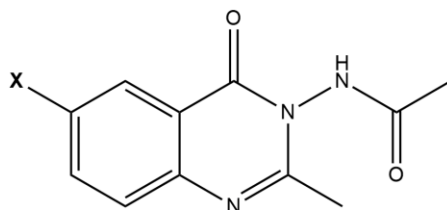
Όπως φαίνεται στην Εικόνα 34 και το Διάγραμμα 2 οι ενώσεις **4g** και **4d**, που έχουν υποκατάσταση (-NO₂) και (-I) αντίστοιχα, εμφανίζουν μεγαλύτερη δράση, σχηματίζοντας κυκλική μορφή του πλασμιδιακού DNA. Ιδιαίτερα η ύπαρξη (-NO₂) φαίνεται να επιδρά

ισχυρά, καθώς συμβαίνει διάσπαση στον ένα κλώνο του DNA υπό την επίδραση φωτός σε ποσοστό 100% προς τον σχηματισμού κυκλικού μορίου. Η δράση της νιτρο-ομάδας, πιθανόν να οφείλεται στην ομόλυση του δεσμού μεταξύ αζώτου και οξυγόνου. Τα υπόλοιπα ακεταμίδια δεν φαίνεται να έχουν κάποια ιδιαίτερη δράση.³³

7.2.3.2. Φωτοβόληση UVA

Η UVA ακτινοβολία κυμαίνεται μεταξύ 315 και 400nm. Οι συνθήκες του παρόντος πειράματος είναι στα 365 nm, σε απόσταση 10 cm και για χρονικό διάστημα 2 ωρών. Όλες οι συγκεντρώσεις των υπό μελέτη ενώσεων είναι 500 μM.

Τα μόρια που εξετάζονται είναι τα εξής:

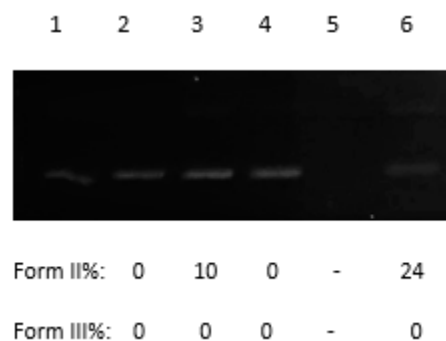


- 1) 4f: X=H
- 2) 4a: X=Br
- 3) 4b: X=Cl
- 4) 4g: X=NO₂
- 5) 4d: X=I

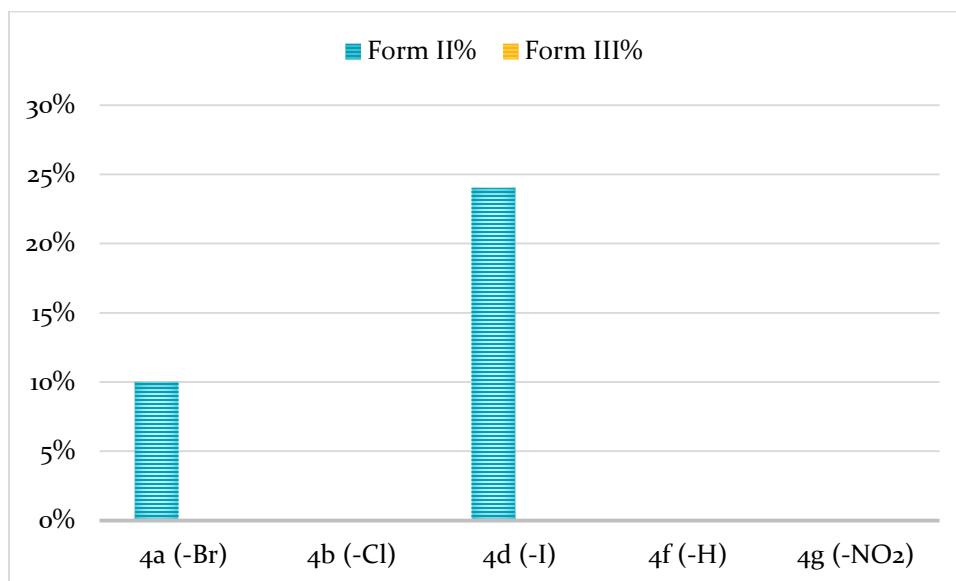
Σχήμα 42: Δομή των κιναζολινονών που μελετήθηκαν στο πείραμα φωτοβόλησης UVA.

Πίνακας 7: Φωτοβόληση UVA.

Σειρά	Περιγραφή
1	DNA+Tris+UV
2	DNA+ 500μM 4f
3	DNA+ 500μM 4a
4	DNA+ 500μM 4b
5	DNA+ 500μM 4g
6	DNA+ 500μM 4d



Εικόνα 35



Διάγραμμα 3: Αποτελέσματα φωτοβόλησης UVA (365 nm).

Σύμφωνα με την Εικόνα 35 και το Διάγραμμα 3, παρατηρείται μια μικρή αύξηση της δράσης της **4a**, σε σχέση με την ακτινοβόληση με ακτινοβολία UVB, ενώ η δράση της **4d**, εμφανίζεται μειωμένη. Όσον αφορά την **4g**, (-NO₂) υποκατάσταση, φαίνεται να ενισχύεται η δράση, καθώς παρατηρείται κατακερματισμός του DNA.

Σκόπιμη κρίνεται η μελλοντική μελέτη των ενώσεων και σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από 500 μM και μελέτη του μηχανισμού, για περαιτέρω επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων και την ενίσχυση της άποψης ότι η δράση των παραπάνω ενώσεων οφείλεται στην ομόλυση του δεσμού μεταξύ αζώτου και οξυγόνου της νιτρο ομάδας.³³

8. Συμπεράσματα

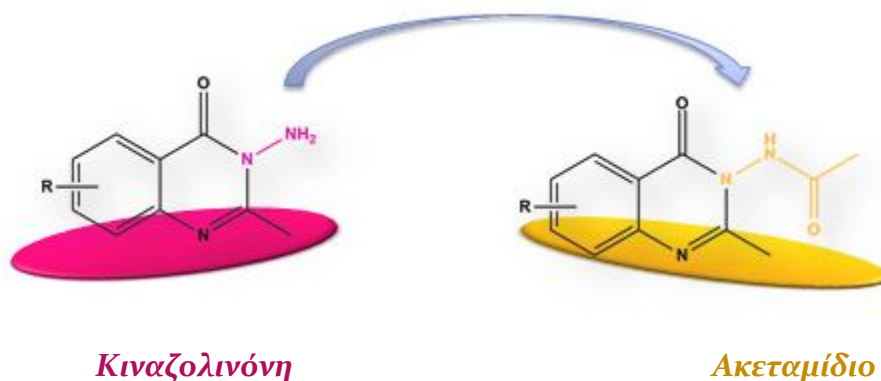
8.1. Σύνθεση

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, πραγματοποιήθηκε σύνθεση κιναζολινονών και κιναζολινικών παραγώγων μέσω δύο μεθόδων, συμβατικά και μέσω μικροκυμάτων. Συγκεκριμένα, συντέθηκαν επτά 3-αμινο-2-μεθυλο-6-υποκατεστημένες-κιναζολινόνες (**3a – 3g**), με χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας, σε δύο στάδια. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε σύνθεση των αντίστοιχων ακεταμιδίων (**4a – 4g**) με χρήση συμβατικής μεθόδου θέρμανσης (ελαιόλουτρο), εκ των οποίων τα 3 μόρια ήταν γνωστά (**4a, 4e, 4f**) και τα υπόλοιπα 4 άγνωστα (**4b, 4c, 4d, 4g**). Αναφέρεται πως, έγιναν προσπάθειες σύνθεσης 2 εκ των κιναζολινικών παραγώγων με χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας (**4d, 4e**), ωστόσο η μέθοδος αυτή απαιτεί βελτίωση των συνθηκών. Προκειμένου να επιτευχθούν μεγαλύτερες αποδόσεις και καθαρότερα προϊόντα, κρίνεται απαραίτητη η αύξηση του χρόνου αντίδρασης, η πιθανή αλλαγή στην αναλογία των αντιδρώντων συστατικών, αλλά και η μελέτη βέλτιστων συνθηκών θερμοκρασίας και ενέργειας. Συγκρίνοντας τις διάφορες υποκαταστάσεις, στις μεν κιναζολινόνες καλύτερη απόδοση λαμβάνεται κατά την σύνθεση της ένωσης **3g**, ενώ, στα αντίστοιχα ακεταμίδια καλύτερη απόδοση λαμβάνεται κατά τη σύνθεση της ένωσης **4f**.

8.2. Βιολογική δράση

Επόμενος σταθμός, αποτέλεσε η αξιολόγηση της βιολογικής δράσης των μορίων, τόσο σε θεωρητικό – υπολογιστικό επίπεδο, όσο και σε πειραματικό. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η παρεμβολή των ενώσεων στο DNA, όπως επίσης και η φωτοδιασπαστική τους δράση.

Η μελέτη της DNA παρεμβολής πραγματοποιήθηκε υπολογιστικά (Molecular Docking), αλλά και πειραματικά μέσω τιτλοδότησης ορατού – υπεριώδους. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν και από τις δύο αναλύσεις ήταν σε συμφωνία. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι τα ακεταμίδια έχουν ισχυρότερη αλληλεπίδραση με το DNA έναντι των κιναζολινονών (Εικόνα 36). Από την υπολογιστική μελέτη ισχυρότερη δράση φαίνεται να έχουν τα μόρια με την νιτροομάδα ως υποκατάσταση (**3g, 4g**), ενώ, πειραματικά προκύπτει ότι ισχυρότερη δράση αναμένεται να έχει η (-H) κιναζολινόνη (**3f**) και το (-OCH₃) ακεταμίδιο (**4c**).

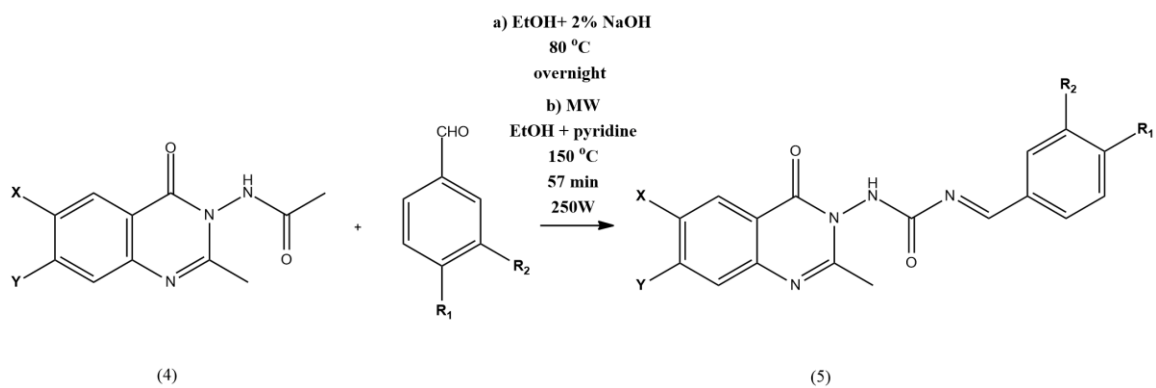


Εικόνα 36: Σχηματική απεικόνιση μετατροπής της αμινομάδας σε ακετυλομάδα.

