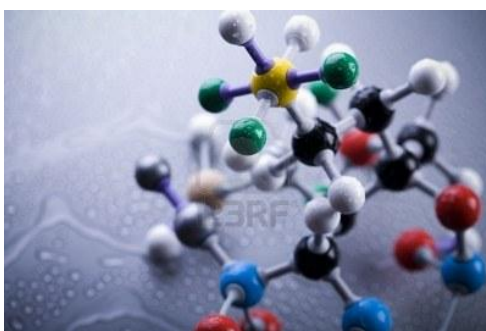




ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ (Ι) ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Σύνθεση, χαρακτηρισμός δομής βιοϊσοστερών αναλόγων
3-καρβοξαμιδικών-2- κινολινονών και μελέτη της
αντιφλεγμονώδους, αντιοξειδωτικής και νευροπροστατευτικής
δράσης τους**



Παρέλη Ιωάννα

Επιβλέπουσα

Δρ. Αναστασία Δέτση

Λέκτορας ΕΜΠ

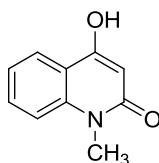
ΑΘΗΝΑ 2012

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο σχεδιασμός και η σύνθεση νέων παραγώγων των κινολινονών με βάση τη βιοϊσοστερή υποκατάσταση και η μελέτη της ικανότητάς τους να αναστέλλουν τη δράση της λιποξυγονάσης, της αντιοξειδωτικής τους δράσης και της προστασίας των κυττάρων HT22 από το οξειδωτικό στρες.

Η βιοϊσοστερή υποκατάσταση αποτελεί μια βασική τεχνική της Φαρμακευτικής Χημείας η οποία βασίζεται στη μοριακή τροποποίηση μιας ένωσης- οδηγού (lead compound) με στόχο την παραγωγή ασφαλέστερων και κλινικά αποτελεσματικότερων φαρμάκων. Μπορούμε να διακρίνουμε δυο κατηγορίες βιοϊσοστέρειας : την κλασσική και τη μη-κλασσική βιοϊσοστέρεια. Στην παρούσα διπλωματική εργασία εφαρμόστηκαν και οι δυο κατηγορίες βιοϊσοστέρειας για το σχεδιασμό νέων αναλόγων των κινολινονών.

Οι κινολινονες αποτελούν ετεροκυκλικές αζωτούχες ενώσεις που απαντώνται ως φυσικά προϊόντα, κυρίως με τη μορφή αλκαλοειδών, ως χημικά ενδιάμεσα στο βιοσυνθετικό μονοπάτι άλλων φυσικών προϊόντων και ως συστατικά προϊόντων μεταβολισμού ορισμένων μικροοργανισμών.

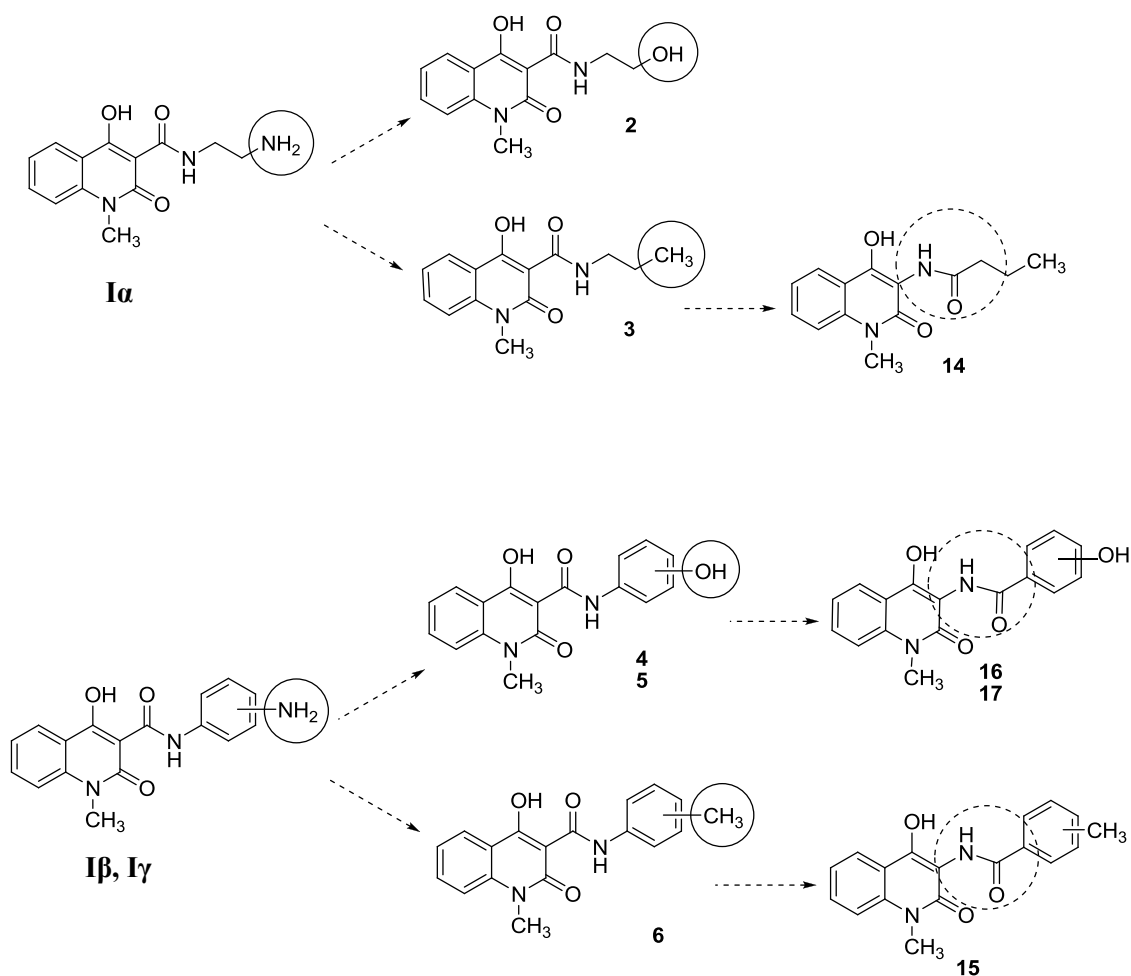


Σχήμα I: Δομή αρχικής κινολινονης

Οι ενώσεις **2-6** (Σειρά A, Σχήμα II) παρασκευάστηκαν με βάση τη κλασσική βιοϊσοστερή υποκατάσταση, η οποία περιλαμβάνει την αντικατάσταση της αμινομάδας του καρβοξαμικού αμιδίου της αρχικής ένωσης με τις ομάδες του υδροξυλίου και μεθυλίου όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα. Οι ενώσεις παρασκευάστηκαν με θέρμανση της 3-μεθοξυκαρβονυλο-4-υδροξυ-2-κινολινονης με την αντίστοιχη αρωματική ή αλειφατική αμίνη, σε διαλύτη τολουόλιο. Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμασιών έδειξαν ότι τα καρβοξαμίδια **3-6** εμφανίζουν σημαντικά αυξημένη ικανότητα αναστολής του ενζύμου της λιποξυγονάσης σε σχέση με τις αρχικές ενώσεις- οδηγούς (**Iα, Iβ, Iγ**).

Με βάση αυτά τα αποτελέσματα παρασκευάστηκαν οι ενώσεις **14-17** (Σειρά B, Σχήμα II), ο σχεδιασμός των οποίων βασίζεται στη μη-κλασσική βιοϊσοστερή υποκατάσταση, και συγκεκριμένα στην εφαρμογή του αντίστροφου αμιδίου. Αρχικά παρασκευάστηκε το υδροχλωρικό άλας 1-μεθυλο-3-αμινο-4-υδροξυ-κινολιν-2-όνης μέσω αντίδρασης νίτρωσης της 1-μεθυλο-4-υδροξυ-κινολιν-2-όνης και αναγωγής της νιτροομάδας. Ακολούθησαν αντιδράσεις ακυλίωσης για την παρασκευή των τελικών καρβοξαμιδίων. Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμασιών έδειξαν ότι τα αντίστροφα καρβοξαμίδια **14-17**

εμφανίζουν γενικά μειωμένη ικανότητα αναστολής του ενζύμου της λιποξυγονάσης σε σχέση με τα καρβοξαμίδια της σειράς A.



Σχήμα II: Νέες ενώσεις που συντέθηκαν στην παρούσα εργασία: Σειρά A: Ενώσεις **2-6**, Σειρά B: Ενώσεις **14-17**.

Για την ταυτοποίηση των παραπάνω ενώσεων χρησιμοποιήθηκαν διάφορες φασματοσκοπικές μέθοδοι, όπως ^1H NMR, ^{13}C NMR, ESI-MS, FT-IR.

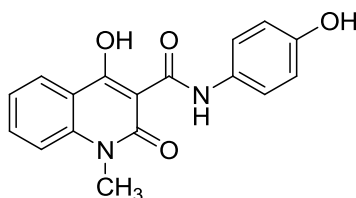
Η αντιφλεγμονώδης δράση των νέων αναλόγων εκτιμάται μέσω πειραμάτων στη λιποξυγονάση από σόγια ενώ η αντιοξειδωτική δράση μετρήθηκε μέσω της μεθόδου του DPPH και της αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης (AAPH).

Από τα αποτελέσματα των παραπάνω βιοδοκιμασιών, μπορούμε να εξάγουμε τα παρακάτω αποτελέσματα:

- Η εφαρμογή της κλασσικής βιοίσοστερους υποκατάστασης της ομάδας NH_2 (ενώσεις **Ia**, **Ib** και **Iγ**) από ομάδες OH και CH_3 (ενώσεις **2-6**) οδήγησε σε πιο δραστικά ανάλογα σε σχέση με τις αρχικές ενώσεις όσον αφορά την ικανότητα αναστολής της λιποξυγονάσης και την αντιοξειδωτική δράση τους. Επιπλέον, τα αμίδια **2-4** εμφανίζουν ισχυρή αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης.

- Η εφαρμογή της μη-κλασσικής βιοϊσοστερούς υποκατάστασης οδηγεί γενικά σε λιγότερο δραστικά ανάλογα έναντι της λιποξυγονάσης αλλά με σαφώς βελτιωμένη δράση έναντι της λιπιδικής υπεροξειδωσης.
- Η απόσταση του αμιδικού καρβονυλίου από το ενολικό υδροξύλιο φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην βιολογική δράση των μορίων καθώς μεγαλύτερη ικανότητα αναστολής της λιποξυγονάσης όσο και της λιπιδικής υπεροξειδωσης παρουσιάζουν οι ενώσεις στις οποίες το καρβονύλιο αναπτύσσει ισχυρό δεσμό υδρογόνου με το υδροξύλιο του συστήματος της κινολινόνης σχηματίζοντας έτσι έναν εξαμελή δακτύλιο. Επίσης, η απόσταση αυτή τροποποιεί την ικανότητα του μορίου να συμπλοκοποιεί το ιόν Fe^{3+} το οποίο βρίσκεται στο ενεργό κέντρο της λιποξυγονάσης.
- Οι ενώσεις **3** και **4** που εμφανίζουν ισχυρή ικανότητα αναστολής της λιποξυγονάσης δείχνουν και την ισχυρότερη ικανότητα προστασίας των κυττάρων HT22 από το οξειδωτικό στρες. Αυτό ενισχύει και μελέτες που αναφέρουν πως η ανασταλτική δράση έναντι του ενζύμου της λιποξυγονάσης σχετίζεται και τη προστασία των κυττάρων HT22 από το οξειδωτικό στρες.

Από τις ενώσεις που μελετήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία ,η ένωση που συνδυάζει την μεγαλύτερη ικανότητα αναστολής του ενζύμου της λιποξυγονάσης, την ισχυρότερη αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης (AAPH) αλλά και σημαντική προστασία των HT22 κυττάρων από το οξειδωτικό στρες είναι το 4-υδροξυ-N-(4-υδροξυφαινυλο)-1-μεθυλο-2-οξο-1,2-διϋδροκινολινο-3-καρβοξαμίδιο (**4**) . Επομένως η ένωση αυτή θα αποτελέσει το 'μόριο-οδηγό' για το σχεδιασμό και τη σύνθεση νέων αναλόγων με βελτιωμένη βιολογική δράση.



4

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Οργανική σύνθεση βιοδραστικών αναλόγων φυσικών προϊόντων.

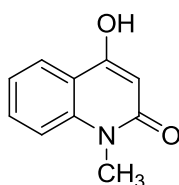
ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: κινολινόνες, βιοϊσοστερήs υποκατάσταση, αναστολή της λιποξυγονάσης από σόγια, αντιοξειδωτική δράση, προστασία των κυττάρων HT22 έναντι του οξειδωτικού στρες.

ABSTRACT

The aim of the present research is the design and synthesis of new quinolinone analogues based on the concept of bioisosterism and the study of their biological properties, including their ability to inhibit lipoxygenase, their antioxidant activity and their ability to protect HT22 cells from oxidative stress.

Bioisosterism represents a strategy in Medicinal Chemistry based on the molecular modification of a lead compound to produce safer and clinically more effective drugs. There are two main categories of bioisosterism: classic and non-classic bioisosterism, both of which were applied in this research for the design of the new analogues.

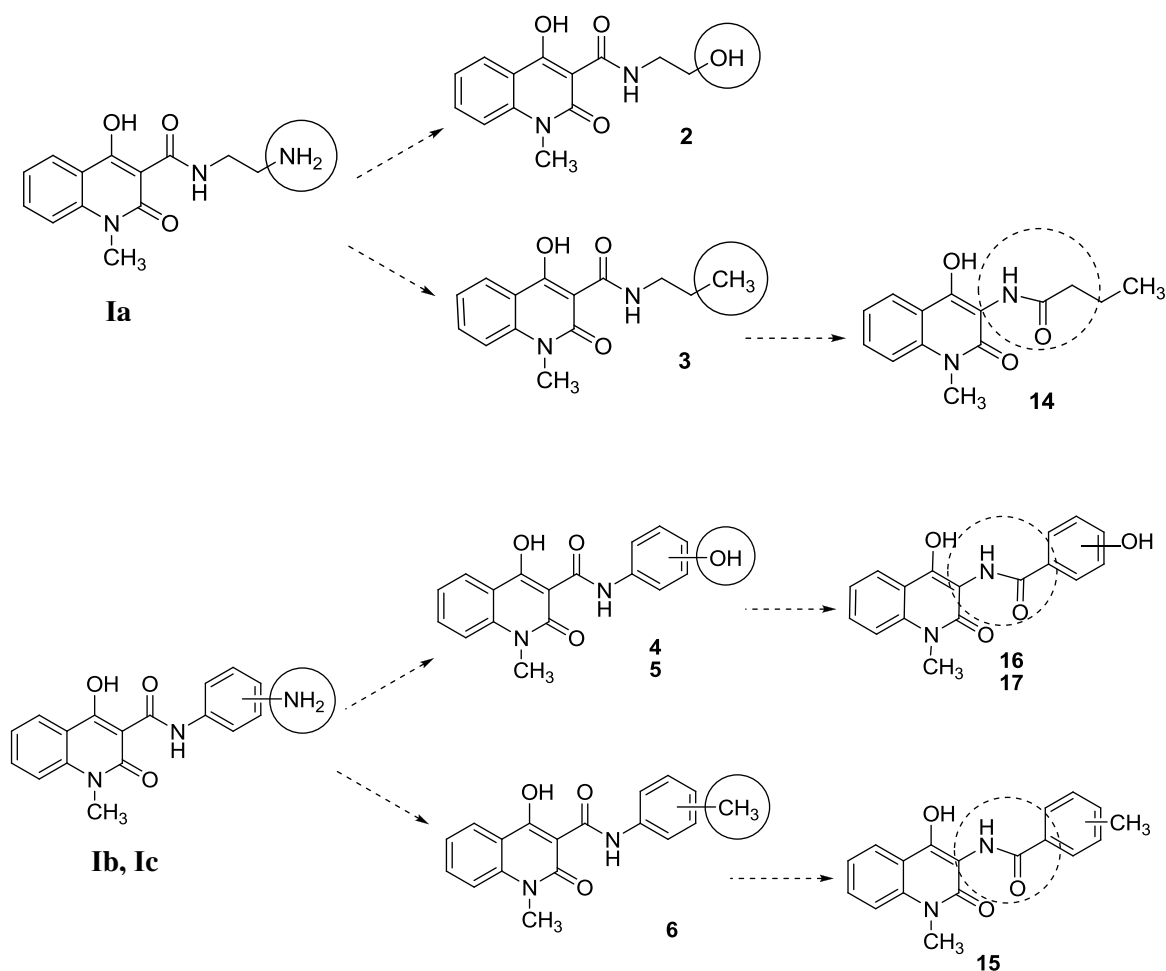
Quinolinones are heterocyclic compounds containing nitrogen which are mainly found as alkaloids in natural products, as chemical intermediates in the biosynthesis of other natural compounds or as components produced during the metabolism of microorganisms.



Scheme I: Basic structure of quinolinone

The synthesis of compounds **2-6** (Series A) is based on the classic bioisosterism, which includes the substitution of the amine group of the carboxamide with the hydroxyl and methyl groups, as described in the figure below. The compounds were prepared by heating 3-methoxycarbonyl-4-hydroxy-2-quinolinone with the suitable aromatic or aliphatic amine in toluene. The results of the biological assays indicated that carboxamides **3-6** exhibit significantly increased inhibition of lipoxygenase than the 'parent' lead compounds (**1 α** , **1 β** , **1 γ**).

Taking into consideration these results, compounds **14-17** were synthesized (Series B), based on the non-classic bioisosterism and specifically on the implementation of the inverse amide. The first step is the synthesis of the hydrochloride salt of 1-methyl-4-hydroxy-quinolin-2-one, prepared by nitration of 4-hydroxy-2-quinolinone followed by reduction of the nitro group. Acylation reactions of the amine moiety were performed using the corresponding acyl-chlorides to produce the final carboxamides. The results of the biological assays indicated that the reversed carboxamides **14-17** exhibit in general lower inhibition of lipoxygenase compared to the carboxamides of Series A.



Scheme II: Novel compounds synthesized in this work: Series A: Compounds **2-6**, Series B: Compounds **14-17**.

The structure identification of the synthesized compounds was accomplished via spectroscopic methods, such as ^1H NMR, ^{13}C NMR, ESI-MS, FT-IR.

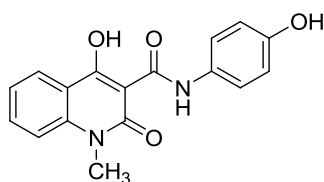
The anti-inflammatory activity of new analogues was evaluated using the soybean lipoxygenase assay, whereas the antioxidant activity was estimated using the methods of DPPH and the inhibition of lipid peroxidation (AAPH).

Considering the results of these biological assays, we can draw the following conclusions:

- The implementation of the classic bioisosteric replacement of the amine group (NH_2) (compounds **Ia**, **Ib**, **Ic**) with the hydroxyl (OH) and methyl (CH_3) groups (compounds **2-6**), has led to more active analogues considering their ability to inhibit lipoxygenase and their antioxidant activity. In addition, amides **2-4** exhibit potent inhibition of lipid peroxidation.

- The implementation of the non-classic bioisosteric replacement generally resulted to less active analogues as far as their ability to inhibit lipoxygenase and their ability to act as radical scavengers. However, the reversed amides were more potent lipid peroxidation inhibitors than the parent amides.
- The distance of the amide carbonyl from the enolic hydroxyl seems to play an important role in the biological activity of the new compounds. The compounds in which the carbonyl group develops a strong hydrogen bond with the hydroxyl group on position 4 of the quinolinone heterocyclic ring, exhibit stronger inhibition of lipoxygenase as well as of lipid peroxidation. In addition, this distance seems to alter the ability of the molecules to bind iron (Fe^{3+}) which is located in the active site of lipoxygenase.
- Compounds **3** and **4** exhibit the strongest inhibition of lipoxygenase as well as the highest neuroprotection of HT22 cells from oxidative stress. This is in accordance with previous studies which state that the inhibition of lipoxygenase provides neuroprotection in HT22 cells from oxidative stress.

From the series of compounds studied in this research, the one which combines the greatest ability to inhibit lipoxygenase and lipid peroxidation as well as the highest neuroprotection of HT22 cells from oxidative stress is 4-hydroxy-N-(4-hydroxyphenyl)-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydroquinolin-3-carboxamide (**4**). Therefore, compound **4** may represent in future studies the 'lead compound' for the design and synthesis of new analogues with improved biological activity.



4

SCIENTIFIC AREA: Organic synthesis of bioactive natural products' analogues

KEYWORDS: quinolinones, bioisosterism, inhibition of lipoxygenase, antioxidant activity, protection of HT22 cells from oxidative stress

Πίνακας περιεχομένων

Κεφάλαιο 1.....	17
Βιοϊσοστερής υποκατάσταση.....	17
1.1 Εισαγωγή.....	17
1.2 Προϋποθέσεις εφαρμογής της βιοϊσοστερούς υποκατάστασης.....	19
1.3 Σχεδιασμός αναλόγων και βιοϊσοστέρεια.....	20
1.4 Ταξινόμηση της βιοϊσοστερούς υποκατάστασης.....	21
1.5 Βιοϊσοστέρεια και μεταβολές στις φυσικοχημικές ιδιότητες.....	23
1.6 Παραδείγματα κλασσικής βιοϊσοστερούς υποκατάστασης.....	24
1.7 Παραδείγματα μη- κλασσικής βιοϊσοστερούς υποκατάστασης.....	30
Κεφάλαιο 2:Κινολινόνες.....	41
2.1Φυσικά προϊόντα κινολινονών και κινολονών.....	41
2.2.Συνθετικά ανάλογα κινολινονών με φαρμακευτική δράση.....	47
Κεφάλαιο 3 Σχεδιασμός, σύνθεση και ταυτοποίηση δομής νέων βιοϊσοστερών αναλόγων κινολινονών.....	52
3.1 Σύνθεση νέων βιοϊσοστερών αναλόγων κινολινονών.....	52
3.2 Ταυτοποίηση της δομής των νέων μορίων.....	59
3.2.1 Φασματοσκοπική μελέτη των κινολινονών 2-6 (Σειρά A).....	60
3.2.1 Φασματοσκοπική μελέτη των κινολινονών 8-17 (Σειρά B).....	70
Κεφάλαιο 4 Πειραματικό μέρος.....	88
4.1. Μέθοδοι σύνθεσης των κινολινονών.....	88
Όργανα και συσκευές.....	88
4.2 Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής δράσης ενάντια στην ελεύθερη ρίζα DPPH.....	97
4.3 Υπολογισμός της αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης (AAPH). [56].....	97
4.4 Υπολογισμός της αναστολής της λιποξυγονάσης (LOX) από σόγια in vitro. [55].....	98
4.5 Μελέτη της νευροπροστατευτικής δράσης των νέων ενώσεων.....	98
4.5.1 Χημικά.....	98
4.5.2 Κυτταρικές σειρές.....	98

4.5.3 Αποστείρωση.....	98
4.5.4 ΜΕΘΟΔΟΙ.....	99
4.5.4.1 Καλλιέργεια κυττάρων.....	99
4.5.4.2 Μέτρηση κυττάρων.....	99
4.5.4.3 Προσδιορισμός της νευροπροστατευτικής δράσης των ενώσεων στα κύτταρα HT-22 παρουσία γλουταμικού.....	100
Κεφάλαιο 5: Μελέτη της αντιοξειδωτικής, αντιφλεγμονώδους και νευροπροστατευτικής δράσης των νέων ενώσεων.....	95
5.1 Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης.....	103
5.1.1 Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης με χρήση της ελεύθερης ρίζας DPPH..	103
5.1.2 Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της λιπιδικής υπεροξειδωσης του AAPH.	105
5.2 Μελέτη της αντιφλεγμονώδους δράσης μέσω του προσδιορισμού της ικανότητας αναστολής του ενζύμου λιποξυγονάση από σόγια	108
5.3 Μελέτη της νευροπροστατευτικής δράσης έναντι του οξειδωτικού στρες στη κυτταρική σειρά HT-22.....	113
5.4 Συσχέτιση της δράσης της λιποξυγονάσης με την αναστολή του κυτταρικού θανάτου λόγω οξειδωτικού στρες στα κύτταρα HT-22.....	116
Κεφάλαιο 6 Αξιολόγηση της βιολογικής δράσης των νέων ενώσεων	117
6.1 Προσδιορισμός της ικανότητας των νέων ενώσεων να αναστέλλουν τη δράση της λιποξυγονάσης από σόγια	117
6.1 Προσδιορισμός της ικανότητας των νέων ενώσεων να προστατεύουν τα κύτταρα HT22 από το οξειδωτικό στρες.....	121
6.2 Προτάσεις για μελλοντική έρευνα.....	123
Βιβλιογραφία	126

Πίνακας σχημάτων

Σχήμα 1	Δομές της τεστοστερόνης και της προγεστερόνης.....	19
Σχήμα 2	Δομές των αναλόγων chlorpromazine και haloperidol.....	20
Σχήμα 3	Ταξινόηση βιοϊσοστερούς υποκατάστασης και κατηγορίες αναλόγων	21
Σχήμα 4	Παράδειγμα βιοϊσοστερούς υποκατάστασης.....	24
Σχήμα 5	Δομές των N-κυκλοπροπυλο-κινολιν-4-ονη, linezolid.....	25
Σχήμα 6	27
Σχήμα 7	Δομή της ένωσης vorinostat.....	28
Σχήμα 8	Δομή της ένωσης tacrine και του πυραζο-πυριδινικού αναλόγου της κινολινόνης	29
Σχήμα 9	Δομή των ενώσεων tolmetin, cetroplac	31
Σχήμα 10	31
Σχήμα 11	Η αλληλεπίδραση μέσω δεσμών υδρογόνου μεταξύ του 4-αμινοκιναζολινικού παραγώγου και της κινάσης	34
Σχήμα 12	Δομή των ενώσεων EXP-7711, losartan	36
Σχήμα 13	Δομή των αναλόγων του refecoxib και celecoxib καθώς και οι τιμές των IC ₅₀ της δράσης τους έναντι στα ένζυμα PGHS-1, PGHS-2	38
Σχήμα 14	Παράγωγα βιοϊσοστερούς υποκατάστασης.....	39
Σχήμα 15	Δομές διάφορων κινολινονών	40
Σχήμα 16	Αλκαλοειδή κινολίνης και κινολινονών από το γένος <i>Agathosma</i> της οικογένειας Rutaceae	41
Σχήμα 16	Αλκαλοειδή κινολίνης και κινολινονών από το γένος <i>Agathosma</i> της οικογένειας Rutaceae	42
Σχήμα 17	Η ένωση harplamide του φυτού <i>Haplophyllum perforatum</i>	43
Σχήμα 18	Παράγωγα κινολίνης και κινολινονών του φυτού <i>Boronia ternata</i>	44
Σχήμα 19	Αλκαλοειδή κινολινόνης του φυτού <i>Haplophyllum acutifolium</i>	45
Σχήμα 20	Αλκαλοειδή κινολινόνης του φυτού <i>D. Vandellianum</i>	45
Σχήμα 21	Αλκαλοειδή κινολινόνης του μύκητα <i>Penicillium janczewskii</i>	46
Σχήμα 22	Κινολινόνες με φωτοβιολογική δράση	47
Σχήμα 23	Παράγωγα κινολινονών με πιθανή αντιπαρασιτική δράση	47

Σχήμα 24 Αλκαλοειδή κινολινόνης και παράγωγα των 3-υποκατεστημένων-4-υδροξυκινολινονών με αντιπαρασιτική δράση.....	48
Σχήμα 25 Παράγωγα 4 - κινολινονών με ανασταλτική δράση έναντι των καλπαϊνών	49
Σχήμα 26 Παράγωγα 2-κινολινονών και κινολονών με νευροπροστατευτική δράση	50
Σχήμα 27 Παράγωγα κινολινονών με αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση	51
Σχήμα 28 Κινολινόνες με αξιόλογη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση.....	52
Σχήμα 29 Σειρά Α: νέα ανάλογα τύπου (I) με κλασικές βιοίσοστερείς υποκαταστάσεις της αμινομάδας.....	52
Σχήμα 30 Κλασική μέθοδος παρασκευής καρβοξαμιδίων των κινολινονών	53
Σχήμα 31 Σειρά β: Νέα ανάλογα τύπου (II) με βάση τη μη-κλασική βιοίσοστερή υποκατάσταση της αμινομάδα	53
Σχήμα 32 Αντιδράσεις νίτρωσης της αρχικής κινολινόνης και αναγωγής της νιτροομάδας..	54
Σχήμα 32 Α Σύνθεση των ακυλοχλωριδίων 12 και 13	55
Σχήμα 33 Αντιδράσεις σύνθεσης των χλωριδίων και ακυλίωσης του υδροχλωρικού άλατος της 3-αμινο-1-μεθυλο-4-υδροξυ-2- κινολινόνης.....	56
Σχήμα 34 Μηχανισμός ακυλίωσης.....	57
Σχήμα 35 Οι διάφορες δομές συντονισμού του DPPH που προκύπτουν από τον απεντοπισμό του ελεύθερου ηλεκτρονίου	102
Σχήμα 36 Μη-δραστική μορφή του μορίου DPPH	103
Σχήμα 37 Αντίδραση μεταξύ του DPPH και του πιθανού αναγωγικού μορίου A-A.....	103
Σχήμα 38 Στάδια λιπιδικής υπεροξειδωσης	104
Σχήμα 39 Παραδείγματα αζω ενώσεων που λειτουργούν ως ενεργοποιητές.....	105
Σχήμα 40 Προσθήκη οξυγόνου στη λιπιδική ρίζα L'	105
Σχήμα 41 Αντίδραση παραγωγής του υδροϋπεροξειδίου	106
Σχήμα 42 Μεταβολικά στάδια παραγωγής λευκοτριενίων μέσω της 5-λιποξυγονάσης..	109
Σχήμα 43 Μηχανισμός ενεργοποίησης της λιποξυγονάσης	111
Σχήμα 44 Δομή του γλουταμικού	113
Σχήμα 45 Δομή της ένωσης baicalein	114

Πίνακας εικόνων

Εικόνα 1 Φυτό του γένους <i>Agathosma</i> της οικογένειας Rutaceae.....	41
Εικόνα 2 Το φυτό <i>Boronia ternata</i> της οικογένειας Rutaceae	43
Εικόνα 3 Το φυτό <i>Haplophyllum acutifolium</i>	44
Εικόνα 4 Το φάσμα ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) της ένωσης 2	59
Εικόνα 5 Το φάσμα ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75MHz) της ένωσης 2	60
Εικόνα 6 Το φάσμα ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) της ένωσης 3	61
Εικόνα 7 Το φάσμα ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75MHz) της ένωσης 3	62
Εικόνα 8 Το φάσμα ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) της ένωσης 4	63
Εικόνα 9 Το φάσμα ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75MHz) της ένωσης 4	64
Εικόνα 10 Το φάσμα ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) της ένωσης 5	65
Εικόνα 11 Το φάσμα ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75MHz) της ένωσης 5	66
Εικόνα 12 Το φάσμα ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) της ένωσης 6	67
Εικόνα 13 Το φάσμα ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75MHz) της ένωσης 6	68
Εικόνα 14 Το φάσμα ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) της ένωσης 8	69
Εικόνα 15 Το φάσμα ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75MHz) της ένωσης 8	70
Εικόνα 16 Το φάσμα IR της ένωσης 8	71
Εικόνα 17 Το φάσμα ESI- MS της ένωσης 8	72
Εικόνα 18 A Το φάσμα ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) του υδροχλωρικού άλατος της 3-αμινο-1-μεθυλο-4-υδροξυ-2-κινολινόνης	73
Εικόνα 18 B Το φάσμα IR του υδροχλωρικού άλατος της 3-αμινο-1-μεθυλο-4-υδροξυ-2-κινολινόνης	74
Εικόνα 19 Το φάσμα ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) της ένωσης 14.....	75
Εικόνα 20 Το φάσμα ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75MHz) της ένωσης 14	76
Εικόνα 21 Το φάσμα ESI- MS της ένωσης 14	77
Εικόνα 22 Το φάσμα IR της ένωσης 14.....	78
Εικόνα 23 Το φάσμα ^1H NMR ($\text{CDCl}_3/\text{DMSO}$, 300 MHz) της ένωσης 15.....	79
Εικόνα 24 Το φάσμα ESI- MS της ένωσης 15	80

Εικόνα 25 Το φάσμα ¹³ C NMR (CDCl ₃ , 75MHz) της ένωσης 15	81
Εικόνα 26 Το φάσμα IR της ένωσης 15.....	82
Εικόνα 27 Το φάσμα ¹ H NMR (CDCl ₃ , 300 MHz) της ένωσης 17.....	83
Εικόνα 28 Το φάσμα ¹³ C NMR (CDCl ₃ , 75MHz) της ένωσης 17	84
Εικόνα 29 Το φάσμα ESI- MS της ένωσης 17	85
Εικόνα 30 Το φάσμα IR της ένωσης 17.....	86
Εικόνα 31 Κάτοψη και πλάγια όψη του αιμοκυτταρόμετρου (πλάκα Neubauer)	99
Εικόνα 32 Θανάτωση των κυττάρων HT22 συναρτήσει του χρόνου επώασης με το γλουταμικό.....	100
Εικόνα 33 Κύτταρα HT22 πριν και μετά την επίδραση τοξικής δόσης γλουταμικού. Μορφολογία των κυττάρων HT22 Α.σε κανονικές συνθήκες καλλιέργειας και Β. ύστερα από την επώαση με το γλουταμικό	101
Εικόνα 34 Διάγραμμα της συγκέντρωσης του λιπιδίου συναρτήσει του χρόνου σε περιπτώσεις απουσίας ενεργοποιητή (ΑΒ), παρουσίας ενεργοποιητή (ΒC), χρήσης αντιοξειδωτικού (CΔ).....	107
Εικόνα 35 Κρυσταλλική μορφή της ανθρώπινης 5-LO,στην οποία φαίνεται ο ρυθμιστικός τομέας του ενζύμου (κίτρινο χρώμα) συνδεδεμένος με ιόντα ασβεστίου και ο καταλυτικός τομέας του άνθρακα με το άτομο σιδήρου (γκρι χρώμα).....	108
Εικόνα 36 Ασθένειες οι οποίες σχετίζονται με διάφορες μορφές λευκοτριενίων.....	109
Εικόνα 37 Διεργασία ενεργοποίησης της λιποξυγονάσης και μετάδοσης σήματος για την παραγωγή λευκοτριενίων.....	110
Εικόνα 38 Μηχανισμός πρόκλησης οξειδωτικού στρες λόγω γλουταμικού στα κύτταρα HT22.....	111

Πίνακας πινάκων

Πίνακας 1 Κυριότερες κλασικές βιοϊσοστερείς ομάδες και άτομα.....	22
Πίνακας 2 Κλασικές βιοϊσοστερείς ομάδες	22
Πίνακας 3 Ιδιότητες κλασικών δισθενών βιοϊσοστερών ομάδων	26
Πίνακας 4 Δομές των ενώσεων I,II και III καθώς και οι τιμές IC ₅₀ σχετιζόμενες με την αναστολή των COX-2 και 5-LOX.....	28

Πίνακας 5 Βιοϊσοστερή ανάλογα που δρουν ως αναστολείς της πρωτεϊνικής κινάσης GSK3.....	33
Πίνακας 6 Μη –κλασικά βιοϊσοστερή της ομάδας του φαινολικού υδροξυλίου.	34
Πίνακας 7 Μη –κλασικά βιοϊσοστερή της ομάδας του καρβονυλίου	35
Πίνακας 8 Μη –κλασικά βιοϊσοστερή της ομάδας του καρβοξυλίου	36
Πίνακας 9 Μη –κλασικά βιοϊσοστερή της ομάδας του αμιδικού δεσμού	37
Πίνακας 10 Προσδιορισμός βιολογικής δράσης των καρβοξαμιδίων τύπου (I)	116
Πίνακας 11 Αποτελέσματα βιολογικής δράσης των ενώσεων της σειράς A και B.....	117
Πίνακας 12 Αποτελέσματα προστασίας των κυττάρων HT22 έναντι του οξειδωτικού στρες	121

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου κατά το ακαδημαϊκό έτος 2010-2011, υπό την επίβλεψη της Δρ Α. Δέτση, Λέκτορα ΕΜΠ. Τα βιολογικά πειράματα μελέτης της προστασίας των κυττάρων ΗΤ22 από το οξειδωτικό στρες πραγματοποιήθηκαν στο Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών και Βιοτεχνολογίας (ΙΒΕΒ) του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, υπό την επίβλεψη του Διευθυντή Ερευνών Δρ Μιχάλη Αλέξη.

Για την πραγματοποίηση της παρούσας ερευνητικής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω:

Την υπεύθυνη Δρ Αναστασία Δέτση, Λέκτορα ΕΜΠ για την ανάθεση της Διπλωματικής Εργασίας και την ουσιαστική βοήθεια που μου προσέφερε, με την άψογη συνεργασία, τις πολύτιμες συμβουλές και την καθοδήγησή της σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της εργασίας.

Τον Δρ Μιχάλη Αλέξη, Διευθυντή Ερευνών στο ΙΒΕΒ, ΕΙΕ, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ σε αυτό το εργαστήριο, την άψογη συνεργασία, καθώς και τις ουσιαστικές συμβουλές που μου έδινε κατά τη διάρκεια της εργασίας μου εκεί.

Τη Μαρίνα Ρουσσάκη, υποψήφια διδάκτορα στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του ΕΜΠ, που με βοήθησε με πολύ υπομονή όποτε τη χρειάστηκα, τόσο σε εργαστηριακό επίπεδο όσο και για τη συγγραφή της παρούσας εργασίας.

Την κα Ζαμπία Κατσανεβάκη, ΕΕΔΙΠ στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας για τη βοήθειά της κατά τη διάρκεια εκπόνησης αυτής της εργασίας.

Τις Σοφία Ζέρβα και Βίκυ Κυριακού, μεταπτυχιακές φοιτήτριες και τη Δρ Αγγελική Μελίγκοβα, μεταδιδακτορική ερευνήτρια του ΙΒΕΒ ΕΙΕ, για την βοήθεια και τις πολύτιμες συμβουλές που μου προσέφεραν σε έναν άγνωστο για μένα τομέα.

Την Καθηγήτρια του Τμήματος Φαρμακευτικής ΑΠΘ Δήμητρα Χατζηπαύλου-Λίτινα, για τη διεξαγωγή των πειραμάτων αξιολόγησης της αντιφλεγμονώδους και αντιοξειδωτικής δράσης των μορίων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένεια μου καθώς και όλους τους φίλους μου που ήταν δίπλα μου ,με υποστήριζαν και με ενθάρρυναν κατά τη διάρκεια των σπουδών και κατά την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ βαθύτατα τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής: κ. Δ. Κέκο και κ. Α. Τσολομούτη για την τιμή που μου έκαναν να συμμετάσχουν στην εξεταστική επιτροπή.

Κεφάλαιο 1

Βιοϊσοστερής υποκατάσταση

1.1 Εισαγωγή

Η ανάπτυξη και η παραγωγή φαρμακευτικών μορίων αποτελούν διαδικασίες που διαρκούν τουλάχιστον μια δεκαετία και είναι αποτέλεσμα πολυετών ερευνητικών προσπαθειών. Σκοπός των επιστημόνων είναι η ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών μορίων με υψηλή αποτελεσματικότητα, δραστικότητα και ελάχιστες ανεπιθύμητες παρενέργειες. [1]

Μια ένωση-οδηγός (*lead compound LC*) με την επιθυμητή φαρμακολογική δράση μπορεί να σχετίζεται με ανεπιθύμητες παρενέργειες, χαρακτηριστικά που περιορίζουν τη βιοδιαθεσιμότητά του, ή δομικά χαρακτηριστικά τα οποία επηρεάζουν αρνητικά το μεταβολισμό και την απέκκριση του από τον οργανισμό. Λαμβάνοντας λοιπόν υπόψη τη δομή του μορίου, προτεραιότητα για ένα φαρμακευτικό χημικό είναι ο σχεδιασμός ενός ασφαλούς φαρμάκου. Με εφαρμογή της ισοστερείας και κατ' επέκταση της βιοϊσοστερείας επιτυγχάνεται η ορθολογική τροποποίηση των κυρίαρχων συστατικών και ο σχεδιασμός ασφαλών και κλινικά αποτελεσματικών φαρμάκων. [1]

Η επιτυχία αυτής της στρατηγικής στην ανάπτυξη νέων ουσιών οι οποίες θα είναι θεραπευτικά ελκυστικές είναι σημαντική και εφαρμόζεται εκτεταμένα από τις φαρμακευτικές βιομηχανίες είτε για την ανακάλυψη νέων αναλόγων θεραπευτικών καινοτομιών είτε σαν χρήσιμο εργαλείο στη μοριακή τροποποίηση. [1]

Ο φυσικός *Langmuir* εισήγαγε την έννοια της ισοστερείας το 1919 ενδιαφερόμενος κυρίως για τις φυσικοχημικές σχέσεις των ισοστερών μορίων. Η ισοστερεία βασίζεται στην αντικατάσταση ενός ατόμου ή μιας ομάδας ατόμων από ένα άλλο άτομο ή μια ομάδα ατόμων αντίστοιχα, τα οποία παρουσιάζουν συγκρίσιμη ηλεκτρονιακή διάταξη, δηλαδή παρόμοιο αριθμό ηλεκτρονίων σθένους. [2]

Όταν, επιπρόσθετα με τη φυσικοχημική αναλογία, οι ενώσεις μοιράζονται και κοινές ή ανταγωνιστικές βιολογικές ιδιότητες χρησιμοποιείται η έννοια της βιοϊσοστερείας η οποία εισήχθη από τον *Friedman* το 1951. [2]

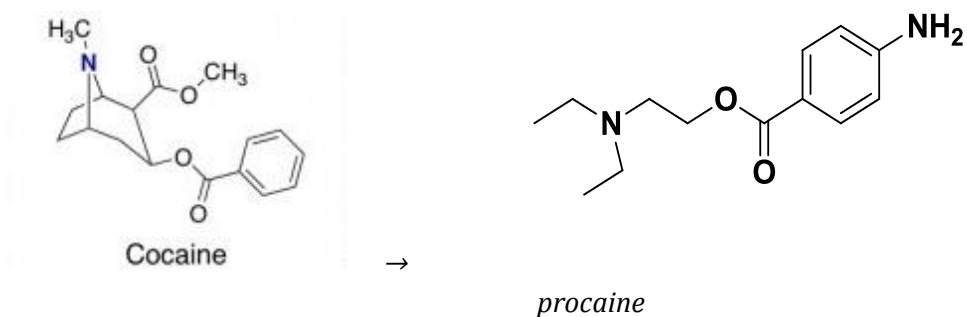
Η σύνθεση αναλόγων βιοδραστικών μορίων μέσω ισοστερών και βιοϊσοστερών αντικαταστάσεων εκπροσωπεί μια από τις βασικές δραστηριότητες στη Φαρμακευτική Χημεία. Πράγματι, στην ιστορία της φαρμακευτικής χημείας, όσο ανακαλύπτονται νέα, φυσικά ή συνθετικά, δραστικά συστατικά τόσο αυξάνονται οι προσπάθειες ώστε να σχηματισθούν τα ανάλογά τους. [2]

Υπάρχουν διάφοροι λόγοι εφαρμογής της βιοϊσοστερούς υποκατάστασης, ορισμένοι από τους οποίους είναι [1]:

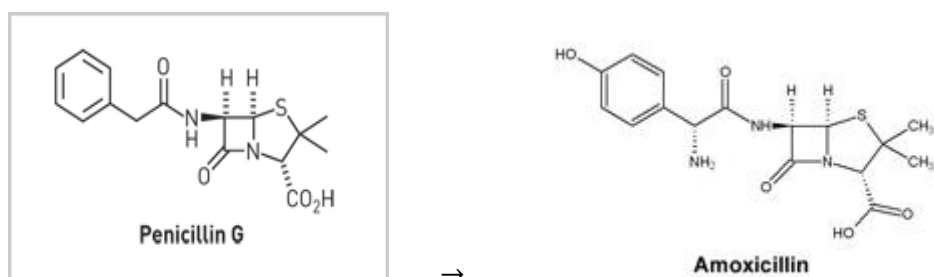
- ✚ Η Μεγαλύτερη εκλεκτικότητα για ένα συγκεκριμένο υποδοχέα.
- ✚ Οι λιγότερες παρενέργειες και η μειωμένη τοξικότητα.
- ✚ Η βελτιωμένη φαρμακοκινητική (διαλυτότητα και υδροφοβικότητα).
- ✚ Η αυξημένη σταθερότητα.
- ✚ Η απλοποιημένη σύνθεση.

Ιστορικά παραδείγματα σχεδιασμού αναλόγων είναι:

- Το προοδευτικό πέρασμα από το αλκαλοειδές κοκαΐνη στο τοπικό αναισθητικό προκαΐνη (νοβοκαΐνη) [2]



- Η μετάβαση από το φυσικό αντιβιοτικό, την πενικιλίνη, στο δραστικό λαμβανόμενο δια στόματος αντιβιοτικό αμοξικιλίνη. [2]



1.2 Προϋποθέσεις εφαρμογής της βιοϊσοστερούς υποκατάστασης.

Η σωστή εφαρμογή της βιοϊσοστερίας απαιτεί τη γνώση των φυσικών, χημικών, ηλεκτρονιακών και διαμορφωτικών παραμέτρων που υπεισέρχονται στη σχεδιασμένη βιοϊσοστερή υποκατάσταση. Οι παράμετροι αυτές θα πρέπει να αναλύονται προσεκτικά ώστε να μπορούν να προβλέψουν, θεωρητικά βέβαια, τυχόν αλλαγές στις φαρμακοδυναμικές και φαρμακοκινητικές ιδιότητες της προκύπτουσας ουσίας. [1]

Οι παράμετροι που υπεισέρχονται σε μια βιοϊσοστερή υποκατάσταση είναι οι ακόλουθες: [1], [3]

- ✚ Το μέγεθος, ο όγκος και η ηλεκτρονιακή διάταξη των ατόμων ή οι εκτιμήσεις ως προς τον βαθμό υβριδισμού, πολωσιμότητας και γωνιών δεσμών.
- ✚ Το βαθμό λιποδιαλυτότητας και υδατοδιαλυτότητας ώστε να μπορεί να προβλεφθεί η μεταβολή των φυσικοχημικών ιδιοτήτων όπως είναι οι $\log P$ και $\log K_a$.
- ✚ Η χημική δραστηριότητα των λειτουργικών ομάδων ή των βιοϊσοστερών δομικών υπομονάδων, κυρίως για την πρόβλεψη των σημαντικών αλλαγών κατά τη βιομετατροπή, μεταξύ των οποίων είναι και η μεταβολή του προφίλ τοξικότητας λόγω των μεταβολικών.
- ✚ Διαμορφωτικοί παράγοντες, όπως είναι η ικανότητα σχηματισμού διαμοριακών ή ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου.

Εκτός από τις παραμέτρους που αναλύθηκαν παραπάνω, θα πρέπει, για τη σωστή εφαρμογή της βιοϊσοστερούς υποκατάστασης, να ληφθούν υπόψη και ορισμένες προϋποθέσεις που αφορούν την ένωση-οδηγό και οι οποίες είναι: [1], [4]

- ✚ Η ένωση-οδηγός θα πρέπει να έχει μια πλήρως καθορισμένη χημική δομή.
- ✚ Ο μηχανισμός δράσης, κυρίως ως προς τον τρόπο με τον οποίο γίνεται η αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα, και τα μονοπάτια της μεταβολικής αδρανοποίησης της ένωσης θα πρέπει να είναι γνωστά.
- ✚ Σημαντικό, επίσης, είναι να διατίθενται οι κύριοι παράγοντες των φυσικοχημικών ιδιοτήτων οι οποίοι ρυθμίζουν τη βιοδιαθεσιμότητά της.
- ✚ Τέλος, σημαντικό βήμα είναι η γνώση των ανεπιθύμητων παρενεργειών της της ένωσης-οδηγού.

1.3 Σχεδιασμός αναλόγων και βιοϊσοστέρεια.

Στη φαρμακευτική βιομηχανία, όταν μια εταιρεία εγκαινιάζει ένα νέο φάρμακο, το οποίο προέρχεται από μια αυθεντική ανακάλυψη και αντιστοιχεί σε μια πραγματική θεραπευτική ανάγκη, οι ανταγωνιστές ξεκινούν αμέσως την αναζήτηση παρόμοιων δραστικών φαρμάκων με σκοπό να διατηρήσουν την θέση τους στην αγορά. Τα ανάλογα είναι απλά αντίγραφα ή εμφανίζουν κάποιες βελτιώσεις σε σχέση με το αυθεντικό φαρμακευτικό μόριο. [2]

Ο όρος «ανάλογο» προέρχεται από την ελληνική λέξη αναλογία και χρησιμοποιείται στις φυσικές επιστήμες από το 1791 για να περιγράψει δομική και λειτουργική ομοιότητα. Όσον αφορά τη φαρμακευτική χημεία, ο συγκεκριμένος ορισμός υπονοεί ότι το ανάλογο ενός υπάρχοντος φαρμακευτικού μορίου μοιράζεται χημικές και φαρμακευτικές ομοιότητες με το αυθεντικό συστατικό. [2]

Με βάση τον παραπάνω ορισμό, υπάρχουν τρεις κατηγορίες φαρμακευτικών αναλόγων: [2]

1. Αυτά που εμφανίζουν χημική και φαρμακολογική ομοιότητα.
2. Αυτά που παρουσιάζουν μόνο χημική ομοιότητα.
3. Αυτά που εμφανίζουν παρόμοιες φαρμακολογικές ομοιότητες αλλά έχουν τελείως διαφορετικές χημικές δομές.

Πρώτη κατηγορία: Τα ανάλογα που παρουσιάζουν χημικές και φαρμακολογικές ομοιότητες ονομάζονται *άμεσα ανάλογα*. Τέτοιου είδους ανάλογα αντιστοιχούν στην κατηγορία εκείνη των φαρμάκων που συχνά αναφέρονται ως «*me-too drugs*». [2]

Δεύτερη κατηγορία: Η δεύτερη κατηγορία αναλόγων αποτελείται από χημικά όμοια μόρια, τα οποία συνήθως ονομάζουμε «*δομικά ανάλογα*», αλλά παρουσιάζουν απρόσμενα διαφορετικές βιολογικές ιδιότητες. [2]

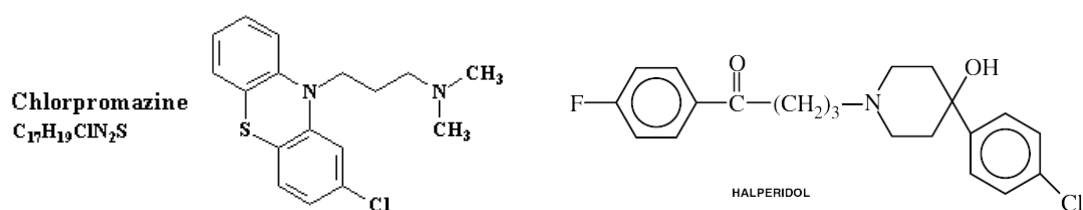
Ένα τυπικό παράδειγμα ενώσεων με παρόμοια χημική δομή αλλά τελείως διαφορετικές βιολογικές ιδιότητες είναι οι στεροειδείς ορμόνες: *τεστοστερόνη (testosterone)* και *προγεστερόνη (progesterone)*. [2]



Σχήμα 1: Δομές της τεστοστερόνης και της προγεστερόνης

Τρίτη κατηγορία: Σε αυτή τη κατηγορία αναλόγων συστατικών, τα μόρια έχουν διαφορετικές χημικές δομές, αλλά εμφανίζουν παρόμοιες βιολογικές ιδιότητες. Για τέτοιου είδους συστατικά προτείνεται ο όρος «λειτουργικά ανάλογα». Ο σχεδιασμός τέτοιων αναλόγων προς το παρόν διευκολύνεται χάρη σε ένα εικονικό έλεγχο μεγάλου αριθμού βιβλιοθηκών με ποικίλες δομές. [2]

Δυο παραδείγματα αναλόγων που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία είναι τα νευροληπτικά chlorpromazine και haloperidol. [2]



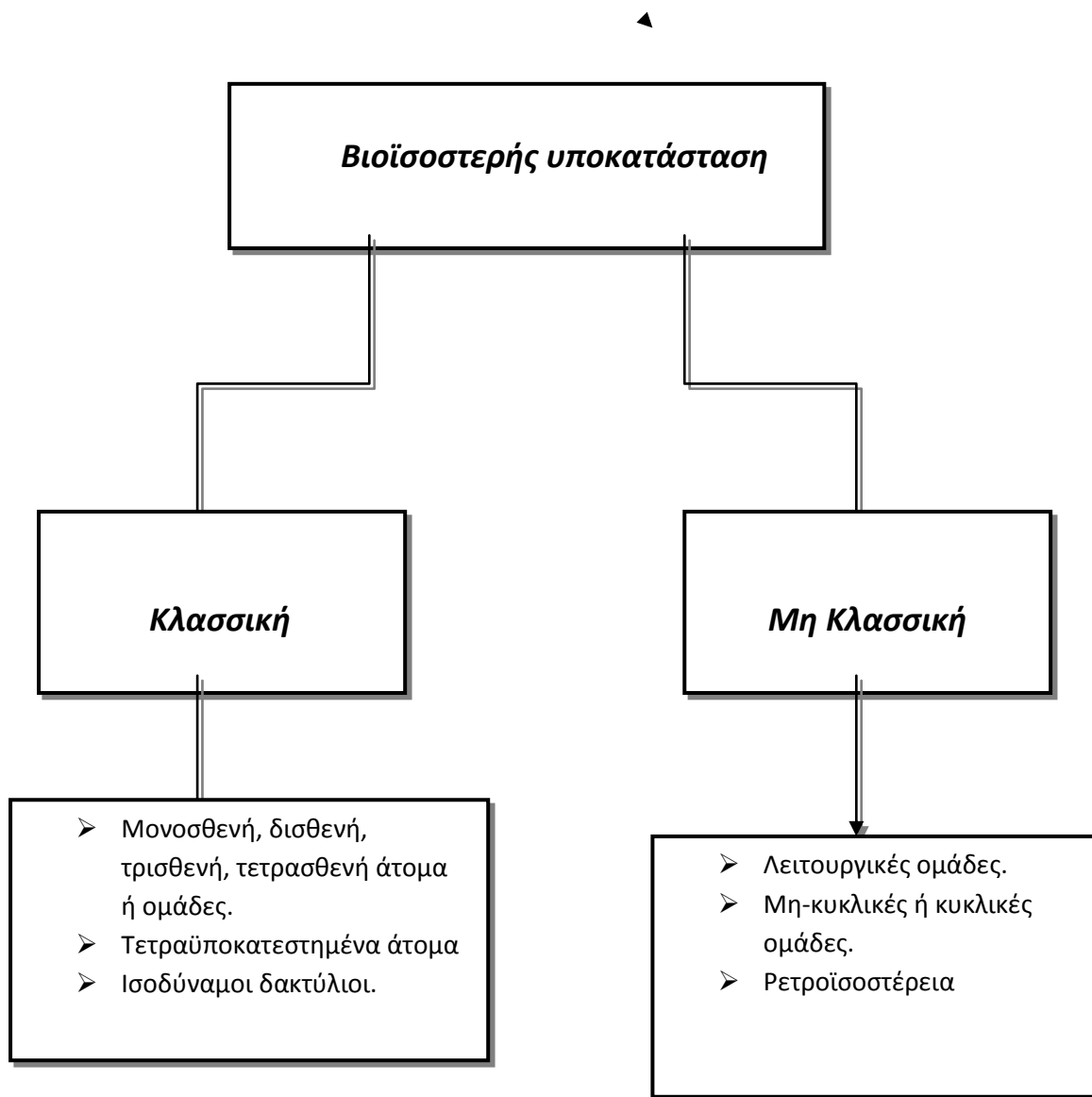
Σχήμα 2: Δομές των αναλόγων chlorpromazine και haloperidol

1.4 Ταξινόμηση της βιοϊσοστερούς υποκατάστασης.

Το 1970, ο Alfred Burger ταξινόμησε και υποδιείρεσε την βιοϊσοστερή υποκατάσταση σε δυο ευρείες κατηγορίες : την Κλασσική και τη Μη-Κλασσική βιοϊσοστερή υποκατάσταση. [1], [5]

Η ταξινόμηση αυτή βοήθησε στη διεύρυνση του ορισμού της κλασσικής βιοϊσοστερούς υποκατάστασης, εκφράζοντας ως κλασσικά βιοϊσοστερή ανάλογα: άτομα, μοριακές υπομονάδες ή λειτουργικές ομάδες του ίδιου σθένους και ισοδύναμους δακτυλίους. Αντίθετα, μη- κλασσικά βιοϊσοστερή ανάλογα θεωρούνται εκείνα που των οποίων ο ορισμός δεν ταιριάζει στην πρώτη κατηγορία αναλόγων. [4]

Στην Σχήμα 3 φαίνεται η κατηγοριοποίηση της βιοϊσοστερούς υποκατάστασης και το είδος των αναλόγων σε κάθε κατηγορία. [1], [4]



Σχήμα 3: Ταξινόμηση βιοϊσοστερών υποκατάστασης και κατηγορίες αναλόγων

Η ταξινόμηση με τον παραπάνω τρόπο, όπως προτάθηκε από τον Burger, για την βιοϊσοστερή υποκατάσταση, διεύρυνε τους ορισμούς που είχαν δοθεί για τα βιοϊσοστερή ανάλογα. Κατ' επέκταση, κλασσικά βιοϊσοστερή θεωρούνται τα άτομα ή οι μοριακές υπομονάδες ή οι λειτουργικές ομάδες με τον ίδιο αριθμό ηλεκτρονίων σθένους καθώς και οι ισοδύναμοι δακτύλιοι. Αντίθετα, τα μη- κλασσικά βιοϊσοστερή επεκτείνουν την έννοια της ισοστερείας σε δομικά στοιχεία τα οποία προσφέρουν μια πιο ουσιαστική και εξελιγμένη μορφή βιοχημικής απομίμησης, βασισμένη κυρίως σε λειτουργικές ομοιότητες, καθώς μπορεί να διαφέρουν σημαντικά ως προς την ηλεκτρονική, φυσικοχημική και τοπογραφική παρουσίασή τους [6]

Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται οι κυριότερες κλασικές βιοϊσοστερείς ομάδες και άτομα.[4]

Πίνακας 1: Κυριότερες κλασικές βιοϊσοστερείς ομάδες και άτομα.

Μονοσθενή	Δισθενή	Τρισθενή	Τετρασθενή
-OH, -NH ₂ , -OR, -CH ₃	-CH ₂	=CH-	=C=
-F, -Cl, -Br, -I, -SH, -PH ₂	-O-	=N-	=Si=
-Si ₃ , -SR	-S-	=P-	=N+=
	-Se-	=As-	=P+=
	-Te-	=Sb-	=As+=
			=Sb+=

Το 1925, ο Grimm διαμόρφωσε το *Νόμο Μετατόπισης Υδριδίου (hydride's displacement law)*, ο οποίος αποτελεί βασική αρχή για την εφαρμογή της κλασσικής βιοϊσοστερούς υποκατάστασης. Αποτελεί έναν εμπειρικό νόμο, ο οποίος αναφέρει ότι η προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου με ένα ελεύθερο ζεύγος ηλεκτρονίων σε ένα άτομο, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός άλλου ψευδοατόμου, με ίδιες φυσικές ιδιότητες με το αρχικό άτομο. Δηλαδή, με την προσθήκη ενός υδριδίου δημιουργούνται ψευδοάτομα με ίδιες φυσικές ιδιότητες. Τα άτομα αυτά διαθέτουν επίσης τον ίδιο αριθμό ηλεκτρονίων. [1]

Με εφαρμογή του νόμου του Grimm προκύπτει ο ακόλουθος πίνακας (Πίνακας 2), οι στήλες του οποίου αποτελούν τις κλασσικές βιοϊσοστερείς ομάδες. [1]

Πίνακας 2: Κλασσικές βιοϊσοστερείς ομάδες

<i>Αριθμός e</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>
	C	N	O	F	Ne	Na ⁺
		CH	NH	OH	FH	
			CH ₂	NH ₂	OH ₂	FH ₂ ⁺
				CH ₃	NH ₃	OH ₃ ⁺
					CH ₄	NH ₄ ⁺

1.5 Βιοϊσοστέρεια και μεταβολές στις φυσικοχημικές ιδιότητες.

Ορισμένες βιοϊσοστερείς ομάδες μπορούν να αλλάξουν δραματικά τις ιδιότητες των ουσιών, και κατά συνέπεια, τη δραστηριότητά τους. Υποκαταστάσεις μεταξύ διάφορων βιοϊσοστερών ομάδων δύνανται να προκαλέσουν μεταβολές στο pKa των συστατικών,

το οποίο είναι υπεύθυνο για τα φαρμακοκινητικό προφίλ μεταξύ των εν λόγω ισοστερών. [4]

Σε ότι αφορά τη μοριακή αναγνώριση ενός συγκεκριμένου τύπου υποδοχέα, η βιοϊσοστερής υποκατάσταση μπορεί να προκαλέσει κατάργηση της ιδιότητας της προσκολλησεως σε αυτή τη θέση ή αντίθετα την ενεργοποίησή της. Πιθανότατα, αυτό να οφείλεται σε σοβαρές μεταβολές των μοριακών ιδιοτήτων, όπως είναι η λιπιδική - υδατική διαλυτότητα, όπως και μεταβολές στη χημική δραστικότητα. [4]

Μια ακόμα μεταβολή που επέρχεται από την βιοϊσοστερή υποκατάσταση είναι η αλλαγή των όξινων ιδιοτήτων και κατ' επέκταση των χαρακτηριστικών δότη ή/ και υποδοχέα δεσμών υδρογόνου. [4]

Συμπερασματικά, όταν η βιοϊσοστερής υποκατάσταση λαμβάνει χώρα στο φαρμακοφόρο τμήμα μιας συγκεκριμένης δραστηρικής ουσίας, η σχετική δραστικότητα των παραγόμενων συστατικών μπορεί να μεταβληθεί δραματικά.

Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι αλλαγές στις φυσικοχημικές ιδιότητες έχουν διαπιστωθεί πειραματικά μέσα από εκτενείς μελέτες σε διάφορες περιπτώσεις βιοϊσοστερών υποκαταστάσεων. Παραδείγματα διάφορων ειδών υποκαταστάσεων παρουσιάζονται στη συνέχεια. [4]

1.6 Παραδείγματα κλασσικής βιοϊσοστερούς υποκατάστασης.

A. Βιοϊσοστερής υποκατάσταση μονοσθενών ομάδων ή ατόμων.

Αυτού του είδους η υποκατάσταση μπορεί να χωριστεί στις ακόλουθες κατηγορίες: i) υποκατάσταση μεταξύ ατόμου φθορίου και υδρογόνου, ii) ανταλλαγή μεταξύ αμινομάδας και υδροξυλίου, iii) ανταλλαγή μεταξύ θειόλης και υδροξυλίου, iv) ανταλλαγές μεταξύ φθορίου, υδροξυλίου, αμινομάδας και μεθυλομάδας (με βάση το νόμο μετατόπισης υδριδίου του Grimm) , v) ανταλλαγές μεταξύ χλωρίου, βρωμίου, θειόλης και υδροξυλίου (με βάση τη διευρυμένη ταξινόμηση κατά Erlenmeyer του νόμου μετατόπισης υδριδίου του Grimm). [1]

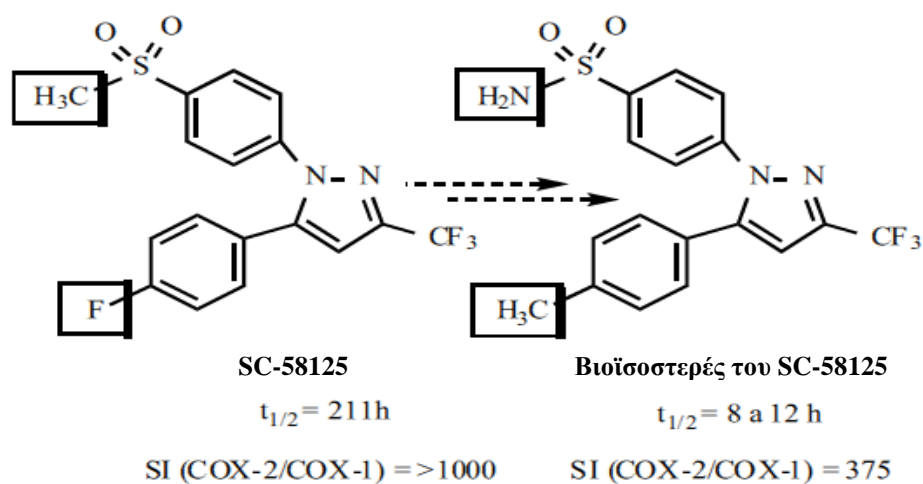
A1) Υποκατάσταση μονοσθενούς μεθυλομάδας (CH₃) με ένα άτομο φθορίου (F) ή μια αμινομάδα.

Συνεχίζοντας τις έρευνες για την ανακάλυψη νέων αντιφλεγμονωδών φαρμάκων, ο Penning και οι συνεργάτες του, στράφηκαν προς την εκλεκτική παρεμπόδιση της συνθάσης της προσταγλανδίνης-2 (Prostaglandin-H Synthase-2, PGHS-2) ή της κυκλοοξυγενάσης (cyclooxygenase-2, COX-2) . Στη μελέτη που πραγματοποίησαν, ερεύνησαν την επίδραση των ισοστερών τροποποιήσεων στη δομή

της ένωσης οδηγού SC-58125 (Σχήμα 4) με στόχο να βελτιώσουν τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες. [4]

Παρά τον υψηλό ρυθμό εκλεκτικότητας ως προς την PGHS-2 ($SI > 1000$) και τις καλές ανασταλτικές ιδιότητες, η ένωση- οδηγός SC-58125 παρουσιάζει χρόνο ημιζωής περίπου 200h, γεγονός που αντικατοπτρίζει τη χαμηλή ευαισθησία του στο σύστημα ενζύμων που εμπλέκεται στον ηπατικό μεταβολισμό των ξενοβιοτικών ουσιών. [4]

Για τους παραπάνω λόγους, οι ερευνητές πρότειναν δυο βιοϊσοστερείς υποκαταστάσεις μονοσθενών ομάδων, την αντικατάσταση της μεθυλομάδας (CH_3) με αμινομάδα (NH_2) και την εναλλαγή ενός ατόμου φθορίου (F) με μια μεθυλομάδα (Σχήμα 4). Και οι δυο προτεινόμενες υποκαταστάσεις επιτρέπουν, εισαγόμενες στην δομή του νέου βιοϊσοστερούς του SC-58125, τη δημιουργία νέων μεταβολικών θέσεων εκμεταλλευόμενες το αποτέλεσμα του πρώτου περάσματος μέσω των αντιδράσεων σύζευξης με γλυκουρονικό οξύ και βενζυλικής υδροξυλίωσης καταλυόμενη από το CYP450. [4]



Σχήμα 4

Το νέο βιοϊσοστερές βελτιστοποιημένο σε σχέση με το SC-58125, το οποίο ονομάζεται celecoxib, έχει χρόνο ημιζωής 8-12 h και εισήχθη στην αγορά της Βραζιλίας το 1999 από τα εργαστήρια Pfizer/ Searle με σκοπό την θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας αλλά και άλλων αντιφλεγμονωδών καταστάσεων. Αναφέρεται ως το πρώτο μη-στεροειδές αντιφλεγμονώδες φάρμακο (Non-Steroidal Antiinflammatory Drug, NSAID) το οποίο λειτουργεί επιλεκτικά έναντι στην PGHS-2 χωρίς να έχει τις τυπικές ερεθιστικές γαστρικές συνέπειες των πρώτης γενιάς NSAID's. [4]

A2) Υποκατάσταση ενός ατόμου υδρογόνου (H) με ένα άτομο φθορίου (F.)

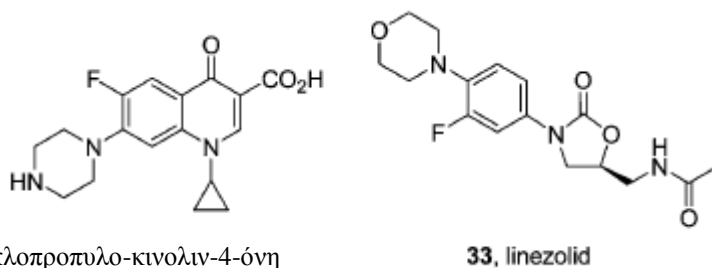
Οι μοναδικές ιδιότητες του φθορίου οδήγησαν σε εκτεταμένη εφαρμογή του στο σχεδιασμό φαρμάκων σαν ισοστερές του υδρογόνου, καθώς ενσωμάτωση αυτού του αναλόγου μπορεί να διαφοροποιήσει σημαντικά μια ποικιλία, ενδιαφέρουσων ως προς τη φαρμακευτική χημεία, ιδιοτήτων. [6]

Από μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 293 ζεύγη μορίων της συλλογής χημικών ενώσεων της Roche τα οποία διαφέρουν μόνο ως προς τις εναλλαγές φθορίου-υδρογόνου, αποκαλύφθηκε ότι η μέση λιποφιλικότητα (logD) αυξήθηκε κατά 0.25 λογαριθμικές μονάδες. Επίσης, το ιστόγραμμα των αποτελεσμάτων παρουσίασε μια κατανομή κατά Gauss η οποία εκτεινόταν και υπό του μηδενός, γεγονός που δείχνει πως σε ορισμένα περιβάλλοντα, η υποκατάσταση του υδρογόνου με ένα άτομο φθορίου μπορεί να μειώσει τη συνολική λιποφιλικότητα ενός μορίου. Σε περίπτωση που τα μόρια περιλάμβαναν και άτομα οξυγόνου, παρατηρήθηκε πως η χαμηλότερης ενέργειας διαμόρφωση είναι αυτή στην οποία το F βρίσκεται κοντά στο O και συγκεκριμένα όταν η απόσταση O-F είναι μικρότερη από 3.1 Å. [6]

Επίδραση της υποκατάστασης H-F στη δραστικότητα

Είναι επαρκώς τεκμηριωμένο ότι αυτού του είδους η υποκατάσταση μπορεί να έχει σημαντική επίδραση στη δραστικότητα. Σε μια σειρά N-κυκλοπροπυλο-κινολιν-4-ονών (Σχήμα.5), που δρουν ως αντιβακτηριδιακοί αναστολείς της γυράσης, η εισαγωγή ενός ατόμου φθορίου στον C-6 βελτίωσε τη δραστικότητα κατά 2 ως 7 φορές, αύξησε κατά 70 φορές την ικανότητα διείσδυσης στα κύτταρα, μείωσε τη δέσμευση των πρωτεϊνών στο πλάσμα και βελτίωσε το φαρμακοκινητικό προφίλ. [6]

Στην αντιβακτηριδιακή κατηγορία των οξαζολιδινονών, η προσθήκη σε μια στρατηγική θέση ενός ατόμου φθορίου αυξάνει τη δραστικότητα και την αποτελεσματικότητα in vivo και έχει κυκλοφορήσει στην αγορά με την ονομασία linezolid (Σχήμα 5). [6]



N-κυκλοπροπυλο-κινολιν-4-όνη

33, linezolid

Σχήμα 5

B. Βιοϊσοστερές υποκατάσταση δισθενών ομάδων ή ατόμων.

Οι ιδιότητες των κλασικών δισθενών ισοστερών ομάδων CH₂, S, O συνοψίζονται στον Πίνακα 3, μέσω του οποίου φανερώνονται οι ομοιότητες αλλά και ορισμένες

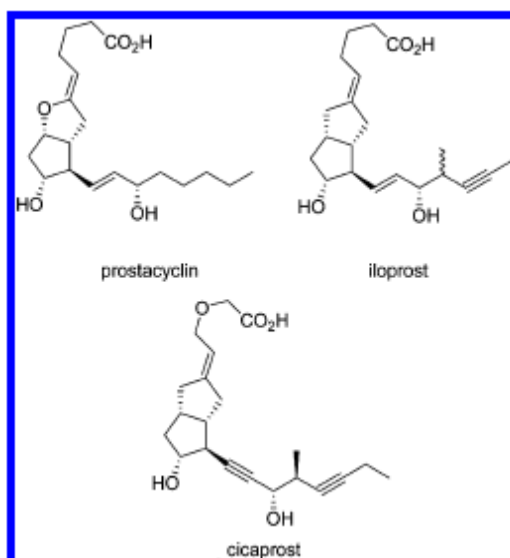
αξιοσημείωτες διαφορές οι οποίες μπορεί να επηρεάσουν σημαντικά το σχεδιασμό φαρμάκων. [6]

Πίνακας 3: Ιδιότητες κλασσικών δισθενών βιοίσοστερών ομάδων

Ιδιότητα	RCH_2-X-CH_2-R		
	X=CH ₂	X=O	X=S
Μήκος δεσμού C-X (Å)	1.54	1.43	1.81
Γωνία δεσμού CXC (°)	109.5	111	99
Απόσταση C---C (Å)	2.51	2.37	2.87
Ακτίνα van der waals του X (Å)	2.0	1.40	1.85
logP	3.39	0.77	1.95
Ηλεκτραρνητικότητα	2.27	3.51	2.32
Συνεισφορά στον όγκο van der waals (cm³/mol)	10.2	3.7	10.8

Ισοστερής υποκατάσταση μεταξύ CH₂/O σε μιμητές της προστακυκλίνης (PGI₂)

Η προστακυκλίνη (prostacyclin, PGI₂-Σχήμα 6) είναι ένας φυσικός μεταβολίτης του αραχιδονικού οξέος, ο οποίος λειτουργεί ως ισχυρός αναστολέας της συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων καθώς και ως αγγειοδιασταλτικό, αλλά χημικά είναι ασταθής ως αποτέλεσμα της παρουσίας της υδρολυτικά ευαίσθητης ομάδας ενολικού αιθέρα που περιέχει. [6]



Σχήμα 6

Αντικαθιστώντας το άτομο του οξυγόνου στον αιθέρα της ένωσης prostacyclin με την ομάδα CH_2 , επιλύθηκε το πρόβλημα της υδρολυτικής αστάθειας ενώ τροποποιώντας την β-πλευρά της αλυσίδας αποκαταστάθηκε η δραστηριότητα επιτρέποντας έτσι στην ένωση iloprost (Σχήμα 6) να λειτουργήσει ως μιμητής της προστακυκλίνης με παρόμοιο προφίλ με το φυσικό προϊόν. Η ένωση iloprost έχει χρόνο ημιζωής $T_{1/2} = 20-30 \text{ min}$ με την β-οξείδωση της ρίζας του καρβοξυλικού οξέος να αποτελεί την κύρια μεταβολική οδό.[6]

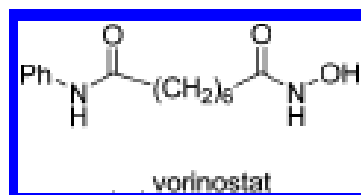
Σε μια τελευταία προσέγγιση, συνδυασμένη με περαιτέρω επεξεργασία της β-πλευράς της αλυσίδας, επιδιώχθηκε η δημιουργία της ένωσης cicaprost (Σχήμα 6), η οποία εμφάνισε υποτασική δραστηριότητα στους αρουραίους με χρόνους 2-3 φορές μεγαλύτερους σε σχέση με την ένωση iloprost (Σχήμα 6). [6]

Γ.Βιοϊσοστερής υποκατάσταση σε δακτύλιο.

Γ1) Η ομάδα $-\text{CHF}_2$ ως ισοστερής του υδροξυλίου των υδροξαμικών οξέων.

Τα υδροξαμικά οξέα είναι εξαιρετικοί υποκαταστάτες για τη συμπλοκοποίηση μετάλλων και ειδικότερα για τον ψευδάργυρο, και αποτελούν ένα σημαντικό στοιχείο-φορέα της φαρμακευτικής δράσης- τόσο σαν αναστολείς της μήτρας μεταλλοπρωτεάσης όσο και της ιστόνης αποακετυλάσης (HDAC). Παρόλα αυτά, τα υδροξαμικά οξέα μπορεί να εκφράσουν μια τοξικότητα η οποία βασίζεται σε μια μεταβολική ενεργοποίηση, που εκφράζεται είτε ως αναδιάταξη Lossen προς τα αντίστοιχα ισοκυανικά είτε ως υδρολυτική διάσπαση που απελευθερώνει καρβοξυλικό οξύ και υδροξυλαμίνη, με την τελευταία να είναι αιτία της μεθαιμοσφαιριναιμίας. [6]

Πολλά φάρμακα αποτελούμενα από υδροξαμικά οξέα έχουν επιτυχώς εισέλθει στην αγορά, με το πιο πρόσφατο να αποτελεί το vorinostat (Σχήμα 7) αναστολέας της HDAC) το οποίο χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του δερματικού T-λεμφώματος (CTCL). [6]



Σχήμα 7

Η δυνατότητα της ομάδας $-CHF_2$ να δρά ως ισοστερές του υδροξυλίου των υδροξαμικών οξέων έχει αξιολογηθεί μέσα από μια σειρά αναστολέων της 2-κυκλοοξυγενάσης (COX-2) και της 5-λιποξυγονάσης (LOX-5), μόρια σχεδιασμένα να αποτρέπουν το μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος μέσα από ένα εναλλακτικό δρόμο απλής αναστολής του ενζύμου με στόχο τη μείωση των παρενεργειών. [6]

Τα υδροξαμικά οξέα είναι καθιερωμένοι αναστολείς της 5-LOX και υποκατάσταση του τολουολίου της ένωσης (I) με ένα κυκλικό υδροξαμικό οξύ παράγει ένα διπλό αναστολέα, την ένωση (II). Το ανάλογο $NCHF_2$ ανακαλύφθηκε ως ένα μη-υδροξαμικού οξέος ισοστερές και αποτελεί μια αποτελεσματική ομάδα, παρόλο που ο μηχανισμός δράσης του δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως. [6]

Στον Πίνακα 4 φαίνονται οι δομές των ενώσεων I, II, και III καθώς και οι τιμές IC_{50} σχετιζόμενες με την αναστολή των COX-2 και 5-LOX. Παρατηρούμε ότι οι υποκαταστάτες του δακτυλίου έχουν σημαντική επίδραση στις τιμές IC_{50} και κατ' επέκταση στην αναστολή των ενζύμων. [6]

Πίνακας 4: Δομές των ενώσεων I, II και III καθώς και οι τιμές IC_{50} σχετιζόμενες με την αναστολή των COX-2 και 5-LOX.

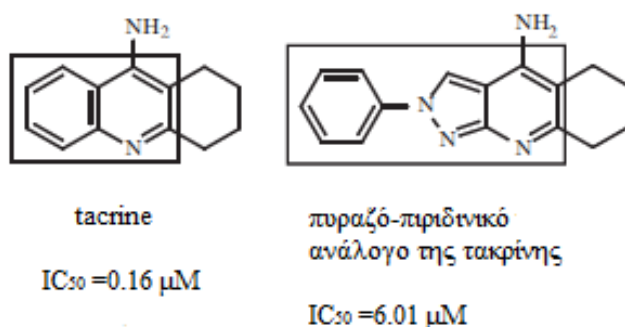
Compound	R		
	I	II	III
IC_{50} COX-1 (μ M)	7.7	10.2	13.1
IC_{50} COX-2 (μ M)	0.12	7.5	0.69
IC_{50} 5-LOX (μ M)	inactive	4.9	5.0
ED_{50} (mpk)	10.8	99.8	27.7

Παρατηρούμε ότι οι υποκαταστάτες του δακτυλίου έχουν σημαντική επίδραση στις τιμές IC_{50} και κατ' επέκταση στην αναστολή των ενζύμων.

Γ2) Εφαρμογή της βιοϊσοστερούς υποκατάστασης στο σχεδιασμό *me-too drugs*

Η χρήση της βιοϊσοστερούς υποκατάστασης σε δακτύλιο μπορεί να φανεί ιδιαίτερα χρήσιμη στο σχεδιασμό υποψήφιων νέων φαρμάκων βασισμένα σε μια ένωση- οδηγό, εν όψει της λεπτομερούς μελέτης σχετικά με τις συνεισφορές στην υδροφοβικότητα ως αποτέλεσμα των ισοδύναμων δακτυλίων. Η στρατηγική αυτή έχει αποδειχθεί ένα θεμελιώδες εργαλείο στο σχεδιασμό των «*me-too*» φαρμάκων, τα οποία ονομάζονται και θεραπευτικά αντίγραφα. [4]

Σε μια πρόσφατη μελέτη τους, ο Barreiro και οι συνεργάτες του περιέγραψαν τη σύνθεση νέων εκλεκτικών αναστολέων της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) , σχεδιασμένα βάσει τροποποιήσεων στην ένωση-οδηγό τακρίνη (tacrine). Αυτές οι τροποποιήσεις επέτρεψαν τον προσδιορισμό μιας νέας βιοϊσοστερούς σχέσης μεταξύ του πυρήνα της κινολίνης στην τακρίνη και του πυραζολο-πυριδινικού αναλόγου της τακρίνης (Σχήμα 8), η οποία φανέρωσε την ύπαρξη παρόμοιας ανασταλτικής ικανότητας της χολινεστεράσης του εγκεφάλου των αρουραίων. [4]



Σχήμα 8

1.7 Παραδείγματα μη- κλασσικής βιοϊσοστερούς υποκατάστασης.

A. Κυκλική και Μη-κυκλική βιοϊσοστερής υποκατάσταση

Σε αυτή τη κατηγορία μη- κλασσικής βιοϊσοστερείας, η βιοϊσοστερής υποκατάσταση λαμβάνει χώρα με τη μορφή της διάνοιξης ενός δακτυλίου, ή το σχηματισμό ενός δεσμού και δημιουργία του δακτυλίου.

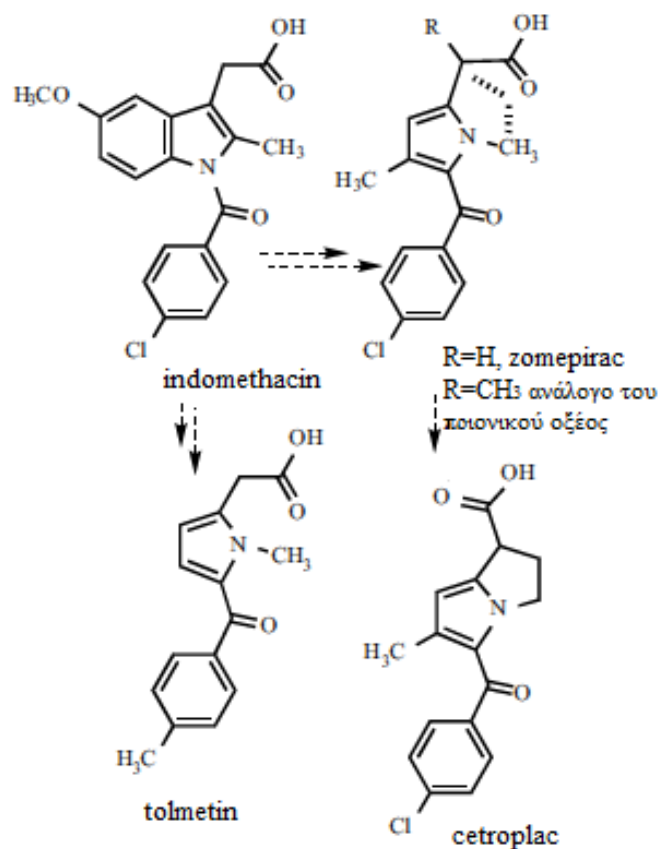
Στην κατηγορία των μη-στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (NSAIDs) , έχουν προκύψει διάφορα παραδείγματα από τη χρήση αυτής της στρατηγικής της

κυκλικής μη- κλασσικής βιοϊσοστερίας. Το 1987, ο Muchowsky και οι συνεργάτες του, ανέπτυξαν τη σύνθεση ενός νέου NSAID το οποίο ονομάζεται cetropnac (Σχήμα 9) και προέκυψε μέσα από κλείσιμο του δακτυλίου μεταξύ της μονάδας του οξικού οξέος και της ομάδας N-CH₃ της ένωσης- οδηγού tolmetin (Σχήμα 9) , η οποία αποτελεί ένα ευρέως γνωστό NSAID της κατηγορίας του ετεροαρυλοξικού οξέος. [4]

Το Tolmetin, με τη σειρά του, αναπτύχθηκε μέσω μοριακής τροποποίησης της δομής της ένωσης indomethacin (Σχήμα 9) η οποία αποτελεί ένα σημαντικό εκπρόσωπο της κατηγορίας των 3- ινδολυλ-οξικών οξέων με αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες . Για το σχεδιασμό της ένωσης tolmetin εφαρμόστηκε η αντίστροφη αρχή, εννοώντας τη μη-κυκλική, μη- κλασσική βιοϊσοστερή αντικατάσταση. Συγκεκριμένα, η υπομονάδα ινδολίου στην indomethacin αντικαταστάθηκε από δακτύλιο πυρρόλιου που φέρει βενζοϋλο-ομάδα στον C-2, καθώς αποτελεί το βιοϊσοδύναμο της παρα-χλωροβενζοϋλο-ομάδας. [4]

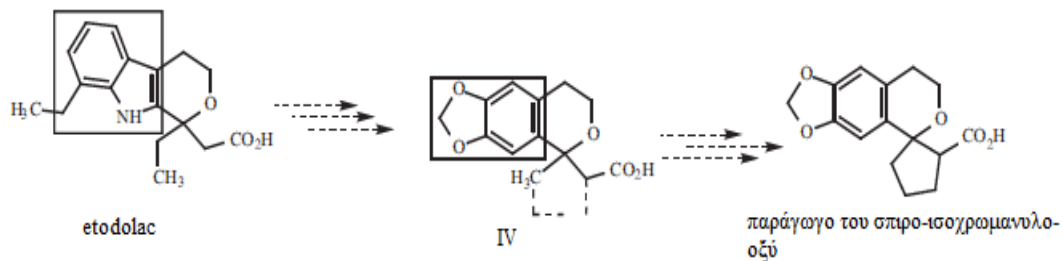
Εφαρμόζοντας την ίδια προσέγγιση, ο Carlson ανέπτυξε την ένωση zomepirac (Σχήμα 9) , έναν επιπλέον μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη παράγοντα της τάξης του πυρρόλο-2- οξικού οξέος. Αυτή η ένωση αποτελεί ένα ανάλογο της ένωσης tolmetin, με τη μόνη δομική διαφορά μεταξύ των δυο αυτών ενώσεων να είναι η ύπαρξη της ομάδας του μεθυλίου στον άνθρακα C-3. [4]

Το 1973, υπό το πρίσμα μελετών που πραγματοποιήθηκαν για την διερεύνηση της σχέσης μεταξύ της χημικής δομής των αρυλικών και ετεροαρυλοξικών παραγώγων , αναπτύχθηκε από τους Carlson και Wong ένα νέο αντιφλεγμονώδες παράγωγο, της κατηγορίας αναλόγων του προπιονικού οξέος (Σχήμα 9) το οποίο έδειξε ισχυρότερες αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες σε σχέση με την κατηγορία αναλόγων του οξικού οξέος. [4]



Σχήμα 9

Το 1995, οι Cabral και Barreiro εφήρμοσαν τη μη- κλασσική βιοϊσοστέρεια δακτυλίου σαν μια στρατηγική μοριακής τροποποίησης με στόχο να συνθέσουν διαμορφωτικά περιορισμένα ανάλογα του etodolac (Σχήμα 10), ενός σημαντικού φαρμάκου με αντιφλεγμονώδεις, αναλγητικές και αντιπυρετικές ιδιότητες. Σε αυτή τη μελέτη, ήταν εφικτή η παρατήρηση ότι το παράγωγο του σπιρο-ισοχρωμανυλο-οξέος (Σχήμα 10) παρουσιάζει καλύτερη αναλγητική δράση σε σύγκριση με τις ενώσεις- οδηγούς etodolac και IV (Σχήμα 10). [4]



Σχήμα 10

B. Βιοϊσοστέρεια ετεροκυκλικών δακτυλίων

Οι πενταμελείς και εξαμελείς ετεροκυκλικές ενώσεις διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο στο σχεδιασμό φαρμάκων, είτε ως «drug scaffolds» είτε ως κυρίαρχα δομικά στοιχεία. Η ευελιξία των ετεροκυκλικών ενώσεων βασίζεται στο μέγεθος και το σχήμα τους, τα οποία επιτρέπουν το σχεδιασμό της υποκατάστασής τους σε ένα εύρος φορέων, ενώ οι εγγενείς ηλεκτρονικές και φυσικές ιδιότητες είναι σημαντικές στη διαμεσολάβηση για την αλληλεπίδραση φαρμάκου-στόχου. [6]

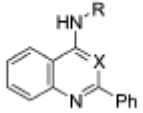
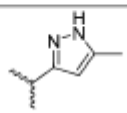
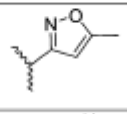
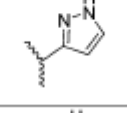
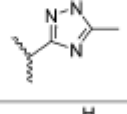
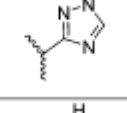
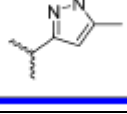
Οι πιο σημαντικές ιδιότητες στο σχεδιασμό φαρμάκων και την βιολειτουργική απομίμηση είναι οι ιδιότητες δότη ή δέκτη δεσμών υδρογόνου (N-H, O-H, C-H) και η δυνατότητα συμμετοχής σε π-π αλληλεπιδράσεις. [6]

Με προσεκτική επιλογή και χρήση των διάφορων υποκαταστατών, οι ηλεκτρονικές και φυσικές ιδιότητες καθώς και η οξύτητα και βασικότητα μπορούν εύκολα να διαμορφωθούν σε ένα σταδιακά διαβαθμισμένο χώρο, ειδικά για τις ακόρεστες ετεροκυκλικές ενώσεις. [6]

Με βάση λοιπόν τα παραπάνω, ομάδες με παρόμοιες τιμές στις παραπάνω ιδιότητες καθίσταται λειτουργικές και μπορούν να συμμετάσχουν σε μη- κλασσικές βιοϊσοστερείς υποκαταστάσεις.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η σύνθεση βιοϊσοστερών αναλόγων που δρουν ως αναστολείς της πρωτεϊνικής κινάσης GSK3 (Πίνακας 5)

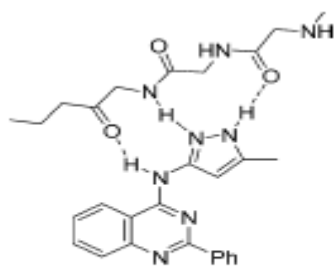
Πίνακας 5: Βιοϊσοστερή ανάλογα που δρουν ως αναστολείς της πρωτεϊνικής κινάσης GSK3

			
Compd #	X	R	GSK3 K _i (μM)
4-αμινοκιναζόλινο παράγωγο	N		0.024
ισοξαζόλιο	N		>2.0
πυραζόλιο	N		0.11
τριαζόλιο	N		23
V	N		0.25
VI	CH		2.5

Η πρωτεϊνική κινάση GSK3 θεωρείται ότι εμπλέκεται σε διάφορες κυτταρικές σηματοδοτικές οδούς και αποτελεί ένα πιθανό μοριακό στόχο για τον διαβήτη τύπου 2 και τη νόσο Alzheimer, στην οποία έχουν διαπιστωθεί υψηλά επίπεδα GSK3. Η GSK3 μπορεί επίσης να συμμετέχει και στο νευρωνικό κυτταρικό θάνατο, ενώ οι αναστολείς της μμούνται τη δράση διάφορων σταθεροποιητών, όπως το λίθιο και το βαλπροϊκό οξύ. [6]

Το 2001 επετεύχθη η πλήρης διεκρίνιση της δομής του ενζύμου, διευκολύνοντας με αυτό τον τρόπο το σχεδιασμό αναστολέων με διαφορετικές χημικές δομές αλλά παρόμοια βιολογική δραστικότητα. [6]

Μια αρχική προσέγγιση αποτελεί το 4-αμινοκιναζόλινο παράγωγο η ανάλυση της δομής του οποίου επιβεβαίωσε τον μηχανισμό της αναστολής και φανέρωσε τρεις αλληλεπιδράσεις με το ένζυμο με τη μορφή δεσμών υδρογόνου (Σχήμα 11). [6]



**4-αμινοκιναζολινικό
παράγωγο**

Σχήμα 11: Η αλληλεπίδραση μέσω δεσμών υδρογόνου μεταξύ του 4-άμινοκιναζολινικού παραγώγου και της κινάσης

Το ισοξαζόλιο (Πίνακας 5) παρουσίασε χαμηλή δραστηριότητα γεγονός που εξηγείται από την έλλειψη μιας ομάδας- δότη δεσμών υδρογόνου , ενώ η 4 φορές μειωμένη δραστηριότητα του πυραζολίου (Πίνακας 5) αποδίδεται σε έλλειψη σημαντικής υδροφοβικής αλληλεπίδρασης η οποία σχετίζεται με την ομάδα μεθυλίου του ισοξαζολίου. Παρόλα αυτά, η αντικατάσταση του πυραζολικού δακτυλίου της ένωσης του ισοξαζολίου από ένα τριαζόλιο (Πίνακας 5), η οποία διατηρεί την ικανότητα του δότη δεσμών υδρογόνου, οδήγησε σε 1000- φορές μείωση της δραστηριότητας. Επιπρόσθετα, αφαιρώντας την ομάδα $-CH_3$ σχηματίστηκε η ένωση V η οποία είναι 100 φορές δραστηριότερη.[6]

Γ. Βιοϊσοστέρια λειτουργικών ομάδων

1. Βιοϊσοστερή της ομάδας του υδροξυλίου

Τα μη- κλασσικά βιοϊσοστερή της ομάδας του φαινολικού υδροξυλίου (Πίνακας 6) γενικά δε μοιάζουν μεταξύ τους όσον αφορά το μέγεθος και τη δυνατότητά τους να δράσουν ως δότες ηλεκτρονίων. [7]

Πίνακας 6: Μη-κλασσικά βιοϊσοστερή της ομάδας του φαινολικού υδροξυλίου.

bioisosteres	σ_p	π	MR
OH	-0.37	-0.67	2.85
CH ₂ OH	0.00	-1.03	7.19
NHCONH ₂	-0.24	-1.30	13.72
NHCOCH ₃	0.00	-0.97	14.93
NHSO ₂ CH ₃	0.03	-1.18	18.17
NHCN	0.06	-0.26	10.14

Η ομάδα του υδροξυμεθυλίου είναι η πιο κοντινή σε μέγεθος με το φαινολικό υδροξύλιο αλλά η δράση τους είναι πολύ διαφορετική. Έτσι, η ομάδα αυτή είναι ακατάλληλη στις εφαρμογές εκείνες όπου η βιολογική δραστηριότητα επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από το μέγεθος και τις ηλεκτρονικές παραμέτρους. [7]

2. Βιοϊσοστερή της ομάδας του καρβονυλίου

Τα βιοϊσοστερή της ομάδας του καρβονυλίου (Πίνακας 7) αναφέρονται σε αντικαταστάσεις οι οποίες έχουν αρχικά χρησιμοποιηθεί για την ομάδα της αλδεΐδης και της κετόνης. Η διαφορά στην ηλεκτραρνητικότητα μεταξύ του άνθρακα και του οξυγόνου οδηγεί σε μια εν μέρει θετική φόρτιση του ατόμου του άνθρακα, ενώ το άτομο του οξυγόνου χρειάζεται ένα αρνητικό φορτίο. [7]

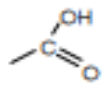
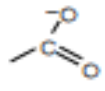
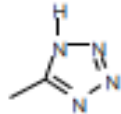
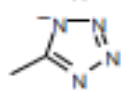
Πίνακας 7: Μη-κλαστικά βιοϊσοστερή της ομάδας του καρβονυλίου.

bioisosteres	σ_p	π	MR
SOCH ₃	0.49	-1.58	13.70
SO ₂ CH ₃	0.72	-1.63	13.49
CH=NOH	0.10	-0.38	10.28
CH=NOCH ₃	0.30	0.40	14.93

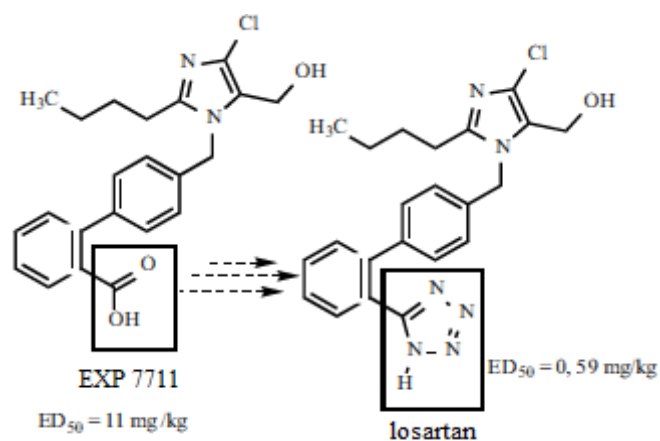
3. Βιοϊσοστερή της ομάδας του καρβοξυλίου.