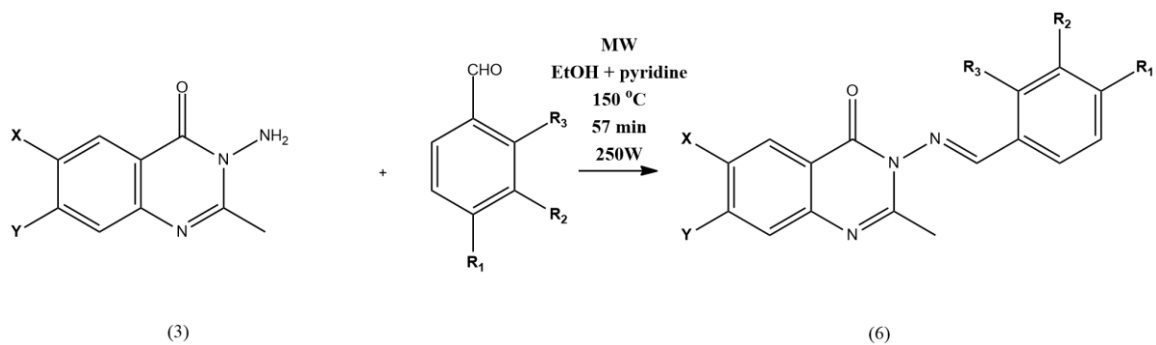
Η αξιολόγηση της φωτοδιασπαστικής τους ικανότητας πραγματοποιήθηκε σε δύο πειράματα φωτοβόλησης των ενώσεων παρουσία πλασμιδιακού DNA. Το πρώτο ήταν στα 312 nm (Φωτοβόληση UVB), και το δεύτερο στα 365 nm (Φωτοβόληση UVA). Σημειώνεται ότι, τα προαναφερθέντα πειράματα αφορούν μόνον τα ακεταμίδια, καθώς οι κινζολιόνες είχαν μελετηθεί στο παρελθόν, και είχε φανεί ότι οι αλογονομάδες και η νιτροομάδα παρουσίαζαν υψηλά ποσοστά φωτοδιάσπασης. Από την ανάλυση των ακεταμιδίων, παρατηρείται ότι σημαντική παραμένει η δράση της νιτροομάδας, πιθανόν να ενισχύεται, καθώς στη μεν φωτοβόληση UVB επιδρά 100% στον σχηματισμό κυκλικού μορίου, στη δε φωτοβόληση UVA είναι φανερός ο κατακερματισμός του DNA. Το φαινόμενο αυτό, μπορεί να καταστήσει το μόριο **4g** ως ένωση οδηγός, πραγματοποιώντας, βέβαια, μελλοντικά επιπλέον αναλύσεις ως προς την συγκέντρωση, την τοξικότητα, και τον μηχανισμό δράσης του.

8.3. Εργασία υπό εξέλιξη

Σε πρώιμο ερευνητικό στάδιο βρίσκεται η σύνθεση ιμινών και υβριδικών μορίων της μορφής κινζολιόνη – φαινολικά οξέα. Κατά την διάρκεια της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκαν σχετικά πειράματα, που αφορούσαν τον σχηματισμό υβριδικών μορίων από κάποιο ακεταμίδιο, τόσο με συμβατική μέθοδο θέρμανσης, όσο και με χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας (Σχήμα 43), όπως επίσης και τον σχηματισμό ιμινών κατευθείαν από τις αντίστοιχες κινζολιόνες υπό την επίδραση μικροκυματικής ακτινοβολίας (Σχήμα 44).



Σχήμα 43: Σύνθεση υβριδικών μορίων a) με συμβατική μέθοδο θέρμανσης και b) με χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας από ακεταμίδιο και βενζαλδεΰδη.



Σχήμα 44: Σύνθεση ιμινών με χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας από κιναζολινόνη και βενζαλδεΰδη.

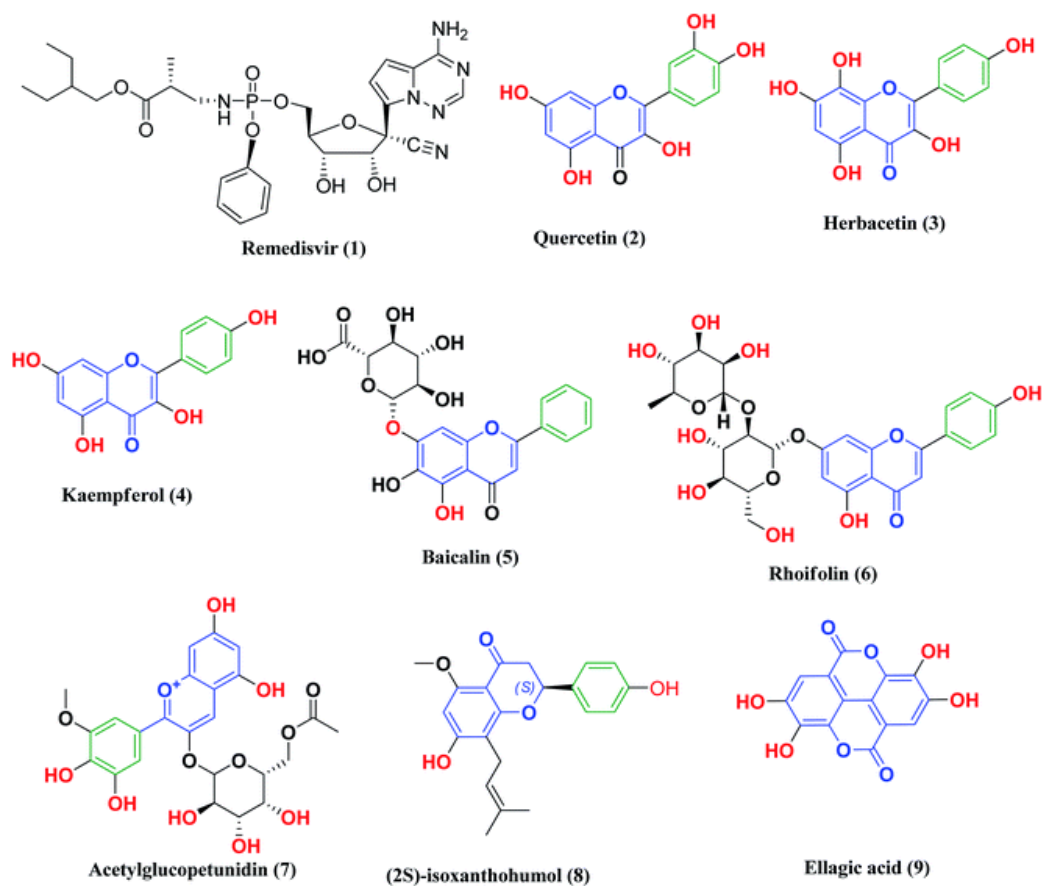
9. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Η μελλοντική έρευνα στη σύνθεση κιναζολινικών παραγώγων θα πρέπει να κινηθεί σε παρόμοια μονοπάτια με τα τωρινά δεδομένα, στοχεύοντας κυρίως, στην ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών μορίων με φιλικές προς το περιβάλλον μεθοδολογίες σύνθεσης. Ο εμπλουτισμός των διαθέσιμων κιναζολινονών και κιναζολινικών παραγώγων θα συμβάλει, στη διεύρυνση των πιθανών ενώσεων οδηγών, και κατ' επέκταση στην εξέλιξη των βιολογικών τους δράσεων.

Ειδικότερα, αναφορικά με την χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας, μιας πολύ σημαντικής μεθόδου της πράσινης χημείας, απαιτείται βελτιστοποίηση των συνθηκών, όπως για παράδειγμα, του χρόνου αντίδρασης, της σύστασης, της θερμοκρασίας και της ενέργειας, αλλά και διερεύνηση των κατάλληλων υποκαταστατών. Η διαδικασία αυτή, θα οδηγήσει στο σχεδιασμό της μεθόδου έτσι ώστε να ενισχύεται ο πράσινος χαρακτήρας της, αλλά και να βελτιστοποιούνται τα παραγόμενα προϊόντα ως προς την απόδοση και την καθαρότητα.

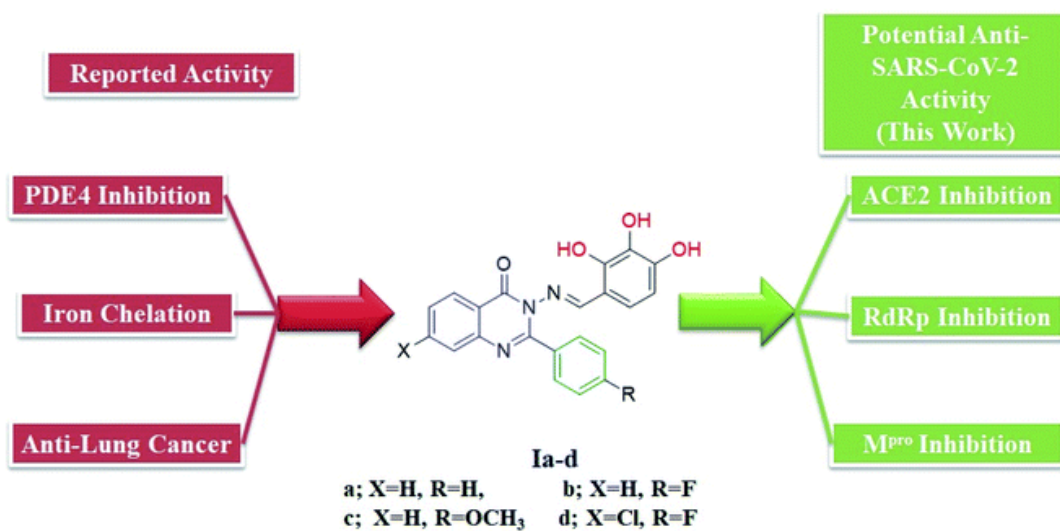
Ταυτόχρονα, ιδιαίτερα σημαντική είναι η συνέχιση της προσπάθειας σύνθεσης ιμινών και υβριδικών μορίων, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως.

Τέλος, εστιάζοντας στην πληθώρα των βιολογικών ιδιοτήτων που παρουσιάζουν τόσο οι κιναζολιόνες, όσο και τα κιναζολινικά παράγωγα, κρίνεται ωφέλιμη η περαιτέρω έρευνα και μελέτη αυτών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, διεύρυνσης του εύρους της βιολογικής δραστηριότητας αποτελεί η εφαρμογή των ενώσεων αυτών για την καταπολέμηση του ιού Sars-CoV-2 που προκαλεί λοίμωξη του αναπνευστικού συστήματος – Covid -19. Ορισμένες πιθανές κιναζολινικές ενώσεις αναστολείς του συγκεκριμένου ιού αναπαρίστανται στο σχήμα 45.^{34,35}



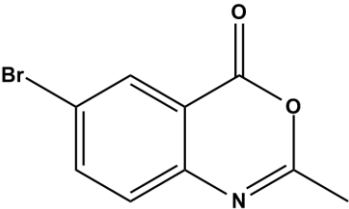
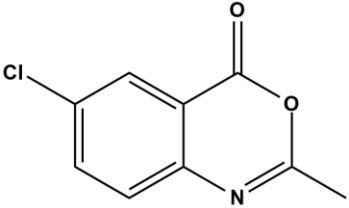
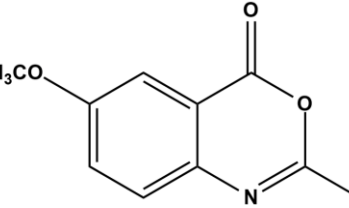
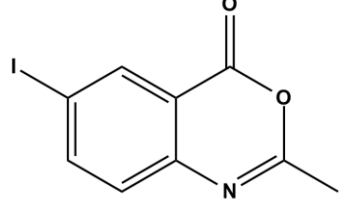
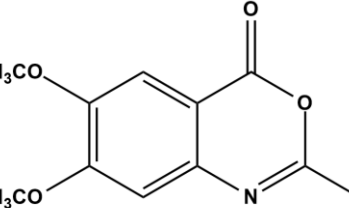
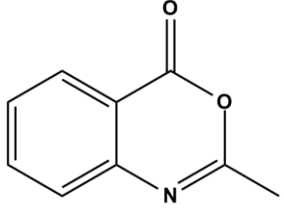
Σχήμα 45: Πιθανές ενώσεις αναστολείς κατά του Sars-CoV-2.

Όπως αναφέρεται, ο σχεδιασμός και η σύνθεση κιναζολιν-4(3H)-ονών και ιμινών δρουν έναντι τριών βασικών πρωτεϊνικών στόχων του ιού Sars-CoV-2 και η πρόβλεψη των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων είναι πολύ σημαντική για τη ταχύτερη ανακάλυψη φαρμάκων (Εικόνα 37).³⁴

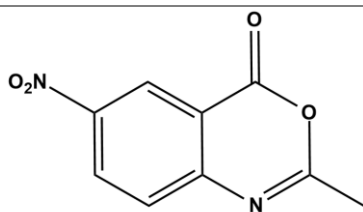


Εικόνα 37: Δομές και λογική για το σχεδιασμό των 2-φαινυλκιναζολιν-4 (3H)-όνη-τριυδροξυφαινυλο μιμών για την θεραπεία της COVID-19.