Τα σουλφοναμίδια (Πίνακας 8) αποτελούν μια βασική βιοϊσοστερή ομάδα του καρβοξυλίου η οποία έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετές υποκαταστάσεις. Παρόλα αυτά, εκτεταμένη εφαρμογή ως φαρμακευτικός παράγοντας γνωρίζει η ομάδα του τετραζολίου (Πίνακας 8) η οποία παρουσιάζει 10 φορές μεγαλύτερη λιποφιλικότητα αλλά παρόμοια οξύτητα (pH= 4.9) συγκρινόμενη με την ομάδα του καρβοξυλίου. [7]

Πίνακας 8: Μη- κλασικά βιοϊσοστερή της ομάδας του καρβοξυλίου.

bioisosteres	σ_p	π	MR
	0.45	-0.32	6.9
	0.00	-4.36	6.0
	0.56	-0.48	15.6
	0.35	-3.55	14.6

Η βιοϊσοστερής σχέση μεταξύ της ομάδας του τετραζολίου και της ομάδας του καρβοξυλικού οξέος φαίνεται μέσα από σύγκριση των δομών της ένωσης losartan (Σχήμα 12) , η οποία αποτελεί ένα ανταγωνιστή των υποδοχέων της αγγειοτασίνης ο οποίος εγκρίθηκε το 1995 για τη θεραπεία της υπέρτασης, με την ένωση- οδηγό EXP 7711 (Σχήμα 12). [4]



Σχήμα 12

4. Βιοϊσοστερή της ομάδας του αμιδίου.

Οι βιοϊσοστερείς υποκαταστάσεις της ομάδας του αμιδίου εκπροσωπούν μια σημαντική κατηγορία λόγω των εφαρμογών της στη χημεία του πεπτιδίου και στην ανάπτυξη μιμητών των πεπτιδίων. Οι πεπτιδικοί δεσμοί καθώς και τα θραύσματα των πεπτιδίων έχουν αντικατασταθεί από μια μεγάλη ποικιλία δομικών ομάδων με στόχο να μετατραπούν τα πεπτίδια σε χημικά σταθερά μόρια. [7]

Στον Πίνακα 9 φαίνονται οι πιθανές βιοϊσοστερείς υποκαταστάσεις για τον αμιδικό δεσμό. Η ικανότητα αυτών των ομάδων να αποτελέσουν κατάλληλα βιοϊσοστερή εξαρτάται από το ρόλο που διαδραματίζει η ομάδα του αμιδίου στο να προκαλεί την βιολογική δραστηριότητα και την ικανότητα του βιοϊσοστερούς να μιμηθεί το ρόλο αυτό όσο το δυνατόν καλύτερα. [7]

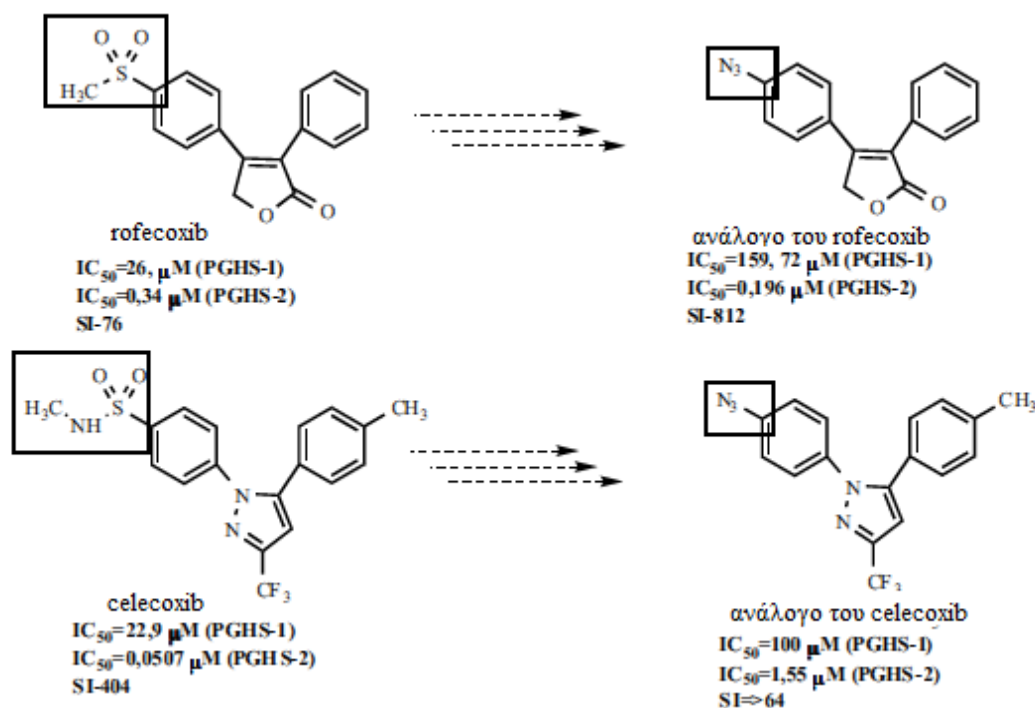
Πίνακας 9: Μη-κλασικά βιοϊσοστερή του αμιδικού δεσμού.

Βιοϊσοστερές	Δομή
Αμίδιο	-CONH-
Αντίστροφο αμίδιο	-NHCO-
Θειοαμίδιο	-NHCS-
Ομόλογο αμιδίου	-CH ₂ NHCO-
Κετομεθυλένιο	-COCH ₂ -
Ουρία	-NHCONH-
Μεθυλενοάμινο	-CH ₂ NH-
Καρβαμίδιο	-NHCO ₂ -
Θειοκαρβαμίδιο	-NHCOS-
Εστέρας	-CO ₂ -
Σουλφοναμίδιο	-NHSO ₂ -
Υδροξυαιθυλένιο	-CH(OH)CH ₂ -

Το 2001 ο Habeeb και οι συνεργάτες του περιέγραψαν το σχεδιασμό τη σύνθεση νέων αναλόγων για τις ενώσεις celecoxib (Σχήμα 13) και rofecoxib (Σχήμα 13), τα οποία αποτελούν μη-στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα δεύτερης γενιάς, αναφέροντας για πρώτη φορά τη βιοϊσοστερή σχέση ανάμεσα στο μεθυλοσουλφοναμίδιο, τη μεθυλοσουλφόνη και τις άζιδο-λειτουργικές ομάδες. [4]

Η βιοϊσοστερεία μεταξύ των λειτουργικών ομάδων του μεθυλοσουλφοναμιδίου CH₃SO₂NH- (Σχήμα 13), του σουλφονιλαμιδίου -SO₂NHCH₃ (Σχήμα 13) και της μεθυλοσουλφόνης CH₃SO₂- (Σχήμα 13) είναι γνωστή μέσα στην κατηγορία των εκλεκτικών αναστολέων του PGHS-2, καθώς αποτελεί τις συνεισφορές του σε άλλους φαρμακοκινητικούς και φαρμακοδυναμικούς παράγοντες. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από αυτές τις μελέτες έδειξαν ότι η άζιδο-ομάδα -N₃ (Σχήμα 13) είναι

ικανή να πραγματοποιεί ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με αμινοξέα της δραστηκής πλευράς του ενζύμου PGHS ενώ αποτελεί αυθεντικό βιοϊσοστερές των ομάδων του μεθυλοσουλφοναμιδίου και της μεθυλοσουλφονής παρουσιάζοντας συγκρίσιμο μοριακό όγκο και ηλεκτροστατικό δυναμικό. [4]



Σχήμα 13: Δομές των αναλόγων του rofecoxib και celecoxib καθώς και οι τιμές IC_{50} της δράσης τους έναντι στα ένζυμα PGHS-1, PGHS-2

Δ. Ρετροϊσοστέρια

Η ρετροϊσοστέρια βασίζεται στην αναστροφή μιας καθοριστικής λειτουργικής ομάδας παρούσα στη δομή μιας ένωσης- οδηγού, παράγοντας με αυτό τον τρόπο ένα ισοστερές με την ίδια λειτουργία. Αυτού του είδους η στρατηγική, η οποία χρησιμοποιείται και για τη σύνθεση των ενώσεων της παρούσας διπλωματικής εργασίας, σκοπεύει στη βελτιστοποίηση των φαρμακοθεραπευτικών ιδιοτήτων της αρχικής ένωσης -οδηγού και πιο συγκεκριμένα στο να βελτιστοποιηθεί το προφίλ της αλληλεπίδρασης με τον βιοϋποδοχέα στο σχεδιασμό φαρμάκων με χρόνο ημιζωής πιο κατάλληλο για φαρμακευτική χρήση. Τέλος, η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιείται και σε μια προσπάθεια να αποφευχθεί ο σχηματισμός των εν δυνάμει τοξικών μεταβολικών ενδιάμεσων. [4]

Η τεχνική της ρετροϊσοστέριας έχει εφαρμοστεί εκτενώς στο σχεδιασμό αναλόγων για τους αναστολείς της 5- λιποξυγονάσης. Ανάμεσα στις διάφορες κατηγορίες αναστολέων της 5-λιποξυγονάσης (5-LOX), μπορούμε να ξεχωρίσουμε τα υδροξαμικά

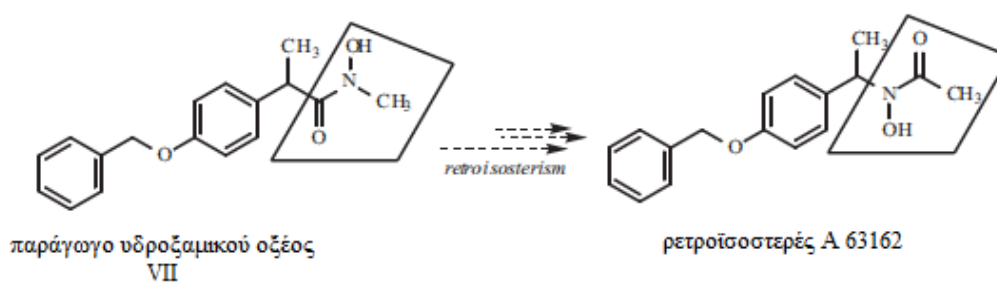
οξέα τα οποία λειτουργούν μέσω του σχηματισμού συμπλόκων με τα ιόντα σιδήρου (Fe^{3+}) του ενεργού κέντρου του ενζύμου. [4]

Διάφορες έρευνες έχουν δείξει ότι πολλά υδροξαμικά οξέα είναι δυνητικοί αναστολείς του ενζύμου *in vitro*, αλλά αποτυγχάνουν να παράγουν αναστολή *in vivo*. Αυτή η διαφοροποίηση μεταξύ *in vivo* και *in vitro* αναστολής μπορεί να εξηγηθεί μέσα από φαρμακοκινητικές μελέτες μεταξύ διάφορων υδροξαμικών οξέων, οι οποίες φανέρωσαν το μεταβολισμό αυτών των ενώσεων σε αδρανή παράγωγα καρβοξυλικού οξέος τα οποία παρεμποδίζουν τη σύνθεση των λευκοτριενίων. [4]

Το 1998, ο Summers και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι τα υδροξαμικά οξέα με ανασταλτική δράση έναντι της 5-LOX έχουν μικρού μεγέθους υποκαταστάτες (υδρογόνο ή μεθύλιο) συνδεδεμένους με το άζωτο του υδροξαμικού οξέος και σχετικά μεγαλύτερου μεγέθους προσαρτημένους στην ομάδα του καρβονυλίου. Βασισμένοι σε αυτή τη παρατήρηση, πρότειναν το σχηματισμό του ρετροϊσομερούς A 63162 (Σχήμα 14) μέσα από εφαρμογή της στρατηγικής της ρετροϊσομερείας στη δομή του παραγώγου του υδροξαμικού οξέος VII (Σχήμα 14). [4]

Η μελέτη της φαρμακοκινητικής συμπεριφοράς του ρετροϊσομερούς A 63162 έδειξε πως χορήγησή του δια στόματος σε ποντικούς, παρήγαγε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε πλάσμα και μεγαλύτερη διάρκεια (140 μM σε 3 h) σε σχέση με το παράγωγο του υδροξαμικού οξέος VII (15 μM σε 30 min) για δόση 100 mg/Kg. [4]

Σε ότι αφορά το φαρμακοδυναμικό προφίλ, οι φαρμακολογικοί προσδιορισμοί που πραγματοποιήθηκαν για το υδροξαμικό οξύ VII και το ρετροϊσομερές A 63162 έδειξαν πως η ένωση A63162 είναι σημαντικά πιο αποτελεσματική στην αναστολή της σύνθεσης λευκοτριενίων με $ED_{50} = 8$ mg/kg ενώ το υδροξαμικό οξύ VII έχει $ED_{50} = 40$ mg/kg. [4]



Σχήμα 14

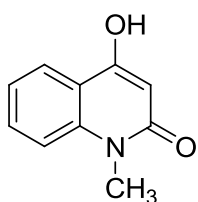
Κεφάλαιο 2

Κινολινόνες

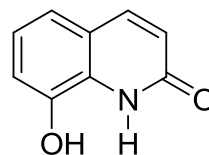
2.1 Φυσικά προϊόντα κινολινονών και κινολονών

Οι κινολινόνες αποτελούν ετεροκυκλικές αζωτούχες ενώσεις που απαντώνται ως φυσικά προϊόντα, κυρίως με τη μορφή αλκαλοειδών, ως χημικά ενδιάμεσα στο βιοσυνθετικό μονοπάτι άλλων φυσικών προϊόντων και ως συστατικά προϊόντων μεταβολισμού ορισμένων μικροοργανισμών.

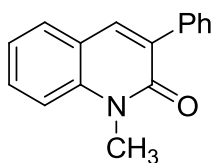
Ανάλογα με το είδος των υποκαταστάσεων στους άνθρακες του συστήματος των ετεροκυκλικών δακτυλίων μπορεί να προκύψουν ποικίλες δομές κινολινονών, χαρακτηριστικά παραδείγματα των οποίων παρουσιάζονται παρακάτω :



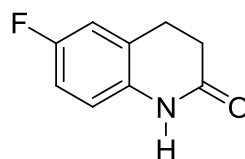
4-hydroxy-1-methyl-2-quinolinone



8-hydroxy-3,4-dihydro-2-quinolinone



1-Methyl-3-phenyl-2(1H)-quinolinone

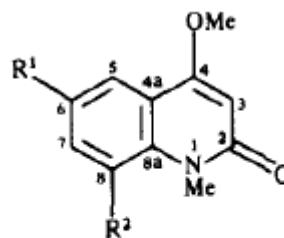
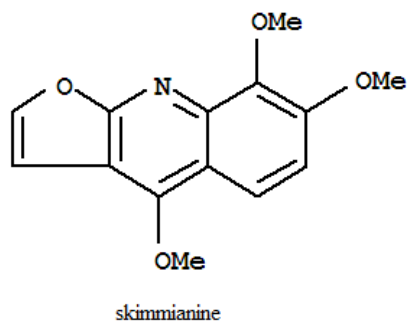


3,4-Dihydro-6-fluoro-2(1H)-quinolinone

Σχήμα 15 : Διάφορες δομές κινολινονών

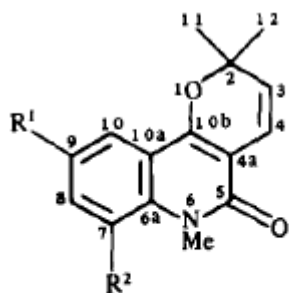
Αλκαλοειδή κινολινών και 2- ή 4- υποκατεστημένων κινολινονών απαντώνται σε ποικίλα φυσικά προϊόντα. Ένας μεγάλος αριθμός αξιοσημείωτων φαρμακολογικών ιδιοτήτων έχει αποδοθεί στα παράγωγα των 2- κινολινονών. [8]

Κατά τη διάρκεια φυτοχημικών ερευνών στα φυτά της οικογένειας Rutaceae της Νότιας Αφρικής, η ερευνητική ομάδα του Campbell και των συνεργατών του απομόνωσε από διάφορα είδη του γένους *Agathosma*, μια σειρά αλκαλοειδών κινολίνης και κινολινόνης, που φέρουν ποικιλία υποκαταστατών (Σχήμα 18). [9]



I: $R^1 = H, R^2 = OMe$

II: $R^1 = OMe, R^2 = H$



πυρανοκινολινικό παράγωγο

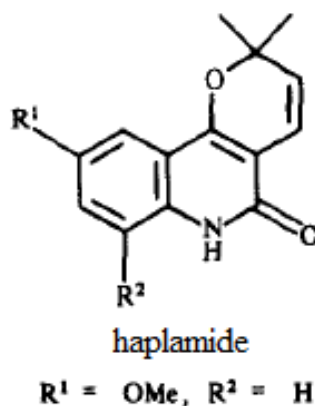
$R^1 = OMe, R^2 = H$

Σχήμα 16: Αλκαλοειδή κινολίνης και κινολινόνων από το γένος *Agathosma* της οικογένειας Rutaceae.



Εικόνα 1: Φυτό του γένους *Agathosma* της οικογένειας Rutaceae.

Ένα ακόμα συστατικό το οποίο εξήχθη σε πολύ μικρές ποσότητες από αυτή την ποικιλία φυτών με τη μορφή ελαίου έχει τη χαρακτηριστική δομή της πυρανοκινολίνης. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι αποτελεί το πρώτο πυρανοκινολινικό αλκαλοειδές (Σχήμα 16) το οποίο απαντάται στο δυόσμο (*Diosmae*) και αποτελεί N-μέθυλο παράγωγο του αλκαλοειδούς haplamide (Σχήμα 17), συστατικό το οποίο εξήχθη από το γένος *Haplophyllum perforatum*. [9]



Σχήμα 17: Η ένωση haplamide του φυτού *Haplophyllum perforatum*.

Τα αλκαλοειδή των κινολινονών από αυτή την οικογένεια φυτών Rutaceae έδειξαν μια ποικιλία βιολογικών ιδιοτήτων, όπως αντιβακτηριακές, αντιμυκητιακές και αντιαρκτικές. Οι 3-αλογο-2(1H)-κινολινόνες έχουν χρησιμοποιηθεί σαν καρδιακά διεγερτικά και ζιζανιοκτόνα, ενώ οι 3-αρυλο-4-υδροξυ-2(1H)-κινολινόνες χρησιμεύουν σαν ενδιάμεσα στη σύνθεση μη-πεπτιδικών ανταγωνιστών υποδοχέων του GnRH. Επιπροσθέτως, έχει αναφερθεί ότι ορισμένα παράγωγα της 4-υδροξυ-2(1H)-κινολινόνης παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα δραστηριότητας έναντι του ιού HIV-1. Περισσότερα σχετικά με τη φαρμακευτική και βιολογική δράση των κινολινονών θα αναφερθούν στη συνέχεια. [10]

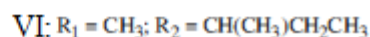
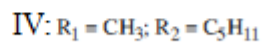
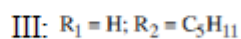
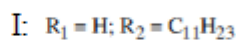
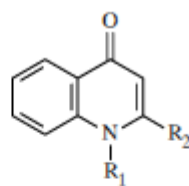
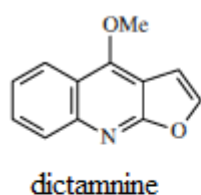
Αλκαλοειδή με δομικό χαρακτηριστικό το σύστημα συμπυκνωμένων δακτυλίων της 4-(1H)-κινολινόνης και της φουροκινολίνης, τυπικά παραδείγματα αλκαλοειδών από την οικογένεια φυτών Rutaceae, έχουν καταγραφεί από πλήθος διάφορων φυτών αυτής της οικογένειας. [11]

Το *Boronia ternata* είναι ένα ενδημικό είδος που βρίσκεται στο νοτιοδυτικό τμήμα της δυτικής Αυστραλίας. Από το συγκεκριμένο είδος επετεύχθη η απομόνωση και εκχύλιση με χρήση αιθανόλης έξι παραγώγων της 4-(1H)-κινολινόνης. [12]



Εικόνα 2: Το φυτό *Boronia ternata* της οικογένειας *Rutaceae*.

Το αλκαλοειδές dictamnine (furoquinoline) (Σχήμα 18) ταυτοποιήθηκε με απευθείας σύγκριση με το πρωτότυπο δείγμα. Τα παράγωγα 2-ενδεκυλο-4(1H)-κινολινόνη (Σχήμα 18) , 2-δωδεκυλο-4(1H)-κινολινόνη (Σχήμα 18) απομονώθηκαν από δυο άλλα είδη της οικογένειας *Rutaceae*, το *Ruta graveolens* και *Ptelea trifoliata* . Το τρίτο παράγωγο 2-n-προπυλο-4(1H)-κινολινόνη (Σχήμα 18) απομονώθηκε από το φυτό *Boronia alutata*. [12]



Σχήμα 18: Παράγωγα κινολίνης και κινολινονών του φυτού *Boronia ternata*.

Το *Harporhylum* A. Juss είναι ένα γένος μικρών, ανθοφόρων και πολυετών φυτών τα οποία βρίσκονται διασκορπισμένα από τις μεσογειακές ακτές της Ευρώπης και της Αφρικής μέχρι τη Σιβηρία. Το συγκεκριμένο είδος φυτών είναι γνωστό για το πλούσιο περιεχόμενό του σε αλκαλοειδή κινολίνης, γεγονός που αποδεικνύεται σε πολλές μελέτες των τελευταίων χρόνων. [13]

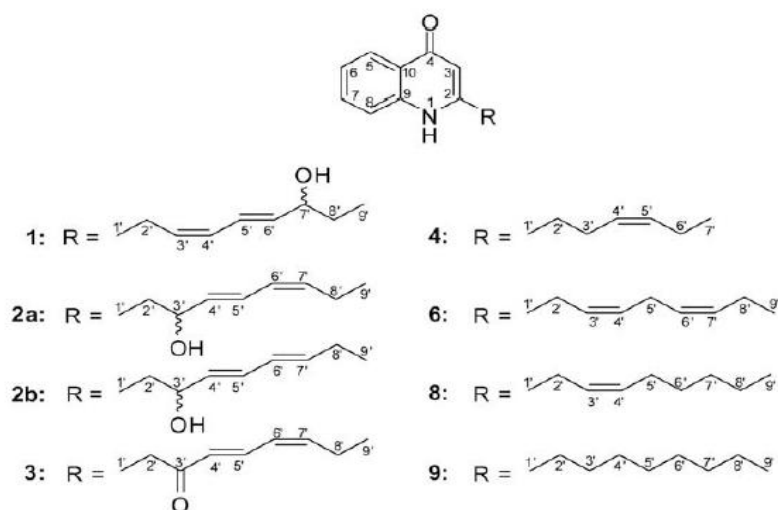


Εικόνα 3 : Το φυτό *Harpophyllum acutifolium*

Εκχυλίσματα διάφορων ειδών αυτού του φυτού έχουν χρησιμοποιηθεί στην παραδοσιακή ιατρική ως αναλγητικά, αντισπασμωδικά, διουρητικά, ηρεμιστικά αλλά και ως τοπικά μέσα για ασθένειες του δέρματος. [14] Τα αλκαλοειδή κινολινόνων που απομονώθηκαν από το *Harpophyllum* όπως και από άλλα είδη της οικογένειας Rutaceae έχουν δείξει οιστρογονική^{15b}, αντιμυκητιασική^{15c}, αντική^{15d}, αντιβακτηριακή^{15e} και αντιπαρασιτική^{15f} δράση. [15]

Πρόσφατα αναφέρθηκε η απομόνωση έξι νέων αλκαλοειδών κινολινόνων από το φυτό *H.acutifolium*, που διαφέρουν στον υποκαταστάτη της θέσης 2 του ετεροκυκλικού δακτυλίου οι οποίες ονομάστηκαν harplacutines A-F (Σχήμα 19).

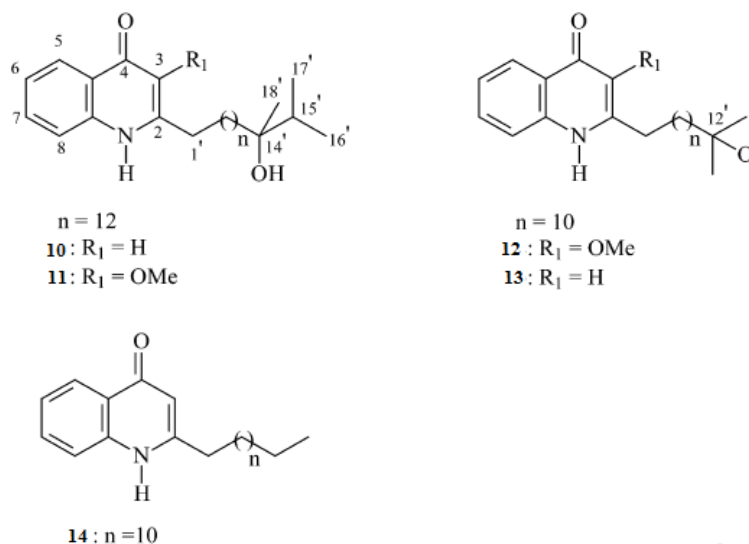
Δύο από τα αλκαλοειδή που απομονώθηκαν έδειξαν ικανοποιητική δράση ως αναστολείς του παρασίτου *Plasmodium falciparum* σε μικρομοριακή συγκέντρωση. [16]



Σχήμα 19: Αλκαλοειδή κινολινόνων του φυτού *Harpophyllum acutifolium*

Αλκαλοειδή 2-ακυλο-κινολινόνων απομονώθηκαν επίσης από τα φύλλα του φυτού *D. Vandellianum*, το οποίο είναι γνωστό για το περιεχόμενό του σε αλκαλοειδή ινδολίου, αλκαλοειδή της 2- κινολινόνων και της κινολόνων και λεμονοειδή. Η ύπαρξη αυτών των συστατικών ήταν σημαντική για τη κατάταξη του είδους στην οικογένεια Rutaceae. Τα

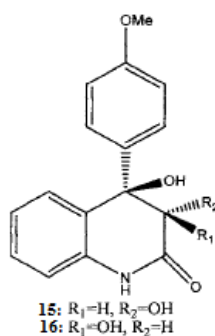
παράγωγα των 2- κινολονών που εξήχθησαν από το φυτό *D. Vandellianum* (Σχήμα 20) έδειξαν μεγάλη ομοιότητα με τα είδη *Zanthoxyleae*, *Ruteae* (*Haplophyllum* και *Ruta*), *Boronieae* (*Boronia*), *Cusparieae* (*Raulinoa*) και *Toddalieae* τα οποία περιέχουν διάφορες 2-αλκυλο-4- κινολόνες. [17]



Σχήμα 20:Αλκαλοειδή κινολινόνης του φυτού *D. Vandellianum*.

Εκτός από τα φυτά, πολλοί μικροοργανισμοί μπορούν να αποτελέσουν πηγές πολλών ενδιαφέρουσων χημικών ουσιών. Μετά από επίμονες μελέτες στους χερσαίους μικροοργανισμούς, το ενδιαφέρον πλέον στρέφεται και σε μικροοργανισμούς που επιβιώνουν και σε άλλου είδους οικοσυστήματα όπως σε ερήμους, στη θάλασσα και σε θερμοπηγές. Συγκεκριμένα, οι θαλάσσιοι μικροοργανισμοί αποτελούν μια εξαιρετική πηγή νέων συστατικών ή συστατικών με σημαντική δραστηριότητα. [18]

Στον εκ θαλάσσης προερχόμενο μύκητα *Penicillium janczewskii*, εντοπίστηκαν δυο νέες στερεοϊσομερείς κινολινόνες, η 3S*, 4R*-διϋδροξυ-4-(4'-μεθοξυφαινυλο)-3, 4-διϋδρο-2(1H)-κινολινόνη (Σχήμα 21, 15) και η 3R*,4R*-dihydroxy-4-(4'-methoxyphenyl)-3, 4-dihydro-2(1H)-quinolinone (σχήμα 21, 16). Τα δυο νέα αυτά φυσικά προϊόντα έδειξαν μια χαμηλή ως μέτρια τοξικότητα έναντι διαφόρων κυτταρικών σειρών. [18]



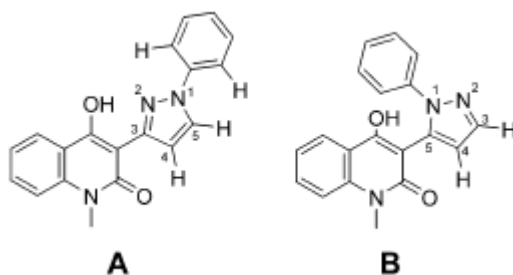
Σχήμα 21: αλκαλοειδές κινολινόνης του μύκητα *Penicillium janczewskii*

2.2.Συνθετικά ανάλογα κινολινονών με φαρμακευτική δράση

Οι 4-υδροξυ- 2(1H)-κινολινονές καθώς και τα παράγωγά τους εκπροσωπούν μια τάξη ετεροκυκλικών ενώσεων οι οποίες σχετίζονται με ποικίλες φαρμακολογικές^{20 a,b}, ιατρικές και βιομηχανικές^{20a,c} εφαρμογές λόγω των βιολογικών ιδιοτήτων που εμφανίζουν. [19], [20]

Γενικά, οι περισσότερες βιολογικές και φαρμακολογικές δράσεις εμφανίζονται στις 3-υποκατεστημένες 4-υδροξυ-2(1H)- κινολινονές. Για παράδειγμα, οι πυρανο[3,2-c]-κινολινονές είναι δραστικές έναντι αντιδράσεων ανοσολογικών ασθενειών , και συγκεκριμένα έναντι άμεσων αντιδράσεων υπερευαισθησίας (αναφυλαξία). [21]

Οι Chimichi και συνεργάτες συνέθεσαν παράγωγα φουροκινολινονών και κινολινονών συνδυασμένες με το δακτύλιο της ισοξαζόλης ή πυραζόλης ως φωτοχημικά ενεργά μόρια ή πιθανούς παράγοντες για την καταπολέμηση των όγκων. Οι νέες κινολινονές που συντέθηκαν φαίνονται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 22,A και B) . [22]

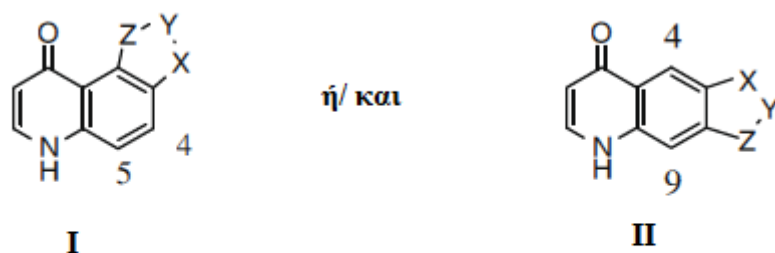


Σχήμα 22: Κινολινονές με φωτοβιολογική δράση

Μετά από μια σειρά βιολογικών πειραμάτων φωτοτοξικότητας με χρήση ακτινοβολίας UVA στις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές NCTC 2544, LoVo και GL-60, παρατηρήθηκε ότι η κινολινονή A έδειξε την μεγαλύτερη δραστικότητα με αρκετά χαμηλές τιμές GI₅₀. Επομένως, η συγκεκριμένη ένωση μπορεί να αποτελέσει ένα δυνητικό φάρμακο για χρήση σε χημειοθεραπεία συνδυασμένη με ακτινοβολία. [22]

Η θεραπεία σημαντικών παρασιτικών ασθενειών αποτελεί μια πρόκληση για τους επιστήμονες λόγω της αντίστασης των παρασίτων σε διαθέσιμα υπάρχοντα φάρμακα. Η ελονοσία, η λεισμανίαση καθώς και ο ιός HIV αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα παρασιτικών ασθενειών για τις οποίες η ανακάλυψη νέων φαρμακευτικών μορίων αποτελεί πλέον επιτακτική ανάγκη. [23]

Ο Dargue και οι συνεργάτες του συνέθεσαν μια σειρά κινολινονών (Σχήμα 23) με πιθανή αντιπαρασιτική δράση αντική δραστηριότητα, συγκεκριμένα έναντι του ιού HIV. Η δραστικότητα των συγκεκριμένων κινολινονών διαπιστώθηκε μέσω πειραμάτων στα παράσιτα *Plasmodium falciparum*, *Leishmania donovani*, *Trichomonas vaginalis* και του HIV. [24]



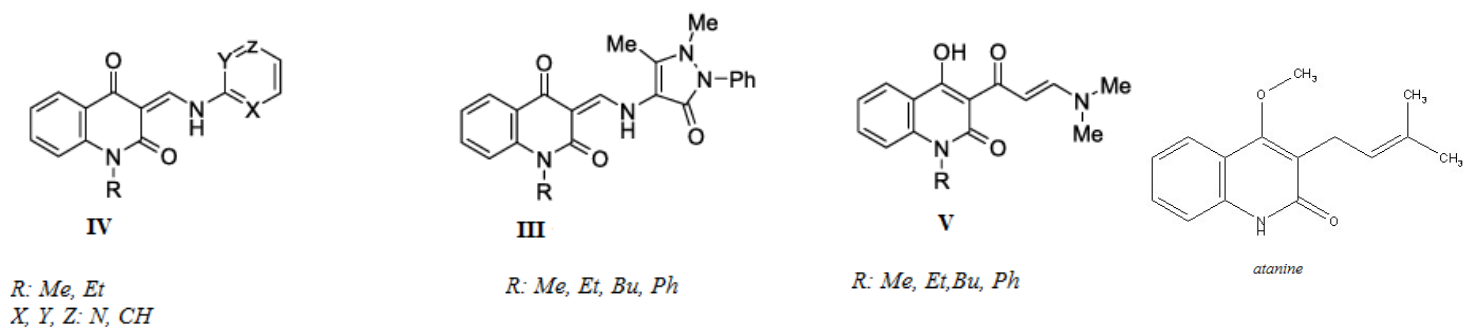
X: O₂, N₂, NH₂, NO₂, CH₂
 Y: N, CH, C=O, C-CH₃, CH₂-CH₂, C-N-Me₂
 Z: S, O, N, NH, CH, NO₂, CH₂

Σχήμα 23: Παράγωγα κινολινονών με πιθανή αντιπαρασιτική δράση

Καμία από αυτές τις ενώσεις δε παρουσίασε αξιόλογη δράση έναντι του παρασίτου *Trichomonas vaginalis* ενώ οι περισσότερες εμφάνισαν και κυτταροτοξικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις. Οι ενώσεις I ή/και II (X:NO₂) και I ή/και II (Y:CH₂) εμφάνισαν δραστηριότητα έναντι του ιού HIV-1. Η ένωση με ταυτόχρονη δράση έναντι του *Plasmodium falciparum* και του ιού HIV-1, η οποία συνδυάζει και χαμηλή κυτταροτοξικότητα είναι η I ή/και II (X:O, Y:CH₂, Z:O). [24]

Η σχιστοσωμίαση είναι μια επίσης σημαντική παρασιτική ασθένεια για τους ανθρώπους και προκαλείται από παράσιτα που ζουν και πολλαπλασιάζονται μέσα σε υδρόβια σαλιγκάρια αλλά και μαλάκια. [25] Πολλά από τα υπάρχοντα μαλακιοκτόνα δρουν επιτυχώς ενάντια στα παράσιτα αλλά είναι τοξικά για το περιβάλλον. Θα πρέπει λοιπόν να σχεδιασθούν νέα μόρια τα οποία θα έχουν όσο το δυνατόν λιγότερο αρνητικές επιπτώσεις στο οικοσύστημα. [25]

Το αλκαλοειδές κινολινόλης, η ατανίνη, καθώς και εναμινόνες προερχόμενες από τις 3-υποκατεστημένες 4- υδροξυκινολινόνες (Σχήμα 24) εμφάνισαν αξιοσημείωτη δράση ως μαλακιοκτόνα. Συγκεκριμένα, η δράση των εναμινονών ως μαλακιοκτόνα εξετάσθηκε στα σαλιγκάρια *Biomphalaria alexandrina*, *Lymnaea natalensis* και *Schistosoma mansoni*. [26]



Σχήμα 24: Αλκαλοειδή κινολινόνης και παράγωγα των 3-υποκατεστημένων- 4-υδροξυκινολινονών με αντιπαρασιτική δράση

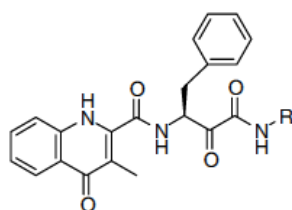
Ισχυρότερη δράση ως μαλακιοκτόνα έναντι του σαλιγκαριού *Biomphalaria alexandrina* έδειξαν οι ενώσεις III (R:Me) , IV (R: Me) και V (R: Me, Et, Bu). Οι ίδιες ενώσεις θεωρούνται δραστικές και έναντι του σαλιγκαριού *Lymnaea natalensis*. Σχετίζοντας τη δομή των συγκεκριμένων ενώσεων με τη δραστικότητα μπορούμε να συμπεράνουμε πως η δραστικότητα αυξάνεται καθώς αυξάνεται και η λιποφιλικότητα των μορίων. [26]

Αξιοσημείωτη είναι επίσης η νευροπροστατευτική δράση ορισμένων παραγώγων των κινολινονών.

Οι καλπαίνες είναι εξαρτώμενα από το ασβέστιο, ενδοκυττάρια, πρωτεολυτικά ένζυμα τα οποία βρίσκονται σε αρκετά κύτταρα. [27a,b] Τα ένζυμα αυτά εμπλέκονται σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες που ρυθμίζονται από το ασβέστιο, όπως η μεταγωγή σήματος, ο πολλαπλασιασμός , η διαφοροποίηση και η απόπτωση των κυττάρων. Παρόλα αυτά, υπερβολική ενεργοποίηση αυτών των ενζύμων μπορεί να προκαλέσει σημαντική κυτταρική βλάβη ή ακόμα και κυτταρικό θάνατο. Η εμπλοκή αυτών των ενζύμων σε σημαντικές νευρολογικές ασθένειες όπως είναι η αποπληξία και η νόσος Alzheimer έστρεψε το ενδιαφέρον των επιστημόνων στην ανακάλυψη νέων φαρμάκων που μπορούν να δράσουν σαν αναστολείς των καλπαϊνών. [27a,c,d]

Ο Don Hyuk Nam και οι συνεργάτες του συνέθεσαν μια σειρά 3-καρβοξαμικών παραγώγων της 4-κινολινονης (Σχήμα 25) και μελέτησαν τη δράση τους ως αναστολείς των καλπαϊνών.

Παρατηρήθηκε, λοιπόν, ότι τα παράγωγα που διαθέτουν ένα πρωταρχικό αμίδιο ή ένα 4-μεθοξυφαιναιθυλο αμίδιο έχουν δυνατότητα να δράσουν ως αναστολείς των καλπαϊνών. Αντίθετα, τα αμίδια της πυριδίνης μείωσαν την ανασταλτική δράση.

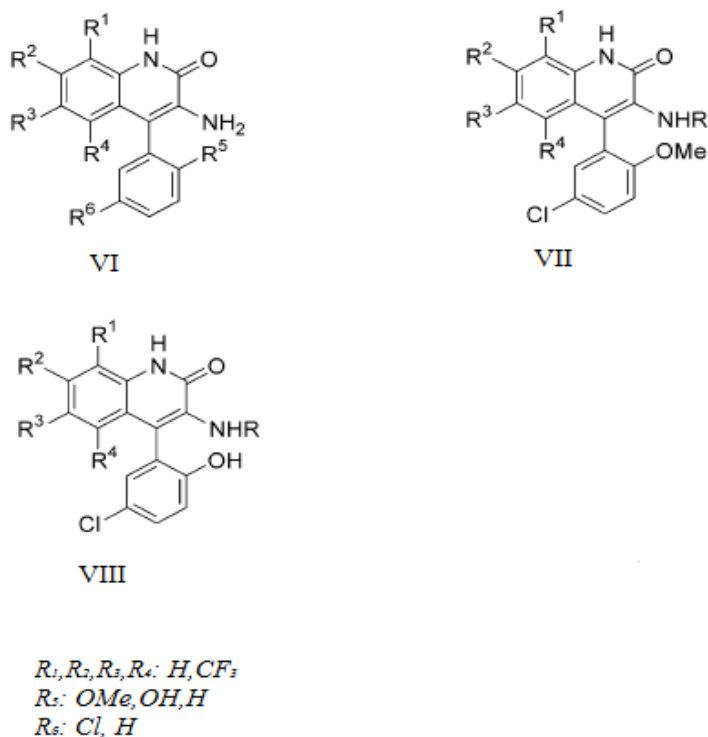


3-καρβοξαμικές-4-κινολινονες

Σχήμα 25: Παράγωγα 4 κινολινονών με ανασταλτική δράση έναντι των καλπαϊνών

Έχει παρατηρηθεί πως κατά τη διάρκεια ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου, οι νευρώνες που βρίσκονται σε κίνδυνο είναι εκτεθειμένοι σε υψηλά επίπεδα ασβεστίου (Ca^{2+}). Ένας μηχανισμός νευροπροστασίας είναι το άνοιγμα των ενεργοποιημένων από το ασβέστιο καναλιών καλίου ($maxi-K$), μειώνοντας με αυτό τον τρόπο την υπερβολική απελευθέρωση αμινοξέων και ελέγχοντας την νευρολογική υπερδιέγερση. [28]

Για το σκοπό αυτό, συντέθηκε μια σειρά 4-άρυλο-3-αμινο-2-κινολινονών (Σχήμα 26) με ποικιλία υποκαταστατών και μελετήθηκε η νευροπροστατευτική δράση τους σε 5 διαφορετικά ωκύτταρα της σειράς *Xenopus laevis* τα οποία εκφράζουν τα κλωνοποιημένα mSlo (ή hSlo) κανάλια καλίου. [29]



Σχήμα 26: Παράγωγα 2-κινολινονών και κινολονών με νευροπροστατευτική δράση

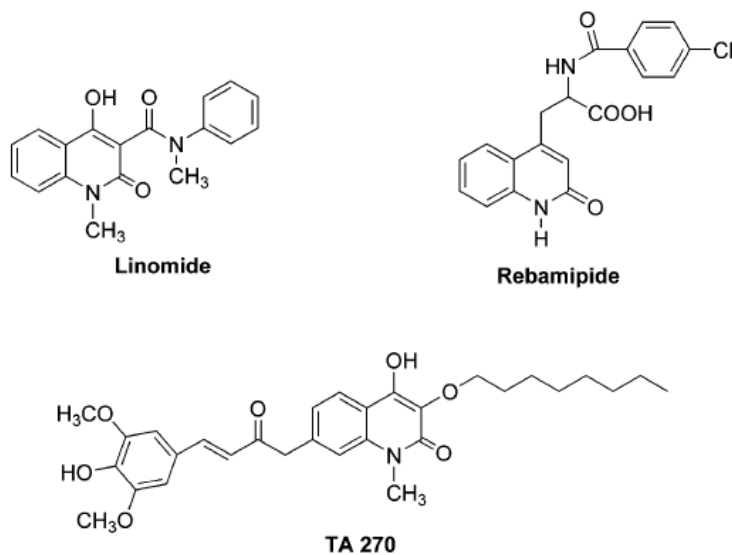
Με βάση τα αποτελέσματα των *in vivo* και *in vitro* πειραμάτων, παρατηρήθηκε πως κυρίως οι 4-άρυλο-3-αμινοκινολόνες μπορούν να δράσουν νευροπροστατευτικά μέσω του ανοίγματος των, διαπερατών στον εγκέφαλο, καναλιών καλίου. Η νευροπροστασία των κινολινονών εξαρτάται από τη φύση των υποκαταστατών και την ύπαρξη του φαινολικού υδροξυλίου. [29a]

Μια σειρά N υποκατεστημένων-κινολινονών-3-αμινοαμιδίων σχεδιάσθηκαν και εξετάσθηκε η αντιοξειδωτική, συγκεκριμένα η *in vitro* αναστολή της λιποξυγονάσης και η αντιφλεγμονώδη δράση τους *in vivo*.

Η ένωση linomide (*N-phenylmethyl-1,2-dihydro-4-hydroxy-1-methyl-2-oxo-3-quinolinecarboxamide*) (Σχήμα 27) είναι ένας συνθετικός ανοσορυθμιστής, ο οποίος είναι αποτελεσματικός έναντι ποικίλων τύπων καρκίνου και αυτοάνοσων διαταραχών, όπως η σκλήρυνση κατά πλάκας και η ρευματοειδής αρθρίτιδα. [30]

Ένα άλλο παράγωγο κινολινόνης, η ένωση rebamipide (Σχήμα 27), αποτελεί έναν αποτελεσματικό αντιοξειδωτικό παράγοντα καθώς και παράγοντα που σχετίζεται με το έλκος και το γαστρικό καρκίνο, δρώντας κυρίως μέσω της αύξησης της ενδογενούς προσταγλανδίνης και δεσμεύοντας τις δραστικές ρίζες οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS). [30], [31]

Επίσης η συνθετική κινολινόνη TA 270 (Σχήμα 27) έχει παρατηρηθεί πως έχει αντιοξειδωτική αλλά και αντιφλεγμονώδη δράση. Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν θεραπευτικός παράγοντας του βρογχικού άσθματος. Μέσα από in vitro πειράματα διαπιστώθηκε πως ο μηχανισμός δράσης αυτής της ένωσης έγκειται στην μείωση της παραγωγής της λευκοτριένης μέσω αναστολής της 5-λιποξυγονάσης σε αντιφλεγμονώδη κύτταρα. [30]



Σχήμα 27: Παράγωγα κινολινονών με αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση.

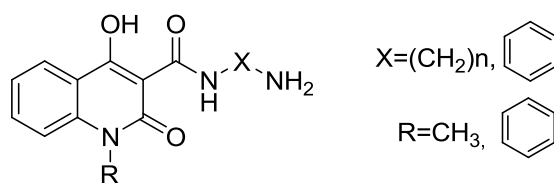
Κεφάλαιο 3

Σχεδιασμός, σύνθεση και ταυτοποίηση δομής νέων βιοϊσοστερών αναλόγων κινολινονών

3.1 Σύνθεση νέων βιοϊσοστερών αναλόγων κινολινονών

Το σύστημα συμπυκνωμένων δακτυλίων της κινολινονης ανήκει στην κατηγορία των 'προνομιούχων' δομών αφού προσφέρει μεγάλες δυνατότητες χημικών τροποποιήσεων τόσο στις θέσεις 1 και 3 του ετεροκυκλικού δακτυλίου όσο και στις θέσεις 5-8 του αρωματικού δακτυλίου, με αποτέλεσμα να είναι εφικτή η σύνθεση μεγάλου αριθμού αναλόγων ενώσεων ώστε να διευκολύνεται η μελέτη της σχέσης δομής-βιολογικής δράσης. Επίσης, η βιβλιογραφική ανασκόπηση των κινολινονών και αναλόγων τους που περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 2 δείχνει ότι οι υποκατεστημένες κινολινονες και τα ανάλογά τους εμφανίζουν μια ποικιλία βιολογικών δράσεων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα προηγούμενης έρευνας στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας ΕΜΠ, τα καρβοξαμίδια των 4-υδροξυ-κινολιν-2-ονών της μορφής (I) (Σχήμα 28) εμφανίζουν αξιόλογη συνδυασμένη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση.



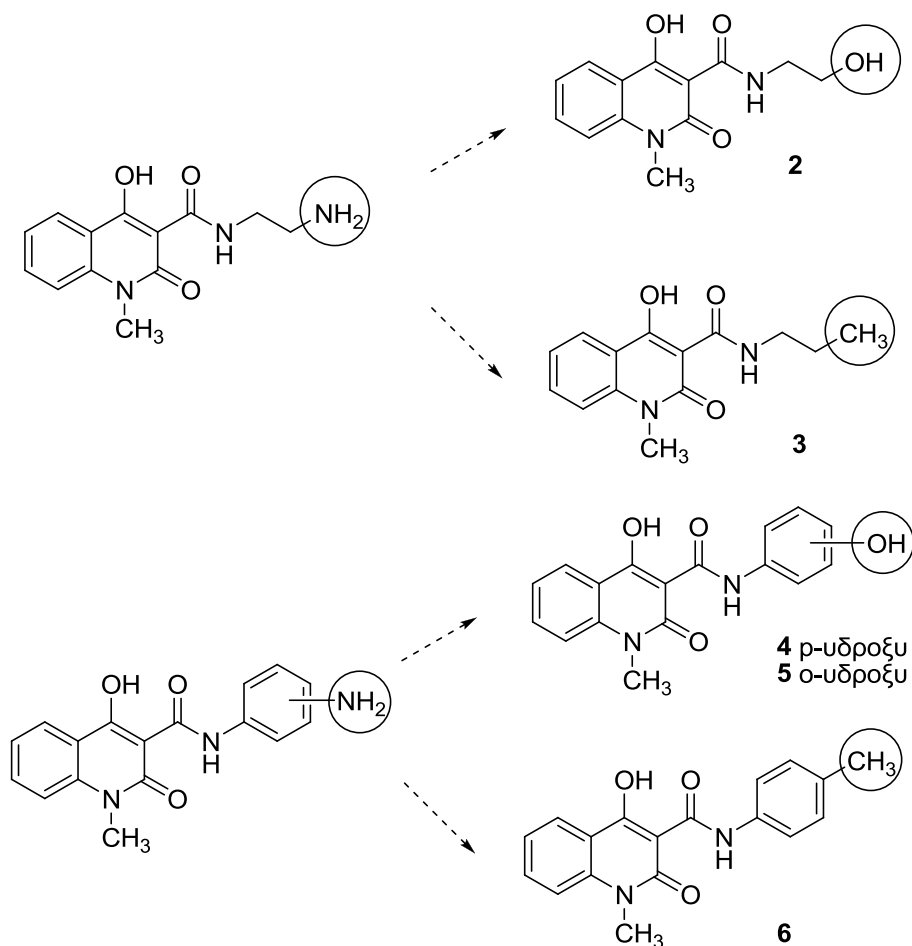
(I)

Σχήμα 28: Κινολινονες με αξιόλογη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση.

Σκοπός αυτής της διπλωματικής εργασίας είναι η σύνθεση νέων αναλόγων μορίων τα οποία θα περιέχουν βιοϊσοστερείς υποκαταστάσεις με στόχο την περαιτέρω μελέτη της σχέσης δομής-βιολογικής δράσης.

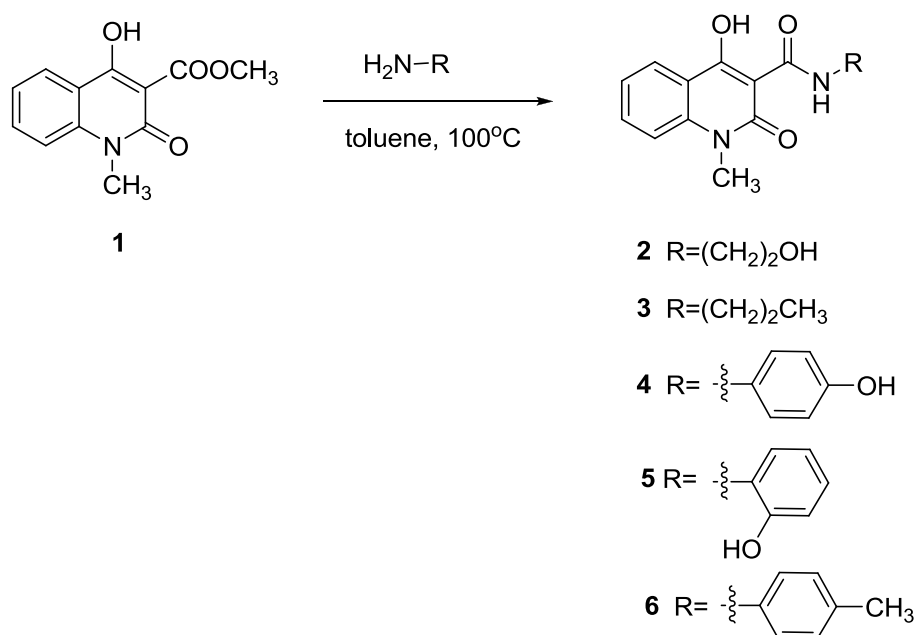
Σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν δύο σειρές νέων ενώσεων, με κλασική (Σειρά Α) και μη κλασική (Σειρά Β) βιοϊσοστερή υποκατάσταση.

Στη Σειρά A περιλαμβάνονται οι ενώσεις **2-6** (Σχήμα 29) στις οποίες η τελική αμινοομάδα του καρβοξαμιδικού τμήματος έχει αντικατασταθεί με ομάδα υδροξυλίου ή μεθυλίου.



Σχήμα 29: Σειρά A: νέα ανάλογα τύπου (I) με κλασικές βιοϊσοστερείς υποκαταστάσεις της αμινοομάδας

Οι ενώσεις παρασκευάστηκαν με θέρμανση της 3-μεθοξυκαρβονυλο-4-υδροξυ-2-κινολινόνης (**1**) με την αντίστοιχη αρωματική ή αλειφατική αμίνη, σε διαλύτη τολουόλιο, όπως φαίνεται στο Σχήμα 30.

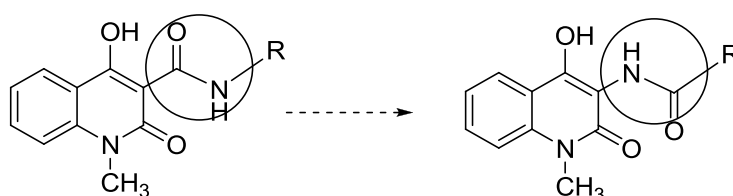


Σχήμα 30: Κλασσική μέθοδος παρασκευής καρβοξαμιδίων των κινολινονών

Τα νέα καρβοξαμίδια απομονώνονται είτε ως στερεά που σχηματίζονται απευθείας από το μίγμα της αντίδρασης ή μετά από κατάλληλη επεξεργασία του μίγματος (προσθήκη υδατικού διαλύματος NaHCO₃ και εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο).

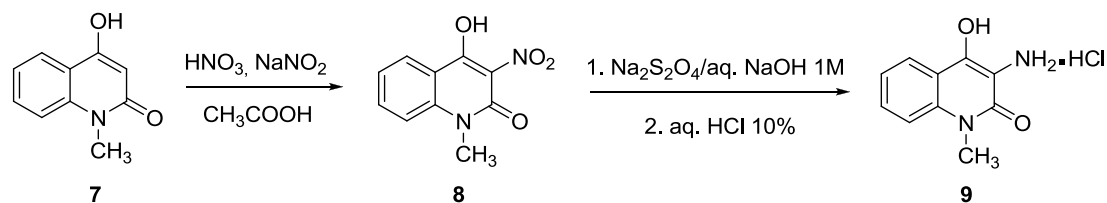
Οι ενώσεις **2-6** της Σειράς Α αξιολογήθηκαν για την αντιοξειδωτική δράση τους, την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου λιποξυγονάση από σόγια, ως ένδειξη της αντιφλεγμονώδους δράσης τους και για την ικανότητά τους να προστατεύουν τα κύτταρα HT22 από το οξειδωτικό στρες. Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμασιών, τα οποία παρουσιάζονται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 5, έδειξαν ότι τα καρβοξαμίδια **3**, **4**, **5** και **6** εμφανίζουν σημαντικά αυξημένη ικανότητα αναστολής της λιποξυγονάσης, σε σχέση με το αρχικό καρβοξαμίδιο του τύπου (I).

Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, παρασκευάστηκαν οι ενώσεις της Σειράς Β, με μη κλασική βιοϊσοστερή υποκατάσταση των δραστικότερων ενώσεων **3**, **4**, **5** και **6** (Σχήμα 31).



Σχήμα 31: Σειρά Β: νέα ανάλογα του τύπου (I) με βάση τη μη-κλασική βιοϊσοστερή υποκατάσταση της αμινο-ομάδας.

Για τη σύνθεση των αντίστροφων αμιδίων αρχικά παρασκευάστηκε το υδροχλωρικό άλας της 1-μεθυλο-3-αμινο-4-υδροξυ-κινολιν-2-όνης (**9**) μέσω αντίδρασης νίτρωσης της 1-μεθυλο-4-υδροξυ-κινολιν-2-όνης (**7**) και αναγωγής της νιτροομάδας (Σχήμα 32).



Σχήμα 32: Αντιδράσεις νίτρωσης της αρχικής κινολινόνης και αναγωγής της νιτροομάδας

Συγκεκριμένα, για την πραγματοποίηση της αντίδρασης της νίτρωσης χρησιμοποιήθηκαν διάφορες μέθοδοι. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε ως μέσο νίτρωσης νιτρικό οξύ 100% (HNO₃) παρουσία παγόμορφου οξικού οξέος (CH₃COOH), τα οποία προστέθηκαν σε γραμμομοριακές αναλογίες 1:1:1, σύμφωνα με τη μέθοδο που αναφέρουν οι Calabri et al. [32], για ανάλογο ετεροκυκλικό σύστημα. Το μίγμα της αντίδρασης θερμάνθηκε στους 90^o C με ανάδευση για 2.5 hr. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το μίγμα τοποθετήθηκε στο παγόλουτρο, όπου όμως δε παρατηρήθηκε ο σχηματισμός κάποιου στερεού. Πραγματοποιήθηκε επίσης εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα για να απομακρυνθεί το υδατικό διάλυμα και εξάτμιση του διαλύτη αλλά το στερεό που σχηματίστηκε είχε τη μορφή ινών και δεν ήταν εφικτή η παραλαβή του. Επομένως, η μέθοδος αυτή δεν ήταν αποτελεσματική για τη νίτρωση της 1-μεθυλο-4-υδροξυ-κινολιν-2-όνης (**7**).

Σε μια δεύτερη προσέγγιση, στο αιώρημα της κινολινόνης **7** σε οξικό οξύ προστίθεται νιτρικό οξύ 65% και ακολουθείται η ίδια πειραματική διαδικασία. Με την προσθήκη του προϊόντος της αντίδρασης στο παγόλουτρο, παρατηρήθηκε ο σχηματισμός σκούρου κίτρινου στερεού, το οποίο παραλήφθηκε με διήθηση υπό κενό. Το σημείο τήξεως του προϊόντος ήταν 159-164^oC, το οποίο είναι πολύ κοντά σε αυτό που αναφέρεται στη βιβλιογραφία για την ένωση **8** [33]. Η αντίδραση επαναλήφθηκε με τετραπλάσιες ποσότητες των ίδιων ακριβώς αντιδραστηρίων αλλά μετά από τοποθέτηση σε παγόλουτρο και εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο (CH₂Cl₂) δε παρατηρήθηκε κάποιο στερεό, επομένως η μέθοδος αυτή δεν είναι κατάλληλη για τη σύνθεση του νιτρο-παραγώγου **8** σε υψηλές αποδόσεις.

Δοκιμάστηκε επίσης η πραγματοποίηση της νίτρωσης με τοποθέτηση των αντιδραστηρίων σε λουτρό υπερήχων για 30 min, σύμφωνα με τη μέθοδο των Kamal et al. [34] για τη νίτρωση φαινολικών παραγώγων, αλλά και πάλι δεν προέκυψε το επιθυμητό προϊόν.

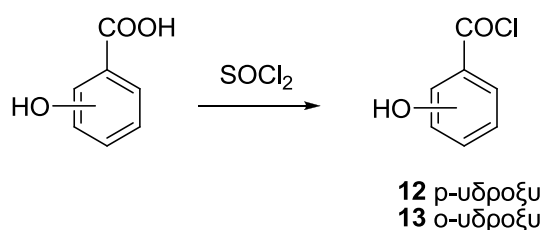
Η αντίδραση της νίτρωσης επετεύχθη τελικά σε μεγάλη απόδοση με την ακόλουθη πειραματική διαδικασία, η οποία πραγματοποιείται σε ήπιες συνθήκες [35]. Αρχικά σχηματίζεται αιώρημα με την προσθήκη στην κινολινόνη **7** ποσότητας οξικού οξέος σε αναλογία 1:1. Στο αιώρημα γίνεται προσθήκη νιτρικού οξέος 65% και καταλύτη νιτρώδες νάτριο (NaNO₂) σε αναλογία 1:1. Η αντίδραση ολοκληρώνεται μέσα σε 10 min και παραλαμβάνεται στερεό κίτρινου χρώματος με διήθηση υπό κενό και ξήρανση, σε αποδόσεις 88-96%.

Η ομάδα μεθυλίου στη θέση 1 του ετεροκυκλικού συστήματος της κινολινόνης ενεργοποιεί τις θέσεις 3-, 6- και 8- ως προς την αντίδραση νίτρωσης. Η παρουσία της ομάδας υδροξυλίου, που είναι επίσης δότης ηλεκτρονίων, στη θέση 4 του ετεροκυκλικού δακτυλίου της κινολινόνης **7**, ενεργοποιεί τη θέση 3 ως προς τη νίτρωση. Επομένως, στην περίπτωση της νίτρωσης της κινολινόνης **7** από την αντίδραση λαμβάνεται ως αποκλειστικό προϊόν η N-μεθυλο-3-νιτρο-4-υδροξυ-κινολιν-2-όνη (**8**). [36].

Η αντίδραση της αναγωγής της νιτροομάδας, που ακολουθεί της νίτρωσης στην πειραματική διαδικασία, πραγματοποιείται σε αλκαλικό περιβάλλον με προσθήκη στη 3-νιτρο-κινολινόνη **8** υδατικού διαλύματος NaOH 1M μέχρι να γίνει ομοιογενές διάλυμα. Στη συνέχεια προστίθεται διθειονώδες νάτριο (Na₂S₂O₄) και το μίγμα αναδεύεται για 30 min. Μετά το πέρας της αντίδρασης ακολουθεί οξίνιση με HCl 10% και παραλαβή του στερεού με διήθηση υπό κενό [32]. Το σχηματιζόμενο υδροχλωρικό άλας **9** είναι φωτοευαίσθητη ουσία και φυλάσσεται σε σκιερό μέρος ενώ απαιτείται ξήρανση του στερεού για αρκετό χρόνο ώστε να απομακρυνθεί όλη η υγρασία.

Η πειραματική διαδικασία ολοκληρώνεται με το σχηματισμό των καρβοξαμιδίων **14-17** μέσω αντίδρασης ακυλίωσης της 3-αμινο-1-μεθυλο-4-υδροξυ-2-κινολινόνης **9** από τα αντίστοιχα χλωρίδια οξέων.

Από τα χλωρίδια που χρησιμοποιήθηκαν, το βουτυρυλοχλωρίδιο (**10**) και το p-τολουούλο-χλωρίδιο (**11**) είναι εμπορικά διαθέσιμα, ενώ τα χλωρίδια του p-υδροξυβενζοϊκού οξέος **12** και του σαλικυλικού οξέος **13**, παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο με θέρμανση των αντίστοιχων οξέων σε θειονυλοχλωρίδιο (Σχήμα 32A).

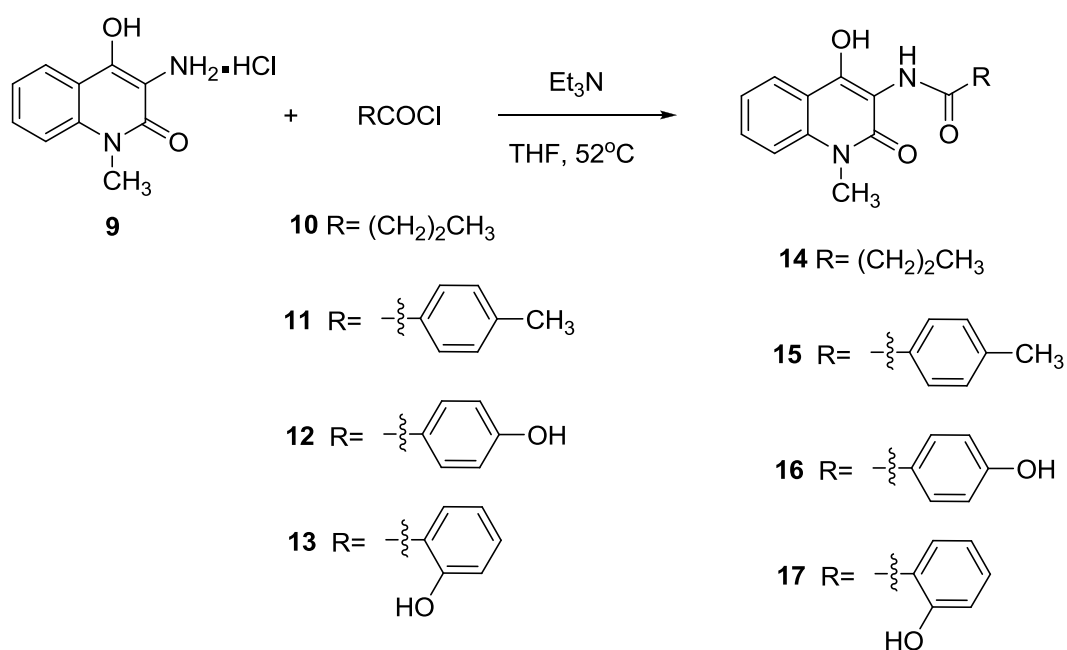


Σχήμα 32A: Σύνθεση των ακυλο-χλωριδίων **12** και **13**.

Για την παρασκευή των χλωριδίων του σαλικυλικού και του p-υδροξυβενζοϊκού οξέος ακολουθείται η ίδια πειραματική διαδικασία. Συγκεκριμένα, τα αντίστοιχα οξέα (σαλικυλικό και p-υδροξυβενζοϊκό οξύ) και το θειονυλοχλωρίδιο προτίθενται σε γραμμομοριακές αναλογίες 1:7.5. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε αδρανή ατμόσφαιρα

αζώτου και θέρμανση στους 84 °C όπου είναι το σημείο ζέσεως του θειονυλοχλωριδίου με ταυτόχρονη ανάδευση. Και στις δύο περιπτώσεις η αντίδραση ολοκληρώνεται σε λιγότερο από μία ώρα και μετά από εξάτμιση σχηματίζεται το στερεό προϊόν. Αφού ξηρανθεί για την πλήρη απομάκρυνση του διαλύτη (θειονυλοχλωρίδιο) , διαλύεται απευθείας σε τετραϋδροφουράνιο (THF) και προστίθεται στο μίγμα της αντίδρασης ακυλίωσης που ακολουθεί. [37]

Στην περίπτωση του χλωριδίου του σαλικυλικού οξέος η απομάκρυνση του διαλύτη γίνεται με προσθήκη τολουολίου (toluene) στο μίγμα της αντίδρασης και εξάτμιση υπό κενό του τολουολίου το οποίο παρασύρει και το θειονυλοχλωρίδιο ή απευθείας εξάτμιση υπό κενό χωρίς την προσθήκη τολουολίου. Παρατηρήθηκε ότι στην πρώτη περίπτωση είχε απομακρυνθεί όλο το θειονυλοχλωρίδιο ενώ στη δεύτερη είχε μείνει μια πολύ μικρή ποσότητα. Αντίστοιχα, στην περίπτωση του χλωριδίου του p-υδροξυβενζοϊκού οξέος η ξήρανση πραγματοποιείται με τοποθέτηση του μίγματος της αντίδρασης στην αντλία. Θεωρούμε ότι οι αντιδράσεις σχηματισμού των χλωριδίων έχουν απόδοση 100%.



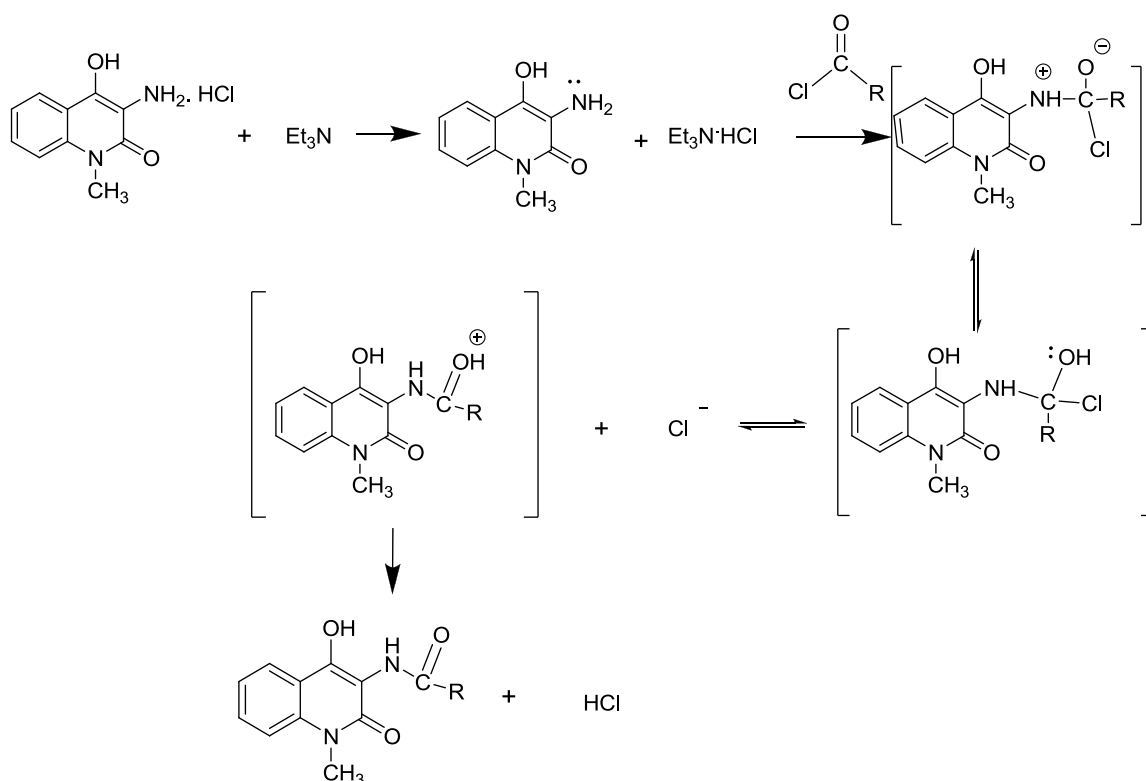
Σχήμα 33: Αντιδράσεις σύνθεσης των χλωριδίων και ακυλίωσης του υδροχλωρικού άλατος της 3-αμινο-1-μεθυλο-4-υδροξυ-2-κινολινόνης (**9**).

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης ακυλίωσης και την παρασκευή των τελικών καρβοξαμιδίων ακολουθείται η ακόλουθη διαδικασία. Αρχικά προστίθεται το υδροχλωρικό άλας της 1-μεθυλο-4-υδροξυ-2-κινολινόνης σε διαλύτη THF και το μίγμα αναδεύεται ώσπου να γίνει ομοιογενές διάλυμα. Στη συνέχεια προστίθενται η άνυδρη τριαιθυλαμίνη (Et₃N) και το αντίστοιχο χλωρίδιο σε αναλογίες 2.5 : 1.5 .Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε συνθήκες αδρανούς ατμόσφαιρας αζώτου και θέρμανση στους 52 °C όπου είναι το σημείο ζέσεως του διαλύτη (THF). Ανά τακτά χρονικά διαστήματα

ελέγχεται η πορεία της αντίδρασης με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) σε κατάλληλο σύστημα διαλυτών.

Ο χρόνος ολοκλήρωσης της αντίδρασης είναι διαφορετικός σε κάθε περίπτωση ενώ για την παραλαβή του τελικού προϊόντος απαιτείται προσθήκη νερού στο τελικό μίγμα της αντίδρασης, οξίνιση με HCl 10% με ταυτόχρονη τοποθέτηση της σφαιρικής σε παγόλουτρο και διήθηση υπό κενό. Οι αντιδράσεις ακυλίωσης εμφανίζουν ικανοποιητικές αποδόσεις (40-50%).

Η αντίδραση ακυλίωσης λαμβάνει χώρα σύμφωνα με το μηχανισμό που παρουσιάζεται στο Σχήμα 34.



Σχήμα 34: Μηχανισμός ακυλίωσης

Ο μηχανισμός της ακυλίωσης του παραπάνω σχήματος περιγράφει την αντίδραση αμινόλυσης, δηλαδή την αντίδραση των χλωριδίων των οξέων με το υδροχλωρικό άλας της 3-αμινο-1-μεθυλο-4-υδροξυ-2-κινολινόνης και τη τριαιθυλαμίνη για το σχηματισμό των αμιδίων σε ικανοποιητικές αποδόσεις. Πολλές αντιδράσεις αμινόλυσης πραγματοποιούνται παρουσία καυστικού νατρίου NaOH και αποκαλούνται αντιδράσεις Schotten-Baumann, αλλά στην περίπτωσή μας το βασικό περιβάλλον δημιουργείται από την παρουσία της τριαιθυλαμίνης. [38]

Επειδή κατά τη διάρκεια της αντίδρασης σχηματίζεται HCl, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν δυο ισοδύναμα αμίνης. Το ένα ισοδύναμο αντιδρά με το υδροχλωρικό άλας της 3-αμινο-1-μεθυλο-4-υδροξυ-2-κινολινόνης, ώστε να απελευθερωθεί η αμινομάδα για να αντιδράσει με το χλωρίδιο του οξέος και το άλλο ισοδύναμο αντιδρά με το παραγόμενο HCl δεσμευοντάς το και μετατοπίζοντας την αντίδραση προς το επιθυμητό προϊόν.

3.2 Ταυτοποίηση της δομής των νέων μορίων

Η ταυτοποίηση των νέων ενώσεων πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπικές μεθόδους και συγκεκριμένα φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (^1H και ^{13}C NMR), φασματοσκοπία υπέρυθρου (IR) και φασματοσκοπία μάζας.

Μέσω της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου (^1H NMR) εντοπίζονται οι χημικές μετατοπίσεις των ομάδων χημικά ισοδύναμων πρωτονίων του μορίου. Μέσω των χημικών μετατοπίσεων, της ολοκλήρωσης των κορυφών, της πολλαπλότητας των κορυφών και της σταθεράς σύζευξης (J) των πολλαπλών κορυφών επιτυγχάνεται η ταυτοποίηση της δομής ενός οργανικού μορίου.

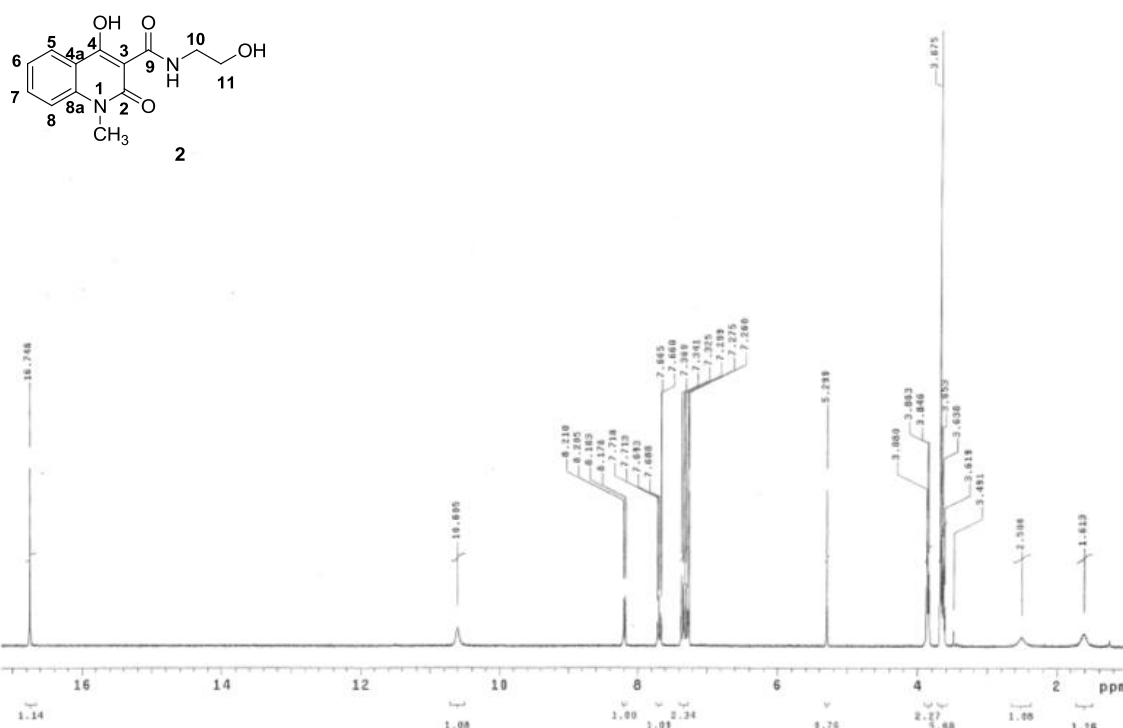
Η φασματοσκοπία υπέρυθρου (IR) βασίζεται στην απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από τα μόρια μιας ένωσης, τα οποία διεγείρονται σε υψηλότερες στάθμες δόνησης ή περιστροφής. Στα πολυατομικά μόρια, όπως είναι και αυτά που εξετάζουμε, υπάρχουν διάφοροι τρόποι δόνησης όπως είναι η δόνηση τάσης και η δόνηση κάμψης. Η δόνηση τάσης είναι όταν δυο συνδεδεμένα άτομα πάλλονται συνεχώς, μεταβάλλοντας την απόσταση μεταξύ τους χωρίς όμως να μεταβάλλεται η γωνία δεσμού. Αντίθετα, η δόνηση κάμψης χαρακτηρίζεται από συνεχή μεταβολή της γωνίας δεσμού των παλλόμενων ατόμων. [39]

Το φάσμα απορρόφησης το οποίο λαμβάνεται με το όργανο IR είναι ένα διάγραμμα με τεταγμένη τη διαπερατότητα του δείγματος επί τοις 100% και τετμημένη τον κυματαριθμό σε cm^{-1} . Κατά την ερμηνεία των φασμάτων, γίνεται αναγνώριση των διάφορων δραστικών ομάδων που υπάρχουν στο μόριο χρησιμοποιώντας κατάλληλους πίνακες [39]

Η φασματοσκοπία μάζας MS (ElectroSpray Ionisation, ESI), η οποία είναι μια ήπια μέθοδος ιονισμού, περιλαμβάνει την παραγωγή ιόντων σε αέρια φάση από τα μόρια ενός δείγματος, στη συνέχεια το διαχωρισμό τους με βάση το λόγο της μάζας m προς το φορτίο τους z (m/z) και τέλος την ανίχνευση των ιόντων αυτών. Από τη μέτρηση της μάζας του ιοντιζόμενου μορίου προκύπτει το μοριακό βάρος και από τα διάφορα θραύσματα του μορίου προκύπτουν βασικά συμπεράσματα για τη δομή του.

Στη μέθοδο που ακολουθείται χρησιμοποιείται και ελάχιστη ποσότητα οξέος, και συγκεκριμένα το οξικό οξύ CH_3COOH , οπότε το μοριακό ιόν είναι το $[\text{M} + \text{H}]^+$ όπου M: το μοριακό βάρος της ένωσης. Επίσης λόγω της ύπαρξης ιόντων νατρίου από ποικίλες πηγές, συχνά για τον εντοπισμό του μοριακού βάρους ανιχνεύεται το ιόν $[\text{M} + 23]^+$. [39]

3.2.1 Φασματοσκοπική μελέτη των κινολινονών 2-6 (Σειρά A)



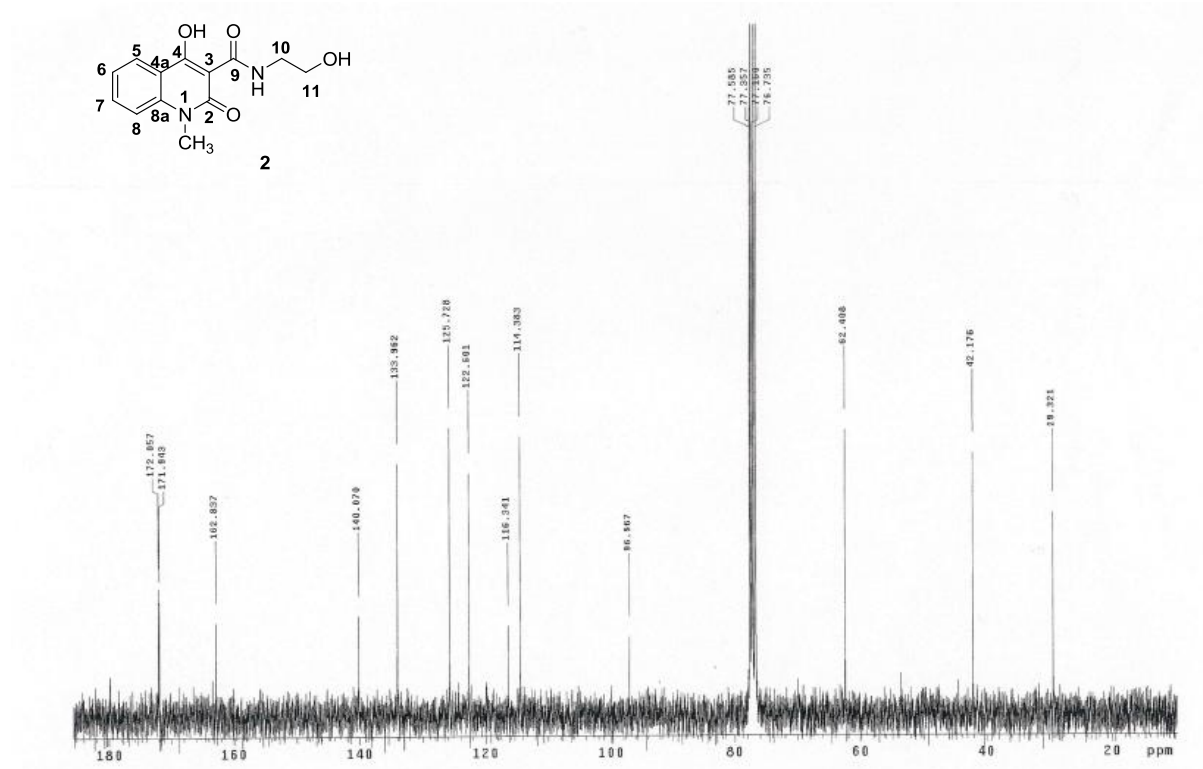
Εικόνα 4: Φάσμα ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) της ένωσης **2**.

Το φάσμα ^1H NMR της ένωσης **2** (Εικόνα 4) χαρακτηρίζεται από μία κορυφή σε χαμηλό πεδίο, στα 16.748 ppm, η οποία αποδίδεται στο πρωτόνιο του υδροξυλίου της θέσης 4, το οποίο συμμετέχει σε ισχυρό δεσμό υδρογόνου με το καρβονύλιο της θέσης 3. Η κορυφή που παρατηρείται στα 10.605 ppm αποδίδεται στο υδρογόνο του αμιδικού δεσμού.

Τα αρωματικά πρωτόνια του ετεροκυκλικού δακτυλίου της κινολινόνης παρατηρούνται στο εύρος χημικών μετατοπίσεων 7.26-8.21 ppm. Συγκεκριμένα, στα 8.19 ppm εμφανίζεται μια doublet doublet κορυφή που ολοκληρώνεται για 1H και έχει σταθερές σύζευξης $J = 9$ Hz και $J = 1.5$ Hz. Η κορυφή αυτή αποδίδεται στο H της θέσης 5, το οποίο εμφανίζει ορθο-σύζευξη με το H-6 ($J_{5,6} = 9$ Hz) και μετα-σύζευξη με το H-7 ($J_{5,7} = 1.5$ Hz). Στα 7.688 ppm εμφανίζεται μια threefold doublet κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για 1 H και αποδίδεται στο H-7 και έχει σταθερές σύζευξης $J_{7,5} = 1.5$ Hz, $J_{7,6} = 7.2$ Hz και $J_{7,8} = 8$ Hz. Τα H-6 και H-8 δίνουν μια πολλαπλή κορυφή στην περιοχή 7.356-7.228 ppm, που ολοκληρώνεται για 2 H.

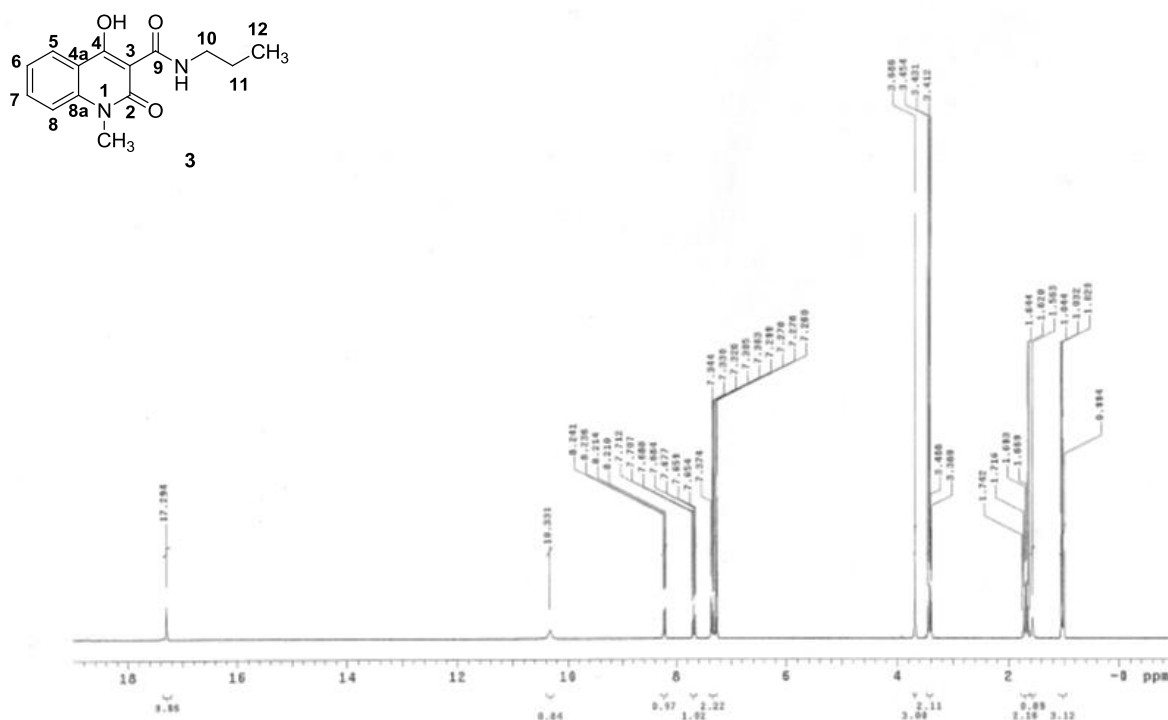
Η κορυφή στα 5.299 ppm αποδίδεται στο αλειφατικό υδροξύλιο του μορίου, και ολοκληρώνεται για 1 H. Η ομάδα του μεθυλίου (N-CH_3) εμφανίζεται στα 3.675 ppm με μια απλή κορυφή και ολοκληρώνεται για 3 H.

Τα αλειφατικά πρωτόνια εμφανίζονται σε υψηλότερο πεδίο από 3.880-3.846 ppm και από 3.653-3.638 ppm. Συγκεκριμένα, παρατηρείται μια τριπλή κορυφή στα 3.863 ppm, η οποία ολοκληρώνεται για 2 H και έχει σταθερά σύζευξης $J = 6$ Hz, και αποδίδεται στα H της θέσης 11 (CH_2OH). Η πολλαπλή κορυφή στην περιοχή 3.653-3.619 ppm ολοκληρώνεται επίσης για 2 H και οφείλεται στα H της θέσης 10 (NHCH_2).



Εικόνα 5: Φάσμα ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75MHz) της ένωσης **2**.

Στο φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **2** (Εικόνα 5) εμφανίζονται οι 13 άνθρακες του μορίου. Χαρακτηριστικές είναι οι κορυφές στα 172.0, 171.9 και 162.8 που οφείλονται στους C-4, C-2 και C-9 αντίστοιχα, όπως επίσης και οι κορυφές στα 62.4, 42.2 και 29.3 που αντιστοιχούν στους C-11, C-10 και στο μεθύλιο του ατόμου του αζώτου (N-CH_3).



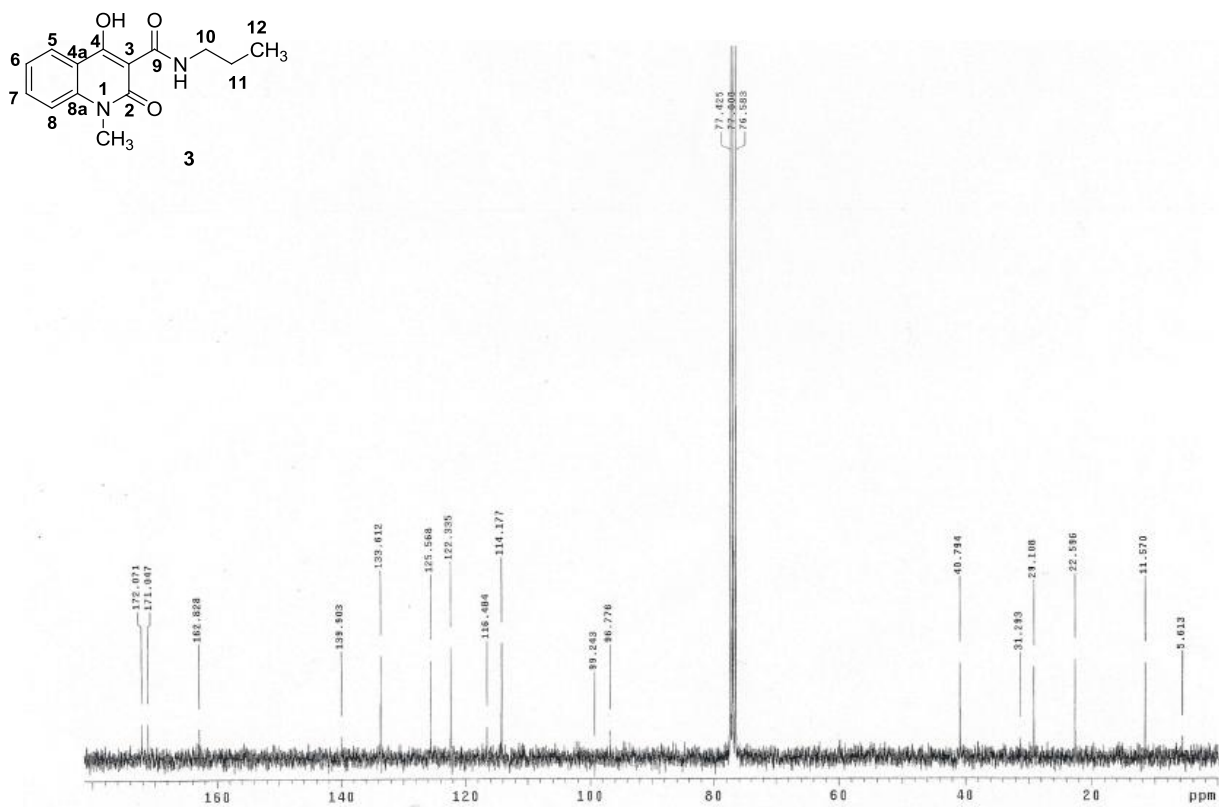
Εικόνα 6: Φάσμα ¹H NMR (CDCl₃, 300MHz) της ένωσης 3.

Το φάσμα ¹H NMR της ένωσης 3 (Εικόνα 6) χαρακτηρίζεται από μία κορυφή σε χαμηλό πεδίο, στα 17.29 ppm, η οποία αποδίδεται στο πρωτόνιο του υδροξυλίου της θέσης 4. Η κορυφή που παρατηρείται στα 10.33 ppm αποδίδεται στο πρωτόνιο του αμιδικού δεσμού N-H.

Τα αρωματικά πρωτόνια του ετεροκυκλικού δακτυλίου της κινολινόνης παρατηρούνται στο εύρος χημικών μετατοπίσεων 8.241-7.260 ppm. Συγκεκριμένα, στα 8.225 ppm εμφανίζεται μια doublet doublet κορυφή που ολοκληρώνεται για 1H και οφείλεται στο H-5, με σταθερές σύζευξης $J_{5,6} = 8$ Hz και $J_{5,7} = 1.5$ Hz. Στα 7.684 ppm εμφανίζεται μια threefold doublet κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για 1 H, οφείλεται στο H-7 και έχει σταθερές σύζευξης $J_{7,5} = 1.5$ Hz, $J_{7,6} = 7.2$ Hz και $J_{7,8} = 8$ Hz. Η διπλή κορυφή στα 7.36 ppm αποδίδεται στο H-8 ($J_{8,7} = 9$ Hz) και η τριπλή κορυφή στα 7.29 ppm που ολοκληρώνεται για 1 H οφείλεται στο H-6 ($J_{6,5} = 7.5$ Hz).

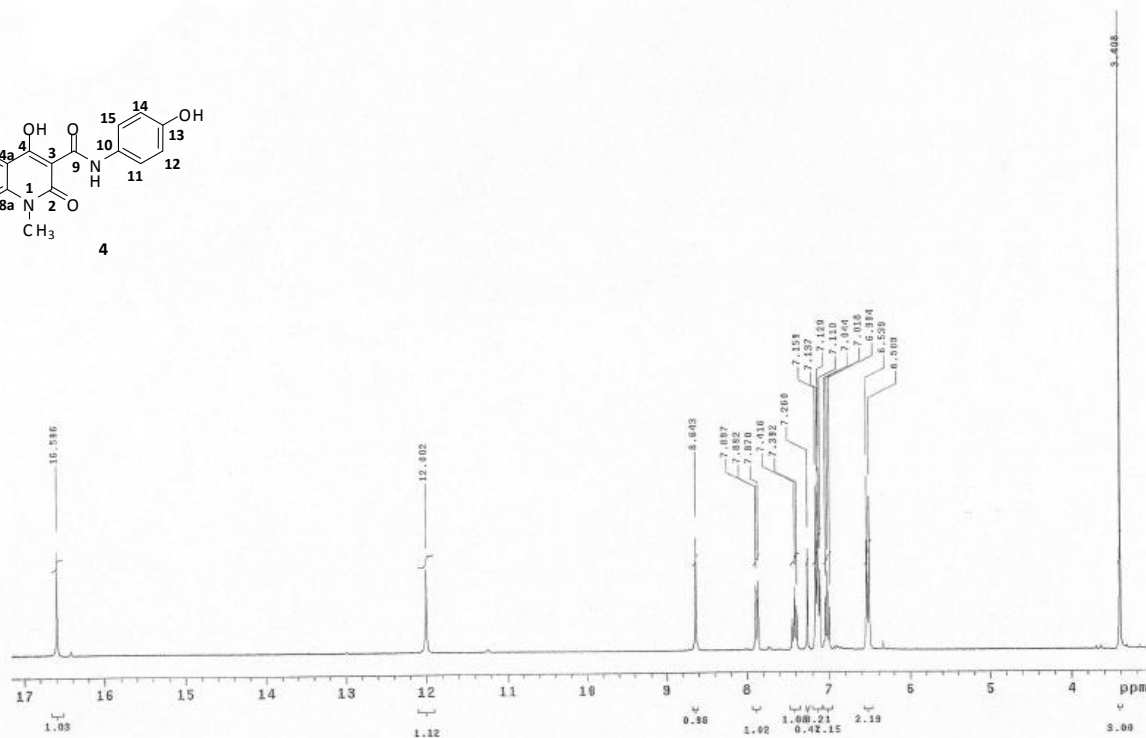
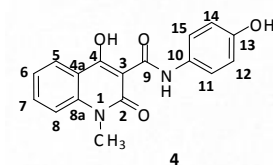
Η ομάδα του μεθυλίου (N-CH₃) εμφανίζεται στα 3.686 ppm με μια απλή κορυφή και ολοκληρώνεται για 3 H.

Το μεθύλιο (H-12) εμφανίζεται με μια τριπλή κορυφή στα 1.020 ppm, η οποία ολοκληρώνεται για 3 H και έχει σταθερά σύζευξης $J = 7.5$ Hz. Τα υδρογόνα του μεθυλενίου της θέσης 11 δίνουν μία εξαπλή κορυφή στα 1.681 ppm με $J = 7.8$ Hz ενώ τα υδρογόνα του μεθυλενίου της θέσης 10 δίνουν μια τετραπλή κορυφή στα 3.421 ppm με $J = 7$ Hz.



Εικόνα 7: Φάσμα ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75MHz) της ένωσης **3**.

Στο φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **3** (Εικόνα 7) εμφανίζονται οι 14 άνθρακες του μορίου. Χαρακτηριστικές είναι οι κορυφές στα 172.1, 171.0 και 162.8 που οφείλονται στους C-4, C-2 και C-9 αντίστοιχα, όπως επίσης και οι κορυφές στα 40.8, 22.59, 11.57 και 29.10 που αντιστοιχούν στους C-11, C-10, C-12 και στο μεθύλιο του ατόμου του αζώτου (N- CH_3) αντίστοιχα.