Παράρτημα Ι: Κατάλογος ενώσεων

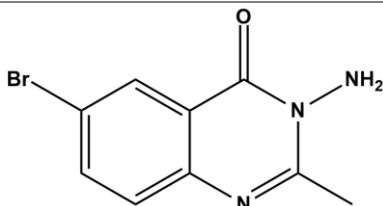
Κωδικός	Ένωση	Μέθοδος
2a		Μικροκύματα
2b		Μικροκύματα
2c		Μικροκύματα
2d		Μικροκύματα
2e		Μικροκύματα
2f		Μικροκύματα

2g



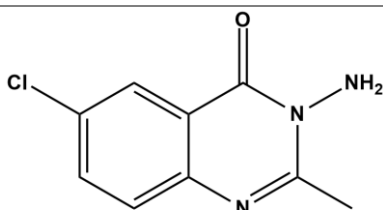
Μικροκύματα

3a



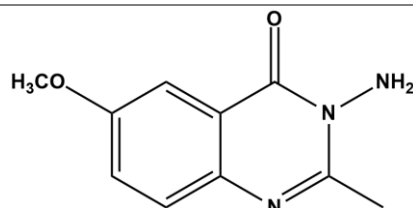
Μικροκύματα

3b



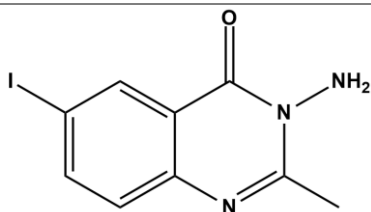
Μικροκύματα

3c



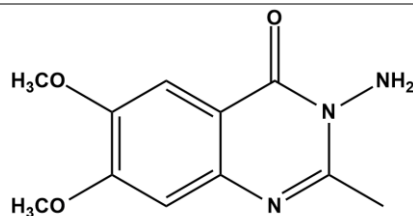
Μικροκύματα

3d



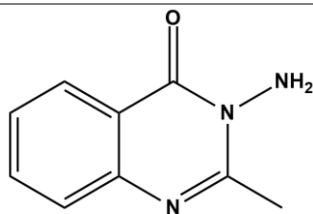
Μικροκύματα

3e



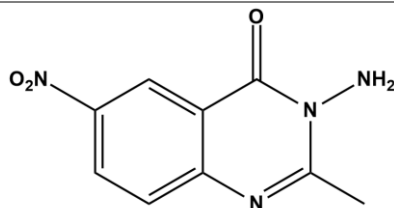
Μικροκύματα

3f



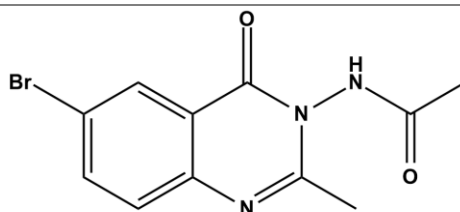
Μικροκύματα

3g



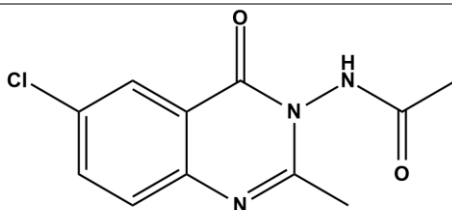
Μικροκύματα

4a



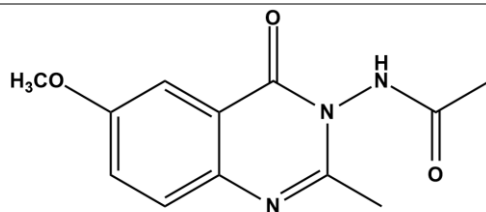
Συμβατική

4b



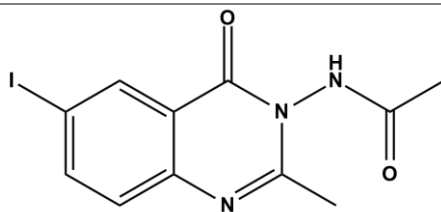
Συμβατική

4c



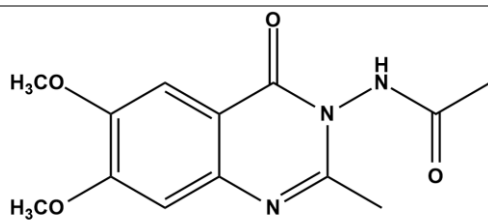
Συμβατική

4d



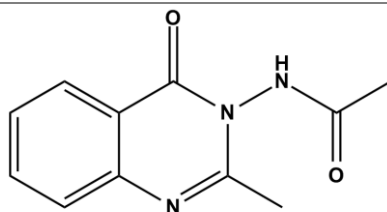
Συμβατική,
Μικροκύματα

4e



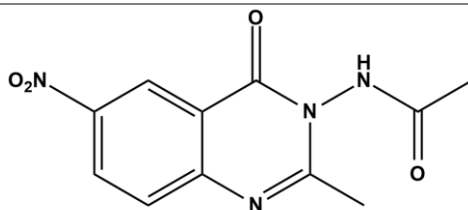
Συμβατική,
Μικροκύματα

4f



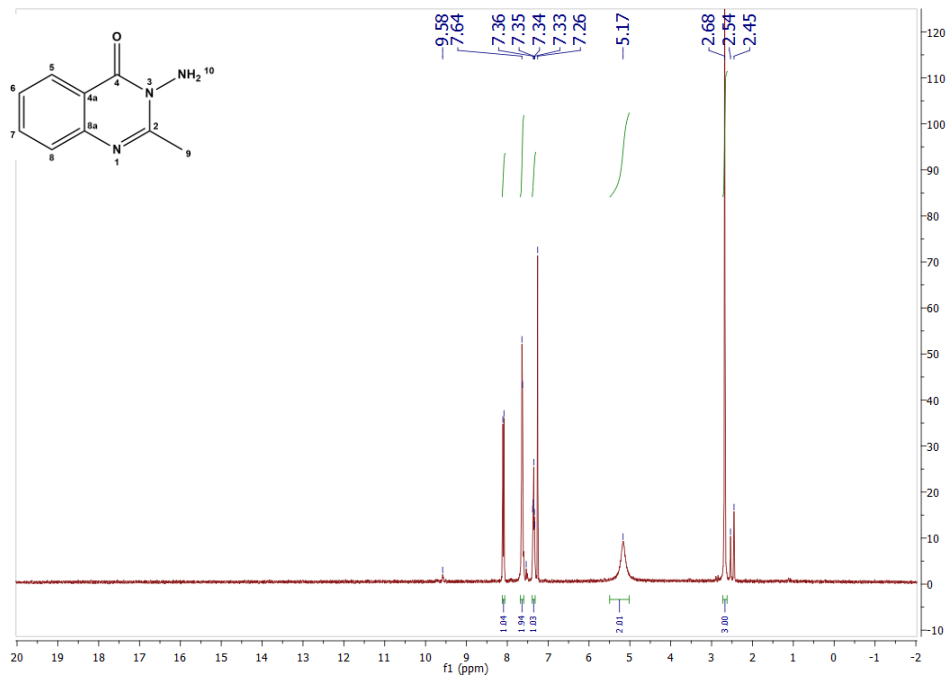
Συμβατική

4g

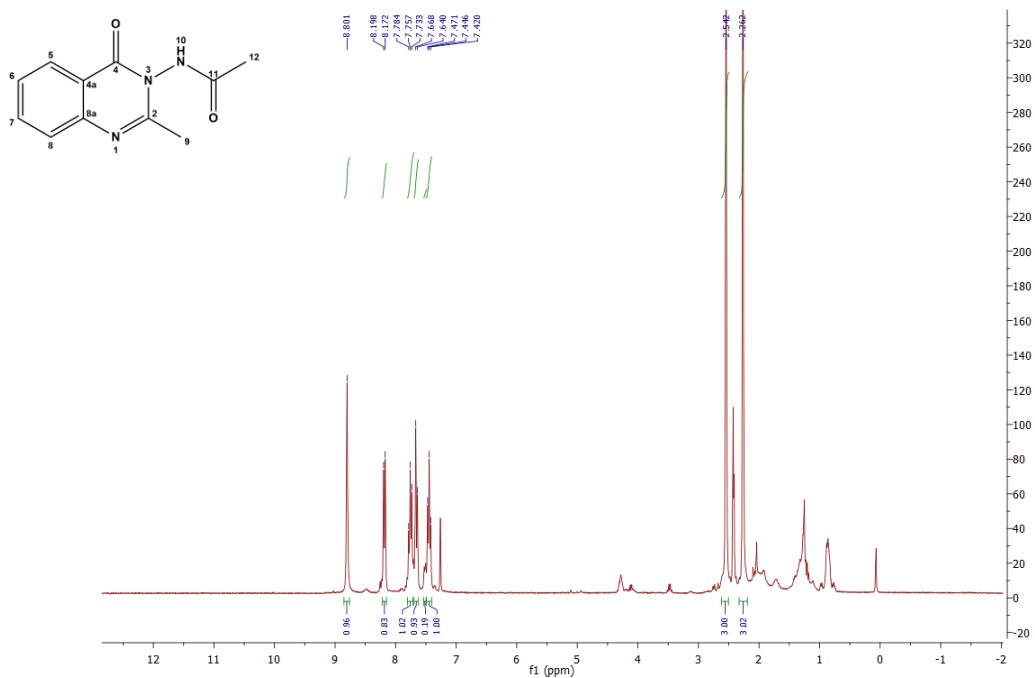