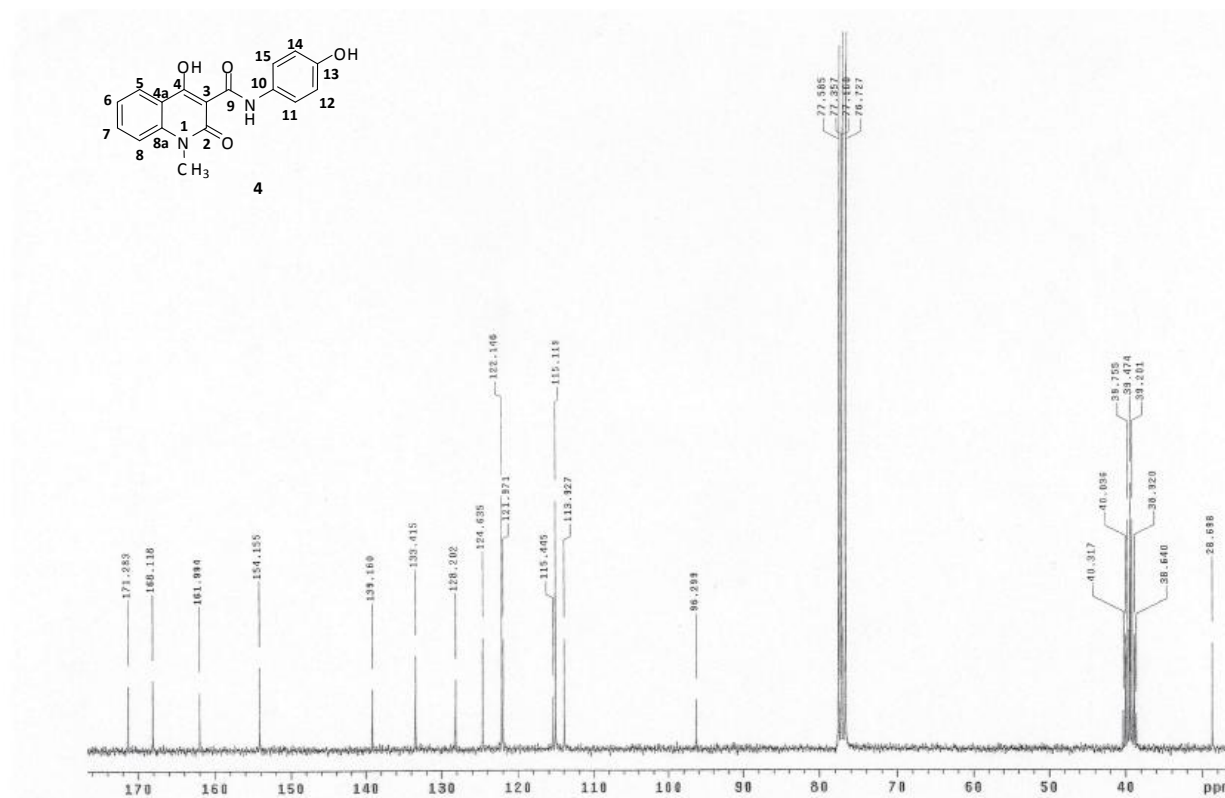
Εικόνα 8: Φάσμα ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) της ένωσης **4**.

Το φάσμα ^1H NMR της ένωσης **4** (Εικόνα 8) χαρακτηρίζεται από μία κορυφή σε χαμηλό πεδίο, στα 16.59 ppm, η οποία αποδίδεται στο πρωτόνιο του υδροξυλίου της θέσης 4 λόγω του δεσμού υδρογόνου που σχηματίζει. Η κορυφή που παρατηρείται στα 12.02 ppm αποδίδεται στο πρωτόνιο του αμιδικού δεσμού N-H.

Η κορυφή στα 8.64 ppm αποδίδεται στο φαινολικό υδροξύλιο (13-OH), και ολοκληρώνεται για 1 H. Η ομάδα του μεθυλίου (N-CH₃) εμφανίζεται στα 3.41 ppm με μια απλή κορυφή και ολοκληρώνεται για 3 H.

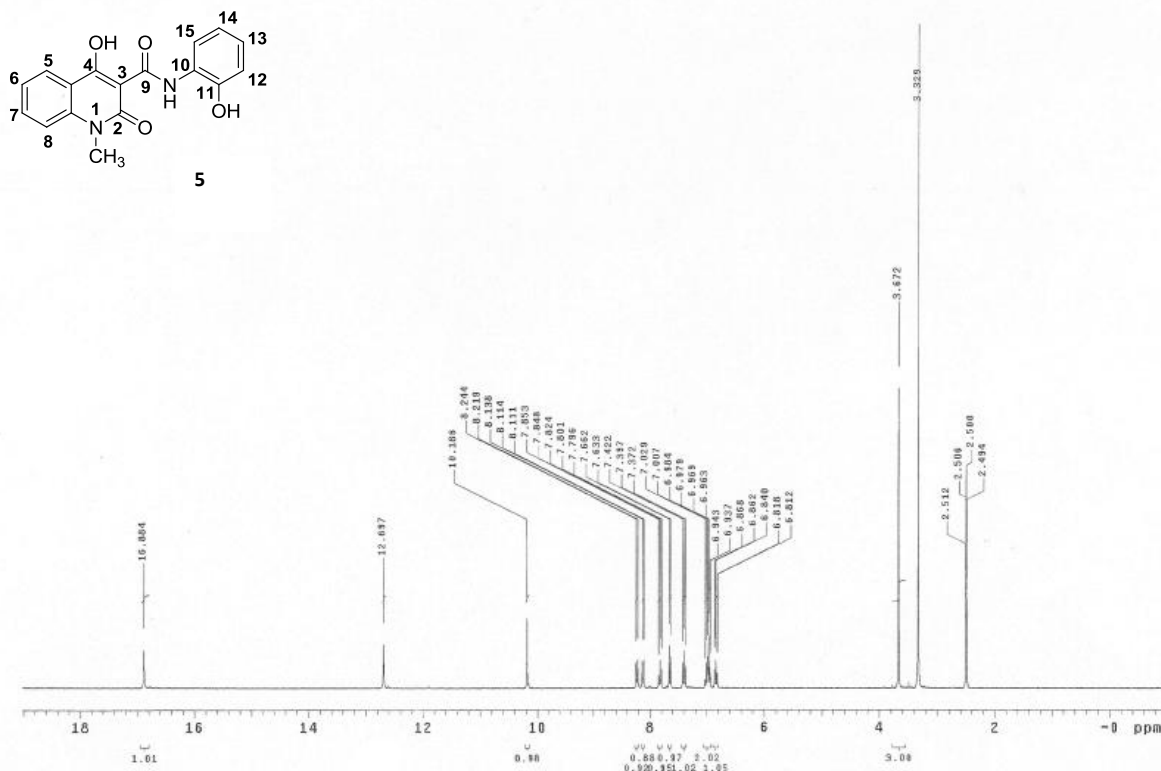
Η διπλή κορυφή στα 7.88 ppm αποδίδεται στο αρωματικό H-5, ολοκληρώνεται για 1 H και έχει σταθερά σύζευξης $J_{5,6} = 7$ Hz. Η τριπλή κορυφή στα 7.42 ppm αντιστοιχεί στο H-7 με σταθερά σύζευξης $J = 7.2$ Hz. Η τριπλή κορυφή που παρατηρείται στα 7.02 ppm ολοκληρώνεται για 1 H και αποδίδεται στο H-6 με σταθερά σύζευξης $J_{6,5} = 7$ Hz. Το H-8 δίνει μια πολλαπλή κορυφή στην περιοχή 7.14-7.11 ppm.

Η διπλή κορυφή στα 6.52 ppm που ολοκληρώνεται για 2 H και έχει σταθερά σύζευξης $J = 9$ Hz αποδίδεται στα H-11 και H15 του p-υποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου. Επίσης, στα 7.14 ppm εμφανίζεται μία διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης $J = 9$ Hz η οποία οφείλεται στα H-12 και H14 του p-υποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου.



Εικόνα 9: Φάσμα ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75MHz) της ένωσης **4**.

Στο φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **4** (Εικόνα 9) εμφανίζονται οι 13 άνθρακες του μορίου. Χαρακτηριστικές είναι οι κορυφές στα 171.3 , 168.1, 161.9 και 154.5 ppm οι οποίες οφείλονται στους C-4, C-2, C-9 και C-13 αντίστοιχα. Οι κορυφές από 139.16-, 96.299 αποδίδονται στους αρωματικούς άνθρακες ενώ η κορυφή στα 28.698 ppm οφείλεται στο μεθύλιο του αζώτου (N-CH₃).



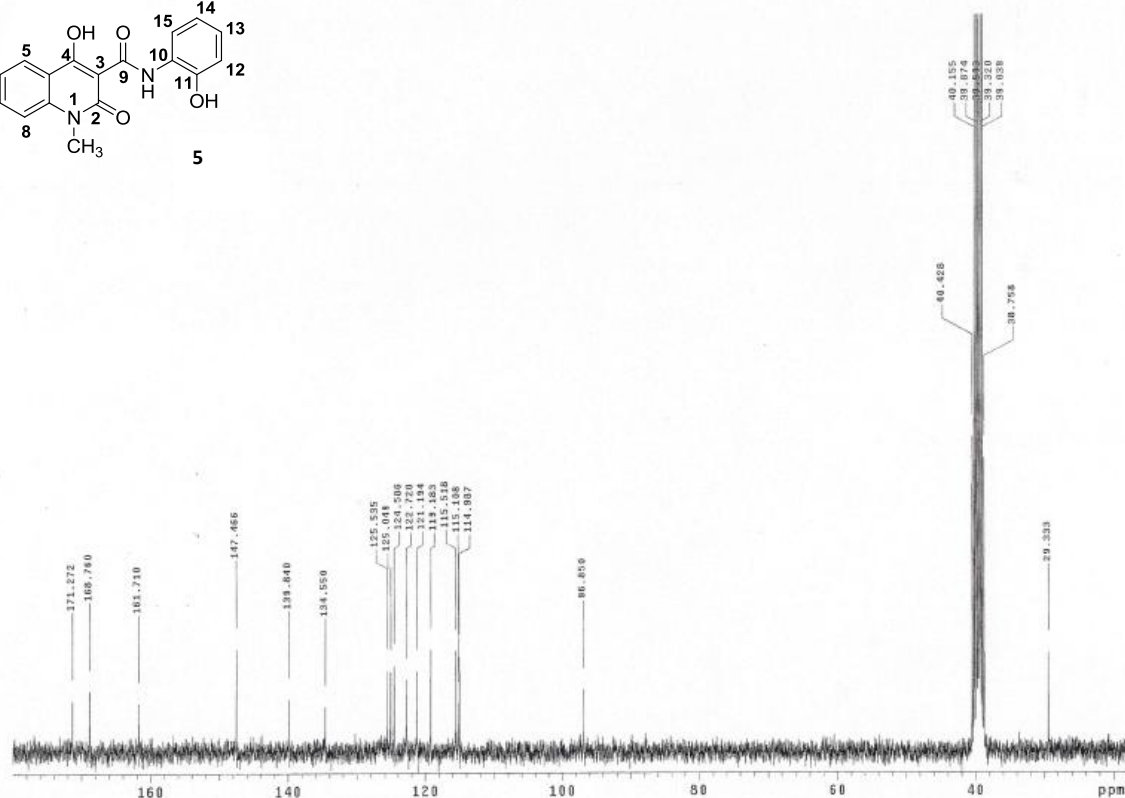
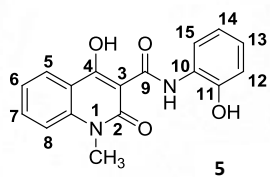
Εικόνα 10: Φάσμα ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300MHz) της ένωσης **5**

Το φάσμα ^1H NMR της ένωσης **5** (Εικόνα 10) χαρακτηρίζεται από μία κορυφή σε χαμηλό πεδίο, στα 16.88 ppm, η οποία αποδίδεται στο πρωτόνιο του υδροξυλίου της θέσης 4 λόγω του δεσμού υδρογόνου που σχηματίζει. Η κορυφή που παρατηρείται στα 12.69 ppm αποδίδεται στο πρωτόνιο του αμιδικού δεσμού N-H.

Η κορυφή στα 10.19 ppm αποδίδεται στο αρωματικό υδροξύλιο (11-OH). Η ομάδα του μεθυλίου (N-CH₃) εμφανίζεται στα 3.28 ppm με μια απλή κορυφή και ολοκληρώνεται για 3 H.

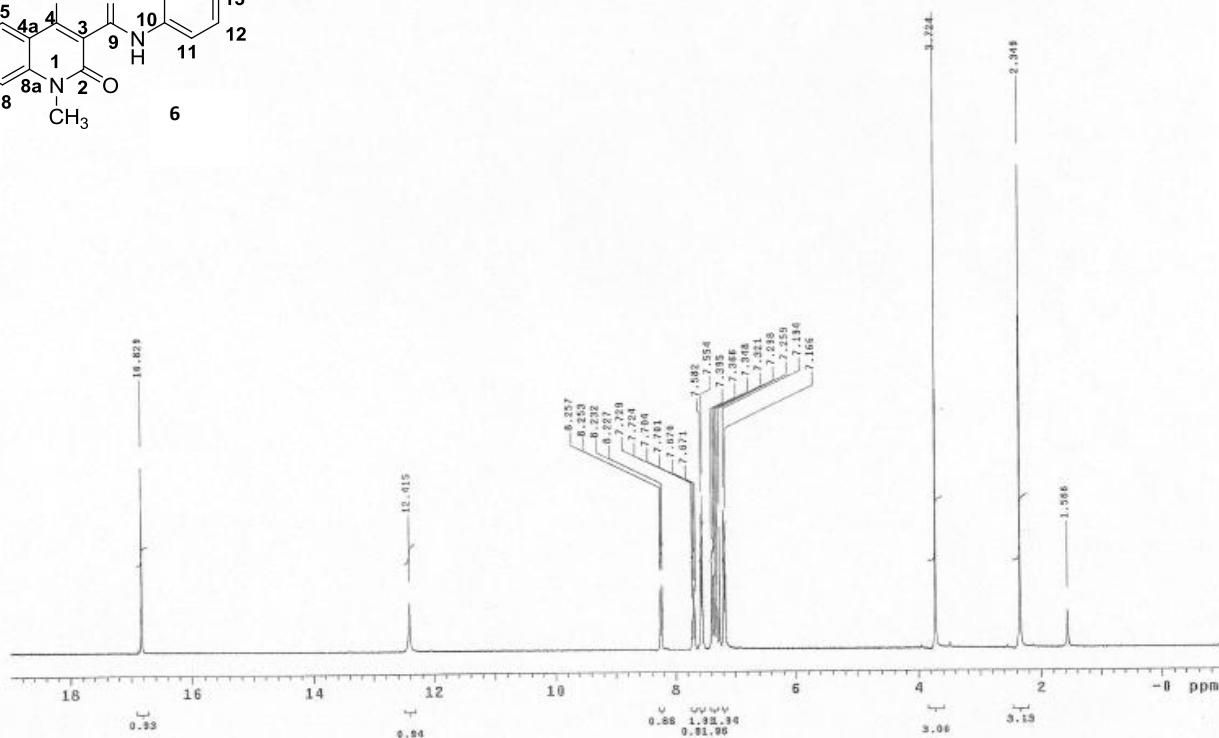
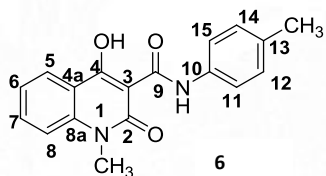
Η διπλή κορυφή στα 8.23 ppm αποδίδεται στο H-5, ολοκληρώνεται για 1 H και έχει σταθερά σύζευξης $J = 7.5$ Hz. Η doublet doublet κορυφή στα 8.11 ppm που αποδίδεται σε αρωματικό πρωτόνιο, ολοκληρώνεται για 1 H και έχει σταθερές σύζευξης $J_1 = 7$ Hz και $J_2 = 1.5$ Hz. Η threefold doublet κορυφή στα 7.82 ppm αντιστοιχεί στο H-7 και έχει σταθερές σύζευξης $J_{7,6} = 7$ Hz και $J_{7,5} = 1.5$ Hz. Η διπλή κορυφή στα 7.65 ppm αποδίδεται στο H-8, ολοκληρώνεται για 1H και έχει σταθερά σύζευξης $J = 9$ Hz.

Η τριπλή κορυφή που παρατηρείται στα 7.40 ppm, ολοκληρώνεται για 1 H και έχει σταθερά σύζευξης $J = 8$ Hz και οφείλεται στο H-6. Η πολλαπλή κορυφή που παρατηρείται στα 7.03-6.94 ppm ολοκληρώνεται για 2 H και αποδίδεται σε αρωματικά πρωτόνια. Τέλος, η doublet triplet κορυφή στα 6.84 ppm που ολοκληρώνεται για 1 H και έχει σταθερές σύζευξης $J = 7.5$ Hz και $J = 1.8$ Hz αποδίδεται σε αρωματικό πρωτόνιο.



Εικόνα 11: Φάσμα ^{13}C NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 75MHz) της ένωσης 5.

Στο φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 5 (Εικόνα 11) εμφανίζονται οι 17 άνθρακες του μορίου. Χαρακτηριστικές είναι οι κορυφές στα 171.3 , 168.8 , 161.7 και 147.5 ppm οι οποίες οφείλονται στους C-4, C-2, C-9 και C-11 αντίστοιχα. Οι κορυφές από 139.8-96.8 ppm αποδίδονται στους αρωματικούς άνθρακες ,ενώ η κορυφή στα 29.3ppm ανήκει στο μεθύλιο του αζώτου (N-CH₃).



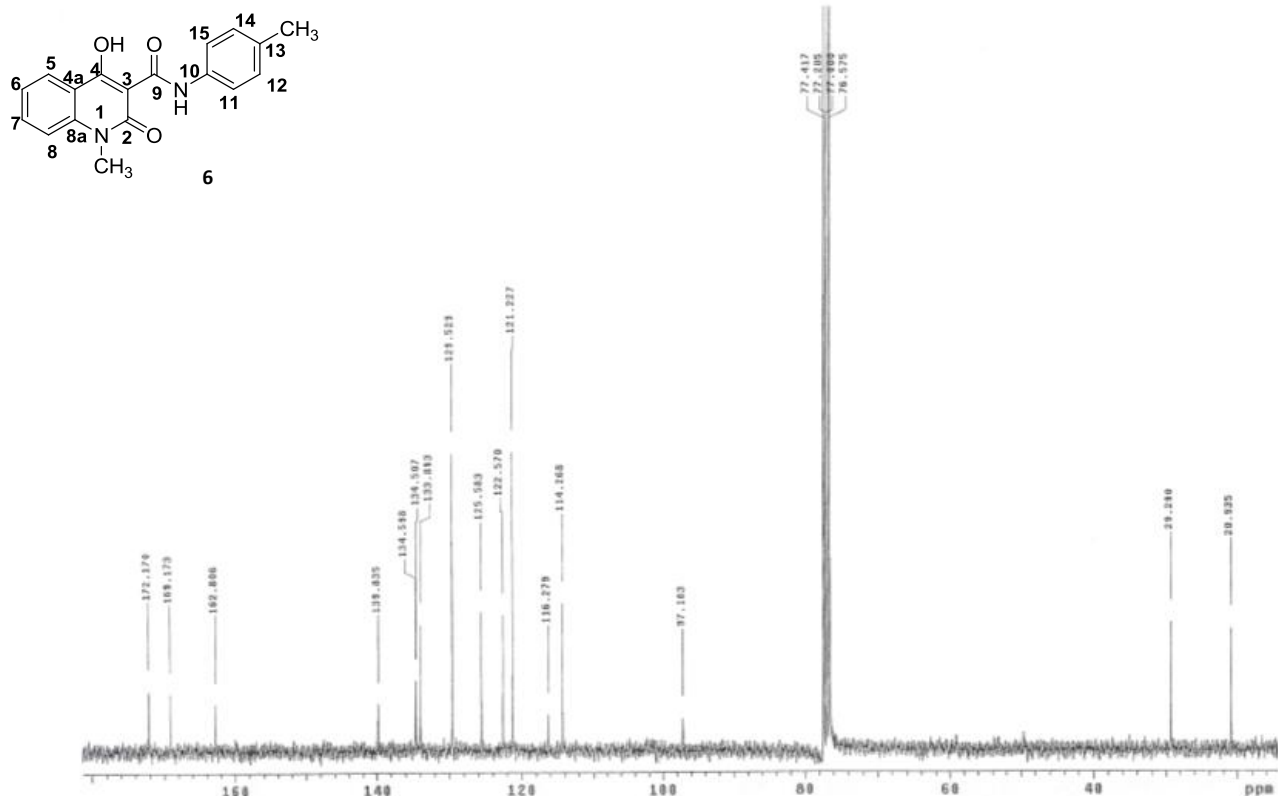
Εικόνα 12: Φάσμα ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) της ένωσης **6**.

Το φάσμα ^1H NMR της ένωσης **6** (Εικόνα 12) χαρακτηρίζεται από μία κορυφή σε χαμηλό πεδίο, στα 16.83 ppm, η οποία αποδίδεται στο πρωτόνιο του υδροξυλίου της θέσης 4 λόγω του δεσμού υδρογόνου που σχηματίζει. Η κορυφή που παρατηρείται στα 12.41 ppm αποδίδεται στο πρωτόνιο του αμιδικού δεσμού N-H.

Η doublet doublet κορυφή στα 8.24 ppm που αποδίδεται στο H-5, ολοκληρώνεται για 1 H και έχει σταθερές σύζευξης $J_{5,7} = 1.5$ Hz και $J_{5,6} = 6$ Hz. Η threefold doublet κορυφή στα 7.70 ppm αντιστοιχεί στο H-7 και έχει σταθερές σύζευξης $J_{7,5} = 1.5$ Hz και $J_{7,6} = 7$ Hz. Η διπλή κορυφή που παρατηρείται στα 7.38 ppm, ολοκληρώνεται για 1 H, έχει σταθερά σύζευξης $J = 9$ Hz και αποδίδεται στο H-6. Η τριπλή κορυφή που παρατηρείται στα 7.30 ppm ολοκληρώνεται για 1 H και έχει σταθερά σύζευξης $J = 6$ Hz και αποδίδεται στο H-8.

Η διπλή κορυφή στα 7.57 ppm με σταθερά σύζευξης $J = 9$ Hz ολοκληρώνεται για 2 H και οφείλεται στα H-11 και H15 του p-υποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου. Τέλος, η διπλή κορυφή στα 7.18 ppm που ολοκληρώνεται για 2 H και έχει σταθερά σύζευξης $J = 9$ Hz αποδίδεται στα H-12 και H14 του p-υποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου.

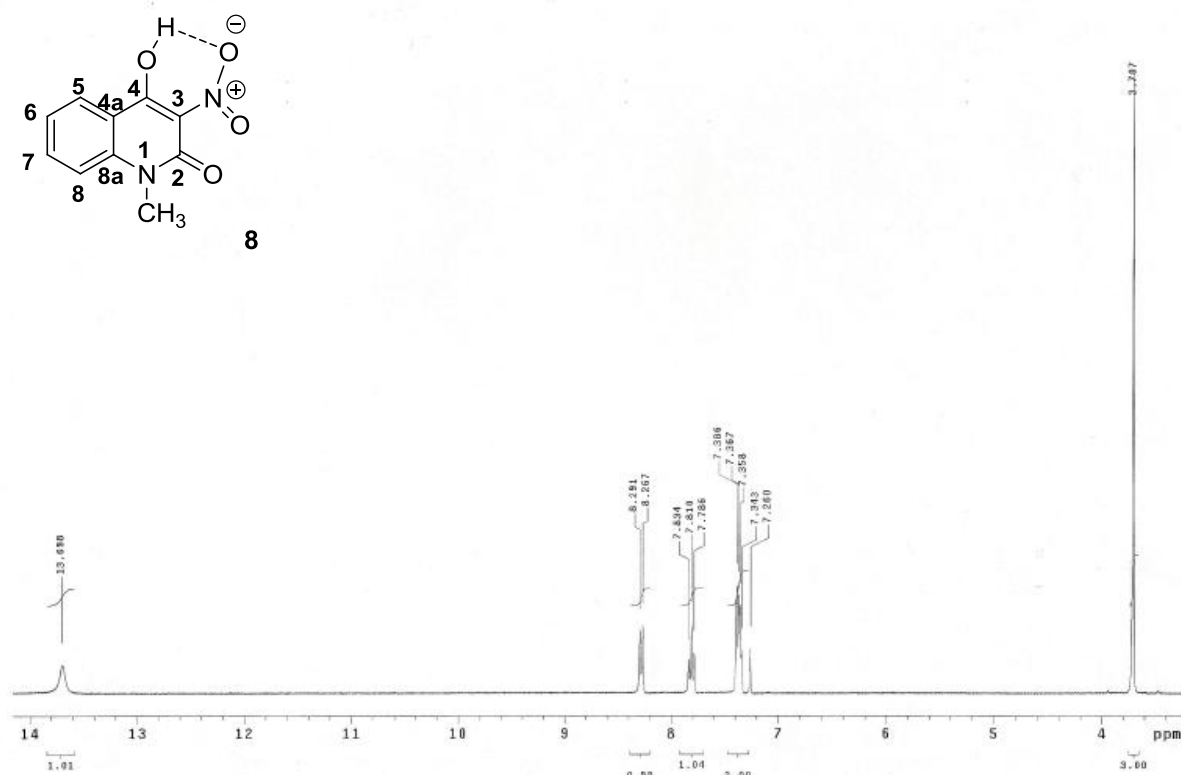
Το μεθύλιο του αζώτου του ετεροκυκλικού συστήματος της κινολινόνης (N- CH_3) εμφανίζεται ως απλή κορυφή στα 3.74 ppm, η οποία ολοκληρώνεται για 3 H. Αντίστοιχα, το μεθύλιο του αρωματικού δακτυλίου εμφανίζεται στα 2.35 ppm με μια απλή κορυφή η οποία ολοκληρώνεται για 3 H.



Εικόνα 13: Φάσμα ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75MHz) της ένωσης **6**.

Στο φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **6** (Εικόνα 13) εμφανίζονται οι 13 άνθρακες του μορίου. Χαρακτηριστικές είναι οι κορυφές στα 172.17 , 169.17 και 162.80 ppm οι οποίες οφείλονται στους C-4, C-2 και C-9 αντίστοιχα. Οι κορυφές από 139.83-97.16 ppm αποδίδονται στους αρωματικούς άνθρακες του μορίου, ενώ οι κορυφές στα 29.29 και 20.93 ppm αποδίδονται στο μεθύλιο του αζώτου (N-CH_3) και στο αρωματικό μεθύλιο αντίστοιχα.

3.2.1 Φασματοσκοπική μελέτη των κινολινονών 8-17 (Σειρά Β)

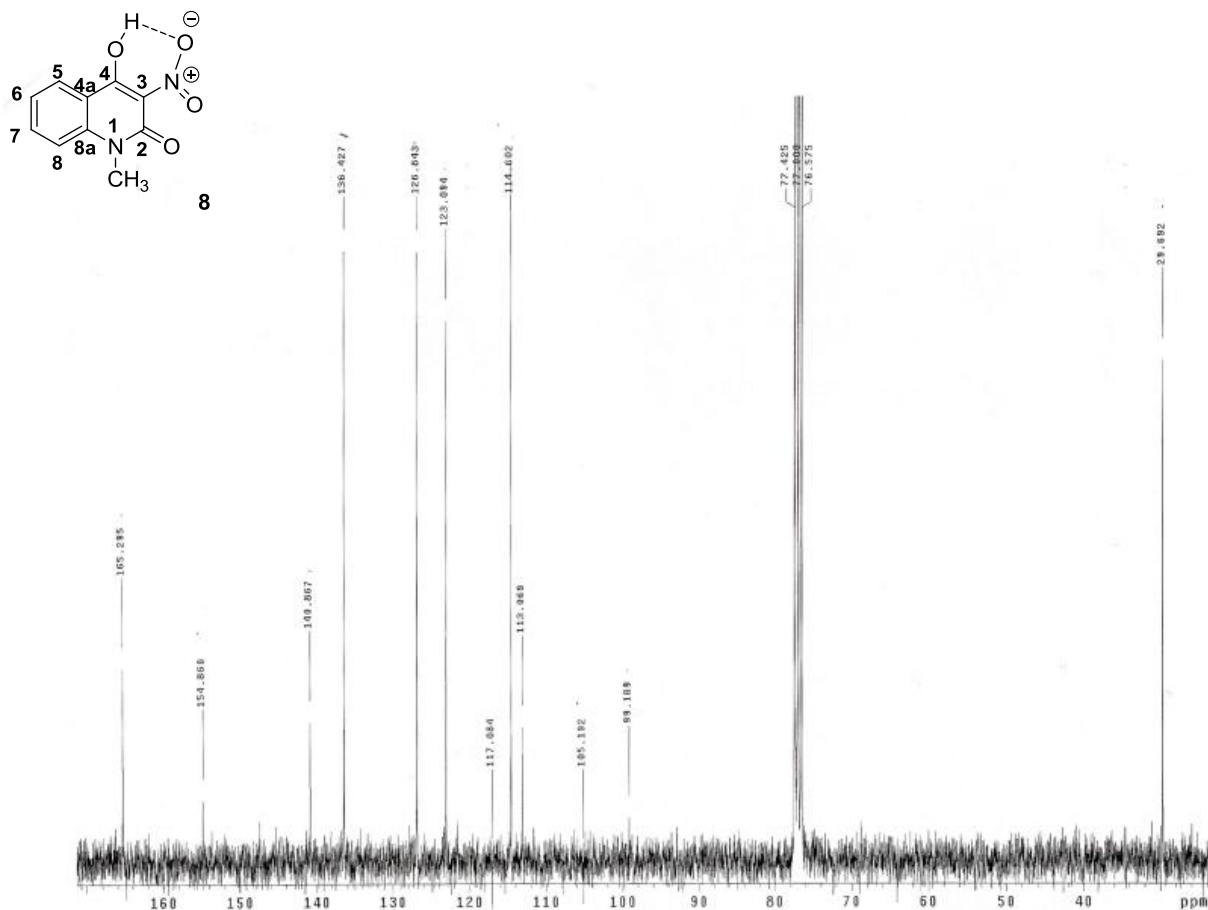


Εικόνα 14: Φάσμα ¹H NMR (CDCl₃, 300MHz) της ένωσης **8**.

Το φάσμα ¹H NMR της 3-νιτρο- 1-μεθυλο-4-υδροξυ-2-κινολινόνης (**8**) (Εικόνα 14) χαρακτηρίζεται από μία κορυφή σε χαμηλό πεδίο, στα 13.69 ppm, η οποία αποδίδεται στο πρωτόνιο του υδροξυλίου της θέσης 4, το οποίο συμμετέχει σε ισχυρό δεσμό υδρογόνου με το οξυγόνο της νιτροομάδας στη θέση 3 .

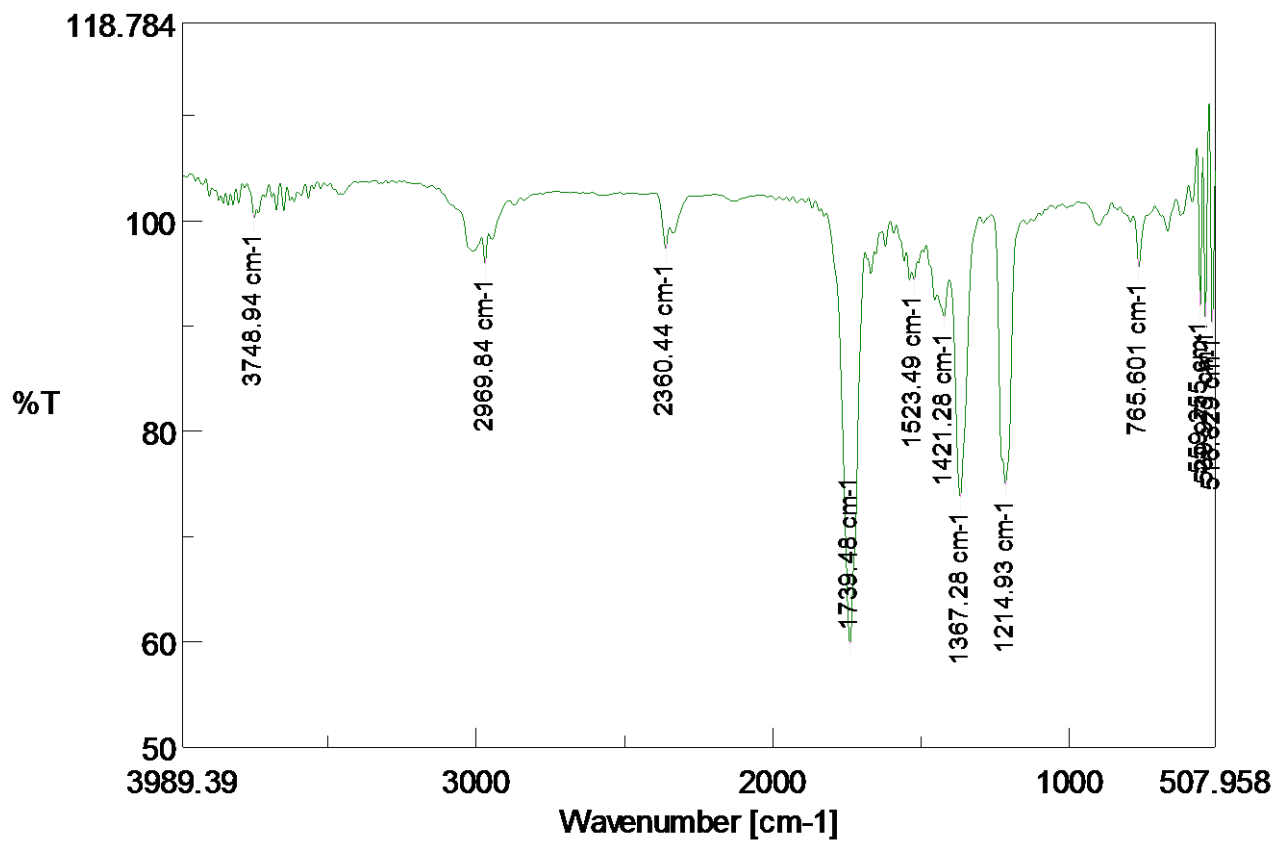
Οι κορυφές που αντιστοιχούν στα αρωματικά πρωτόνια εμφανίζονται στις αναμενόμενες χημικές μετατοπίσεις (8.29-7.34 ppm). Συγκεκριμένα, παρατηρείται μια διπλή κορυφή στα 8.28 ppm , η οποία ολοκληρώνεται για 1 H, έχει σταθερά σύζευξης J= 7 Hz και οφείλεται στο H-5. Η τριπλή κορυφή στα 7.81 ppm που αποδίδεται στο H-7 έχει σταθερά σύζευξης J= 7.2 Hz. Τέλος, η πολλαπλή κορυφή στα 7.38-7.34 ppm, ολοκληρώνεται για 2 H και έχει σταθερά σύζευξης J= 7 Hz.

Το σήμα των πρωτονίων του μεθυλίου εμφανίζεται με τη μορφή απλής κορυφής στα 3.70 ppm που ολοκληρώνεται για 3 H.



Εικόνα 15: Φάσμα ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75MHz) της ένωσης **8**.

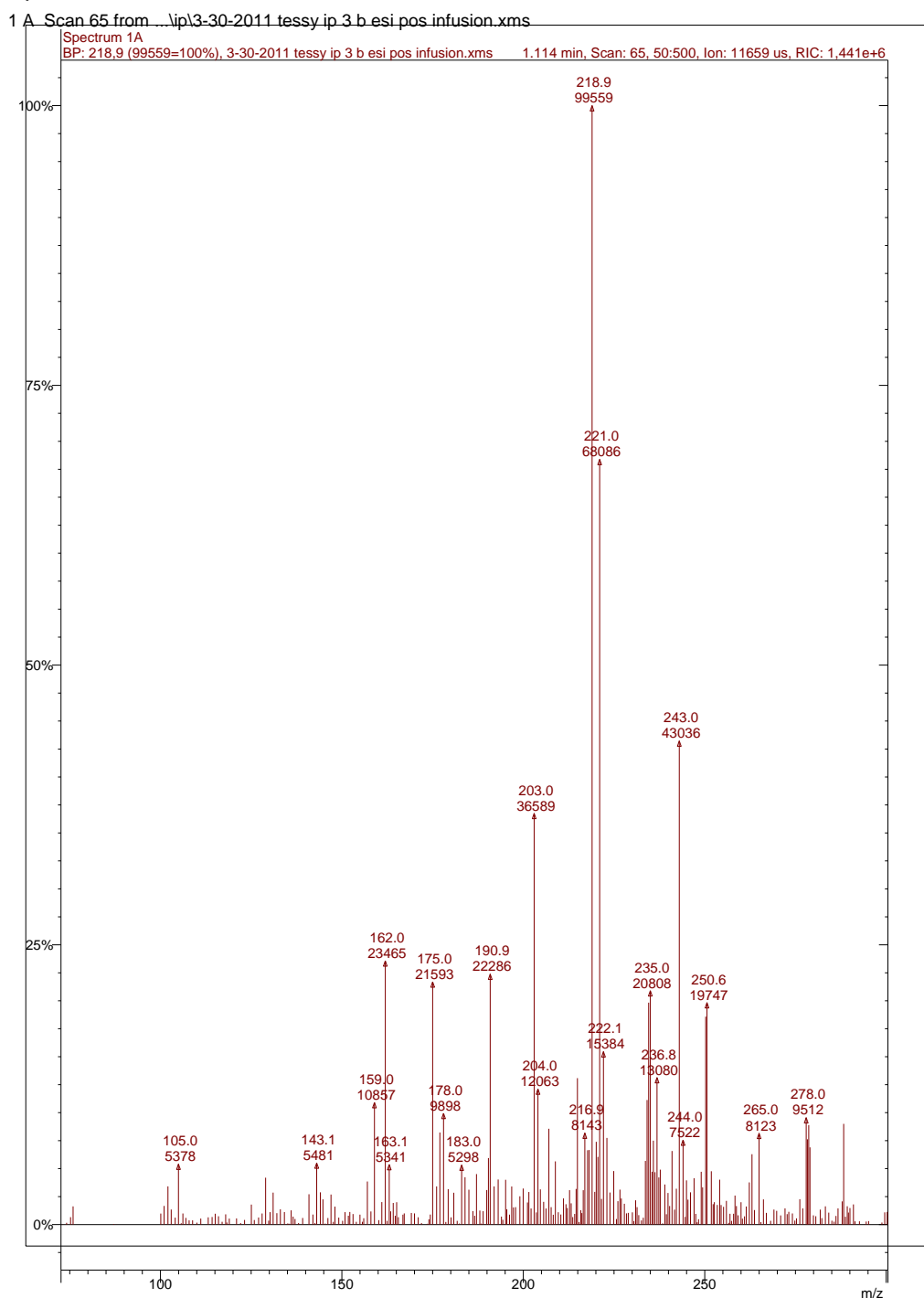
Στο φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **8** (Εικόνα 15) εμφανίζονται οι 10 άνθρακες του μορίου. Χαρακτηριστικές είναι οι κορυφές στα 165.29 και 154.86 οι οποίες οφείλονται στους C-2 και C-4 του μορίου. Οι κορυφές από 140.86- 99.18 ppm αποδίδονται στους αρωματικούς άνθρακες, ενώ η κορυφή στα 29.69 ppm. Οφείλεται στο μεθύλιο του αζώτου (N-CH_3).



Εικόνα 16: Φάσμα IR της ένωσης **8**

Στο φάσμα IR της ένωσης **8** (Εικόνα 16) η κορυφή στα 1523 cm^{-1} οφείλεται στην ασύμμετρη δόνηση τάσης ν_{as} της νιτροομάδας και η κορυφή στα 1367 cm^{-1} οφείλεται στη συμμετρική δόνηση τάσης της νιτροομάδας ν_s . Επίσης παρατηρείται η κορυφή στα 1739 cm^{-1} η οποία αντιστοιχεί στην ομάδα του καρβονυλίου του κυκλικού αμιδίου.

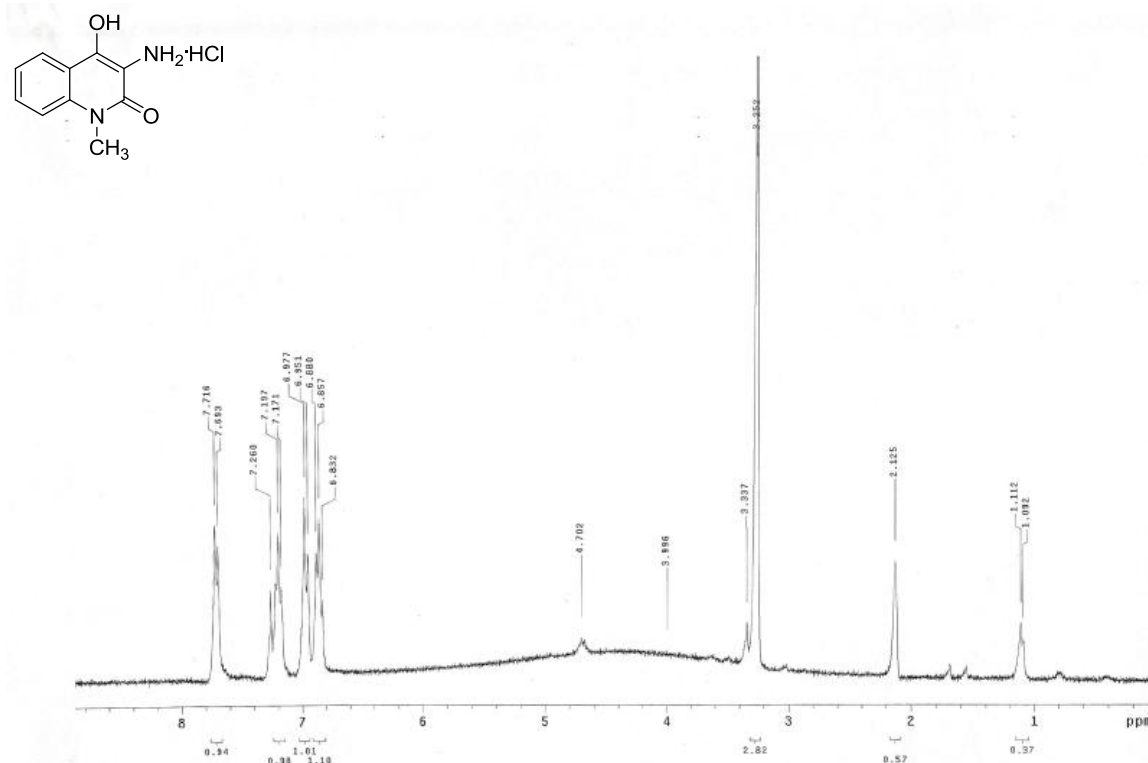
Spectrum 1A Plot - 30/12/2011 1:15 ì



Εικόνα 17 : Φάσμα MS της ένωσης **8**

Στο φάσμα ESI-MS της ένωσης **8** (Εικόνα 17) παρατηρείται μια κορυφή σε m/z 221, η οποία αντιστοιχεί στο $[M+H]^+$, δηλαδή στο μοριακό βάρος της ένωσης με την προσθήκη ενός πρωτονίου H^+ . Επίσης παρατηρείται μια κορυφή σε m/z 243 που αποδίδεται στο ιόν $[M+23]^+$, λόγω της παρουσίας ιόντων νατρίου στο διάλυμα. Η κορυφή σε m/z 175

αντιστοιχεί στο ιόν $[M-NO_2]^+$, το οποίο προκύπτει μετά από απόσπαση της νιτροομάδας. Τέλος, η κορυφή σε m/z 203 αντιστοιχεί στο ιόν $[M-OH]^+$ το οποίο προκύπτει μετά από απόσπαση της ομάδας του υδροξυλίου.

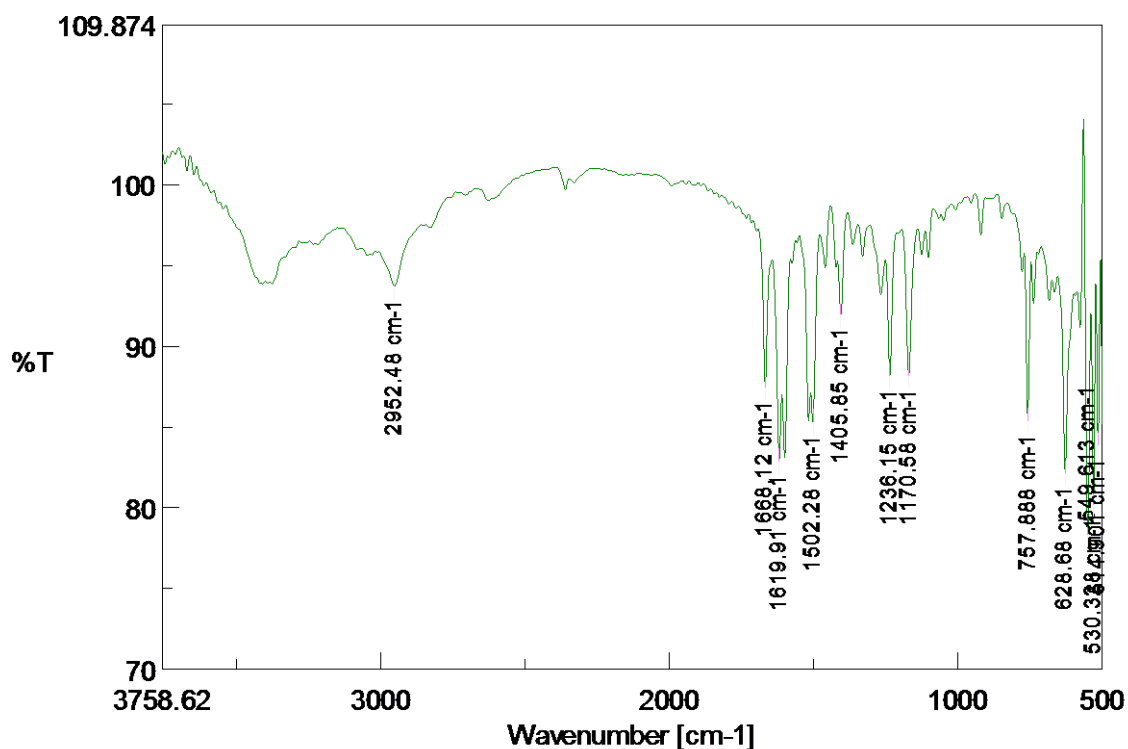


Εικόνα 18A : Φάσμα 1H ($CDCl_3$, 300MHz) του υδροχλωρικού άλατος της 3-αμινο-1-μεθυλο-4-υδροξυ-2- κινολινόνης

Στο φάσμα 1H NMR παρατηρούνται οι κορυφές από 6.832-7.716 ppm οι οποίες αποδίδονται σε αρωματικά πρωτόνια. Συγκεκριμένα, παρατηρείται μια διπλή κορυφή στα 7.70 ppm, η οποία αποδίδεται σε ένα αρωματικό πρωτόνιο του συστήματος της κινολινόνης και έχει σταθερά σύζευξης $J=7$ Hz. Η τριπλή κορυφή που παρατηρείται στα 7.19 ppm αποδίδεται επίσης σε ένα αρωματικό πρωτόνιο του συστήματος της κινολινόνης και έχει σταθερά σύζευξης $J=8$ Hz. Η διπλή κορυφή στα 6.97 ppm ολοκληρώνεται για 1 H του συστήματος της κινολινόνης και έχει σταθερά σύζευξης $J=8$ Hz. Τέλος, η τριπλή κορυφή στα 6.857 ppm, αποδίδεται επίσης σε αρωματικό H του συστήματος της κινολινόνης και έχει σταθερά σύζευξης $J=7$ Hz.