Συμβατική

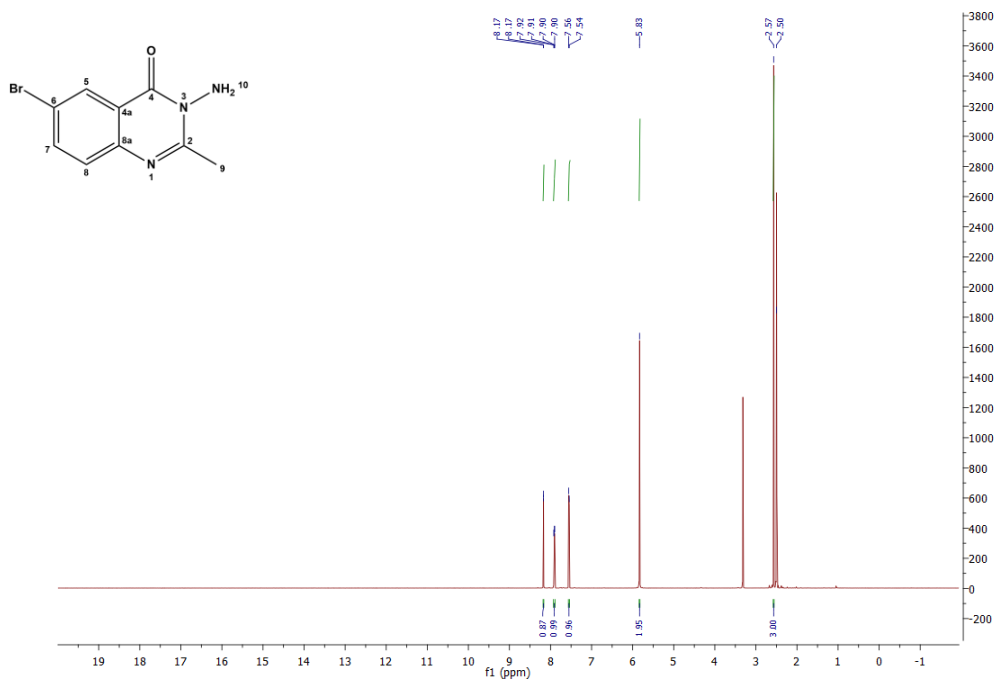
Παράρτημα II: Φάσματα ^1H - NMR



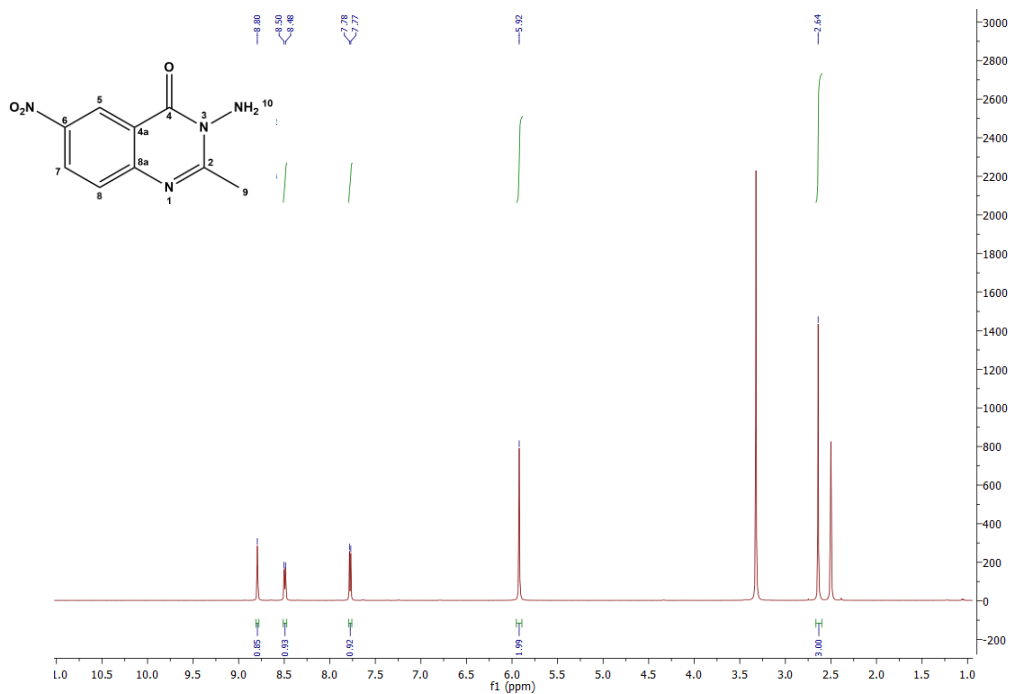
Εικόνα 38: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR της 3-αμινο-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3H)-όνης – 3f (300 MHz, CDCl_3).



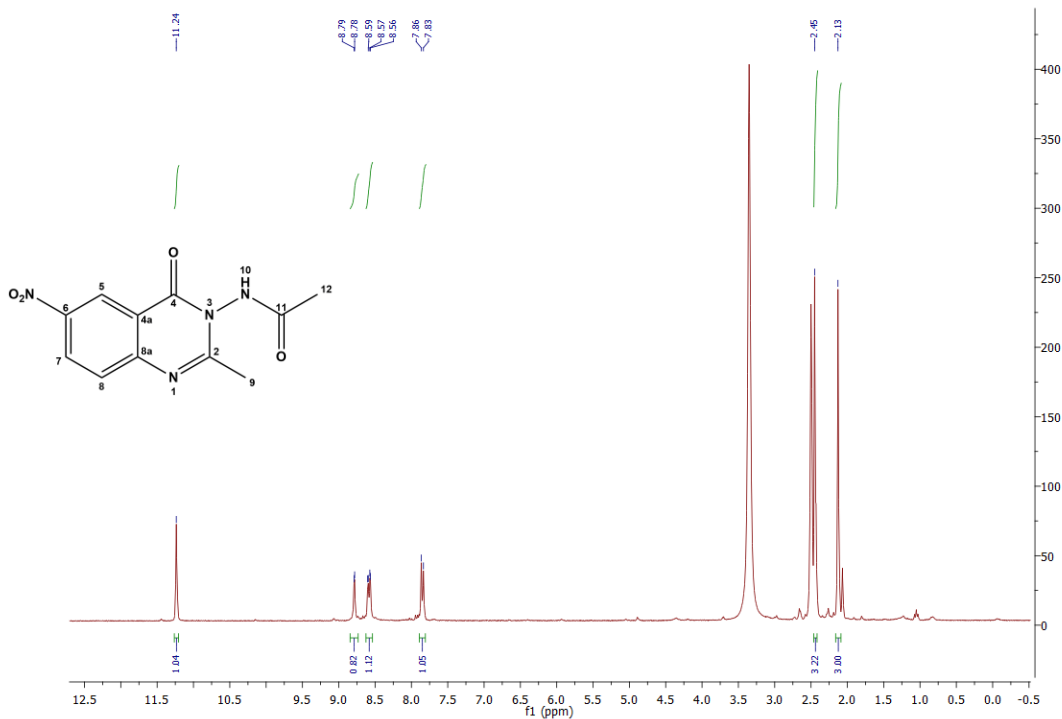
Εικόνα 39: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR του N-(2-μεθυλο-4-οξοκιναζολιν-3(4H)-υλ)ακεταμιδίου – 4f (300 MHz, CDCl_3).



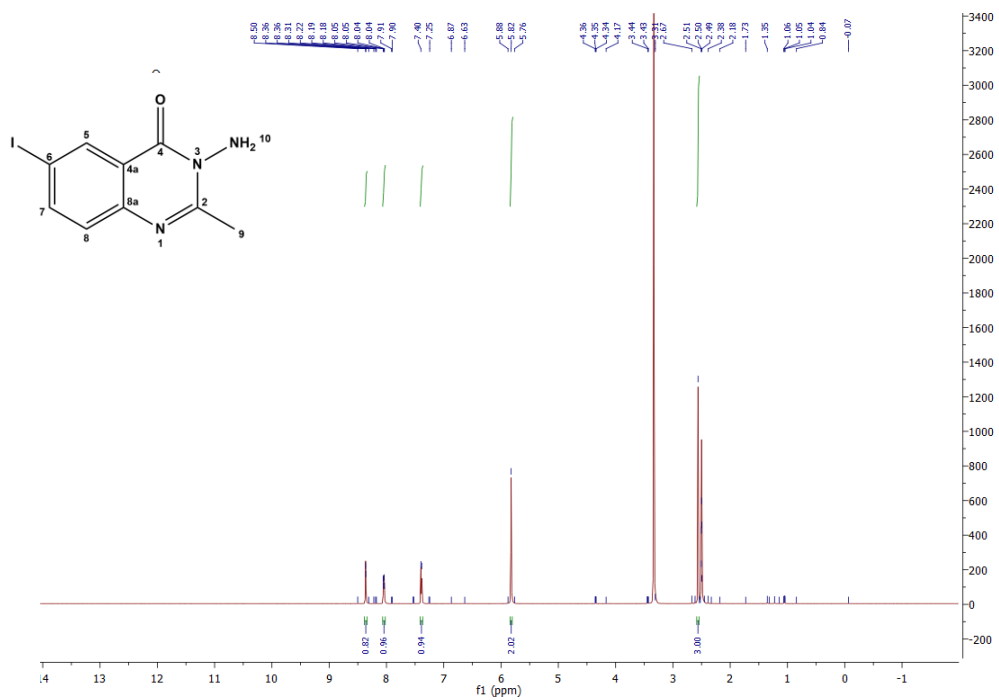
Εικόνα 4ο: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR της 3-αμινο-6-βρωμο-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3H)-όνης - 3a (600 MHz, DMSO-d_6)



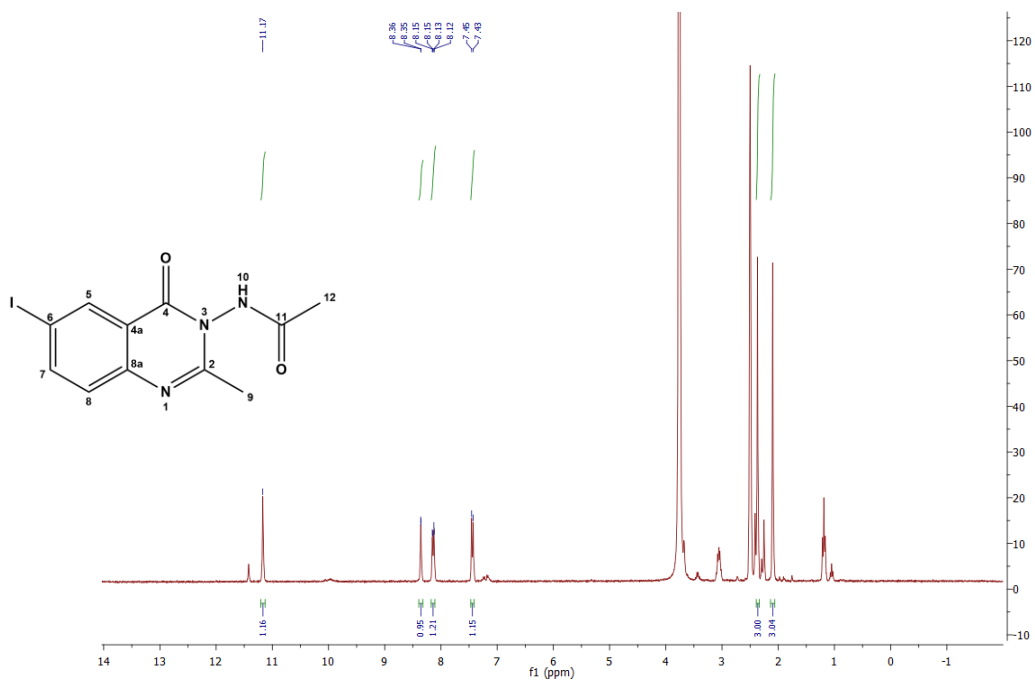
Εικόνα 41: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR της 3-αμινο-2-μεθυλο-6-νιτρο-κιναζολιν-4(3H)-όνης - 3g (600 MHz, DMSO-d_6)



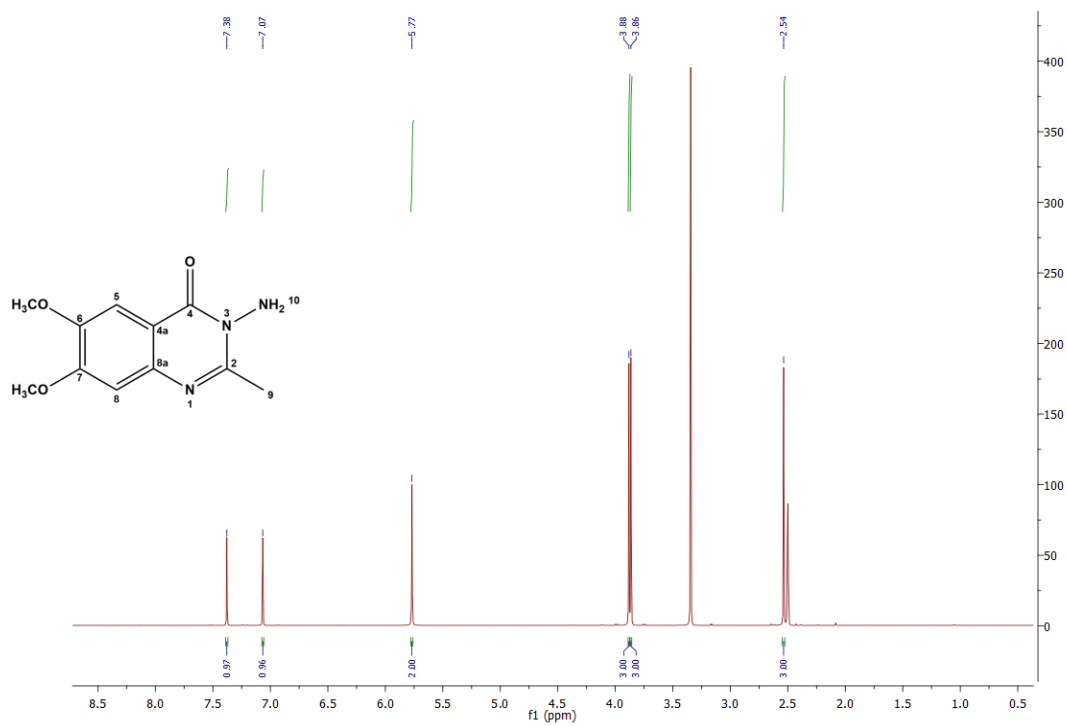
Εικόνα 42: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR του N-(2-μεθυλο-6-νιτρο-4-οξοκιναζολιν-3(4H)-υλ) ακεταμίδιου -4g (600 MHz, DMSO-d_6)



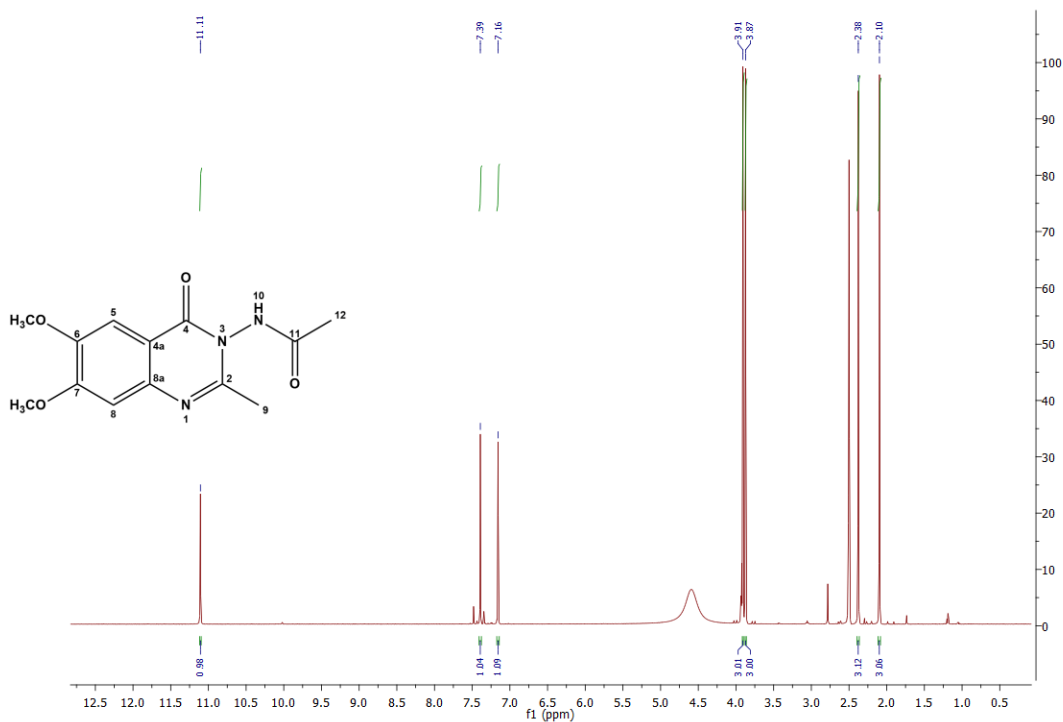
Εικόνα 43: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR της 3-αμινο-6-ιωδο-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3H)-όνης - 3d (600 MHz, DMSO-d_6)



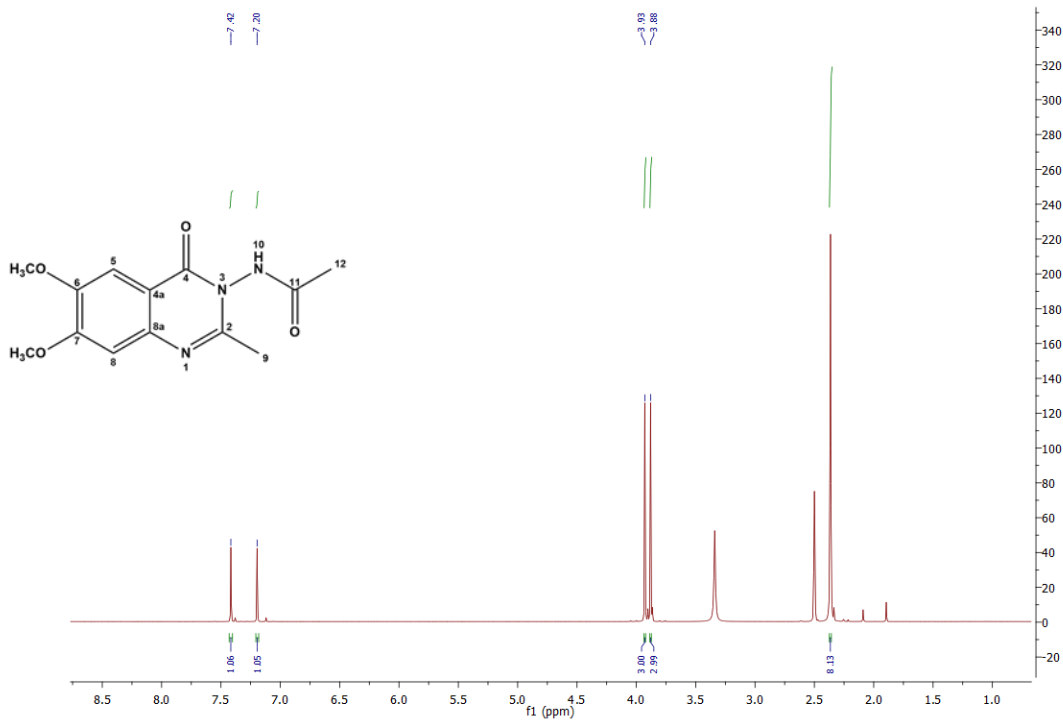
Εικόνα 44: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR του N-(6-ιωδο-2-μεθυλο-4-οξοκιναζολιν-3(4H)-υλ) ακεταμίδιου -4d (600 MHz, DMSO-d_6)



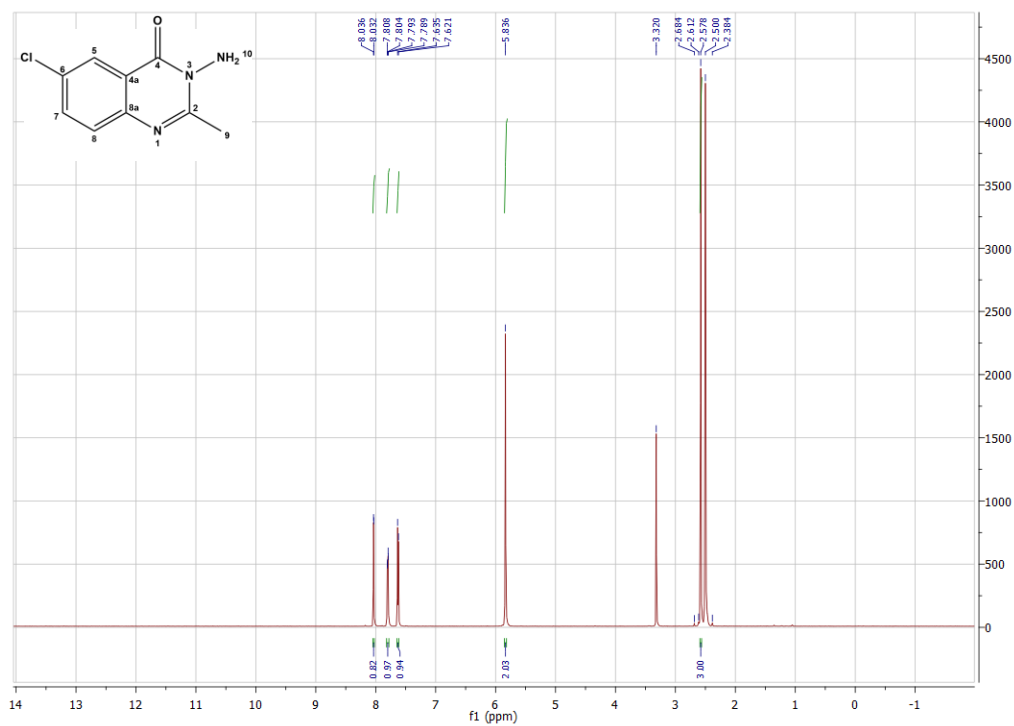
Εικόνα 45: Φάσμα πρωτονίου ¹H NMR της 3-αμινο-6,7-διμεθοξυ-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3H)-όνης -3e (600 MHz, DMSO-d₆)



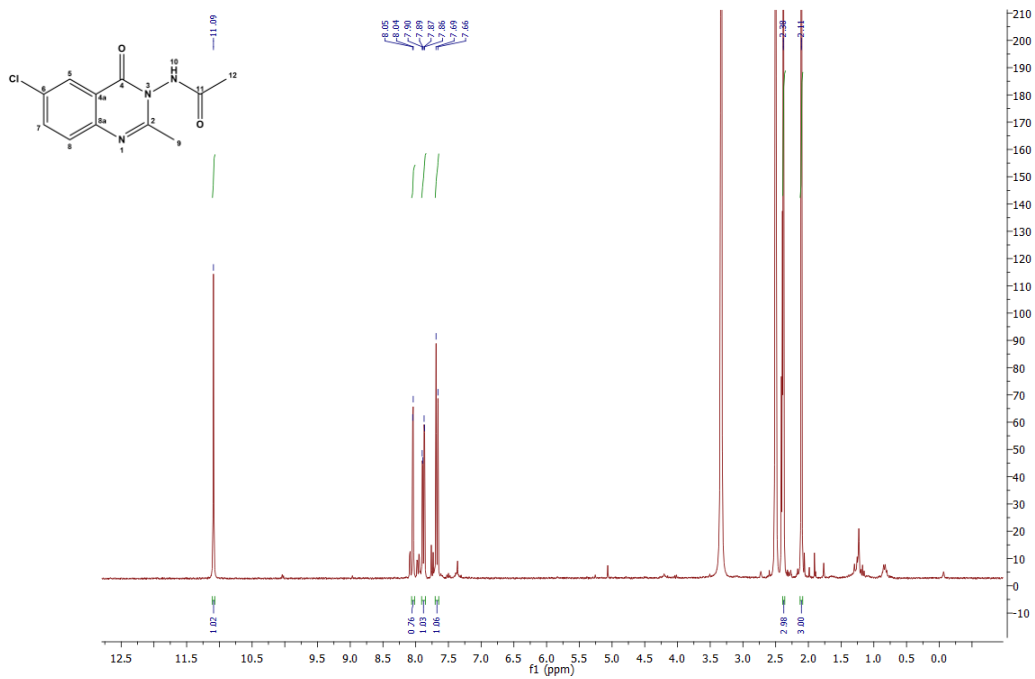
Εικόνα 46: Φάσμα πρωτονίου ¹H NMR του N-(6,7-διμεθοξυ-2-μεθυλο-4-οξοκινναζολιν-3(4H)-υλ) ακεταμιδίου -4e (600 MHz, DMSO-d₆) – Συμβατική μέθοδος σύνθεσης.



Εικόνα 47: Φάσμα πρωτονίου ¹H NMR του N-(6,7-διμεθοξυ-2-μεθυλο-4-οξοκινναζολιν-3(4H)-υλ) ακεταμιδίου – 4e (600 MHz, DMSO-d₆) – Μικροκυματική μέθοδος σύνθεσης.