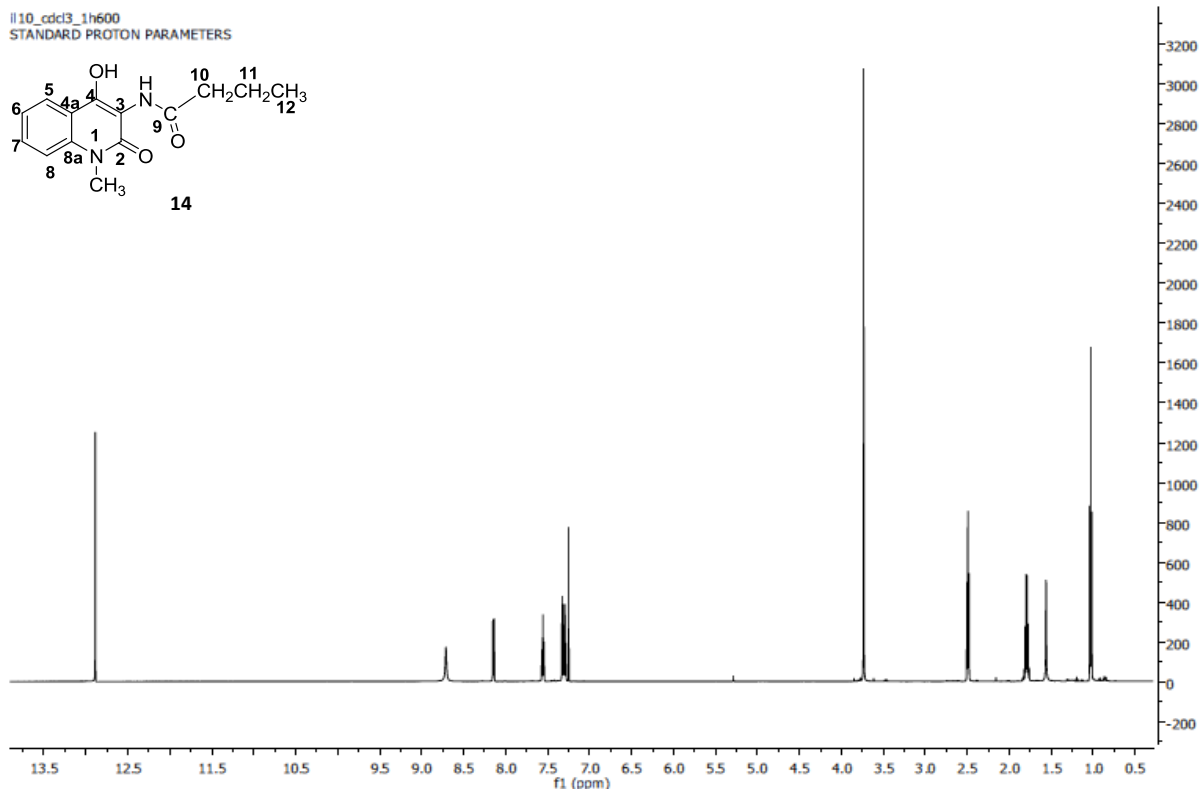
Η ομάδα του μεθυλίου του ατόμου του αζώτου ($N-CH_3$) εμφανίζεται με μια απλή κορυφή στα 3.253 ppm, η οποία ολοκληρώνεται για 3 H.

Η ομάδα του υδροχλωρικού άλατος της αμίνης εμφανίζεται με μια ευρεία κορυφή στα 4.702 ppm.



Εικόνα 18B: Φάσμα IR του υδροχλωρικού άλατος της 3-άμινο-1-μέθυλο-4-υδροξύ-2-κινολινόνης

Στο φάσμα IR του υδροχλωρικού άλατος της 3-άμινο-1-μέθυλο-4-υδροξύ-2-κινολινόνης (Εικόνα 18) αρχικά παρατηρείται μια κορυφή στα 3409 cm⁻¹ η οποία αντιστοιχεί στη δόνηση τάσης του αμιδικού δεσμού N-H. Στη συνέχεια, παρατηρούνται δυο κορυφές οι οποίες αντιστοιχούν σε δονήσεις κάμψης του αμιδικού δεσμού N-H. Η πρώτη κορυφή στα 1600 cm⁻¹ οφείλεται στην ασύμμετρη δόνηση κάμψης δ_{as} NH₃⁺, ενώ η δεύτερη κορυφή στα 1502 cm⁻¹ οφείλεται στη συμμετρική δόνηση κάμψης δ_s NH₃⁺. Επίσης, η κορυφή που εντοπίζεται στα 1236 cm⁻¹ αντιστοιχεί σε τάση του αρωματικού δεσμού C-N (στο δεσμό N-CH₃) και η κορυφή στα 1668 cm⁻¹ στην ομάδα του καρβονυλίου.

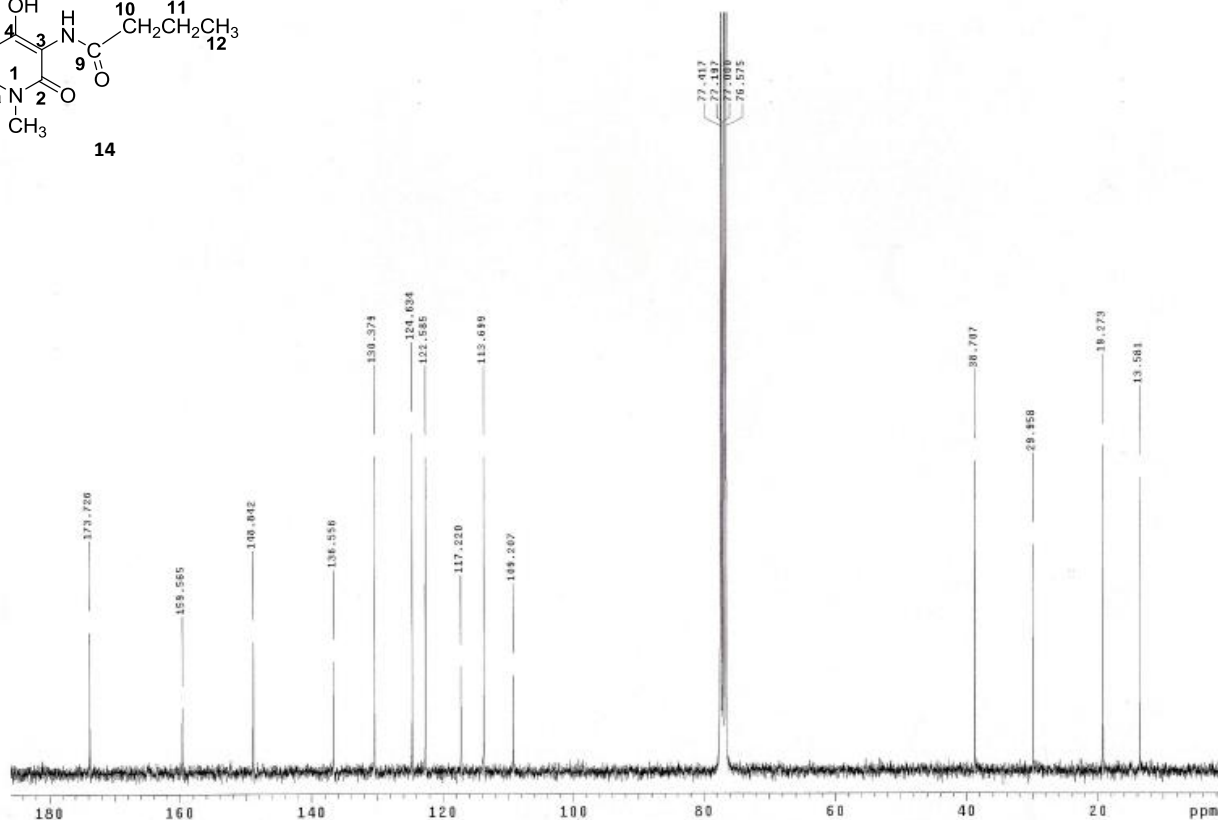
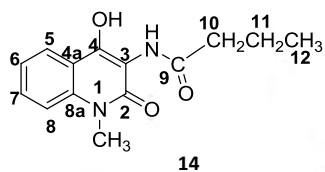


Εικόνα 19: Φάσμα ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) της ένωσης **14**

Το φάσμα ^1H NMR της ένωσης **14** (Εικόνα 19) χαρακτηρίζεται από μία κορυφή σε χαμηλό πεδίο, στα 12.89 ppm, η οποία αποδίδεται στο πρωτόνιο του υδροξυλίου της θέσης 4. Η κορυφή που παρατηρείται στα 8.71 ppm αποδίδεται στον αμιδικό δεσμό N-H.

Τα αρωματικά πρωτόνια του ετεροκυκλικού δακτυλίου της κινολινόνης παρατηρούνται στο εύρος χημικών μετατοπίσεων 7.25-8.14 ppm. Συγκεκριμένα, στα 8.14 ppm εμφανίζεται μια doublet κορυφή που ολοκληρώνεται για 1H και έχει σταθερά σύζευξης $J=6$ Hz. Στα 7.55 ppm εμφανίζεται μια triplet κορυφή η οποία επίσης ολοκληρώνεται για 1H και έχει σταθερά σύζευξης $J=6$ Hz. Τέλος, εμφανίζεται μια πολλαπλή κορυφή στα 7.31 ppm, ολοκληρώνεται για 2H.

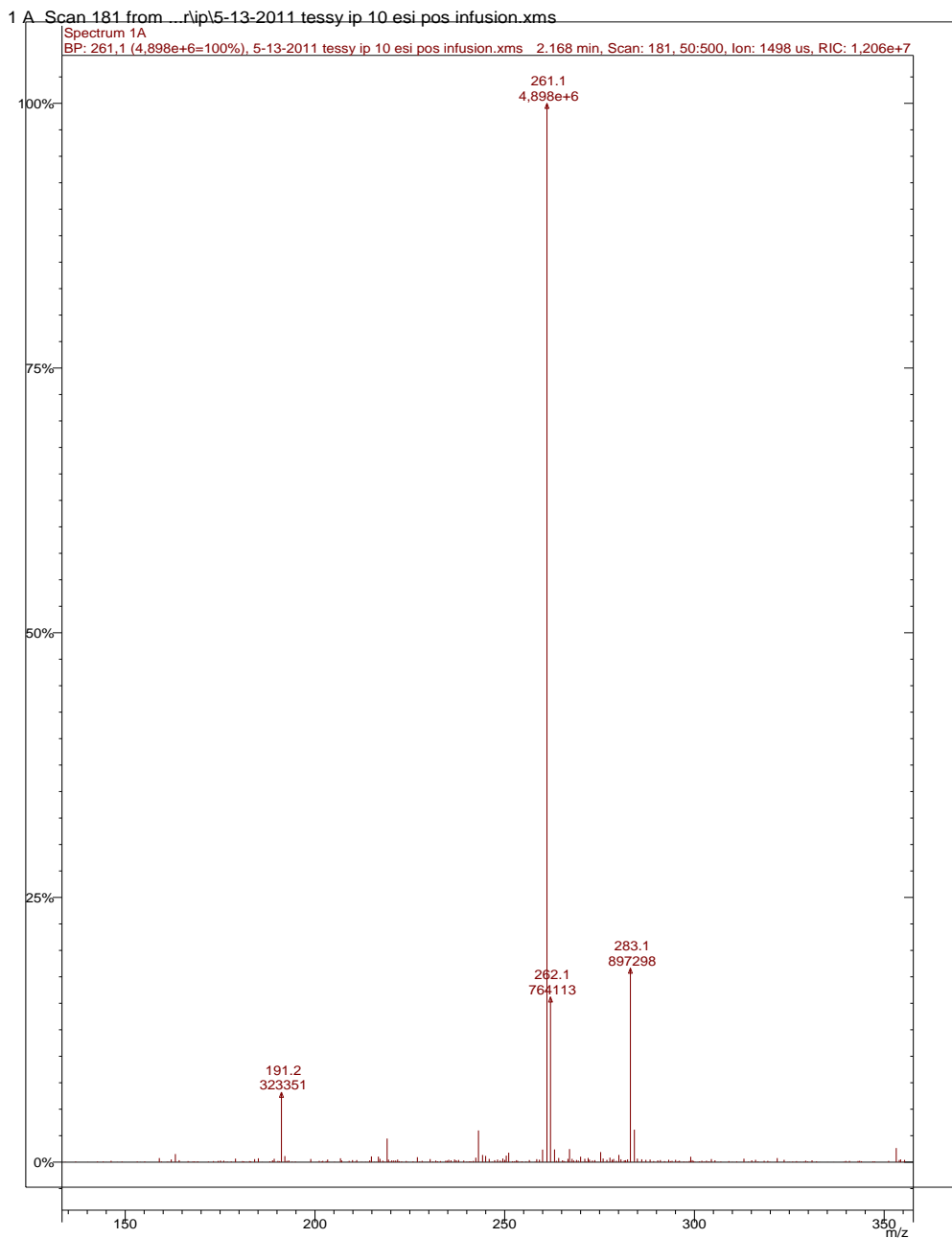
Η κορυφή στα 3.73 ppm αποδίδεται στην ομάδα του μεθυλίου (N-CH_3). Τα αλειφατικά πρωτόνια της προπυλο-ομάδας εμφανίζονται σε υψηλότερο πεδίο από 1.03- 2.49 ppm. Η πιο αποπροστατευμένη ομάδα του μεθυλενίου εμφανίζεται με μια τριπλή κορυφή στα 2.49 ppm και ολοκληρώνεται για 2H, ενώ η ενδιάμεση ομάδα του μεθυλενίου εμφανίζεται με μια sextet κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για 2 H και έχει σταθερές σύζευξης $J_1=6$ Hz και $J_2=6$ Hz. Η ομάδα του μεθυλίου, τέλος, χαρακτηρίζεται από μια τριπλή κορυφή στα 1.03 ppm, η οποία ολοκληρώνεται για 3 H και έχει σταθερά σύζευξης $J=6$ Hz.



Εικόνα 20: Φάσμα ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) της ένωσης **14**

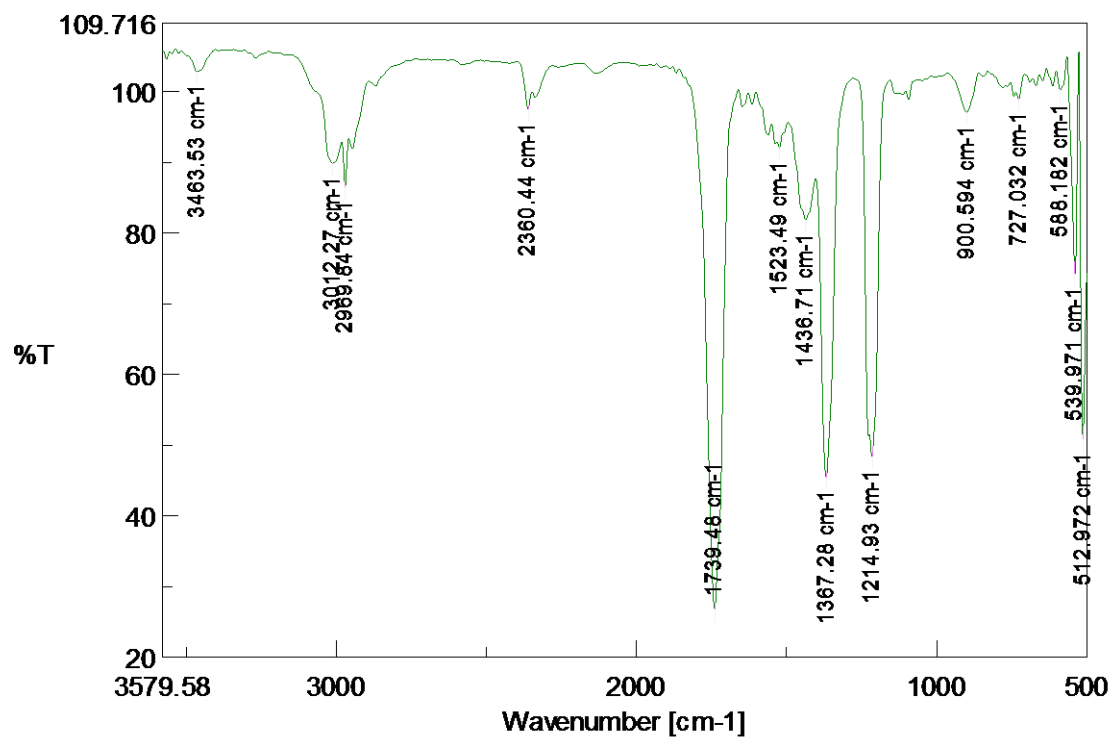
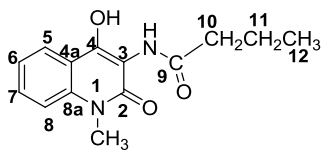
Στο φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **14** (Εικόνα 20) εμφανίζονται οι κορυφές των 14 ατόμων άνθρακα του μορίου. Χαρακτηριστικές είναι οι κορυφές στα 173.72, 159.56, 148.84 ppm οι οποίες οφείλονται στους C-4, C-2 και C-9 αντίστοιχα. Οι κορυφές από 136.5-109.2 αποδίδονται στους αρωματικούς άνθρακες ενώ η κορυφή στα 29.95 ppm αποδίδεται στην ομάδα του μεθυλίου που είναι συνδεδεμένη με το άζωτο (N-CH₃).

Spectrum 1A Plot - 30/12/2011 1:40 ì



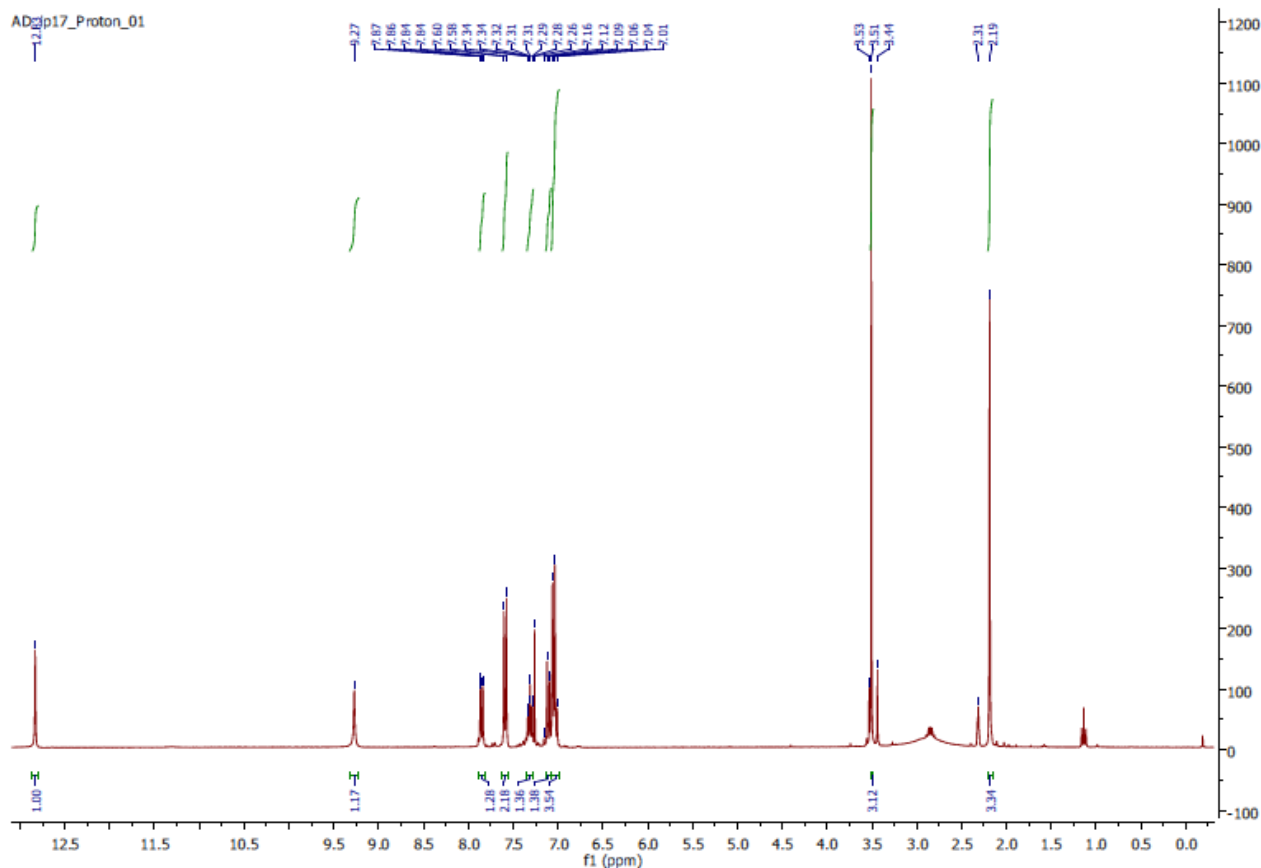
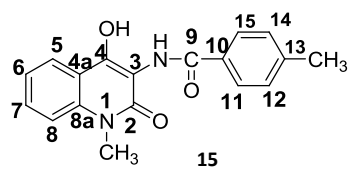
Εικόνα 21: Φάσμα ESI-MS της ένωσης **14**

Στο φάσμα ESI- MS της ένωσης **14** (Εικόνα 21) παρατηρείται μια κορυφή σε m/z 261.1 το οποίο αντιστοιχεί στο ιόν $[M+H]^+$, δηλαδή στο μοριακό βάρος της ένωσης με την προσθήκη ενός πρωτονίου H^+ . Η κορυφή m/z 283 αποδίδεται στο ιόν $[M+23]^+$, λόγω της παρουσίας ιόντων νατρίου στο διάλυμα. Επίσης παρατηρείται μια κορυφή σε m/z 191 η οποία αντιστοιχεί στο ιόν που προκύπτει μετά από απόσπαση της ομάδας C_4H_7O .



Εικόνα 22: Φάσμα IR της ένωσης **14**

Στο φάσμα IR της ένωσης **14** (Εικόνα 22) αρχικά παρατηρείται μια κορυφή στα 3012 cm^{-1} η οποία αντιστοιχεί σε δόνηση τάσης του αμιδικού δεσμού N-H και μια στα 1739.40 cm^{-1} η οποία αποδίδεται στη δόνηση τάσης της ομάδας του κυκλικού καρβονυλίου (C=O). Η κορυφή στα 1367.28 cm^{-1} αποδίδεται σε αρωματικά πρωτόνια, ενώ η κορυφή στα 1214 cm^{-1} αποδίδεται στη δόνηση τάσης ν του δεσμού C-N και στη δόνηση κάμψης του αμιδίου της θέσης 3.



Εικόνα 23: Φάσμα ^1H NMR ($\text{CDCl}_3/\text{DMSO}, 300 \text{ MHz}$) της ένωσης **15**

Το φάσμα ^1H NMR της ένωσης **15** (Εικόνα 23) χαρακτηρίζεται από μία κορυφή σε χαμηλό πεδίο, στα 12.83 ppm, η οποία αποδίδεται στο πρωτόνιο του υδροξυλίου της θέσης 4. Η απλή κορυφή στα 9.27 ppm αποδίδεται στο πρωτόνιο του αμιδικού δεσμού N-H.

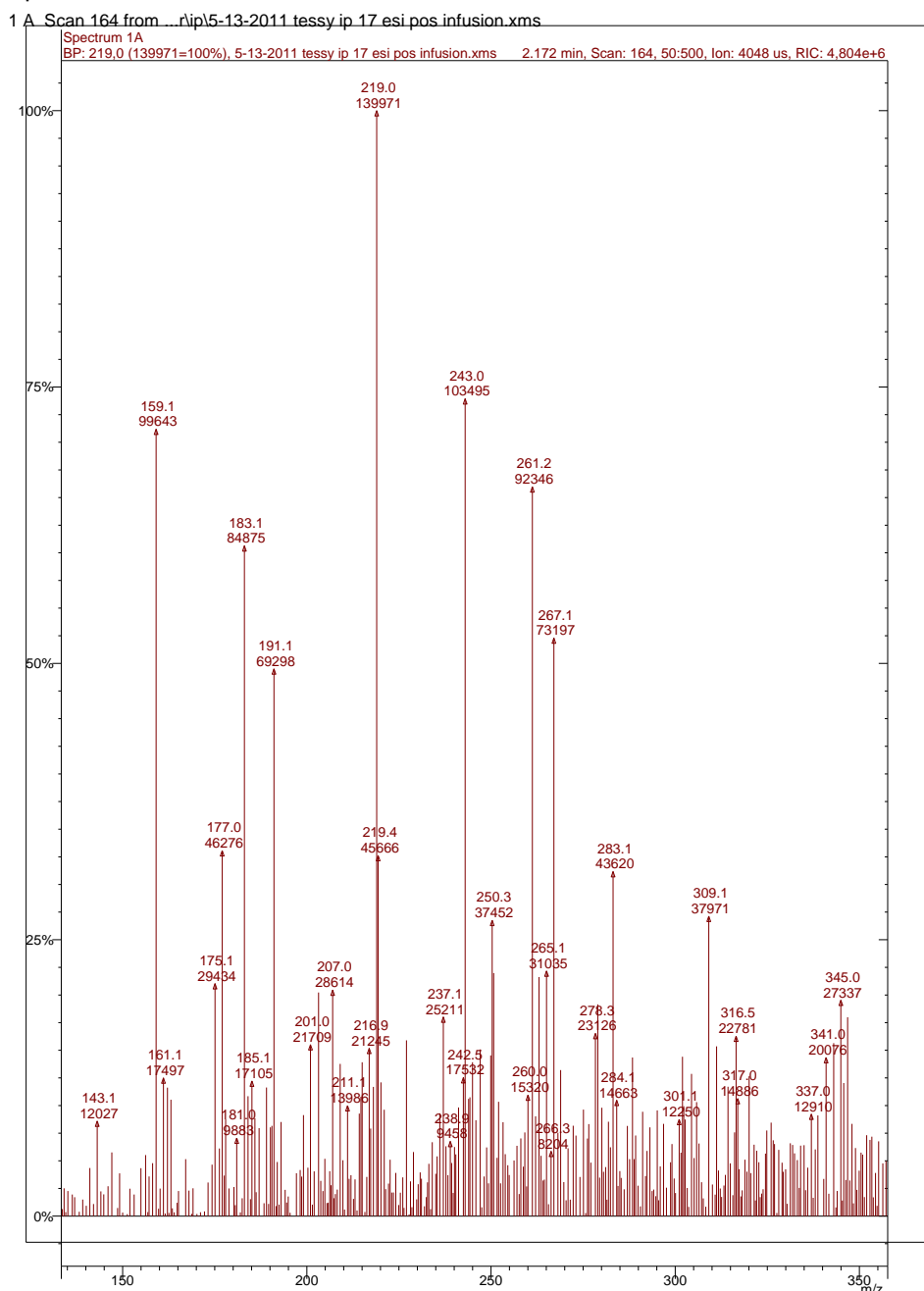
Τα αρωματικά πρωτόνια εμφανίζονται στις χημικές μετατοπίσεις 7.85-7.01 ppm. Συγκεκριμένα, το πρωτόνιο H-5 εμφανίζεται στα 7.85 ppm με μια doublet doublet κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για 1H και έχει σταθερές σύζευξης $J_{5,6}=6 \text{ Hz}$, $J_{5,7}=3 \text{ Hz}$. Στα 7.31 ppm εμφανίζεται μια threefold doublet κορυφή η οποία αποδίδεται στο πρωτόνιο H-7, ολοκληρώνεται για 1H και έχει σταθερά σύζευξης $J=9 \text{ Hz}$. Η διπλή κορυφή στα 7.14 ppm αποδίδεται στο πρωτόνιο H-8, ολοκληρώνεται για 1 H και έχει σταθερά σύζευξης $J=9 \text{ Hz}$. Το πρωτόνιο H-6 εμφανίζεται με μια πολλαπλή κορυφή από 7.06-7.01 ppm.

Η διπλή κορυφή στα 7.59 ppm με σταθερά σύζευξης $J=6 \text{ Hz}$ ολοκληρώνεται για 2 H και οφείλεται στα H-11 και H15 του p-υποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου. Τέλος, η

διπλή κορυφή στα 7.05 ppm που ολοκληρώνεται για 2 H και έχει σταθερά σύζευξης J =6 Hz αποδίδεται στα H-12 και H14 του p-υποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου.

Η ομάδα του μεθυλίου (N-CH₃) χαρακτηρίζεται από μια απλή κορυφή στα 3.51 ppm , η οποία ολοκληρώνεται για 3H. Το μεθύλιο του τολουολίου χαρακτηρίζεται από μια απλή κορυφή στα 2.19 ppm η οποία ολοκληρώνεται για 3 H.

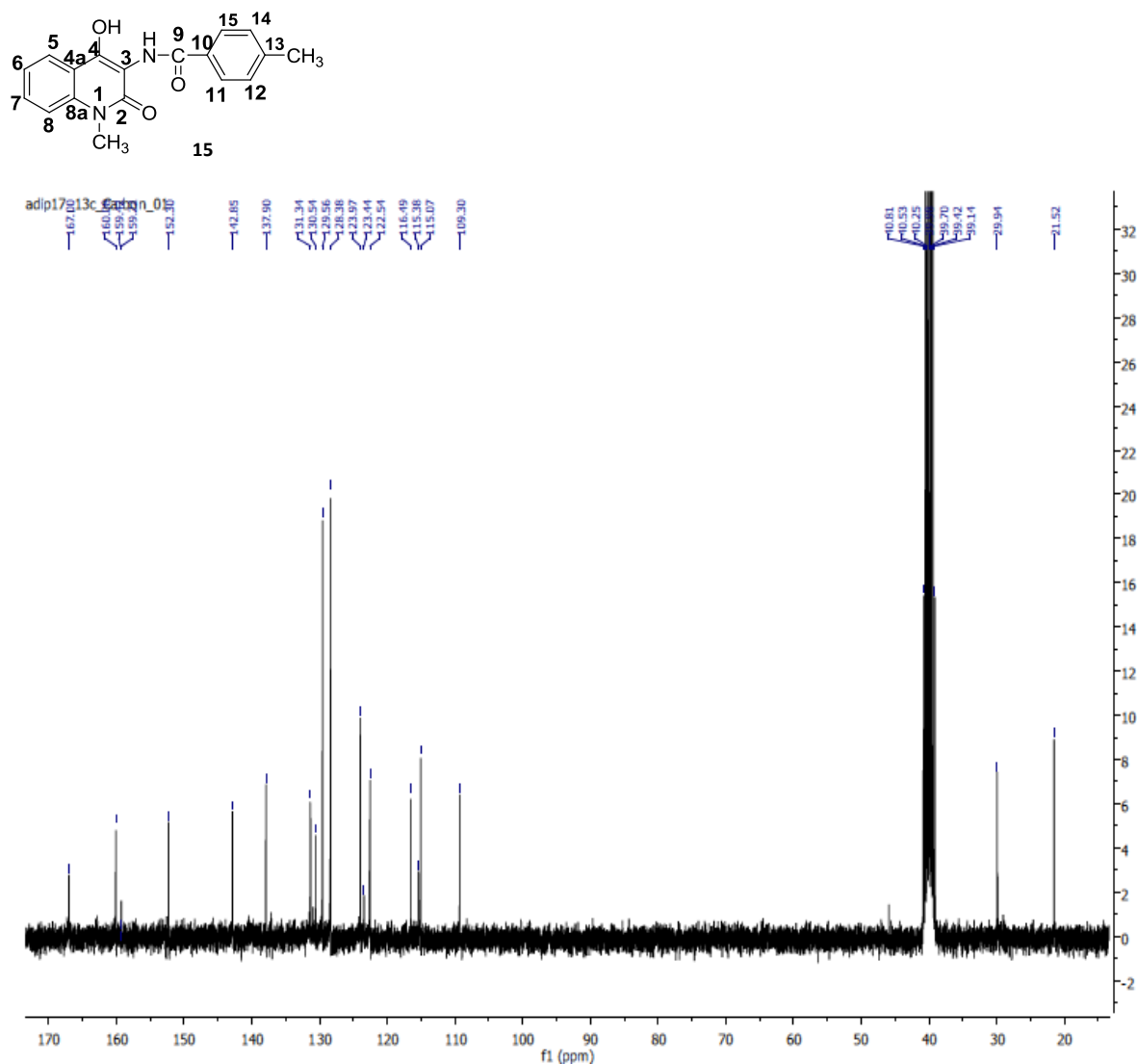
Spectrum 1A Plot - 30/12/2011 1:42 ì



Εικόνα 24: Φάσμα ESI-MS της ένωσης 15

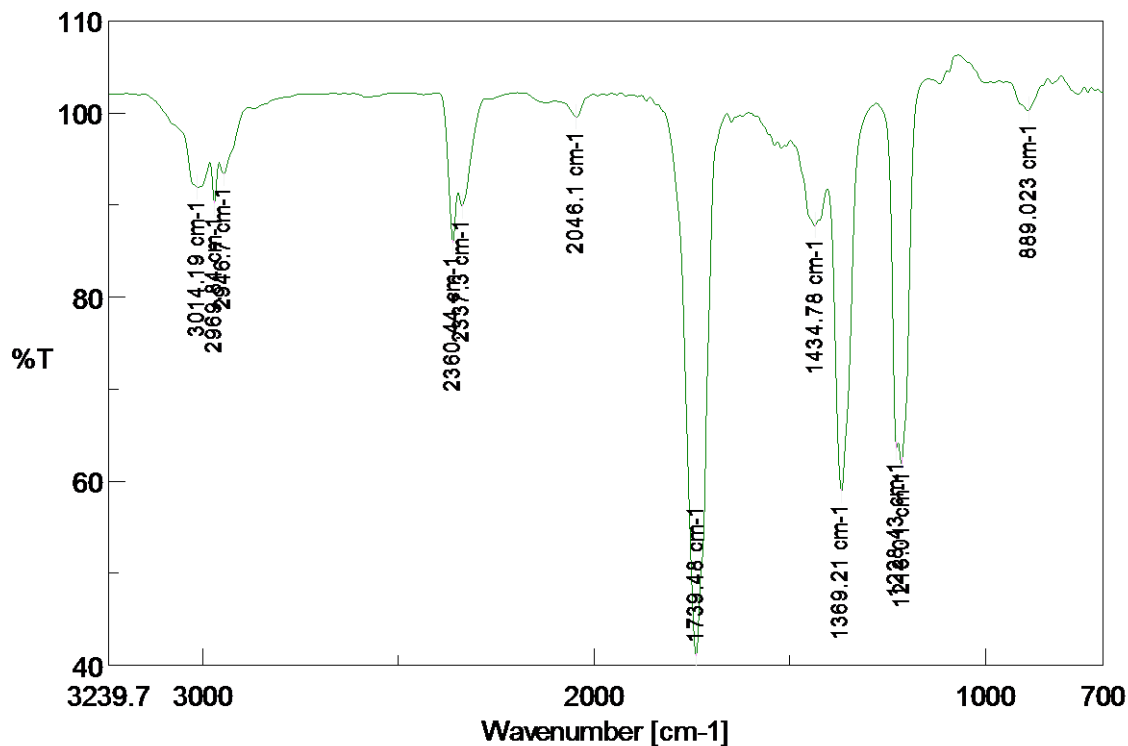
Στο φάσμα ESI-MS της ένωσης 15 (Εικόνα 24) παρατηρείται μια κορυφή σε m/z 309.1, η οποία αντιστοιχεί στο [M+H]⁺, δηλαδή στο μοριακό βάρος της ένωσης με την

προσθήκη ενός πρωτονίου H⁺. Η κορυφή σε m/z 219 αντιστοιχεί στο ιόν το οποίο προκύπτει μετά από απόσπαση του τολουολίου.



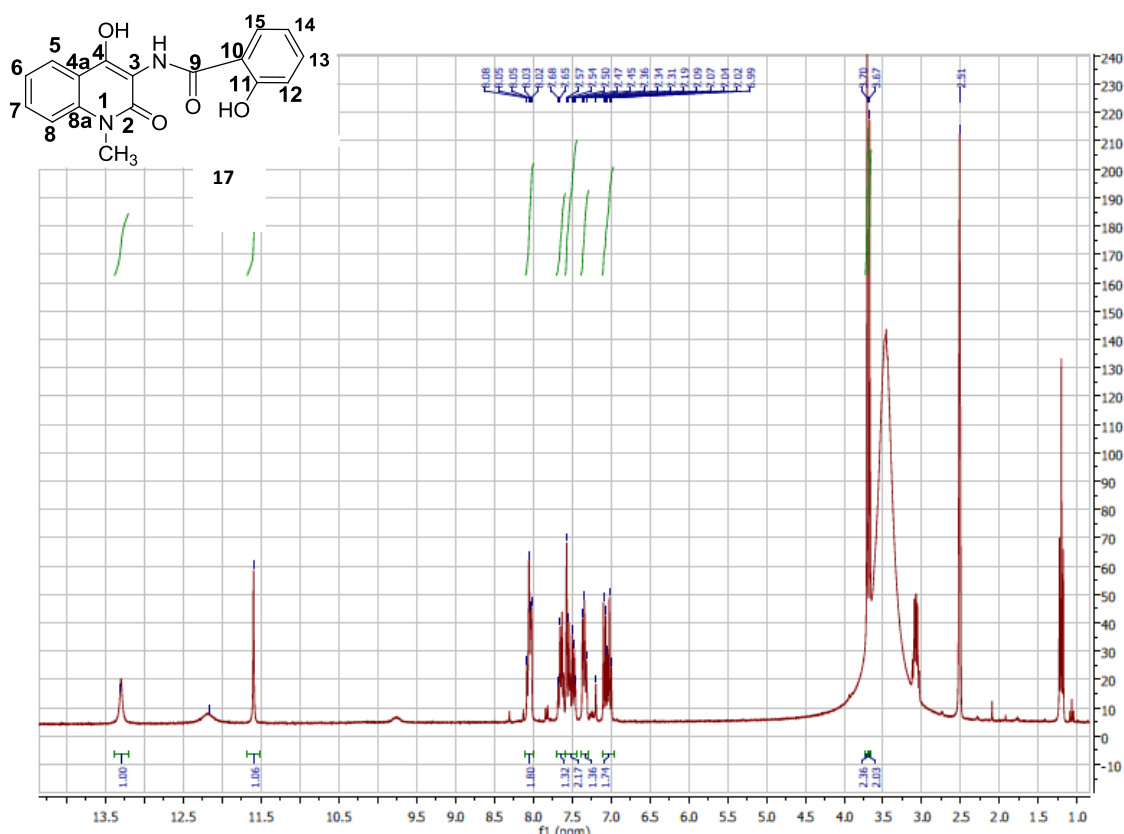
Εικόνα 25: Φάσμα ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) της ένωσης **15**

Στο φάσμα ¹³C NMR της ένωσης **15** (Εικόνα 25) εμφανίζονται οι 13 άνθρακες του μορίου. Χαρακτηριστικές είναι οι κορυφές στα 166.8, 160.08 και 152.32 ppm οι οποίες οφείλονται στους C-2, C-4 και C-9 αντίστοιχα. Οι κορυφές από 142.8-109.30 ppm αποδίδονται στους αρωματικούς άνθρακες ενώ η κορυφή στα 29.94 ppm αποδίδεται στο μεθύλιο του αζώτου (N-CH₃).



Εικόνα 26: Φάσμα IR της ένωσης **15**

Στο φάσμα IR της ένωσης **15** (Εικόνα 26) αρχικά παρατηρείται μια κορυφή στα 1739.4 cm^{-1} η οποία αποδίδεται στη δόνηση τάσης του κυκλικού καρβονυλίου. Η κορυφή στα 1369 cm^{-1} αποδίδεται σε αρωματικά πρωτόνια, ενώ η κορυφή που εντοπίζεται στα 1216 cm^{-1} οφείλεται στη δόνηση τάσης ν του δεσμού C-N και στη δόνηση κάμψης δ του αμιδίου της θέσης 3.

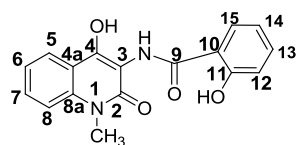


Εικόνα 27: Φάσμα ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) της ένωσης **17**

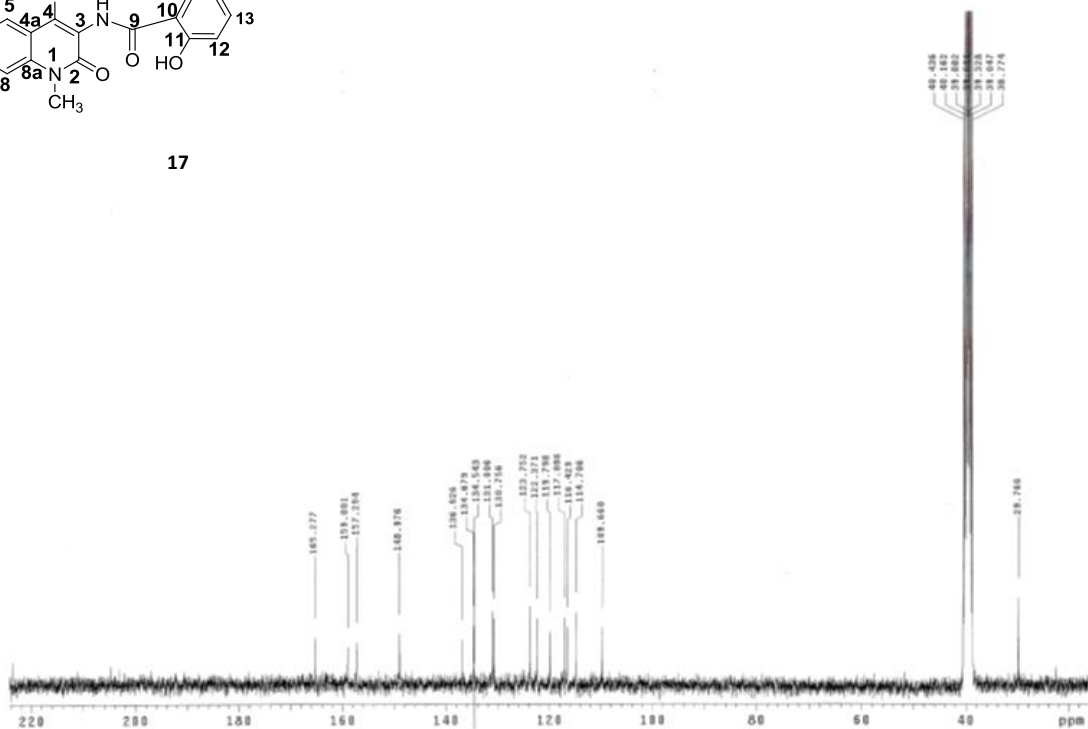
Το φάσμα ^1H NMR της ένωσης **17** (Εικόνα 27) χαρακτηρίζεται από μία κορυφή σε χαμηλό πεδίο, στα 13.31 ppm, η οποία αποδίδεται στο πρωτόνιο του υδροξυλίου της θέσης 4. Το υδροξύλιο προερχόμενο από το σαλικυλικό οξύ εμφανίζεται με μια απλή κορυφή στα 11.59 ppm η οποία ολοκληρώνεται για 1 H.

Τα αρωματικά πρωτόνια του μορίου εμφανίζονται στο πεδίο από 6.99-8.08 ppm. Συγκεκριμένα, εμφανίζεται μια πολλαπλή κορυφή από 8.08-8.02 ppm, η οποία ολοκληρώνεται για 2 H. Επίσης, η πολλαπλή κορυφή από 7.68-7.57 ppm αποδίδεται επίσης σε αρωματικό πρωτόνιο και ολοκληρώνεται για 1 H. Η πολλαπλή κορυφή από 7.54-7.45 ppm ολοκληρώνεται για 2 H ενώ η πολλαπλή κορυφή από 7.36-7.31 ppm ολοκληρώνεται για 1 H. Τέλος, η πολλαπλή κορυφή από 7.09-6.99 ppm ολοκληρώνεται για 2 H και οφείλεται σε αρωματικά πρωτόνια.

Η ομάδα του μεθυλίου (N-CH_3) χαρακτηρίζεται από μια απλή κορυφή στα 3.70 ppm, η οποία ολοκληρώνεται για 3 H.



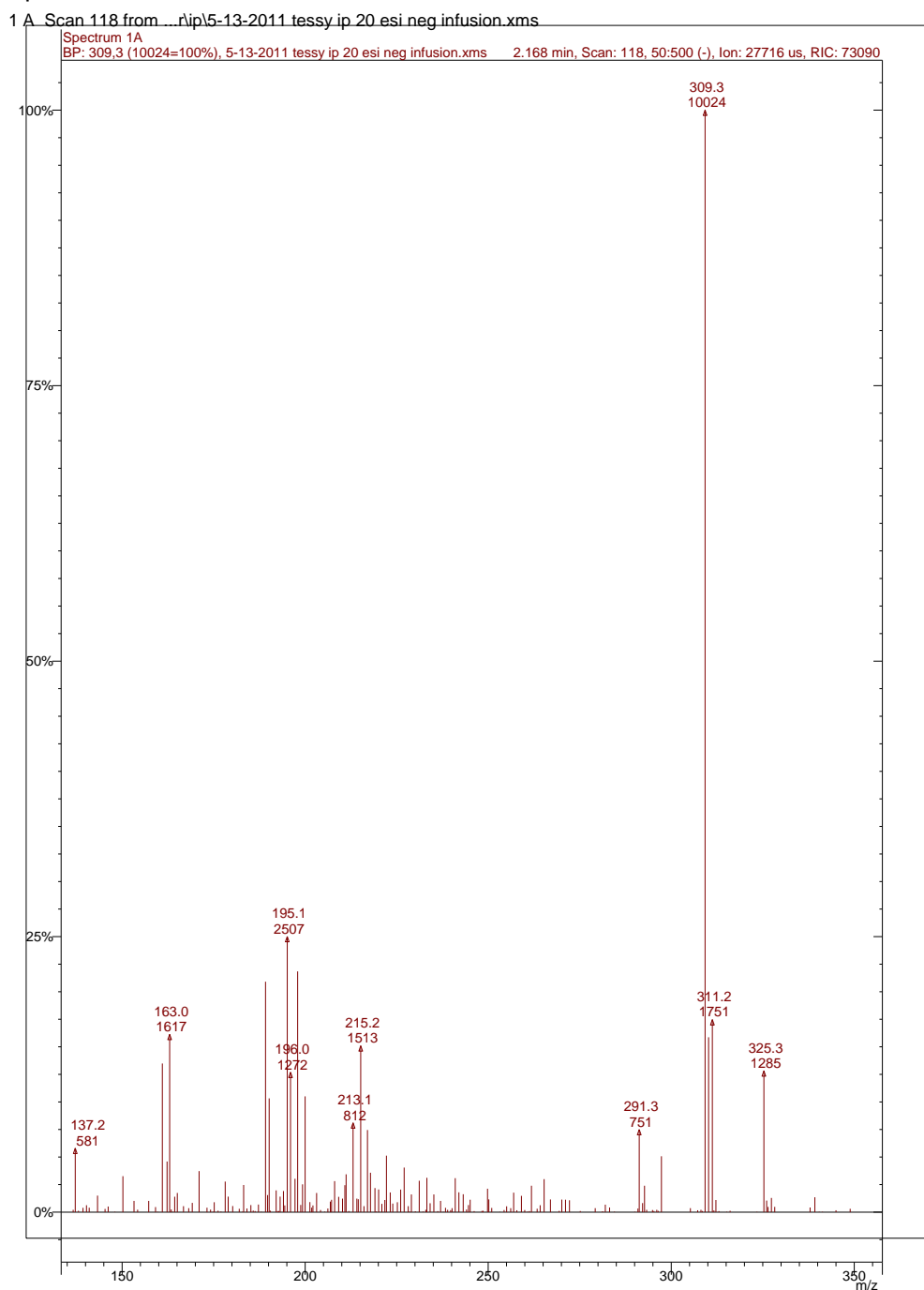
17



Εικόνα 28 : Φάσμα ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) της ένωσης **17**

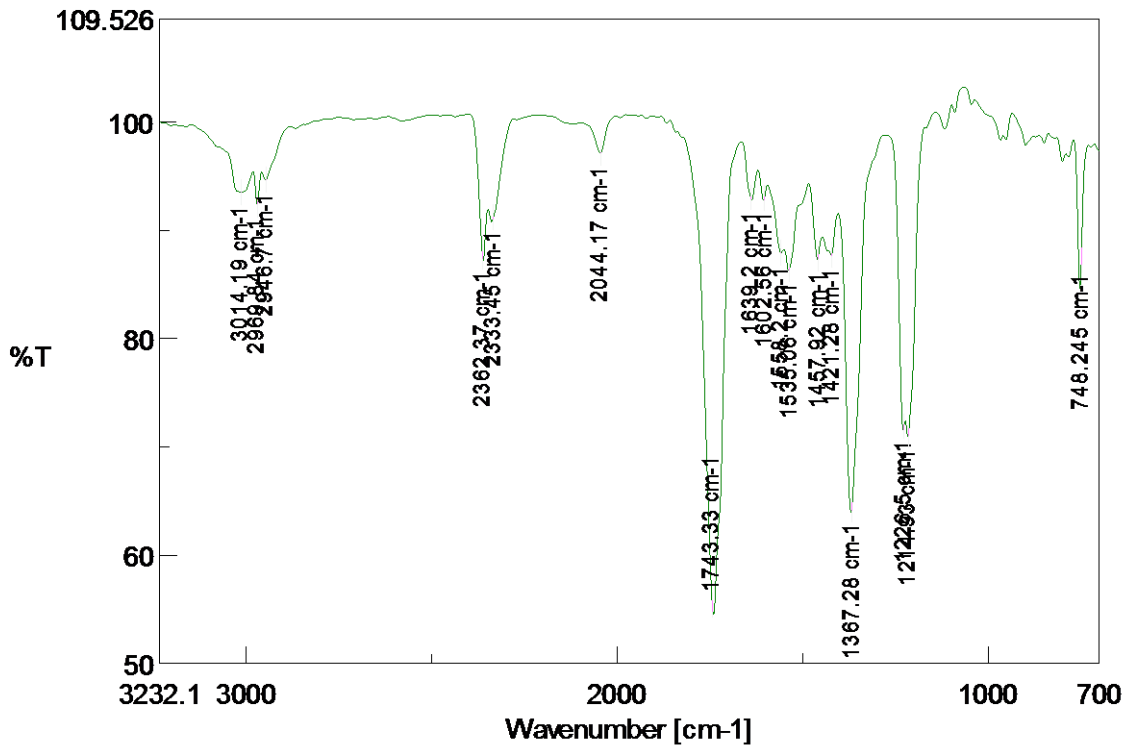
Στο φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **17** (Εικόνα 28) εμφανίζονται οι 17 άνθρακες του μορίου. Χαρακτηριστικές είναι οι κορυφές στα 165.2, 159.0 και 157.29 ppm οι οποίες οφείλονται στους C-2, C-4 και C-9 αντίστοιχα. Οι κορυφές από 148.9-109.60 ppm αποδίδονται στους αρωματικούς άνθρακες ενώ η κορυφή στα 29.76 ppm αποδίδεται στο μεθύλιο του αζώτου (N-CH₃).