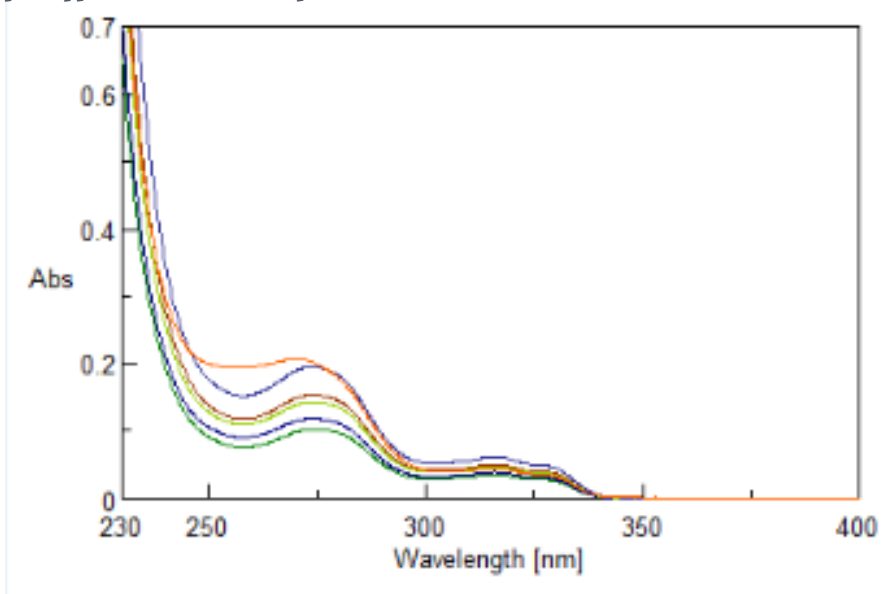


Εικόνα 48: Φάσμα πρωτονίου ¹H NMR της 3-αμινο-6-χλωρο-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3H)-όνης - 3b (600 MHz, DMSO-d₆)

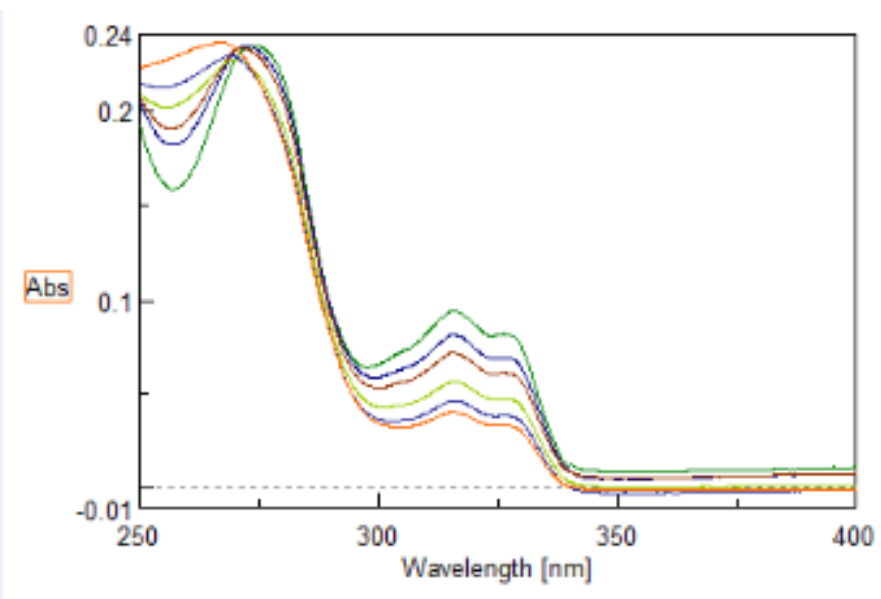


Εικόνα 49: Φάσμα πρωτονίου ¹H NMR του N-(6-χλωρο-2-μεθυλο-4-οξοκιναζολιν-3(4H)-υλ) ακεταμιδίου - 4b (600 MHz, DMSO-d₆).

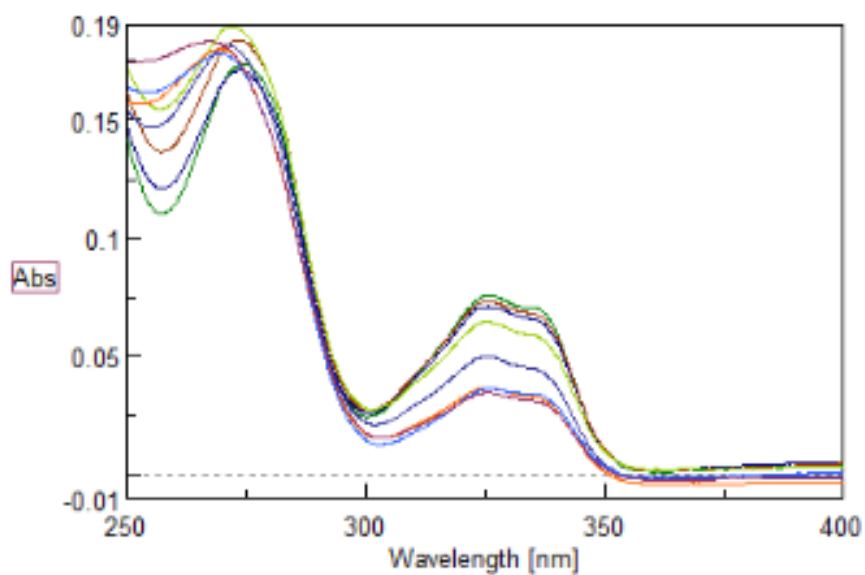
Παράρτημα III: Φάσματα UV-Vis



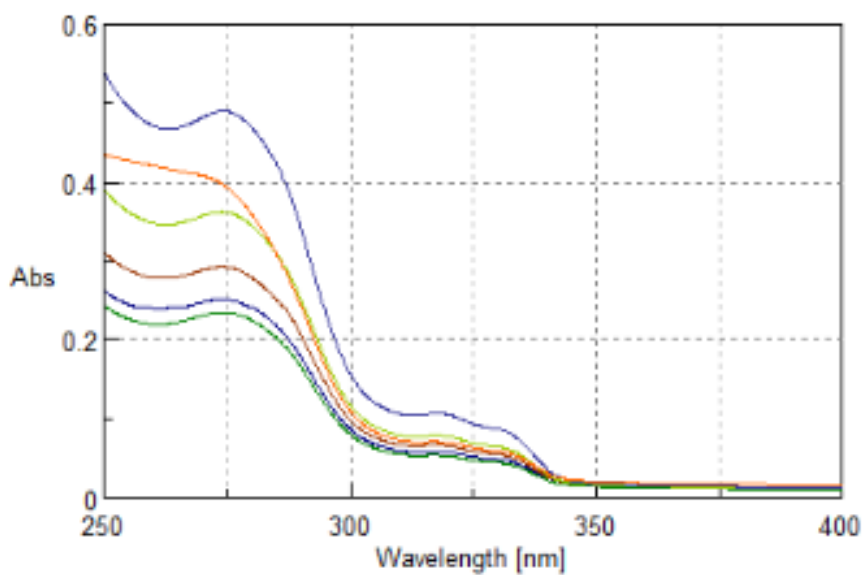
Εικόνα 50: Φάσμα UV-Vis της 3-αμινο-6-βρωμο-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3H)-όνης - 3a για διάφορες συγκεντρώσεις CT-DNA.



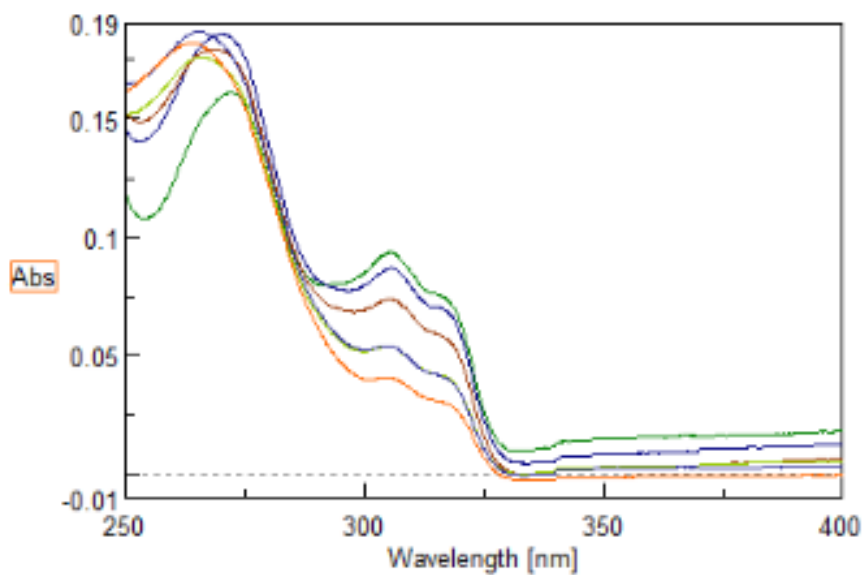
Εικόνα 51: Φάσμα UV-Vis της 3-αμινο-6-χλωρο-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3H)-όνης -3b για διάφορες συγκεντρώσεις CT-DNA.



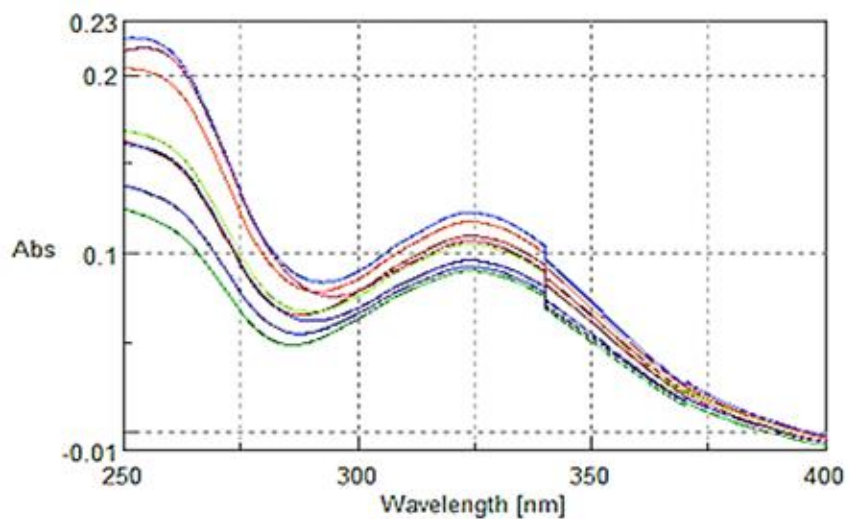
Εικόνα 52: Φάσμα UV-Vis της 3-αμινο-6-μεθοξυ-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3H)-όνης -3c για διάφορες συγκεντρώσεις CT-DNA.



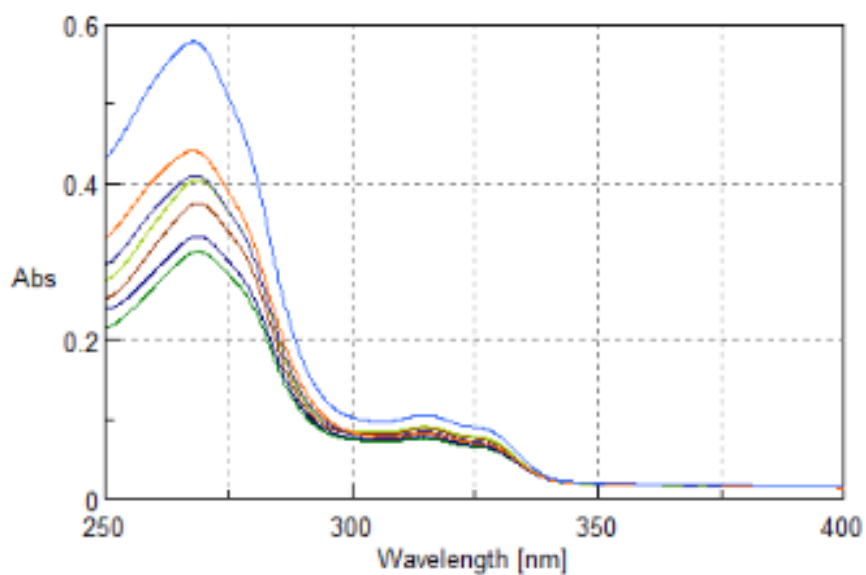
Εικόνα 53: Φάσμα UV-Vis της 3-αμινο-6-ιωδο-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3H)-όνης -3d για διάφορες συγκεντρώσεις CT-DNA.



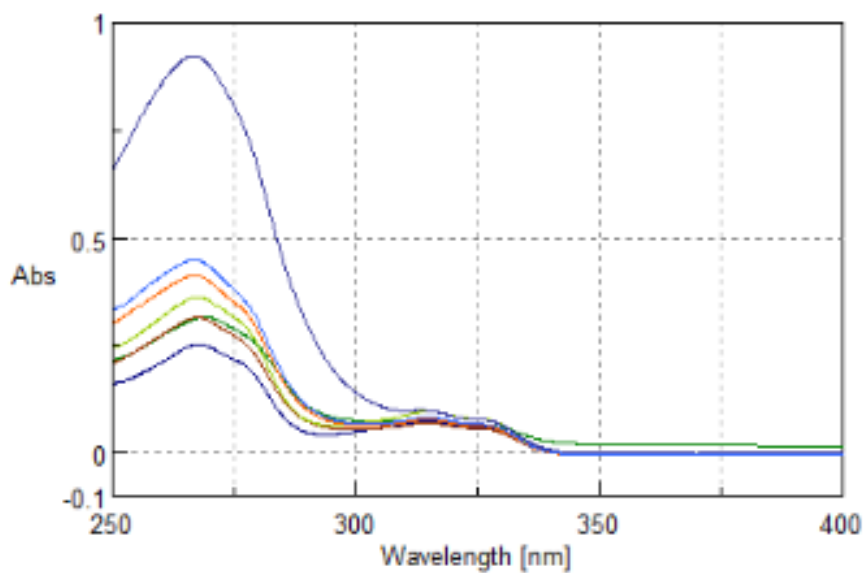
Εικόνα 54: Φάσμα UV-Vis της 3-αμινο-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3H)-όνης -3f για διάφορες συγκεντρώσεις CT-DNA.