Spectrum 1A Plot - 30/12/2011 1:44 ì



Εικόνα 29: Φάσμα ESI-MS της ένωσης **17**

Στο φάσμα ESI-MS της ένωσης **17** (Εικόνα 29) παρατηρείται μια κορυφή σε m/z 309.1, η οποία αντιστοιχεί στο $[M - H]^+$, δηλαδή στο μοριακό βάρος της ένωσης με την προσθήκη ενός πρωτονίου H^+ . Η κορυφή σε m/z 291.3 αντιστοιχεί στο ιόν το οποίο προκύπτει μετά από απόσπαση της ομάδας του υδροξυλίου. Τέλος, η κορυφή σε m/z 215 αντιστοιχεί στο ιόν το οποίο προκύπτει μετά από απόσπαση της ρίζας C_6H_5O .



Εικόνα 30: Φάσμα IR της ένωσης **17**

Στο φάσμα IR της ένωσης **17** (Εικόνα 30) αρχικά παρατηρείται μια κορυφή στα 3014 cm⁻¹ η οποία αποδίδεται στη δόνηση τάσης του αμιδίου (ν_{NH}). Επίσης, η κορυφή που εντοπίζεται στα 1743 cm⁻¹ αντιστοιχεί σε δόνηση τάσης του κυκλικού καρβονυλίου. Η κορυφή στα 1367 cm⁻¹ αποδίδεται σε αρωματικά υδρογόνα, ενώ η κορυφή που παρατηρείται στα 1639 cm⁻¹ αποδίδεται στο καρβονύλιο του αμιδικού δεσμού της θέσης 3. Τέλος, η κορυφή στα 1214 cm⁻¹ αποδίδεται στη δόνηση τάσης ν του δεσμού C-N και στη δόνηση κάμψης δ του αμιδίου III.

Κεφάλαιο 4

Πειραματικό μέρος

Το πειραματικό μέρος της παρούσας διπλωματικής εργασίας περιλαμβάνει τρία μέρη. Στο πρώτο μέρος περιγράφεται η σύνθεση και η ταυτοποίηση μια σειράς κινολινονών η οποία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου. Στο δεύτερο περιγράφεται η πειραματική διαδικασία προσδιορισμού της ικανότητας των ενώσεων να αναστέλλουν τη δράση της λιποξυγονάσης και της αντιοξειδωτικής τους δράσης, πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Στο τρίτο μέρος, περιγράφεται η μελέτη της νευροπροστατευτικής δράσης των κινολινονών μέσω μιας σειράς βιολογικών πειραμάτων που έλαβαν χώρα στο Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

4.1. Μέθοδοι σύνθεσης των κινολινονών

Όργανα και συσκευές

- Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (^1H και ^{13}C NMR) έχουν καταγραφεί με τα εξής όργανα:
 - Varian Gemini 300MHz
 - Varian 600MHz

Οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων, δίνονται σε ppm. Η πολλαπλότητα των σημάτων στα φάσματα ^1H NMR αναφέρονται ως:

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

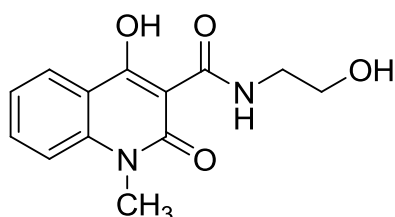
Η σταθερές συζεύξεως J δίνονται σε Hz.

- Τα φάσματα μάζας έχουν καταγραφεί στο όργανο VARIAN LC/ESI-MSⁿ.
- Τα φάσματα υπερύθρου έχουν καταγραφεί στο όργανο FT-IR JASCO 4200.
- Τα σημεία τήξεως έχουν ληφθεί σε συσκευή Gallenkamp και δεν έχουν διορθωθεί.

Γενική μέθοδος σύνθεσης των καρβοξαμιδίων 2-6

Σε σφαιρική φιάλη στην οποία προσαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας προστίθενται η 1-μεθυλο-3-μεθοξυλαρβονυλο-4-υδροξυ-2-κινολινόνη (**1**) (1eq) και η κατάλληλη αμίνη (1 ή 2eq) και το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται στους 120°C, υπό αδρανή ατμόσφαιρα, για 2-24h. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχεται με TLC. Το προϊόν είτε καταβυθίζεται ως στερεό από το μίγμα της αντίδρασης, οπότε παραλαμβάνεται με διήθηση, είτε παραλαμβάνεται μετά από εκχύλιση από το διάλυμα με κατάλληλο διαλύτη.

4-υδροξυ-N-(2-υδροξυαιθυλο)-1-μεθυλο-2-οξο-1,2-διϋδροκινολινο-3-καρβοξαμίδιο (2)



Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο, με προσθήκη 0.86 mmol (200mg) της κινολινόνης **1** και 1.72 mmol (74mg) αιθανολαμίνης σε 4 mL τολουόλιο και θέρμανση 24h. Το μίγμα της αντίδρασης ψύχεται στη θερμοκρασία περιβάλλοντος, προστίθεται κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaHCO₃ (10mL) και ακολουθεί εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο (3x10mL). Τα οργανικά εκχυλίσματα ενώνονται, ξηραίνονται με Na₂SO₄ και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση. Παραλαμβάνεται στερεό ανοιχτού μπεζ χρώματος, το οποίο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (CH₃OH/CH₂Cl₂ 98:2).

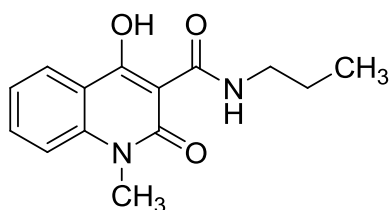
Απόδοση: 180 mg (78 %)

Σημείο τήξεως: 147-149 °C

¹H NMR (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm): 16.75 (s, 1H, OH), 10.60 (s, 1H, N-H), 8.15 (dd, 1H, J_{5,6} = 9 Hz, J_{5,7} = 1.5 Hz, αρωματικό H-5), 7.69 (td, 1H, J_{7,5} = 1.5 Hz, J_{7,6} = 7.2Hz, J_{7,8} = 8 Hz, αρωματικό H-7), 7.356-7.228 (m, 2H, αρωματικά H-6 και H-8), 5.30 (s, 1H, αλειφατικό OH), 3.67 (s, 3H, N-CH₃), 3.86 (t, 2H, J = 6 Hz, H-11 CH₂OH), 3.653-3.619 (m, 2H, H-10 NHCH₂)

¹³C NMR (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm): 172.0, 171.9, 162.8, 140.1, 133.9, 125.7, 122.6, 116.3, 114.3, 96.9, 62.4, 42.1, 29.3.

4-υδροξυ-1-μεθυλο-2-οξο-N-προπυλο-1,2-διϋδροκινολινο-3-καρβοξαμίδιο (3)



Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο, με προσθήκη 1.07 mmol (250mg) της κινολινόνης **1** και 2.014 mmol (120mg) προπυλαμίνης σε 5mL τολουόλιο και θέρμανση 2h. Το μίγμα της αντίδρασης ψύχεται στη θερμοκρασία περιβάλλοντος, προστίθεται κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaHCO₃ (10mL) και ακολουθεί εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο (3x10mL). Τα οργανικά εκχυλίσματα ενώνονται, ξηραίνονται με Na₂SO₄ και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση. Παραλαμβάνεται υπόλευκο

στερεό χρώματος, το οποίο καθαρίζεται με ανακρυστάλλωση από CH₃OH, οπότε προκύπτουν λευκοί κρύσταλλοι.

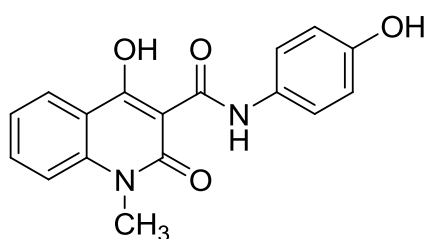
Απόδοση: 120 mg (43 %)

Σημείο τήξεως: 91-93 °C

¹H NMR (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm): 17.29 (s, 1H, OH), 10.33 (s, 1H, N-H), 8.22 (dd, 1H, J_{5,6} = 8 Hz, J_{5,7} = 1.5 Hz, αρωματικό H-5), 7.68 (td, 1H, J_{7,5} = 1.5 Hz, J_{7,6} = 7.2 Hz, J_{7,8} = 8 Hz, αρωματικό H-7), 7.36 (d, 1H, J_{8,7} = 9 Hz, H-8), 7.29 (t, 1H, J_{6,5} = 7.5 Hz, H-6)

¹³C NMR (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm): 172.1, 171.0, 162.8, 139.9, 133.6, 125.6, 122.3, 116.5, 114.2, 99.2, 96.8, 40.8, 29.1, 22.6

4-υδροξυ-N-(4-υδροξυφαινυλο)-1-μεθυλο-2-οξο-1,2-διϋδροκινολινο-3-καρβοξαμίδιο (4)



Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο, με προσθήκη 1.07mmol (250mg) της κινολινόνης **1** και 1.07mmol (117mg) p-αμινο-φαινόλης σε 5mL τολουόλιο και θέρμανση 24h. Το προϊόν καταβυθίζεται ως στερεό από το μίγμα της αντίδρασης, διηθείται υπό ελαττωμένη πίεση και εκπλένεται με εξάνιο. Το στερεό ανακρυσταλλώνεται από CH₃OH/ CHCl₃ οπότε

προκύπτουν κρύσταλλοι μπεζ χρώματος.

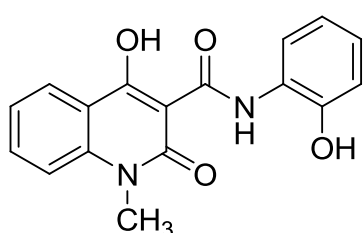
Απόδοση: 180mg (54%)

Σημείο τήξεως: 225-227 °C

¹H NMR (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm): 16.59 (s, 1H, OH), 12.02 (s, 1H, N-H), 8.64 (s, 1H, 13-OH), 7.88 (d, 1H, J_{5,6} = 7 Hz, H-5), 7.42 (t, 1H, J = 7.2 Hz, H-7), 7.02 (t, 1H, J_{6,5} = 7 Hz, H-6), 7.14-7.11 (m, 1H, H-8), 6.52 (d, 2H, J = 9 Hz, H-11 και H-15 του p-υποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου), 7.14 (d, 2H, J = 9 Hz, H-12 και H-14 του p-υποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου), 3.41 (s, 1H, N-CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm): 171.2, 168.1, 161.9, 154.5, 139.2, 133.4, 128.2, 124.6, 122.5, 115.1, 96.3, 28.7

4-υδροξυ-N-(2-υδροξυφαινυλο)-1-μεθυλο-2-οξο-1,2-διϋδροκινολινο-3-καρβοξαμίδιο (5)



Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο, με προσθήκη 1.07mmol (250mg) της κινολινόνης **1** και 1.07mmol (117mg) o-αμινο-φαινόλης σε 5mL τολουόλιο και θέρμανση 24h. Το προϊόν καταβυθίζεται ως στερεό από το μίγμα της αντίδρασης, διηθείται υπό ελαττωμένη πίεση και εκπλένεται με διαιθυλαιθέρα. Τα φάσματα ¹H και ¹³C NMR

του προϊόντος πιστοποιούν ότι δεν απαιτείται περαιτέρω καθαρισμός.

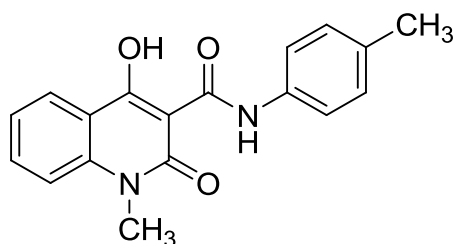
Απόδοση: 230mg (69%)

Σημείο τήξεως: 294-296°C

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz) δ (ppm): 16.88 (s,1H,OH), 12.69 (s,1H, N-H), 10.19 (s,1H,OH), 8.23 (d,1H, J= 7.5 Hz, H-5), 8.11 (dd, 1H, $J_1 = 7$ Hz, $J_2 = 1.5$ Hz,αρωματικό H), 7.82 (td, 1H, $J_{7,6} = 7$ Hz, $J_{7,5} = 1.5$ Hz, H-7), 7.65 (d, 1H, J=9 Hz, H-8), 7.40 (t, 1H, J=8 Hz, H-6), 7.03-6.94 (m, 2H, αρωματικά H), 6.84 (td, 1H, J= 7.5 Hz, J = 1.8 Hz, αρωματικό H), 3.28 (s, 1H, N- CH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm): 171.3, 168.8, 161.7, 147.5, 139.8, 134.5, 125.5,125.0, 124.5,122.7,121.1, 119.1, 115.5, 115.1, 114.9, 96.8, 29.3

4-υδροξυ- 1-μεθυλο-2-οξο-N-p-τολουουyl-1,2-διυδροκινολινο-3-καρβοξαμίδιο (6)



Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο, με προσθήκη 1.07mmol (250mg) της κινολινόνης **1** και 1.07mmol (107mg) p-τολουιδίνης σε 5mL τολουόλιο και θέρμανση 24h. Το παραγόμενο διαυγές καφέ διάλυμα ψύχεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος οπότε

καταβυθίζεται το προϊόν ως στερεό, το οποίο διηθείται υπό ελαττωμένη πίεση και εκπλένεται με διαιθυλαιθέρα. Ανακρυστάλλωση από $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CHCl}_3$ παρέχει το καθαρό προϊόν με τη μορφή λευκών κρυστάλλων.

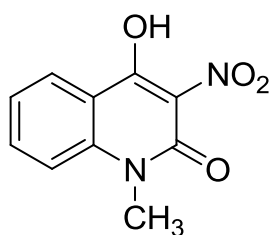
Απόδοση: 120mg (36%)

Σημείο τήξεως: 198-200 °C (βιβλ. σ.τ. 192-194 °C, [40])

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz) δ (ppm): 16.83 (s,1H,OH), 12.41 (s,1H,N-H) , 8.24 (dd,1H, $J_{5,7} = 1.5$ Hz, $J_{5,6} = 6$ Hz ,H-5), 7.70 (td,1H, $J_{7,5} = 1.5$ Hz, $J_{7,6} = 7$ Hz, H-7), 7.38 (d,1H, J=9 Hz,H-6) , 7.30 (t,1H, J= 6 Hz, H-8), 7.57 (d,2H, J=9 Hz, H-11 και H-15), 7.18 (d, 2H, J = 9 Hz, H-12 και H-14), 3.74 (s, 3H, N- CH_3), 2.35 (s,3H, αρωματικό CH_3)

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm): 172.1, 169.1, 162.8, 139.8, 134.5, 129.5, 125.5, 121.2, 114.2, 97.1, 29.2, 20.9

4-υδροξυ-1-μέθυλο-3-νιτροκινολιν-2-όνη (8)



Σε σφαιρική φιάλη των 150 ml προστίθενται η 1-μεθυλο-4-υδροξυ-2-κινολινόνη (1) και οξικό οξύ σε γραμμομοριακή αναλογία 1:1. Το μίγμα αναδεύεται για λίγη ώρα οπότε σχηματίζεται αιώρημα. Στο αιώρημα προστίθενται νιτρικό οξύ και νιτρώδες νάτριο σε γραμμομοριακές αναλογίες 1:1 και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου. Παρατηρείται ο σχηματισμός κίτρινου στερεού μέσα σε 5 min αντίδρασης. Μετά από 35 min διακόπτεται η αντίδραση και το προϊόν αποχύνεται σε κωνική φιάλη και τοποθετείται σε παγόλυτρο. Προστίθεται ποσότητα πάγου μέσα στο μίγμα της αντίδρασης και γίνεται διήθηση υπό κενό για την παραλαβή του στερεού. Τοποθετείται το στερεό στον ξηραντήρα για απομάκρυνση της ξηρασίας.

Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία $^1\text{H NMR}$.

Απόδοση: 1.46 g (87 %)

Σημείο τήξεως: 159-161 °C (βιβλ. σ.τ :169-170 °C [33])

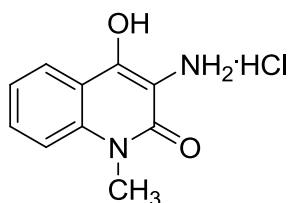
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz) δ (ppm): 13.69 (s, 1H, OH), 8.28 (d, 1H, J= 7 Hz, H-5), 7.81 (t, 1H, J= 7.2 Hz, H-7), 7.38-7.34 (m, 2H, J= 7 Hz), 3.70 (s, 3H, N-CH₃)

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm): 165.2, 154.8, 140.8, 136.4, 126.8, 123.1, 114.6, 113.1, 99.2, 29.6

FT-IR (cm^{-1}): 1523 & 1367 cm^{-1} (NO₂), 1739 (C=O αμιδικού δεσμού)

ESI-MS (m/z): 221 [M+H]⁺, 243 [M+23]⁺, 203 [M-17]⁺, 175 [M-45]⁺.

Υδροχλωρικό άλας της N-μεθυλο-3-αμινο-4-υδροξυ-κινολιν-2-όνης (9)



Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης της αναγωγής της νιτροομάδας απαιτείται πρώτα η παρασκευή διαλύματος καυστικού νατρίου (NaOH) 1M, καθώς η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε αλκαλικό περιβάλλον.

Σε σφαιρική φιάλη των 50 ml προστίθενται η 1-μεθυλο-3-νιτρο-4-υδροξυ-κινολιν-2-όνη (8) και διάλυμα NaOH 1M σε γραμμομοριακές αναλογίες 1:1 και το μίγμα αναδεύεται μέχρι να γίνει ομοιογενές. Στη συνέχεια προστίθεται σε αναλογία 1:1 διθειονώδες νάτριο (Na₂S₂O₄) και το μίγμα αναδεύεται για 30 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Μετά το πέρας της αντίδρασης, το προϊόν οξινίζεται με αρκετή ποσότητα HCl 10% ώστε να σχηματισθεί το υδροχλωρικό άλας. Τοποθετείται για λίγη ώρα στο ψυγείο και διηθείται υπό κενό για την παραλαβή του στερεού προϊόντος.

Το προϊόν της αντίδρασης είναι μια φωτοευαίσθητη ουσία η οποία θα πρέπει να φυλάσσεται σε ειδικά φιαλίδια σκούρου χρώματος και σε σκοτεινό μέρος. Λόγω της ευαισθησίας της αυτής, θα πρέπει να μη μεσολαβεί μεγάλο διάστημα από την παραγωγή μέχρι τη χρήση της στην επόμενη αντίδραση.

Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία $^1\text{H NMR}$.

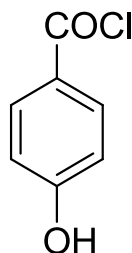
Απόδοση: 492 mg (96%).

Σημείο τήξεως $>300^\circ\text{C}$

$^1\text{H NMR}$ ($\text{CDCl}_3/\text{DMSO}$, 300MHz) δ (ppm): 7.71 (d, 1H, $J=7$ Hz, αρωματικό H), 7.19 (t, 1H, $J=8$ Hz, αρωματικό H), 7.96 (d, 1H, $J=7$ Hz, αρωματικό H), 6.86 (t, 1H, $J=8$ Hz, αρωματικό H), 3.25 (s, 3H, N-CH_3), 4.702 ($\text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$)

FT-IR (cm^{-1}) : 3409 (δόνηση τάσης N-H) , 1600 (δόνηση κάμψης N-H), 1502 (δόνηση κάμψης N-H), 1236 (τάση αρωματικού C-N) , 1668 (C=O).

4-υδροξυ-βενζοϋλο-χλωρίδιο (12)



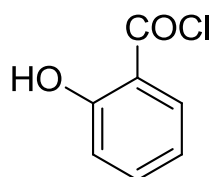
Σε μια σφαιρική φιάλη των 25 ml προστίθενται 345 mg (2.5 mmoles) p-υδροξυβενζοϊκού οξέος και 1.5 ml (18.75 mmoles) θειονυλοχλωριδίου (SOCl_2). Στη σφαιρική φιάλη προσαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας και το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται στους 84°C (σημείο ζέσεως του θειονυλοχλωριδίου) υπό αδρανή ατμόσφαιρα.

Μετά την προσθήκη των αντιδραστηρίων σχηματίζεται ένα άσπρο, θολό διάλυμα .Η αντίδραση ολοκληρώνεται όταν σχηματισθεί ένα άσπρο στερεό σε μορφή ζελέ σε λιγότερο από 1 hr.

Μετά το πέρας της αντίδρασης, το SOCl_2 απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα διαλύεται σε 6.5 ml THF και χρησιμοποιείται απευθείας για την αντίδραση ακυλίωσης.

Η αντίδραση σχηματισμού του χλωριδίου θεωρείται ότι έχει απόδοση 100%.

2-υδροξυ-βενζοϋλο-χλωρίδιο (13)



Σε σφαιρική φιάλη των 25 ml προστίθενται 414 mg (3 mmoles) σαλικυλικού οξέος και 1.6 ml (22.5 mmoles) θειονυλοχλωριδίου (SOCl_2). Στη σφαιρική φιάλη προσαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας και και το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται στους 84°C (σημείο ζέσεως του θειονυλοχλωριδίου) υπό αδρανή

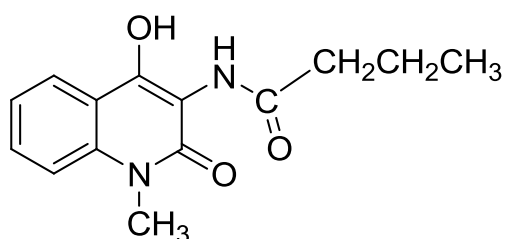
ατμόσφαιρα.

Η αντίδραση (Σχήμα 36) ολοκληρώνεται σε λιγότερο από 1 hr όταν εξαντληθεί όλη η ποσότητα του σαλικυλικού οξέος.

Μετά το πέρας της αντίδρασης, το SOCl₂ απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα διαλύεται σε 5 ml THF και χρησιμοποιείται απευθείας για την αντίδραση ακυλίωσης.

Θεωρούμε ότι η αντίδραση σχηματισμού του χλωριδίου έχει απόδοση 100%.

N-(4-υδροξυ-1-μεθυλο-2-οξο-1,2-διϋδροκινολιν-3-υλ)βουτυραμίδιο (14)



Σε σφαιρική φιάλη των 25 ml, στην οποία προσαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας, προστίθενται 200 mg (1.7 mmoles) υδροχλωρικού άλατος της N-μεθυλο-3-αμινο-4-υδροξυ-κινολιν-2-όνης (**9**) σε 5 ml THF και αναδεύονται για 15min όπου παραμένουν σε

αιώρημα. Στη συνέχεια, προστίθενται 0.30 ml (4.25 mmoles) άνυδρης τριαιθυλαμίνης (Et₃N) και 0.09 (2.55 mmoles) βουτυρυλο-χλωριδίου (**10**) και το μίγμα αναδεύεται στους 52 °C υπό αδρανή ατμόσφαιρα για 2.5h

Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με TLC (PE: EtOAc 7:3 και 5:5).

Το μίγμα της αντίδρασης τοποθετείται σε παγόλουτρο, προστίθενται 5 ml H₂O και οξινίζεται με HCl 10%. Παραμένει για μια μέρα στο ψυγείο, όπου παρατηρείται ο σχηματισμός ενός στερεού το οποίο παραλαμβάνεται με διήθηση υπό κενό.

Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία ¹H και ¹³C NMR.

Απόδοση: 105 mg (46 %).

Σημείο τήξεως: 122-123 °C

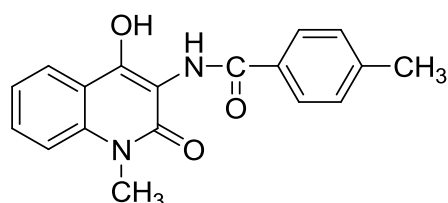
¹H NMR (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm): 12.89 (s, 1H, OH), 8.71 (s, 1H, N-H), 8.14 (d, 1H, J=6 Hz, αρωματικό H), 7.55 (t, 1H, J= 6 Hz, αρωματικό H), 7.31 (m, 2H), 3.73 (s, 3H, N-CH₃), 2.49 (t, 2 H, J= 6 Hz, CH₂), 1.80 (sextet, 2H, J₁=6 Hz, J₂=6 Hz, CH₂), 1.03 (t, 3H, J=6 Hz, CH₃)

¹³C NMR (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm): 173.7, 159.5, 148.8, 136.5, 130.3, 124.6, 122.5, 117.2, 113.6, 109.2, 38.7, 29.9, 19.2, 13.5

ESI-MS (m/z): 261.1 [M+H]⁺, 283 [M+23]⁺, 191 [M- 69]⁺.

FT-IR (cm^{-1}) : 3012 (ν του αμιδίου N-H), 1739 (ν του κυκλικού καρβονυλίου), 1367 (αρωματικά H), 1214 (ν του δεσμού C-N και δ του αμιδίου III) ,1436 (μεθυλένιο $CH_2 - NHCO$), 1523.5 (N- CH_3)

N-(4-υδροξυ-1-μεθυλο-2-οξο-1,2-διϋδροκινολιν-3-υλ)-4-μεθυλοβενζαμίδιο (15)



Σε σφαιρική φιάλη των 25 ml, στην οποία προσαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας, προστίθενται 490 mg (2.16 mmoles) υδροχλωρικού άλατος της N-μεθυλο-3-αμινο-4-υδροξυ-κινολιν-2-όνης (**9**) σε 12 ml THF και αναδεύονται για 15min οπότε σχηματίζεται ένα ροζ αιώρημα. Στη συνέχεια, προστίθενται 0.73 ml (5.4 mmoles) άνυδρης τριαιθυλαμίνης (Et_3N) και 0.34 ml (2.59 mmoles) p-τολουούλο-χλωριδίου (**11**) και το κόκκινο μίγμα που προκύπτει αναδεύεται στους 52 $^{\circ}C$ υπό αδρανή ατμόσφαιρα για 2h. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με TLC (PE: EtOAc 7:3).

Το μίγμα της αντίδρασης ψύχεται με παγόλουτρο, προστίθενται 2 ml H_2O και οξινίζεται με HCl 10% οπότε προκύπτει ένα στερεό προϊόν, το οποίο διηθείται υπό κενό.

Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία 1H και ^{13}C NMR.

Απόδοση: 190 mg (29%)

Σημείο τήξεως: 188- 190 $^{\circ}C$

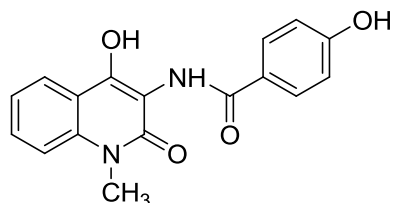
1H NMR ($CDCl_3$, 300MHz) δ (ppm): 12.83 (s, 1H, OH) , 9.27 (s, 1H, N-H) ,7.85 (dd, 1H , $J_{5,6}=6$ Hz, $J_{5,7}=3$ Hz, H-5) ,7.59 (d, 2H, $J=6$ Hz, H-11 και H-15), 7.31 (td, 1H, $J=9$ Hz, H-7) , 7.11 (d, 1 H, $J=9$ Hz, αρωματικό H του συστήματος της κινολινόνης), 7.14 (d, 2H, $J=9$ Hz, H-8) ,7.06-7.01 (m, 1H, H-6) ,7.05 (d,2H, $J=6$ Hz , H-12 και H-14), 3.51 (s, 3 H, N- CH_3) , 2.19 (s, 3H, 4'- CH_3)

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ (ppm): 166.8, 159.5, 152.3, 142.8, 137.9, 131.4, 129.5, 123.8, 116.4, 115.2, 109.3, 29.9, 21.5.

ESI-MS (m/z): 309.1 $[M+H]^+$, 219 $[M-90]^+$.

FT-IR (cm^{-1}) : 1739 (ν του κυκλικού καρβονυλίου), 1367 (αρωματικά H), 1216 (ν του δεσμού C-N και δ του αμιδίου III)

4-υδροξυ-N-(4-υδροξυ-1-μεθυλο-2-οξο-1,2-διϋδροκινολιν-3-υλ)βενζαμίδιο (16)



Σε σφαιρική φιάλη των 25 ml, στην οποία προσαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας, προστίθενται 470 mg (2.075 mmoles) υδροχλωρικού άλατος της N-

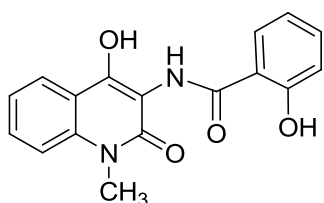
μεθυλο-3-αμινο-4-υδροξυ-κινολιν-2-όνης (**9**) με 11.5 ml THF και αναδεύονται για 15 min. Στη συνέχεια, προστίθενται 0.6 ml άνυδρης τριαιθυλαμίνης και το διάλυμα του 4-υδροξυ-βενζοϋλο-χλωριδίου (**12**) σε 6 ml THF και το μίγμα που προκύπτει αναδεύεται στους 52 °C υπό αδρανή ατμόσφαιρα για 2h. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με TLC (CH₂Cl₂ : MeOH 7:3). Το προϊόν της αντίδρασης διηθείται υπό κενό και παραλαμβάνεται το στερεό το οποίο ζυγίζει 257 mg. Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία ¹H NMR.

Προκειμένου να επιτευχθεί μεγαλύτερη καθαρότητα στο τελικό προϊόν πραγματοποιήθηκε ανακρυστάλλωση. Η ανακρυστάλλωση γίνεται με την εν θερμώ διάλυση του παραγώγου σε μεθανόλη. Το λαμβανόμενο διάλυμα τοποθετείται στο ψυγείο για μια ημέρα προκειμένου να επιτευχθεί πλήρης καταβύθιση των κρυστάλλων του προϊόντος. Τέλος ακολουθεί διήθηση υπό κενό του μίγματος και παραλαβή του ανακρυσταλλωμένου προϊόντος.

Απόδοση : 41 %

Σημείο τήξεως: > 300 °C (μη ανακρυσταλλωμένου στερεού)

2-υδροξυ-N-(4-υδροξυ-1-μεθυλο-2-οξο-1,2-διϋδροκινολιν-3-υλ)βενζαμίδιο (**17**)



Σε σφαιρική φιάλη των 25 ml, στην οποία προσαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας, προστίθενται 519 mg (2.3 mmoles) υδροχλωρικού άλατος της N-μεθυλο-3-αμινο-4-υδροξυ-κινολιν-2-όνης (**9**) σε 12.7 ml THF και αναδεύονται για 15 min. Στη συνέχεια, προστίθενται 0.77 ml άνυδρης τριαιθυλαμίνης και το διάλυμα του 2-υδροξυ-βενζοϋλο-χλωριδίου (**13**) σε 5,5 ml THF και το μίγμα που προκύπτει αναδεύεται στους 52 °C υπό αδρανή ατμόσφαιρα για 3h. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης παρατηρείται ο σχηματισμός κίτρινου στερεού αιωρούμενο στο διάλυμα.

Η αντίδραση παρακολουθείται ανά τακτά χρονικά διαστήματα με TLC σε σύστημα διαλυτών PE : EtOAc. Στη συνέχεια η σφαιρική φιάλη τοποθετείται σε παγόλουτρο, προστίθενται 2 ml H₂O και οξινίζεται με HCl 10%. Το τελικό μίγμα της αντίδρασης διηθείται υπό κενό και παραλαμβάνεται το τελικό στερεό προϊόν. Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία ¹H NMR.

Προκειμένου να επιτευχθεί μεγαλύτερη καθαρότητα στο τελικό προϊόν πραγματοποιήθηκε ανακρυστάλλωση. Η ανακρυστάλλωση γίνεται με την εν θερμώ διάλυση του παραγώγου σε μεθανόλη. Το λαμβανόμενο διάλυμα τοποθετείται στο ψυγείο για μια ημέρα προκειμένου να επιτευχθεί πλήρης καταβύθιση των κρυστάλλων του προϊόντος. Τέλος ακολουθεί διήθηση υπό κενό του μίγματος και παραλαβή του ανακρυσταλλωμένου προϊόντος.

Απόδοση αντίδρασης: 42%

Σημείο τήξης : 280- 285 °C

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz) δ (ppm): 13.31 (s, 1H ,4-OH) , 11.59 (s, 1H , 6'-OH), 8.08-8.02 (m, 2H, αρωματικά H), 7.68-7.57 (m, 1 H, αρωματικό H), 7.54-7.45 (m, 2 H, αρωματικά H), 7.26-7.31 (m, 1H, αρωματικό H), 7.09-6.99 (m, 2 H, αρωματικά H), 3.70 (s, 3 H, N-CH₃)

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 165.2, 159.0, 157.2, 148.9, 136.9, 134.6, 134.5, 131.0, 130.7, 123.7, 122.3, 119.7, 117.0, 116.4, 114.7, 109.6, 29.7

ESI-MS (m/z): 309.1 [M+H]⁺ , 291.3 [M-17]⁺, 215 [M- 93]⁺

FT-IR (cm^{-1}) : 3014 (ν του αμιδίου N-H), 1739 (ν του κυκλικού καρβονυλίου), 1639 (C=O του αμιδικού δεσμού), 1367 (αρωματικά H), 1214 (ν του δεσμού C-N και δ του αμιδίου III)

4.2 Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής δράσης ενάντια στην ελεύθερη ρίζα DPPH. [55]

Οι ουσίες διαλύονται σε DMSO, και στη συνέχεια προστίθενται σε αιθανολικό διάλυμα DPPH (0.05 mM) απόλυτης αιθανόλης μέχρι τελικής συγκέντρωσης 0.1 mM. Το μείγμα αναδεύεται έντονα και αφήνεται σε ηρεμία 20 ή 60 λεπτά. Καταγράφεται η απορρόφηση στα 517 nm και υπολογίζεται μέσω αυτής το ποσοστό της αντιοξειδωτικής δράσης. Όλα τα τεστ γίνονται τρεις φορές και τα αποτελέσματα του προκύπτουν μετά από τον υπολογισμό του μέσου όρου.

4.3 Υπολογισμός της αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης (AAPH). [56]

Η αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης από τις ενώσεις που παρασκευάστηκαν υπολογίζεται από την οξείδωση του λινολεϊκού οξέος σε υδατικό αιώρημα, κάτι που παρατηρείται στα 234 nm. Το 2,2,- αζοδις- (2-αμιδινοπροπανο) διυδροχλωρίδιο (AAPH) χρησιμοποιείται σαν εκκινητής των ελευθέρων ριζών.

Συγκεκριμένα , δέκα μικρόλιτρα από το αιώρημα των 16 mM του λινολεϊκού οξέος προστίθενται στην UV κυψελίδα που περιέχει 0.93 mL από το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 0.05 M με pH= 7.4 το οποίο έχει προθερμανθεί στους 37 °C. Η αντίδραση οξείδωσης ξεκινά στους 37 °C υπό ατμοσφαιρική πίεση με την προσθήκη 50 μL του διαλύματος AAPH των 40 mM. Η οξείδωση πραγματοποιείται παρουσία δόσεων 10 μL της υπό εξέταση ένωσης. Στην δοκιμασία χωρίς προσθήκη του αντιοξειδωτικού, η λιπιδική οξείδωση μετράται με την παρουσία ίδιας ποσότητας DMSO. Ο ρυθμός οξείδωσης στους 37 °C παρακολουθείται καταγράφοντας την αύξηση

της απορρόφησης στα 234 nm που προκαλείται από τα συζευγμένα διενικά υδροϋπεροξειδία.

4.4 Υπολογισμός της αναστολής της λιποξυγονάσης (LOX) από σόγια in vitro. [55]

Οι υπό εξέταση ουσίες διαλύονται σε DMSO και αφήνονται να επωαστούν σε θερμοκρασία δωματίου με λινολεϊκό νάτριο (0.1 mL) και 0.2 mL ενζυμικού διαλύματος ($1/9 \times 10^{-4}$ w/v σε φυσιολογικό ορό) σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris pH= 9. Η μετατροπή του sodium λινολεϊκού νατρίου σε 13-υδροπεροξυλινολεϊκό οξύ στα 234 nm καταγράφεται και συγκρίνεται με το κατάλληλο πρότυπο αναστολέα.

4.5 Μελέτη της νευροπροστατευτικής δράσης των νέων ενώσεων

4.5.1 Χημικά

- Υλικό καλλιέργειας κυττάρων : DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) low glucose/ FBS , L-γλουταμίνη (20mM) , τρυψίνη.
- Ορός εμβρύου βοός (FBS).
- Διάλυμα φωσφορικών PBS .
- Χρωμογόνο MTT .
- Διάφορες μορφές κινολινόνης που εξετάστηκαν για την νευροπροστατευτική τους δράση.

4.5.2 Κυτταρικές σειρές

- HT22: αθανатоποιημένα κύτταρα ιππόκαμπου μυός

4.5.3 Αποστείρωση

Η καλλιέργεια των κυττάρων και τα πειράματα μελέτης της νευροπροστατευτικής δράσης διάφορων ουσιών στα κύτταρα αυτά απαιτεί στείρωση . Τα γυάλινα και τα πλαστικά σκεύη πολλαπλών χρήσεων αποστειρώνονται σε αυτόκαυστο στους 120°C για 30 min (υγρή αποστείρωση). Τα διαλύματα αποστειρώνονται με τον ίδιο τρόπο αλλά για 15 min. Στην περίπτωση θερμοευαίσθητων διαλυμάτων η αποστείρωση γίνεται με φίλτρα Sartorius (μέγεθος πόρων 0,22 μm) όταν αυτά πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για καλλιέργεια κυττάρων.

4.5.4 ΜΕΘΟΔΟΙ

4.5.4.1 Καλλιέργεια κυττάρων

Η βασική κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την εργασία είναι τα HT-22. Όλες οι διαδικασίες καλλιέργειας των κυττάρων πραγματοποιούνται υπό στείρες συνθήκες, ενώ στείρα είναι επίσης και όλα τα υλικά που χρησιμοποιούνται. Τα κύτταρα HT-22 καλλιεργούνται σε υλικό DMEM απουσία ερυθρού της φαινόλης παρουσία 10% FBS. Υποκαλλιεργούνται κάθε 2 ή 3 μέρες σε αραιώση που ποικίλλει ανάλογα με τον επιθυμητό αριθμό κυττάρων στο τρυβλίο.

Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε πλαστικές φιάλες κυτταροκαλλιέργειας εμβαδού 75cm², με 10ml πλήρους υλικού, στους 37°C και σε ατμόσφαιρα 5% CO₂. Όταν τα κύτταρα καλύψουν όλη την επιφάνεια της φιάλης, παραλαμβάνονται με τρυψινοποίηση.

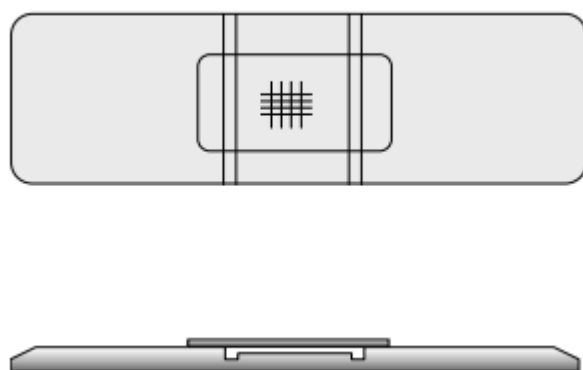
Αρχικά, η φιάλη πλένεται με 5 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών PBS (14.7mM KH₂PO₄ / 80.5mM Na₂HPO₄, pH 7.5 , 2.68 mM KCl, 136.7 mM NaCl). Κατόπιν, προστίθεται 1ml διαλύματος τρυψίνης-EDTA (0,25% κ.ό. τρυψίνη και 0.02% κ.ό. EDTA σε PBS) και ακολουθεί επώαση στους 37°C μέχρι να αποκολληθούν τα κύτταρα (1-2 λεπτά). Μετά την αποκόλληση των κυττάρων προστίθεται ορισμένη ποσότητα θρεπτικού υλικού DMEM 10% FBS ανάλογα με την επιθυμητή αραιώση στο τρυβλίο.

Ο ορός του υλικού, απενεργοποιεί την τρυψίνη που χρησιμοποιήθηκε. Με ανάλογο τρόπο παραλαμβάνονται τα κύτταρα και προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για κάποιο πείραμα, (στην περίπτωση αυτή, μοιράζονται στην κατάλληλη αραιώση σε τρυβλία petri) καθώς και στο τέλος κάποιων πειραμάτων.

4.5.4.2 Μέτρηση κυττάρων

Πριν το μοίρασμα των κυττάρων HT22 σε πλάκες μικροκαλλιέργειας 96 θέσεων και μετά τη διαδικασία της τρυψινοποίησης ,πραγματοποιείται το μέτρημά τους. Λαμβάνονται 25 μl τρυψινοποιημένων κυττάρων στα οποία προστίθενται 50 μl trypan blue ώστε η τελική αραιώση να είναι 1:3. Αφού το μίγμα αναδεύεται αρκετά, λαμβάνονται 10 μl τα οποία τοποθετούνται στο αιμοκυτταρόμετρο, η αλλιώς γνωστό ως Neubauer, (Εικόνα 31) το οποίο είναι μια ειδική κατασκευασμένη αντικειμενοφόρος με τη δική του καλυπτρίδα και χρησιμοποιείται για την καταμέτρηση των κυττάρων.

Συγκεκριμένα, καταμετρώνται τα ζωντανά κύτταρα που βρίσκονται μέσα στο μικρό τετράγωνο της πλάκας που φαίνεται στο σχήμα.



Εικόνα 31: Κάτοψη και πλάγια όψη του αιμοκυτταρόμετρου (πλάκα Neubauer)

Η χρωστική ουσία trypan blue έχει τη δυνατότητα να διαπερνά τη μεμβράνη των νεκρών κυττάρων τα οποία χρωματίζονται μπλε. Αντίθετα, η μεμβράνη των ζωντανών κυττάρων είναι πολύ επιλεκτική ως προς τις ενώσεις που τη διαπερνούν. Επομένως, η συγκεκριμένη χρωστική ουσία χρησιμεύει στη διάκριση μεταξύ νεκρών και ζωντανών κυττάρων.

4.5.4.3 Προσδιορισμός της νευροπροστατευτικής δράσης των ενώσεων στα κύτταρα HT-22 παρουσία γλουταμικού.

Για να μελετηθεί η δράση του γλουταμικού στα κύτταρα HT22, αυτά μοιράζονται σε πλάκα μικροκαλλιέργειας 96 θέσεων σε αριθμό 2000 κύτταρα/ πηγαδάκι σε υλικό με 5 % FBS και αφήνονται να αναπτυχθούν για 24 ώρες (καλλιέργεια προεπάσης). Στη συνέχεια το υλικό αντικαθίσταται με άλλο που περιείχε 5 % FBS με ή χωρίς γλουταμικό (καλλιέργεια ελέγχου). Μετά από 18 ώρες επώασης, προστίθενται 25 μ l MTT (1mg/ml) για άλλες 4 ώρες. Μετά το τέλος και της τετράωρης επώασης προστίθεται ισοπροπανόλη για τη διάλυση του αδιάλυτου φορμαζανίου που είχε σχηματιστεί και μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση στα 550 nm, η οποία είναι ανάλογη του αριθμού των ζωντανών κυττάρων.

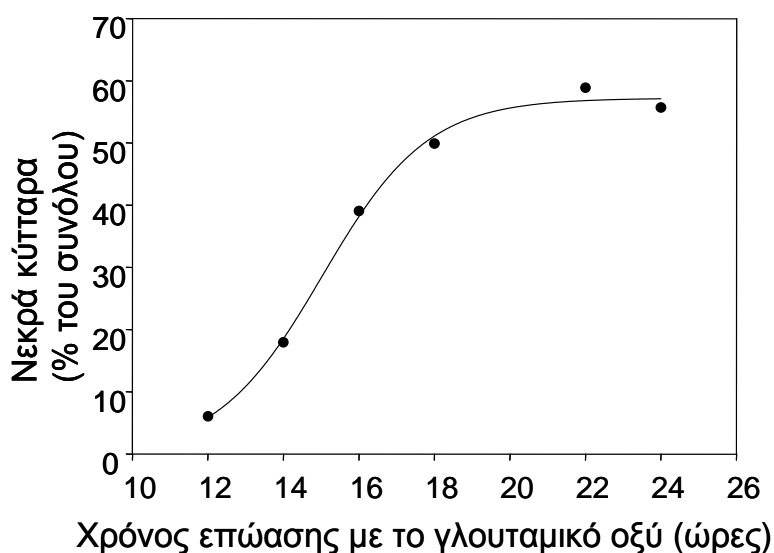
Οι ενώσεις που μελετώνται αρχικά διαλύονται σε dmsο σε συγκέντρωση 10^{-2} M και στη συνέχεια αραιώνονται διαδοχικά με διαλύτη για τη παρασκευή των ενδιάμεσων συγκεντρώσεων 10^{-5} , 10^{-6} , $3 \cdot 10^{-6}$, 10^{-7} , $2 \cdot 10^{-7}$.

Η χρονική εξέλιξη του φαινομένου της επαγωγής κυτταρικού θανάτου σε κύτταρα HT22 που επώαστηκαν με 5mM γλουταμικού (συγκέντρωση που επιλέχθηκε με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα) (Behl C. et al, 1995) φαίνεται στην εικόνα 16.

Παρατηρούμε ότι το μέγιστο ποσοστό θανάτου, όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο του MTT με βάση τη σχέση:

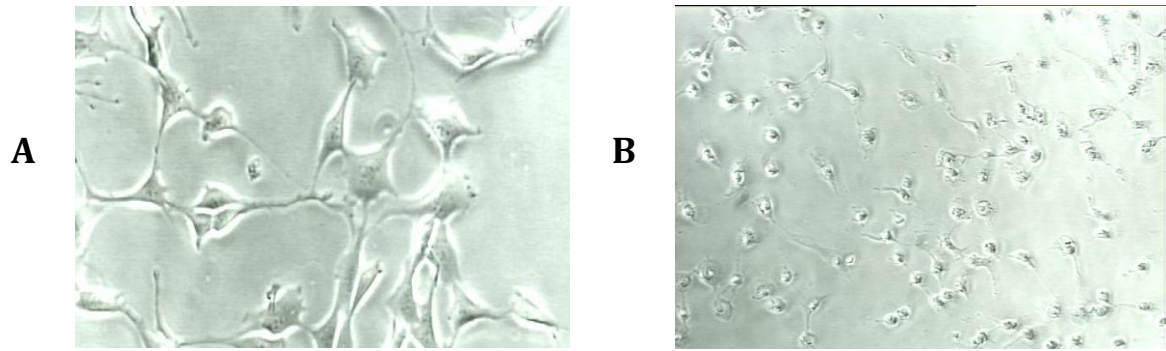
$\% \text{ νεκρά} = (\text{απορρόφηση στα } 550 \text{ nm απουσία γλουταμικού} - \text{απορρόφηση στα } 550 \text{ nm παρουσία γλουταμικού}) / (\text{απορρόφηση στα } 550 \text{ nm απουσία γλουταμικού})$, επιτυγχάνεται μετά από τουλάχιστον 18 ώρες επώασης με γλουταμικό. Στο συγκεκριμένο πείραμα το ποσοστό αυτό δε ξεπερνά το 55% για λόγους που έχουν να κάνουν με την πυκνότητα της καλλιέργειας ελέγχου, την πυκνότητα της μητρικής καλλιέργειας, το ποσοστό γλυκόζης στο υλικό καλλιέργειας κ.ά.