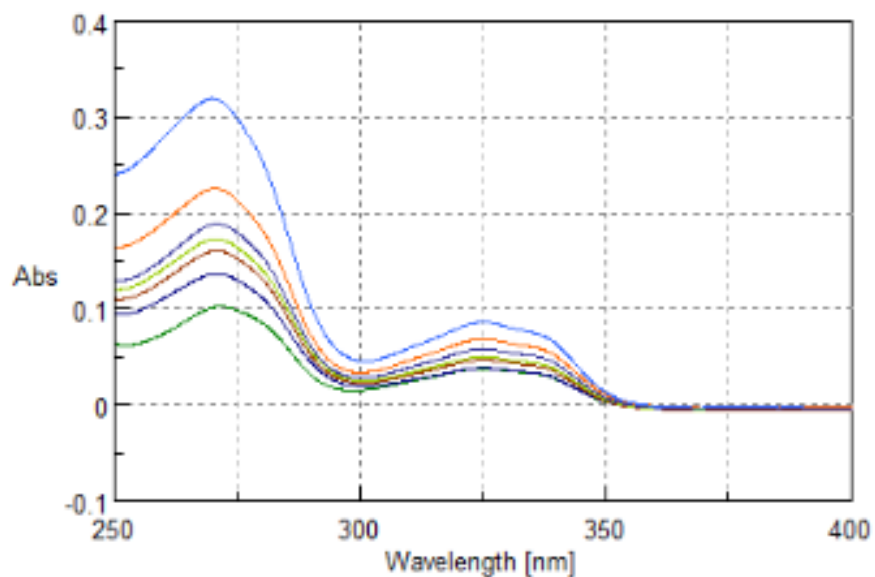
Εικόνα 55: Φάσμα UV-Vis της 3-αμινο-2-μεθυλο-6-νιτρο-κιναζολιν-4(3H)-όνης -3g για διάφορες συγκεντρώσεις CT-DNA.



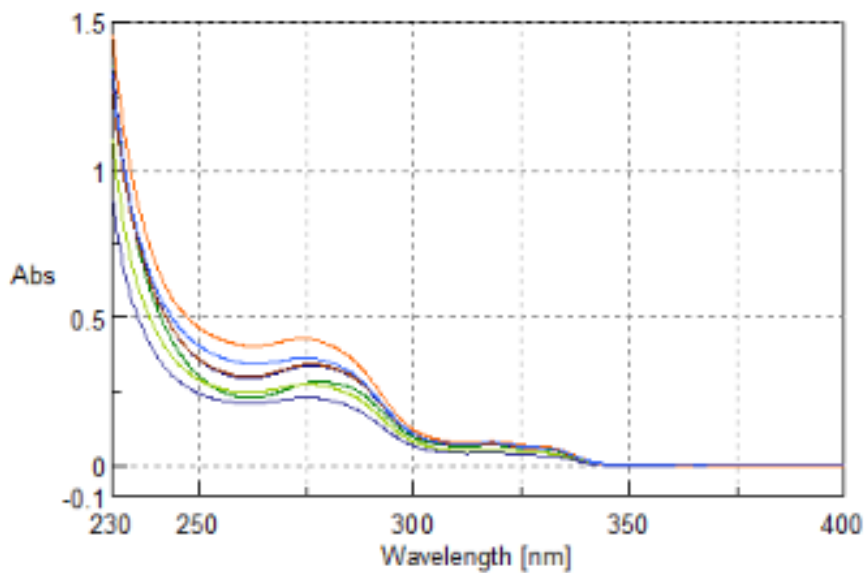
Εικόνα 56: Φάσμα UV-Vis του N-(6-βρωμο-2-μεθυλο-4-οξοκινναζολιν-3(4H)-υλ) ακεταμιδίου - 4a για διάφορες συγκεντρώσεις CT-DNA.



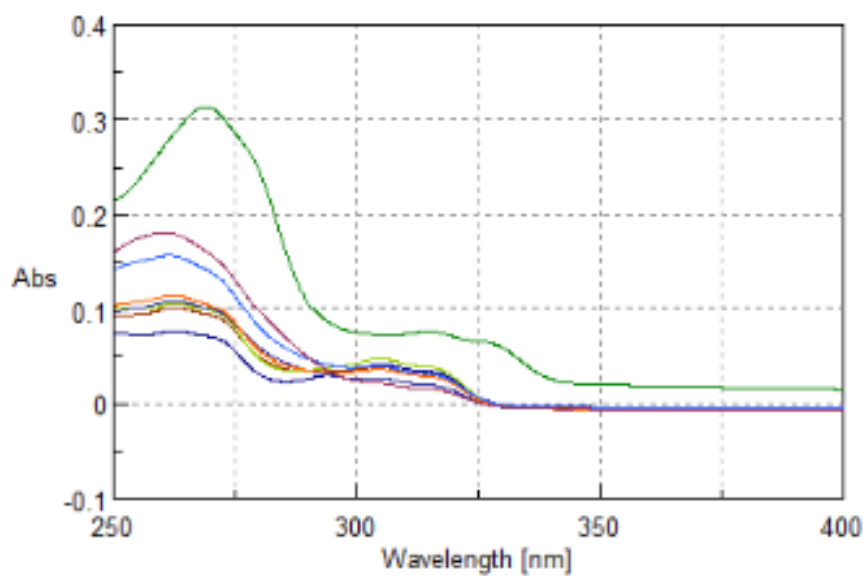
Εικόνα 57.: Φάσμα UV-Vis του N-(6-χλωρο-2-μεθυλο-4-οξοκινναζολιν-3(4H)-υλ) ακεταμιδίου - 4b για διάφορες συγκεντρώσεις CT-DNA.



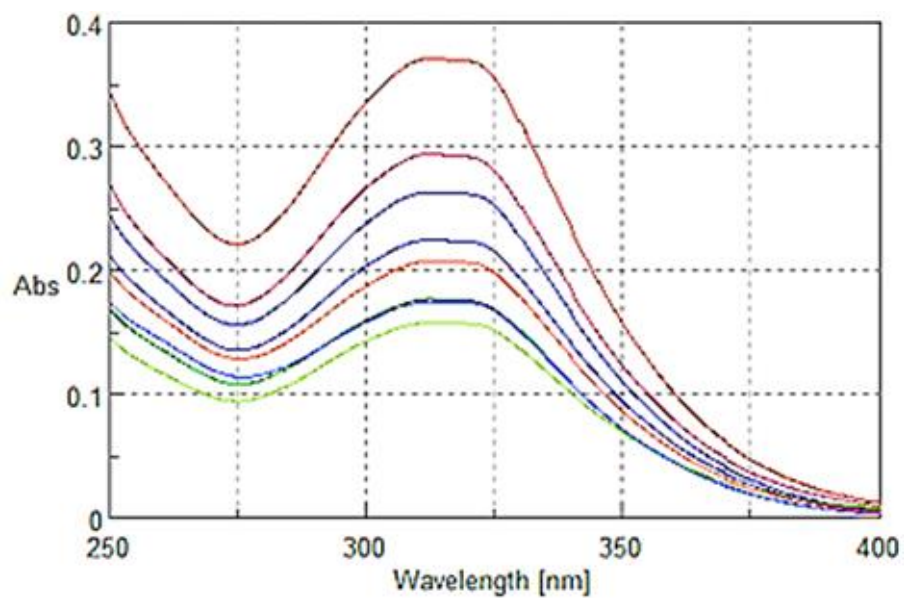
Εικόνα 58:Φάσμα UV-Vis του N-(6-μεθοξυ-2-μεθυλο-4-οξοκινναζολιν-3(4H)-υλ) ακεταμιδίου - 4c για διάφορες συγκεντρώσεις CT-DNA.



Εικόνα 59:Φάσμα UV-Vis του N-(6-ιωδο-2-μεθυλο-4-οξοκινναζολιν-3(4H)-υλ) ακεταμιδίου -4d για διάφορες συγκεντρώσεις CT-DNA.

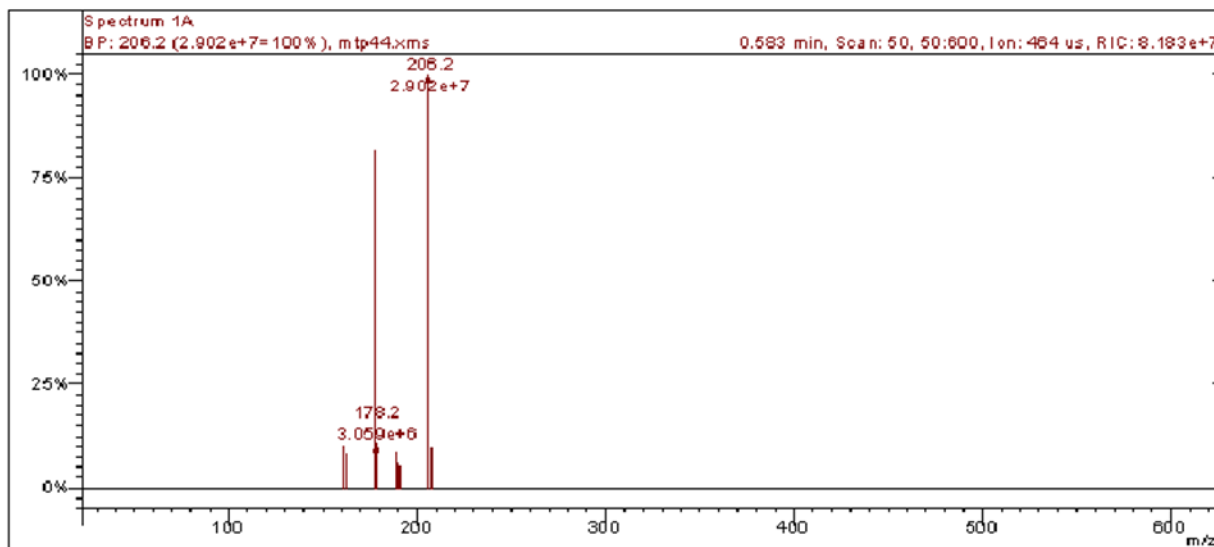


Εικόνα 60: Φάσμα UV-Vis του N-(2-μεθυλο-4-οξοκιναζολιν-3(4H)-υλ)ακεταμιδίου -4f για διάφορες συγκεντρώσεις CT-DNA.

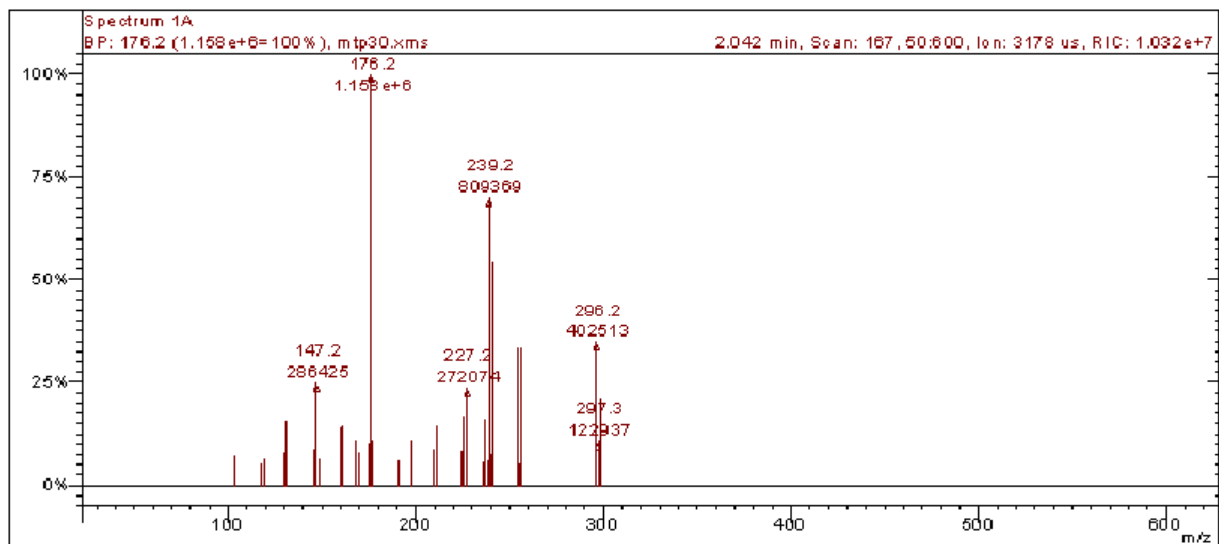


Εικόνα 61: Φάσμα UV-Vis του N-(2-μεθυλο-6-νιτρο-4-οξοκιναζολιν-3(4H)-υλ)ακεταμιδίου -4g για διάφορες συγκεντρώσεις CT-DNA.

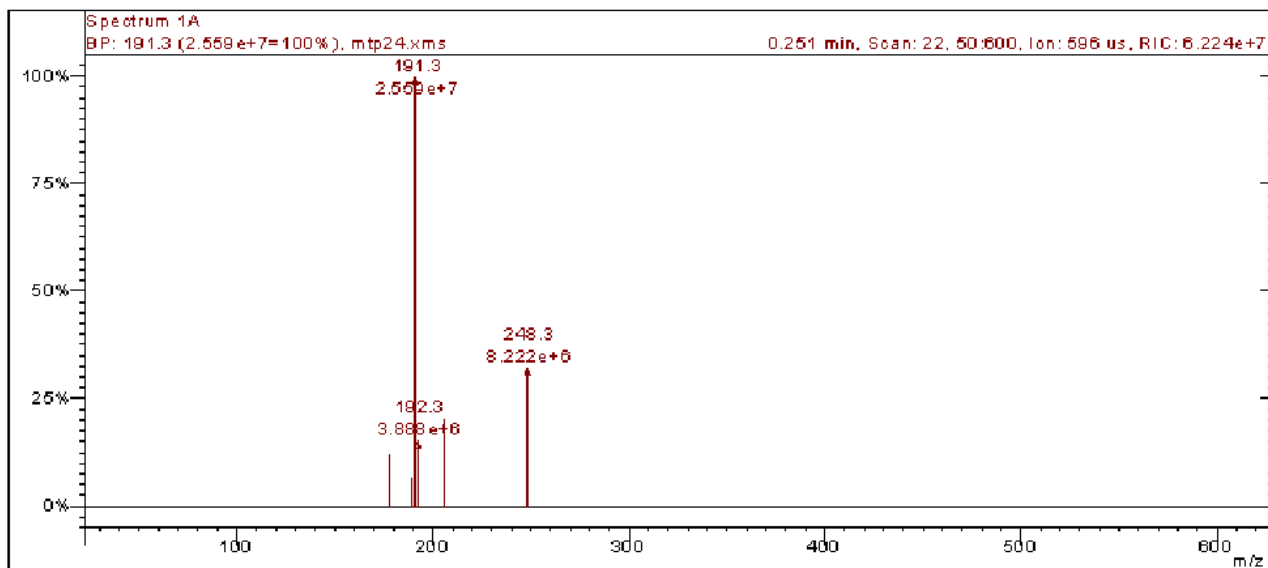
Παράρτημα IV: Φάσματα MS



Εικόνα 62: Φάσμα MS της 3-αμινο-6-μεθοξυ-2-μεθυλο-κιναζολιν-4(3H)-όνης -3c.



Εικόνα 63: Φάσμα MS του N-(6-βρωμο-2-μεθυλο-4-οξοκιναζολιν-3(4H)-υλ) ακεταμιδίου -4a.



Εικόνα 64: Φάσμα MS του N-(6-μεθοξυ-2-μεθυλο-4-οξοκινολιν-3(4H)-υλ) ακεταμιδίου -4c.

Βιβλιογραφία

1. Kumar Tiwary B, Pradhan K, Kumar Nanda A, Chakraborty R. Implication of Quinazoline-4(3H)-ones in Medicinal Chemistry: A Brief Review. *J Chem Biol Ther.* 2016;01(02):1-7. doi:10.4172/2572-0406.1000104
2. Chawla* A, Batra C. Recent Advances of Quinazolinone Derivatives As Marker for Various Biological Activities. *Int Res J Pharm.* 2013;4(3):49-58. doi:10.7897/2230-8407.04309
3. Mhaske SB, Argade NP. The chemistry of recently isolated naturally occurring quinazolinone alkaloids. *Tetrahedron.* 2006;62(42):9787-9826. doi:10.1016/j.tet.2006.07.098
4. Ameta KL, Dandia A. Green chemistry: Synthesis of bioactive heterocycles. *Green Chem Synth Bioact Heterocycles.* Published online 2014:1-412. doi:10.1007/978-81-322-1850-0
5. Alagarsamy V, Chitra K, Saravanan G, Solomon VR, Sulthana MT, Narendhar B. An overview of quinazolines: Pharmacological significance and recent developments. *Eur J Med Chem.* 2018;151(October 2019):628-685. doi:10.1016/j.ejmech.2018.03.076
6. El-Hashash MAEAM, Salem MS, Al-Mabrook SAM. Synthesis and anticancer activity of novel quinazolinone and benzamide derivatives. *Res Chem Intermed.* 2018;44(4):2545-2559. doi:10.1007/s11164-017-3245-4
7. Surat M a., Jauhari S, Desak KR. A brief review : Microwave assisted organic reaction. *Appl Sci Res.* 2012;4(1):645-661.
8. Kappe CO. Microwave-assisted chemistry. *Compr Med Chem II.* 2006;3:837-860. doi:10.1016/b0-08-045044-x/00109-7
9. Tierney JP, Lidström P. Microwave Assisted Organic Synthesis. *Microw Assist Org Synth.* 2009;57(589):1-280. doi:10.1002/9781444305548
10. Singh N, Gill V, Gill P, Singh S. International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences (IRJPAS) CHRONOPHARMACEUTICAL DRUG DELIVERY SYSTEM-A GUIDED THERAPY. 2013;3(4):84-87.
11. Zamai CA, Bavoso D, Rodrigues AA, Barbosa JAS. No 主観的健康感を中心とした在宅高齢者における健康関連指標に関する共分散構造分析Title. *Resma.* 2016;3(2):13-22.
12. Yamazaki H. Microwave Heating. *Shinku.* 1968;11(3):78-85. doi:10.3131/jvsj.11.78
13. Soni A, Khurana P, Singh T, Jayaram B. A DNA intercalation methodology for an efficient prediction of ligand binding pose and energetics. *Bioinformatics.* 2017;33(10):1488-1496. doi:10.1093/bioinformatics/btx006

14. Rauf S, Gooding JJ, Akhtar K, et al. Electrochemical approach of anticancer drugs-DNA interaction. *J Pharm Biomed Anal.* 2005;37(2):205-217. doi:10.1016/j.jpba.2004.10.037
15. Mukherjee A, Sasikala WD. *Drug-DNA Intercalation: From Discovery to the Molecular Mechanism.* Vol 92. 1st ed. Copyright © 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.; 2013. doi:10.1016/B978-0-12-411636-8.00001-8
16. Pinzi L, Rastelli G. Molecular docking: Shifting paradigms in drug discovery. *Int J Mol Sci.* 2019;20(18). doi:10.3390/ijms20184331
17. Elokely KM, Doerksen RJ. Docking challenge: Protein sampling and molecular docking performance. *J Chem Inf Model.* 2013;53(8):1934-1945. doi:10.1021/ci400040d
18. Li S, Cooper VR, Thonhauser T, Lundqvist BI, Langreth DC. Stacking interactions and DNA intercalation. *J Phys Chem B.* 2009;113(32):11166-11172. doi:10.1021/jp905765c
19. Baraldi PG, Bovero A, Fruttarolo F, et al. DNA minor groove binders as potential antitumor and antimicrobial agents. *Med Res Rev.* 2004;24(4):475-528. doi:10.1002/med.20000
20. Cai X, Gray PJ, Von Hoff DD. DNA minor groove binders: Back in the groove. *Cancer Treat Rev.* 2009;35(5):437-450. doi:10.1016/j.ctrv.2009.02.004
21. Hamilton PL, Arya DP. Natural product DNA major groove binders. *Nat Prod Rep.* 2012;29(2):134-143. doi:10.1039/c1np00054c
22. Palchadhuri R, Hergenrother PJ. DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. *Curr Opin Biotechnol.* 2007;18(6):497-503. doi:10.1016/j.copbio.2007.09.006
23. Rescifina A, Zagni C, Varrica MG, Pistarà V, Corsaro A. Recent advances in small organic molecules as DNA intercalating agents: Synthesis, activity, and modeling. *Eur J Med Chem.* 2014;74:95-115. doi:10.1016/j.ejmech.2013.11.029
24. Karimi Goftar M, Kor NM, Kor ZM. DNA intercalators and using them as anticancer drugs. *Int J Adv Biol Biomed Res.* 2014;2(3):811-822. <http://www.ijabbr.com>
25. Panagopoulos A, Balalas T, Mitrakas A, et al. 6-Nitro-Quinazolin-4(3H)-one Exhibits Photodynamic Effects and Photodegrades Human Melanoma Cell Lines. A Study on the Photoreactivity of Simple Quinazolin-4(3H)-ones. *Photochem Photobiol.* 2021;4. doi:10.1111/php.13376
26. Pasolli M, Dafnopoulos K, Andreou NP, et al. Pyridine and p-nitrophenyl oxime esters with possible photochemotherapeutic activity: Synthesis, DNA

- photocleavage and DNA binding studies. *Molecules*. 2016;21(7). doi:10.3390/molecules21070864
27. Ghorbani J, Rahban D, Aghamiri S, Teymouri A, Bahador A. Photosensitizers in antibacterial photodynamic therapy: An overview. *Laser Ther*. 2018;27(4):293-302. doi:10.5978/islsm.27_18-RA-01
 28. Bhaumik J, Mittal AK, Banerjee A, Chisti Y, Banerjee UC. Applications of phototheranostic nanoagents in photodynamic therapy. *Nano Res*. 2015;8(5):1373-1394. doi:10.1007/s12274-014-0628-3
 29. Kwiatkowski S, Knap B, Przystupski D, et al. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed Pharmacother*. 2018;106(July):1098-1107. doi:10.1016/j.biopha.2018.07.049
 30. Lan M, Zhao S, Liu W, Lee CS, Zhang W, Wang P. Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Adv Healthc Mater*. 2019;8(13):1-37. doi:10.1002/adhm.201900132
 31. Singla P, Luxami V, Paul K. Quinazolinone-benzimidazole conjugates: Synthesis, characterization, dihydrofolate reductase inhibition, DNA and protein binding properties. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2017;168:156-164. doi:10.1016/j.jphotobiol.2017.02.009
 32. Kudo K ichi, Ito H, Ihara S, Terato H. Quantitative analysis of oxidative DNA damage induced by high-voltage pulsed discharge with cavitation. *J Electrostat*. 2015;73:131-139. doi:10.1016/j.elstat.2014.10.010
 33. Karamtzioti P, Papastergiou A, Stefanakis JG, et al. O-Benzoyl pyridine aldoxime and amidoxime derivatives: Novel efficient DNA photo-cleavage agents. *Medchemcomm*. 2015;6(4):719-726. doi:10.1039/c4md00548a
 34. Mansour MA, Aboulmagd AM, Abdel-Rahman HM. Quinazoline-Schiff base conjugates:: In silico study and ADMET predictions as multi-target inhibitors of coronavirus (SARS-CoV-2) proteins. *RSC Adv*. 2020;10(56):34033-34045. doi:10.1039/d0ra06424f
 35. Lee JY, Shin YS, Jeon S, et al. Design, synthesis and biological evaluation of 2-aminoquinazolin-4(3H)-one derivatives as potential SARS-CoV-2 and MERS-CoV treatments. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2021;39(December 2020):127885. doi:10.1016/j.bmcl.2021.127885
 36. Kakoulidou C, Gritzapis PS, Hatzidimitriou AG, Fylaktakidou KC, Psomas G. Zn(II) complexes of (E)-4-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)quinazoline in combination with non-steroidal anti-inflammatory drug sodium diclofenac: Structure, DNA binding and photo-cleavage studies, antioxidant activity and interaction with albumin. *J Inorg Biochem*. 2020;211(June):111194.

doi:10.1016/j.jinorgbio.2020.111194