Στην εικόνα 32 απεικονίζεται η μορφολογία των κυττάρων HT22 πριν (A) και μετά (B) την επίδραση του γλουταμικού (5mM) για 20 ώρες.



Εικόνα 32 : Θανάτωση των κυττάρων HT22 συναρτήσει του χρόνου επώασης με το γλουταμικό.

Η Εικόνα 33 Α δείχνει πώς φαίνονται τα κύτταρα HT22 όταν καλλιεργούνται σε υλικό με 10% FBS, δηλαδή με το κυτταρικό σώμα στη μέγιστη ανάπτυξη πρόσφυσης στο υπόστρωμα και τους άξονες να προεξέχουν. Τα κύτταρα καλλιεργούνται μέχρι να καλυφθεί το ταπήτιο σε ποσοστό 70% περίπου. Στη συνέχεια, επάζονται με το γλουταμικό (5mM) για 20 ώρες (εικόνα 33 Β), οπότε συρρικνώνονται, γίνονται στρογγυλά και τελικά πεθαίνουν.



Εικόνα 33 : Κύτταρα HT22 πριν και μετά την επίδραση τοξικής δόσης γλουταμικού. Μορφολογία των κυττάρων HT22 A. σε κανονικές συνθήκες καλλιέργειας και B. ύστερα από επώαση με το γλουταμικό (5mM) για 20 ώρες.

Κεφάλαιο 5

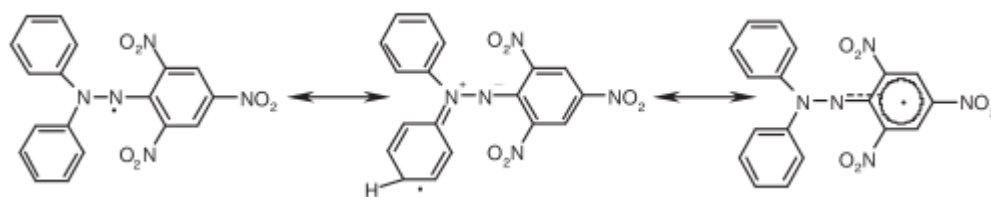
Μελέτη της αντιοξειδωτικής, αντιφλεγμονώδους και νευροπροστατευτικής δράσης των ενώσεων

5.1 Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης

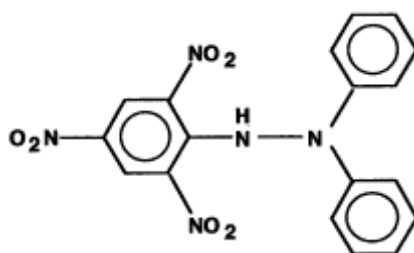
5.1.1 Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης με χρήση της ελεύθερης ρίζας DPPH.

Η μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης διάφορων ενώσεων με χρήση της μεθόδου DPPH χρησιμοποιείται ευρύτατα τα τελευταία χρόνια καθώς αποτελεί μια φυσική, απλή και με υψηλή ευαισθησία μέθοδο.[41]

Η ένωση 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) (Σχήμα 35) χαρακτηρίζεται ως μια σταθερή ελεύθερη ρίζα της οποίας η σταθερότητα οφείλεται στον απεντοπισμό του ελεύθερου ηλεκτρονίου στο μόριο, έτσι ώστε τα μόρια να μη διμερίζονται, όπως συμβαίνει με τις περισσότερες ελεύθερες ρίζες. Ο απεντοπισμός του ελεύθερου ηλεκτρονίου προκαλεί ένα βαθύ μωβ χρώμα στο μόριο, το οποίο χαρακτηρίζεται με μια ζώνη απορρόφησης σε διάλυμα αιθανόλης στα 520 nm. [41]

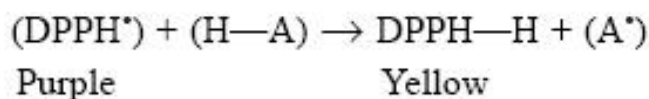


Σχήμα 35: Οι διάφορες δομές συντονισμού του DPPH που προκύπτουν απεντοπισμό του ελεύθερου ηλεκτρονίου



Σχήμα 36: Μη-δραστική μορφή του μορίου DPPH

Όταν ένα διάλυμα του DPPH αναμιγνύεται με ένα συστατικό το οποίο μπορεί να λειτουργήσει ως δότης ενός ατόμου υδρογόνου, τότε το DPPH λαμβάνει τη μη-δραστική μορφή του (Σχήμα 36) με ταυτόχρονη απώλεια του μωβ χρώματος. Μετά την αντίδραση με το μόριο H-A εμφανίζεται ένα ελαφρύ κίτρινο χρώμα το οποίο οφείλεται στην ομάδα του πικρυλίου που είναι παρούσα στο μόριο. [41]



Σχήμα 37: Αντίδραση μεταξύ του DPPH και του πιθανού αναγωγικού μορίου H-A

Ο μηχανισμός της συγκεκριμένης αντίδρασης βασίζεται στη μεταφορά ηλεκτρονίου, με την απόσπαση ενός ατόμου υδρογόνου να θεωρείται το καθοριστικό στάδιο της αντίδρασης, καθώς λαμβάνει χώρα αργά στους ισχυρά δεμένους με δεσμούς υδρογόνου διαλύτες, όπως είναι η μεθανόλη και η αιθανόλη. Η ρίζα A[•] μπορεί στη συνέχεια να υποβληθεί σε περαιτέρω αντιδράσεις οι οποίες ελέγχουν τη στοιχειομετρία, δηλαδή τον αριθμό των μορίων του DPPH τα οποία καταναλώνονται (αποχρωματίζονται) από ένα αναγωγικό μόριο. [42]

Σημαντικές παράμετροι της αντίδρασης μεταξύ του DPPH και του αναγωγικού μορίου H-A είναι ο διαλύτης και το pH. Όσον αφορά το διαλύτη, η μέθοδος φαίνεται ότι λειτουργεί ικανοποιητικά με χρήση μεθανόλης ή αιθανόλης. Επίσης, το βέλτιστο pH της αντίδρασης κυμαίνεται στο εύρος τιμών 5.0- 6.5 και ρυθμίζεται με χρήση οξικών ρυθμιστικών διαλυμάτων. Περαιτέρω παράγοντες που εξετάζονται για τη βελτιστοποίηση της αντίδρασης είναι ο χρόνος πραγματοποίησής της, η συγκέντρωση του DPPH καθώς και το ποσοστό νερού που χρησιμοποιείται. [41], [42]

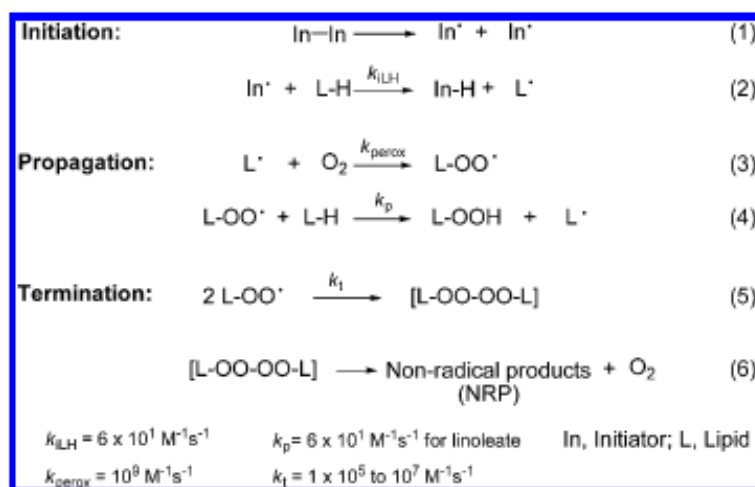
Έχει βρεθεί επίσης ότι η χωροταξική προσβασιμότητα στη ρίζα του DPPH διαδραματίζει επίσης σημαντικό ρόλο, με τα μικρού μεγέθους μόρια να έχουν καλύτερη πρόσβαση και να εμφανίζουν μεγαλύτερη δραστηριότητα ως αντιοξειδωτικά. [43]

5.1.2 Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της λιπιδικής υπεροξειδωσης του AAPH.

Στα κύτταρα των αερόβιων οργανισμών παράγονται συνεχώς χαμηλά επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) οι οποίες έχουν σημαντικό φυσιολογικό ρόλο στις διαδικασίες μεταγωγής σήματος [44],[45]. Όμως, ανεβασμένα επίπεδα αυτών των ριζών, αποδεικνύονται ιδιαίτερα τοξικά για τα κύτταρα. Οι ελεύθερες ρίζες μπορεί να αλληλεπιδράσουν με γειτονικά συστατικά του κυττάρου, όπως λιπίδια, πρωτεΐνες και DNA, και να τους προκαλέσουν οξειδώσεις.

Τα λιπίδια είναι ουσιώδη συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών τα οποία διατηρούν τη δομή και τον έλεγχο της λειτουργίας των κυττάρων. Επίσης αποτελούν βασικό στόχο των ROS και η οξείδωσή τους σχετίζεται με ποικίλες παθολογικές καταστάσεις. Η λιπιδική υπεροξειδωση, η αλλιώς η αντίδραση του λιπιδίου με το μοριακό οξυγόνο, εμπλέκεται σε πολλές ασθένειες όπως είναι η αθηροσκλήρωση, ο καρκίνος, ο διαβήτης αλλά και η νόσος Alzheimer και Parkinson. [46]

Ο μηχανισμός της αντίδρασης υπεροξειδωσης περιλαμβάνει τρία στάδια: την έναρξη, τη διάδοση και το τερματισμό, όπως φαίνεται στο σχήμα 38.



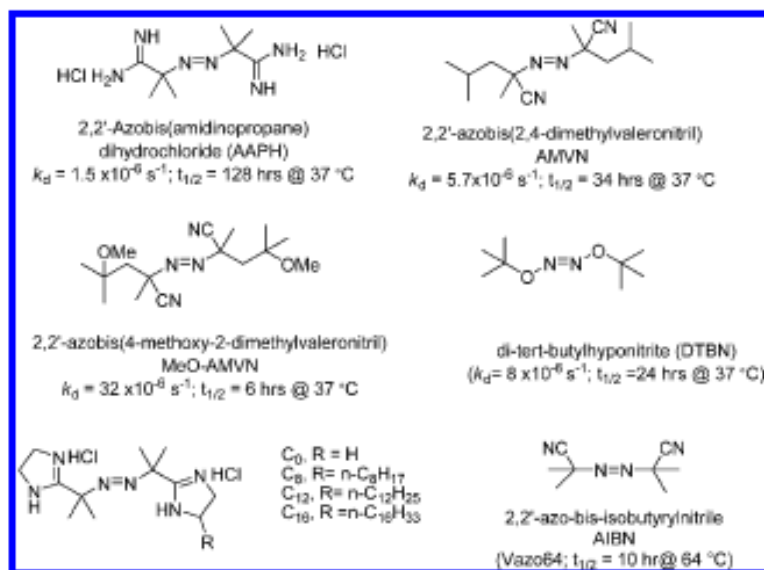
Σχήμα 38: Στάδια της λιπιδικής υπεροξειδωσης

1. Στάδιο της έναρξης

Το πρωταρχικό βήμα της λιπιδικής υπεροξειδωσης είναι ο σχηματισμός της λιπιδικής ρίζας L[·]. Στις περισσότερες χημικές μελέτες, είναι σημαντικό να υπάρχουν μέθοδοι οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν την ενεργοποίηση των ριζών. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται οι άζω ενεργοποιητές ελευθέρων ριζών, όπως είναι η ένωση 2,2'-Azobis-2-methylpropionamide dihydrochloride, (AAPH). (Σχήμα 39) Οι υδροφοβικοί, υδροφιλικί ή αμφιφιλικί άζω ενεργοποιητές στις συνήθεις συνθήκες οξειδωτικών αντιδράσεων διασπώνται μέσω μια αντίδρασης πρώτης

τάξης και δίνουν ένα μόριο αζώτου και ένα ζεύγος ελευθέρων ριζών. Υπάρχουν ορισμένες περιπτώσεις, όπως στον ενεργοποιητή AAPH, όπου απαιτείται θέρμανση για τη διάσπασή του. [46]

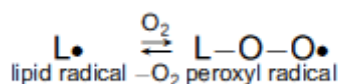
Συγκεκριμένα, το AAPH διασπάται στους 37 °C, σε διάλυμα μεθανόλης και εμφανίζει χρόνο ημιζωής $\tau_{1/2} = 128$ h. Το ζεύγος των ελευθέρων ριζών που παράγεται από τη διάσπασή του μπορεί να ενωθεί με ένα λιπιδικό υπόστρωμα και να παράγει άλκυλο ρίζες με κεντρικό άτομο άνθρακα L'. [46]



Σχήμα 39: Παραδείγματα αζω ενώσεων που λειτουργούν ως ενεργοποιητές

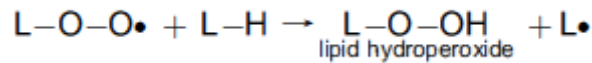
2. Στάδιο της διάδοσης

Σε ένα από τα στάδια διάδοσης της υπεροξειδωσης, το μοριακό οξυγόνο προστίθεται στη ρίζα με κεντρικό το άτομο άνθρακα L' έτσι ώστε να προκύψει μια υπεροξική ρίζα LOO· (Σχήμα 40). Στη πλειοψηφία των περιπτώσεων, η συγκεκριμένη μορφή υπεροξικής ρίζας αποτελεί το βασικό είδος της αλυσιδωτής αντίδρασης υπεροξειδωσης. Η προσθήκη οξυγόνου σε μια ρίζα αποτελεί ουσιαστικά ένα είδος «ζευγαρώματος» του μονού ηλεκτρονίου του άνθρακα με ένα από τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια του οξυγόνου και επηρεάζεται σημαντικά από τη χωροταξική διαμόρφωση των μορίων. [46]



Σχήμα 40: Προσθήκη οξυγόνου στη λιπιδική ρίζα L'

Το βασικό στάδιο διάδοσης στις περισσότερες αλυσιδωτές οξειδώσεις ελευθέρων ριζών είναι η μεταφορά ενός ατόμου υδρογόνου από το οργανικό υπόστρωμα στην υπεροξική ρίζα. Το προϊόν της αντίδρασης είναι ένα λιπιδικό υδροϋπεροξειδίο (LOOH) και μια λιπιδική ρίζα L'. (Σχήμα 41). [46]



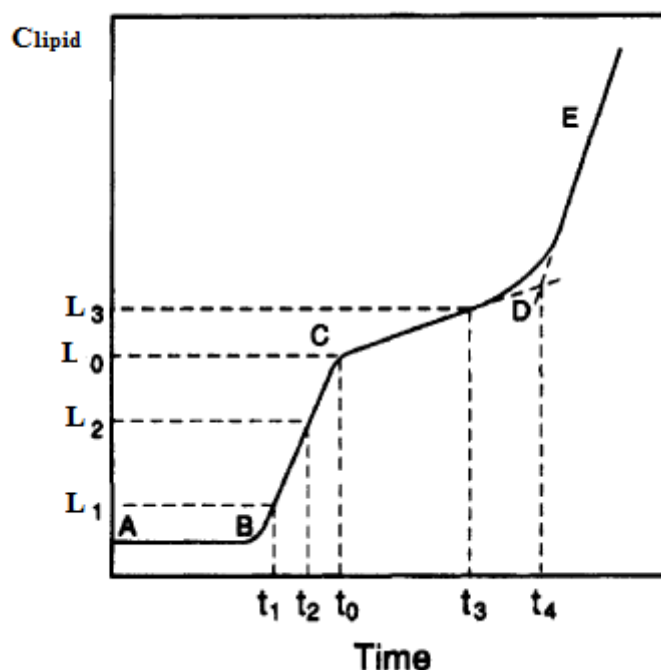
Σχήμα 41: Αντίδραση παραγωγής του υδροϋπεροξειδίου

3. Στάδιο τερματισμού

Το στάδιο τερματισμού της αντίδρασης της λιπιδικής υπεροξείδωσης περιλαμβάνει το συνδυασμό δυο υπεροξικών ριζών που οδηγεί σε μη-δραστικά μόρια (non-radical products, NRP).

Ουσιαστικά, η μέθοδος μελέτης της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της αντίδρασης λιπιδικής υπεροξείδωσης στηρίζεται στη ικανότητα του αντιοξειδωτικού να αποτρέψει την δράση του ενεργοποιητή και κατ'επέκταση το σχηματισμό των δραστικών ριζών οξυγόνου.

Συγκεκριμένα, περιλαμβάνει τη χρήση του ενεργοποιητή ελευθέρων ριζών AAPH, ενός υποστρώματος (για παράδειγμα, το λινολεϊκό οξύ), ενός αντιοξειδωτικού και διαλυμένου οξυγόνου. Απουσία του ενεργοποιητή πραγματοποιείται μια αμελητέα αντίδραση (καμπύλη AB). (Εικόνα 34) Με τη προσθήκη της ρίζας του ενεργοποιητή, και συγκεκριμένα του AAPH, η αντίδραση ξεκινάει και η οξείδωση του συζευγμένου διενίου πραγματοποιείται με ταχύτατους ρυθμούς (καμπύλη BC). Όταν προστίθεται ένα αντιοξειδωτικό, η αντίδραση εξελίσσεται πιο αργά (καμπύλη CD) μέχρι την κατανάλωση του αντιοξειδωτικού και η ταχύτητα της αντίδρασης αυξάνεται μέχρι το σημείο E (καμπύλη DE) (Εικόνα 34). [47]



Εικόνα 34: Διάγραμμα της συγκέντρωσης του λιπιδίου συναρτήσει του χρόνου σε περιπτώσεις απουσίας ενεργοποιητή (AB), παρουσίας ενεργοποιητή (BC), χρήση αντιοξειδωτικού (CD)

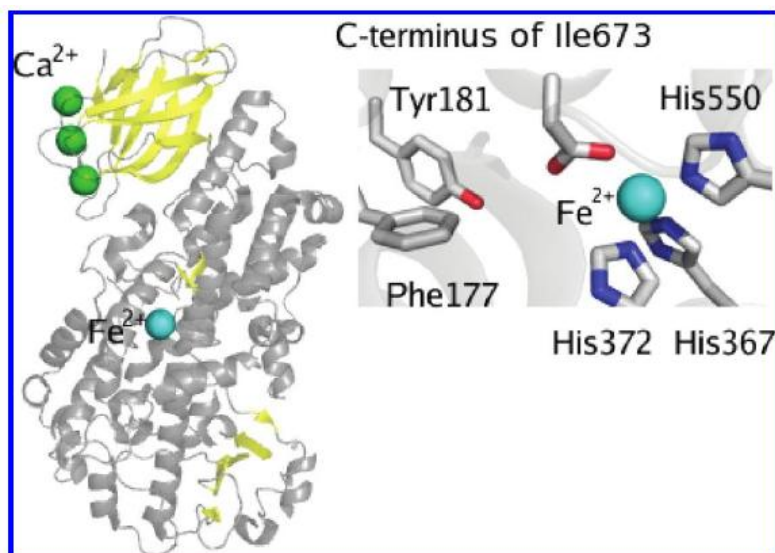
5.2 Μελέτη της αντιφλεγμονώδους δράσης μέσω του προσδιορισμού της ικανότητας αναστολής του ενζύμου λιποξυγονάση από σόγια

Η μελέτη του μηχανισμού δράσης της λιποξυγονάσης και των λευκοτριενίων αποτελούν αντικείμενο έρευνας εδώ και δεκαετίες, και παρόλο που αυτή τη στιγμή βρίσκονται σε πολύ εξελιγμένο επίπεδο, συνεχίζουν να δίνουν τη δυνατότητα νέων ανακαλύψεων. [48]

Οι λιποξυγενάσες συναντώνται ευρέως σε φυτά, μύκητες και ζώα και ταξινομούνται ανάλογα με τον αριθμό των ανθράκων που υπόκεινται σε οξυγόνωση. Οι πιο εκτενώς μελετημένες είναι οι λιποξυγενάσες προερχόμενες από φυτά και συγκεκριμένα η λιποξυγονάση από σόγια η οποία απομονώθηκε σε κρυσταλλική μορφή ήδη από το 1947. Υπάρχουν περισσότερα από έξι είδη λιποξυγονάσης, αλλά αυτή που είναι άμεσα συνδεδεμένη με ανθρώπινες ασθένειες και μελετάται σε μεγαλύτερο βαθμό είναι η 5-λιποξυγονάση. [48]

Η 5-λιποξυγονάση είναι ένα ένζυμο το οποίο αποτελείται από 673 αμινοξέα και εμφανίζεται συνήθως στο κυτταρόπλασμα ή στον πυρήνα, ανάλογα με το είδος των κυττάρων. Η πολυπεπτιδική αλυσίδα της λιποξυγονάσης χωρίζεται σε δυο τομείς, τον

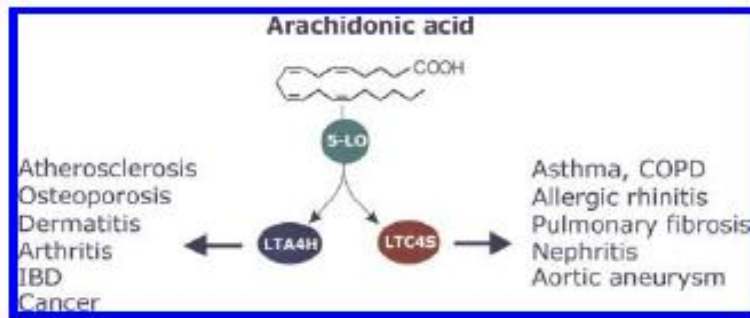
αζωτούχο τερματικό ρυθμιστικό τομέα και τον καταλυτικό τομέα του άνθρακα ο οποίος φιλοξενεί και ένα άτομο σιδήρου. Το συγκεκριμένο άτομο σιδήρου λειτουργεί σαν δότης ή δέκτης ηλεκτρονίων κατά τη διάρκεια της καταλυτικής διεργασίας που περιγράφεται παρακάτω. Συγκεκριμένα, όταν είναι αδρανές, το άτομο του σιδήρου έχει τη δισθενή μορφή Fe^{2+} ενώ η καταλυτικά δραστική 5-λιποξυγονάση απαιτεί τη μετατροπή του στον τρισθενή σίδηρο Fe^{3+} , γεγονός που επιτυγχάνεται με οξείδωση μέσω των λιπιδικών υδροϋπεροξειδίων (LOOH). [48]



Εικόνα 35: Κρυσταλλική μορφή της ανθρώπινης 5-LO, στην οποία φαίνεται ο ρυθμιστικός τομέας του ενζύμου (κίτρινο χρώμα) συνδεδεμένος με ιόντα ασβεστίου και ο καταλυτικός τομέας του άνθρακα με το άτομο σιδήρου (γκρι χρώμα).

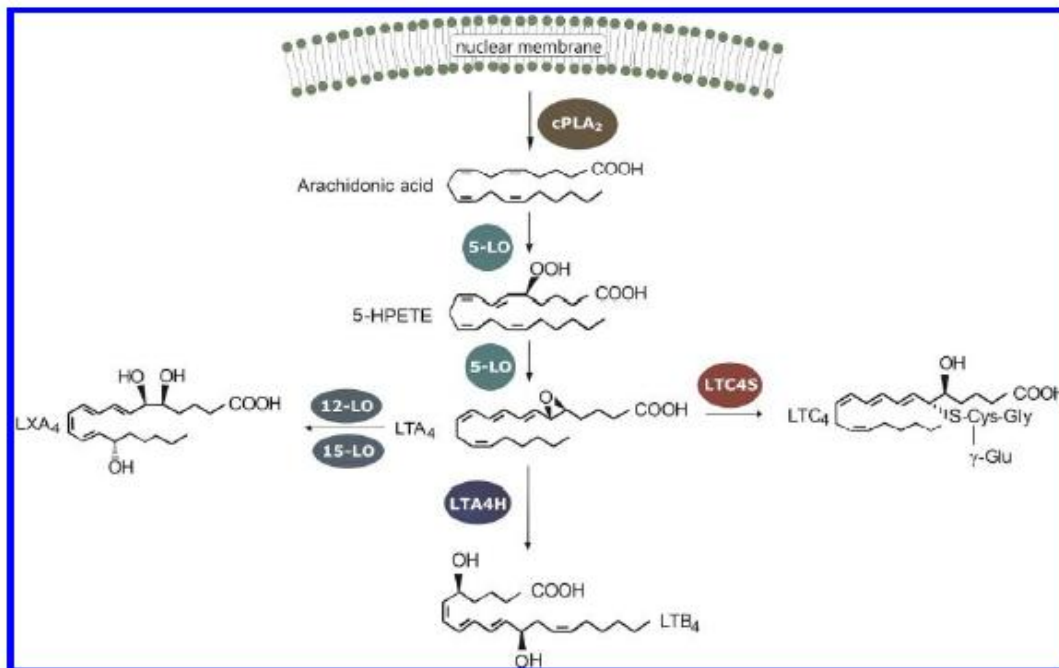
Η 5-λιποξυγονάση συμμετέχει στο σχηματισμό διαφόρων σηματοδοτικών μορίων των κυττάρων, σημαντικότερα εκ των οποίων θεωρούνται τα λευκοτριένια (LTs) λόγω της αναμφισβήτητης ανάμειξής τους σε φλεγμονώδεις ασθένειες. Τα λευκοτριένια αποτελούν βιοδραστικά, λιπιδικά ενδιάμεσα τα οποία παράγονται και απελευθερώνονται σε διάφορους τύπους λευκοκυττάρων αλλά και δενδριτικών κυττάρων. [48]. [49]

Μέσα από ποικίλες μελέτες, έχει καταστεί σαφές ότι τα λευκοτριένια εμπλέκονται σε μεγάλο βαθμό σε πολλές φλεγμονώδεις και αλλεργικές ανωμαλίες. Ως εκ τούτου, το βρογχικό άσθμα, η αλλεργική ρινίτιδα, οι φλεγμονώδεις δερματικές ασθένειες και η ρευματοειδής αρθρίτιδα έχουν άμεσα συσχετισθεί και με τη δράση της 5-λιποξυγονάσης. Επίσης, νέες τεχνολογίες της μοριακής και κυτταρικής βιολογίας, έδειξαν την συσχέτιση της δράσης της 5-λιποξυγονάσης με ασθένειες όπως ο καρκίνος, η οστεοπόρωση και το καρδιακό έμφραγμα. (Εικόνα 35) [49]



Εικόνα 36: Ασθένειες οι οποίες σχετίζονται με διάφορες μορφές λευκοτριενίων

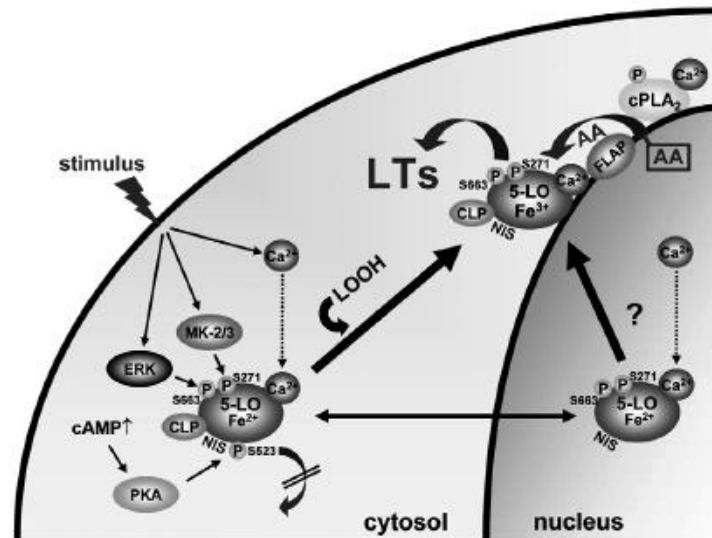
Η σύνθεση των λευκοτριενίων μέσω του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος από την 5-λιποξυγονάση φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 42):



Σχήμα 42: Μεταβολικά στάδια παραγωγής λευκοτριενίων μέσω της 5-λιποξυγονάσης

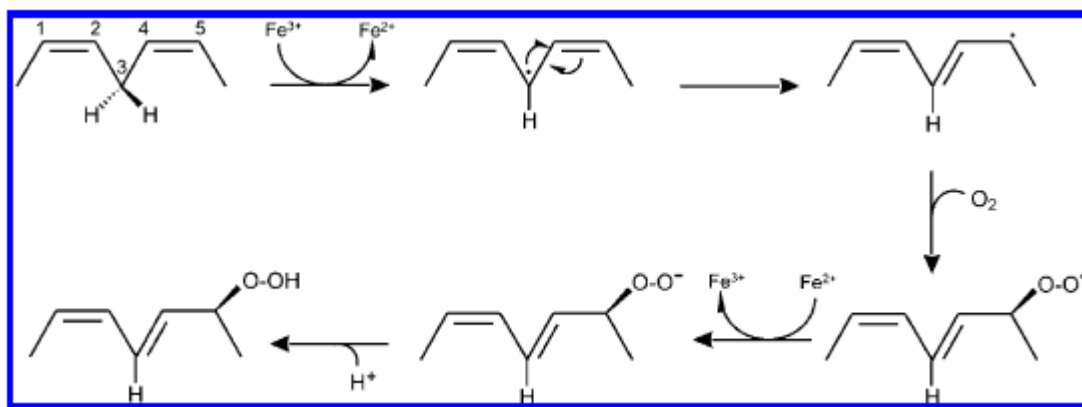
Το αρχικό βήμα στη σύνθεση των λευκοτριενίων αποτελεί η απελευθέρωση του αραχιδονικού οξέος (AA) η οποία πραγματοποιείται μέσω της συνδυασμένης δράσης της 5-λιποξυγονάσης και της φωσφολιπάσης A₂ (cPLA₂) του κυτταροπλάσματος. Συγκεκριμένα, η φωσφολιπάση cPLA₂, η οποία ενεργοποιείται από κάποιο κυτταρικό διαμέρισμα και μεταφέρεται στον πυρήνα για να εκφράσει τη δράση της, είναι υπεύθυνη για την υδρόλυση και απελευθέρωση του αραχιδονικού οξέος από τα φωσφολιπίδια. Η μεταφορά του αραχιδονικού οξέος στη 5-LO καθώς και η ενεργοποίηση της 5-λιποξυγονάσης πραγματοποιείται μέσω της 5-λιποξυγονάσης-ενεργοποιητικής πρωτεΐνης (five lipoxygenase-activating protein, FLAP) (Σχήμα 42). [48], [49]

Η 5-λιποξυγονάση, η οποία ενεργοποιείται μέσω μιας αντίδρασης με μηχανισμό ελευθέρων ριζών, αξιοποιεί κυρίως το μοριακό οξυγόνο και μετατρέπει το ελεύθερο πλέον αραχιδονικό οξύ στο 15-υδροϋπεροξυ-5,8,11-cis-13-trans-εικοσατετραενοϊκό οξύ [15-hydroperoxy-5,8,11-cis-13-trans-eicosatetraenoic acid, 15-HPETE]. Στη συνέχεια, η ένωση 15-HPETE μεταβολίζεται μέσω της 5-λιποξυγονάσης στο ενδιάμεσο LTA₄. [48], [49], [50]



Εικόνα 37 : Διεργασία ενεργοποίησης της λιποξυγονάσης και μετάδοσης σήματος για την παραγωγή των λευκοτριενίων.

Η ενεργοποίηση της λιποξυγονάσης πραγματοποιείται μέσω μιας καταλυτικής διεργασίας η οποία ξεκινάει με στερεοειδική απόσπαση του υδρογόνου στον άνθρακα C-3 του cis,cis-1,4-πενταδιενίου το οποίο οδηγεί σε ρίζα με κεντρικό άτομο άνθρακα (Σχήμα 43). Το υδρογόνο διασπάται σε πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο, το οποίο ανάγει το σίδηρο σε ιόν Fe²⁺. Το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο της ρίζας συνδέεται με ένα από τα ηλεκτρόνια του γειτονικού διπλού δεσμού, σχηματίζοντας το 1-cis-3-trans- συζυγιακό διένιο με μεταφορά της ρίζας στον άνθρακα C-5 όπου αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο για να σχηματίσει τη ρίζα υπεροξειδίου (Σχήμα 43). Ο σίδηρος ακολούθως οξειδώνεται μέσω μεταφοράς ηλεκτρονίου στη ρίζα υπεροξειδίου σχηματίζοντας ένα υπεροξυ-ανιόν το οποίο πρωτονιώνεται για να δώσει το υδροϋπεροξειδίο (LOOH) και τη δραστική μορφή του σιδήρου Fe³⁺. Με το σχηματισμό της δραστικής μορφής σιδήρου Fe³⁺, ενεργοποιείται η λιποξυγονάση. [48]



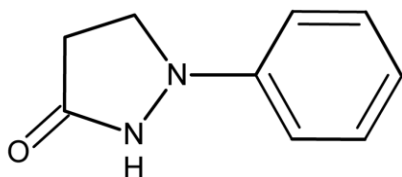
Σχήμα 43: Μηχανισμός ενεργοποίησης της λιποξυγονάσης

Όπως φαίνεται και από σχήμα 42 που παρατίθεται παραπάνω, η μετέπειτα πορεία του ενδιάμεσου LTA_4 εξαρτάται από τύπο των κυττάρων και τα ένζυμα που συμμετέχουν σε αυτή. Μέσω της LTA_4 υδρολάσης, η οποία εμφανίζεται στα περισσότερα κύτταρα των θηλαστικών, πραγματοποιείται η μετατροπή του LTA_4 στο λευκοτριένιο LTB_4 . Επίσης, μέσω της δράσης της LTC_4 συνθάσης γίνεται η σύζευξη του ενδιάμεσου LTA_4 με τη γλουταθειόνη σχηματίζοντας το λευκοτριένιο LTC_4 . Απελευθέρωση του LTC_4 στο εξωκυτταρικό περιβάλλον και με δέσμευση των αμινοξέων σχηματίζονται τα λευκοτριένια LTD_4 και LTE_4 . Τέλος, η συνδυασμένη δράση της 5-λιποξυγονάσης με τα ένζυμα 12-LO και 15-LO μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό των λιποξινών (LX), τα οποία αποτελούν βιοδραστικά λιπιδικά ενδιάμεσα και αποτρέπουν την αποστολή σημάτων για φλεγμονώδεις αντιδράσεις. [48], [50]

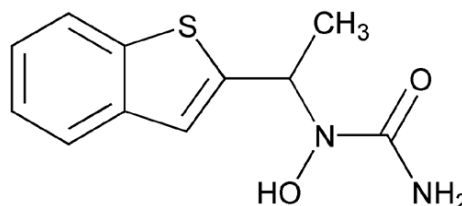
Όπως αναφέρεται και προηγουμένως τα λευκοτριένια μπορεί να έχουν σημαντικές επιπτώσεις στον ανθρώπινο οργανισμό λόγω της εμπλοκής τους σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Ως εκ τούτου, έχουν πραγματοποιηθεί πολλές προσπάθειες παραγωγής διάφορων αναστολέων των ενζύμων που εμπλέκονται στη δράση της 5-λιποξυγονάσης (Σχήμα 42) και την παραγωγή των λευκοτριενίων.

Οι - αναστολείς της 5-λιποξυγονάσης μπορούν να διακριθούν στις τρεις ακόλουθες κατηγορίες: [48]

- Αντιοξειδωτικοί αναστολείς όπως είναι οι ενώσεις: phenidone, BW-755 C (Burroughs-Wellcome) και ICI 2207968 (ICI Pharmaceuticals).
- Αναστολείς που δρουν μέσω της δέσμευσης σιδήρου, οι οποίοι διαθέτουν ομάδα υδροξαμικού οξέος για τη συμπλοκοποίηση του μετάλλου. Παραδείγματα τέτοιων ενώσεων είναι το zileuton και το αρυλο-υδροξαμικό οξύ BWA4C (Wellcome).
- Αναστολείς που στοχεύουν στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, οι οποίοι σχεδιάστηκαν μέσω μοντέλων του καταλυτικού τμήματος του ενζύμου. Παραδείγματα τέτοιων ενώσεων είναι μεθοξυάκυλο θειαζόλες ICI211965 και ICID2138.



phenidone



zileuton

Οι παραπάνω ενώσεις έδειξαν ευεργετικά αποτελέσματα έναντι της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, της φλεγμονώδους ασθένειας του νεφρού, της ψωρίασης, της αλλεργικής ρινίτιδας και έναντι του άσθματος. [48]

Θα πρέπει να σημειωθεί πως, τα τελευταία χρόνια, λόγω της γνώσης της κρυσταλλικής δομής του ενζύμου, ο σχεδιασμός αναστολέων της 5-LO και η συσχέτιση δομής- δράσης έχει γνωρίσει ιδιαίτερη άνθηση.

Τα πειράματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκαν *in vitro* με χρήση της λιποξυγονάσης από σόγια. Καθώς όμως έχει καταστεί σαφές ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της δράσης της λιποξυγονάσης από σόγια και της 5-λιποξυγονάσης του ανθρώπου, θεωρούμε πως τα αποτελέσματα είναι ενδεικτικά της ανασταλτικής δράσης των ενώσεων έναντι της 5-λιποξυγονάσης.

5.3 Μελέτη της νευροπροστατευτικής δράσης έναντι του οξειδωτικού στρες στη κυτταρική σειρά HT-22

Ο ιππόκαμπος αποτελεί έναν από τους βασικούς σχηματισμούς του Κεντρικού Νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) στον οποίο εδρεύουν οι μηχανισμοί της μάθησης και της έκδηλης και συνειρμικής μνήμης και αποτελεί σημαντικό στόχο διαφόρων παραγόντων με νευροεκφυλιστική δράση. Δύο είναι οι πλέον γνωστές και καλά μελετημένες διαδικασίες που οδηγούν στην εκφύλιση των νευρώνων του ιππόκαμπου και οι οποίες συνοδεύονται με απώλεια μνήμης: το χρόνιο στρες και η γήρανση.

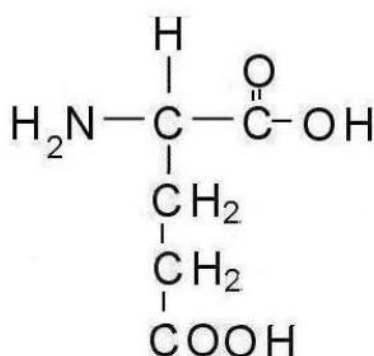
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, υψηλά επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) αποδεικνύονται ιδιαίτερα τοξικά για τα κύτταρα. Το οξειδωτικό στρες περιγράφει την κατάσταση κατά την οποία οι κυτταρικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί δεν είναι ικανοί να κρατήσουν τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών κάτω από το κατώφλι τοξικότητάς τους. Αυτό μπορεί να συμβαίνει είτε λόγω της εκτεταμένης παραγωγής ελευθέρων

ριζών, της μείωσης αντιοξειδωτικών μηχανισμών ή με συνδυασμό και των δύο γεγονότων . Ο κυτταρικός θάνατος λόγω οξειδωτικού στρες διαφέρει από το κλασικό μονοπάτι της απόπτωσης και πιθανότατα εμπλέκεται σε πολλές μορφές εκφύλισης του ΚΝΣ.

Το γλουταμικό οξύ (Σχήμα 44) είναι ο κύριος νευροδιαβιβαστής στον εγκέφαλο και ένα από τα πιο άφθονα ελεύθερα αμινοξέα. Εκτός από τη συμμετοχή του στην πρωτεϊνική σύνθεση , το γλουταμικό είναι ένα μόριο με ποικίλες βιολογικές δράσεις. [57] . Οι υψηλές όμως συγκεντρώσεις γλουταμικού είναι τοξικές για τα κύτταρα και πρέπει ,ειδικά οι εξωκυτταρικές, να διατηρούνται σε χαμηλά επίπεδα. Στην περίπτωση της τοξικότητας που προκαλείται από το γλουταμικό λόγω οξειδωτικού στρες, η πρόσληψη κυστίνης στο κύτταρο μέσω ενός μηχανισμού αντιμεταφοράς κυστίνης/γλουταμικού αναστέλλεται παρουσία υψηλών εξωκυττάρων συγκεντρώσεων γλουταμικού.

Συγκεκριμένα, εξωκυτταρικές συγκεντρώσεις του γλουταμικού της τάξης του 10mM εμποδίζουν την είσοδο κυστίνης με αποτέλεσμα την εξάντληση των αποθεμάτων της γλουταθειόνης [58] . Η κυστίνη είναι ένα από τα τρία αμινοξέα που απαιτούνται για τη σύνθεση της γλουταθειόνης (GSH), το κύριο αναγωγικό και αντιοξειδωτικό μέσο του κυττάρου. Όταν το απόθεμα γλουταθειόνης του κυττάρου μειώνεται σε ποσοστό υψηλότερο του 80% για μια περίοδο μερικών ωρών, τα κύτταρα πεθαίνουν από μια μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που διαφέρει τόσο από την απόπτωση όσο και από τη νέκρωση. Στην περίπτωση των νευρικών κυττάρων HT22, έχει βρεθεί ότι ο θάνατός τους μπορεί να ανασταλεί από αντιοξειδωτικά όπως η βιταμίνη E.

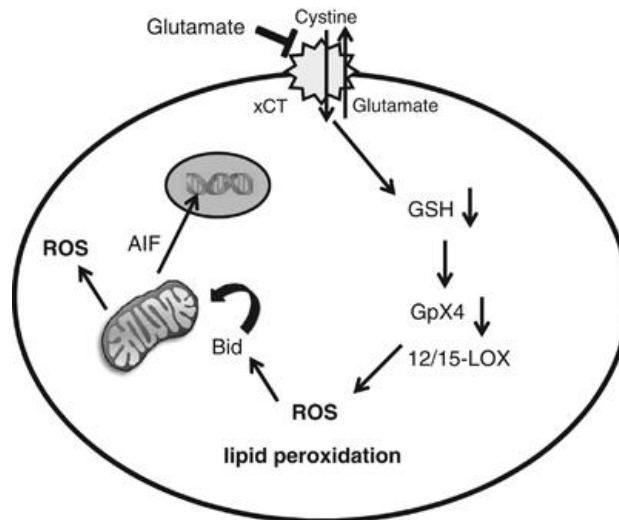
Glutamate



Σχήμα 44: Δομή του γλουταμικού οξέος

Τα κύτταρα HT22 είναι μετασηματισμένα νευρικά κύτταρα που δεν εκφράζουν λειτουργικούς υποδοχείς και για αυτό εμφανίζουν κυτταροτοξικότητα στη παρουσία 5 mM γλουταμικού αποκλειστικά λόγω οξειδωτικού στρες [59] .Το αρχικό γεγονός στο θάνατο λόγω οξειδωτικού στρες από το γλουταμικό είναι η αναστολή της εισόδου κυστίνης. Ενώ πολλά κύτταρα μπορούν να συνθέσουν την κυστίνη μέσω διάφορων ενζύμων, τα νευρικά κύτταρα δεν περιέχουν τέτοιου είδους ένζυμα οπότε εξαρτώνται

αποκλειστικά από την εξωκυττάρια κυστίνη. Τα αποθέματα γλουταθειόνης εξαντλούνται πολύ γρήγορα λόγω του ότι η σύνθεση πρωτεϊνών συνεχίζεται με αμείωτο ρυθμό στα κύτταρα που έχουν εκτεθεί στο γλουταμικό. Χαρακτηριστικά, μετά από 4 ώρες αναστολής της εισόδου κυστίνης από το γλουταμικό, υπάρχει πολύ μικρή μείωση στο ρυθμό της πρωτεϊνικής σύνθεσης ενώ τα επίπεδα της γλουταθειόνης έχουν σχεδόν μηδενιστεί. Εάν τα κύτταρα εκτεθούν στο γλουταμικό για 7 ή περισσότερες ώρες, το μονοπάτι που οδηγεί στο κυτταρικό θάνατο είναι μη αναστρέψιμο ενώ για μικρότερο χρόνο τα κύτταρα ανακάμπτουν μετά από απομάκρυνση του γλουταμικού.



Εικόνα 38: Μηχανισμός πρόκλησης οξειδωτικού στρες λόγω του γλουταμικού στα κύτταρα HT22

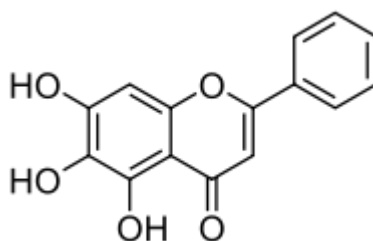
Οι βλάβες λόγω οξειδωτικού στρες και η πρόοδος των διάφορων ασθενειών μπορεί να επιβραδυνθεί με τη χορήγηση εξωγενών προστατευτικών ενώσεων, οι οποίες δρουν ως δεσμευτές ελευθέρων ριζών, αναστολείς του σχηματισμού ελευθέρων ριζών οξυγόνου, δεσμευτές μετάλλων της ομάδας των στοιχείων μεταπτώσεως και άλλα. Η προστατευτική αποτελεσματικότητα των αντιοξειδωτικών εξαρτάται από τον τύπο των ROS που παράγονται, τον τόπο δημιουργίας τους και την σοβαρότητα της προσβολής.

5.4 Συσχέτιση της δράσης της λιποξυγονάσης με την αναστολή του κυτταρικού θανάτου λόγω οξειδωτικού στρες στα κύτταρα HT-22

Νεότερες μελέτες στα νευρικά κύτταρα HT22 έδειξαν ότι η αναστολή του ενζύμου της 12/15-λιποξυγονάσης έχει επίσης και νευροπροστατευτική δράση για τα κύτταρα. Η 12/15-λιποξυγονάση μπορεί να γίνει νευροτοξική για τα κύτταρα από την εξάντληση της ενδοκυτταρικής, αντιοξειδωτικής γλουταθειόνης και πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης-4 μπορεί να ρυθμίσει τα κυτταροτοξικά αποτελέσματα της 12/15 λιποξυγονάσης. [52]

Έχει υποστηριχθεί ότι τα τοξικά αποτελέσματα της δράσης της 12/15-LO σχετίζονται με τους διαλυτούς μεταβολίτες της, οι οποίοι περιλαμβάνουν κυρίως οξειδωμένα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Μια άλλη υπόθεση σχετικά με το μηχανισμό δράσης του ενζύμου αναφέρει ότι το ένζυμο μέσω της συνεισφοράς του στη φυσιολογική κατανομή των μιτοχονδρίων των ερυθρών αιμοσφαιρίων, προκαλεί βλάβη στα νευρικά κύτταρα. Παρόλα αυτά, ο ακριβής μηχανισμός παραμένει ακόμα αδιευκρίνιστος. [52]

Σύμφωνα με τη μελέτη του P.A Larchack και των συνεργατών του, η ένωση baicalein (Σχήμα 45), που αποτελεί ένα πολυφαινολικό φυσικό φλαβονοειδές, εμφανίζει ταυτόχρονα πολύ καλή ανασταλτική δράση του ενζύμου της 12/15 λιποξυγονάσης αλλά και νευροπροστατευτική δράση. Η συγκεκριμένη ερευνητική ομάδα αναφέρει ότι πιθανόν τα κύτταρα HT22 να περιέχουν την 12/15 λιποξυγονάση και ότι το ένζυμο ρυθμίζεται από την εξάντληση των ενδοκυτταρικών αποθεμάτων γλουταθειόνης ή από τη πρόκληση τοξικότητας λόγω του γλουταμικού. [54]



Σχήμα 45: Η δομή της ένωσης baicalein

Κεφάλαιο 6

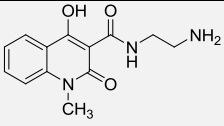
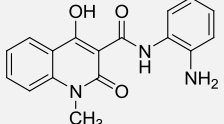
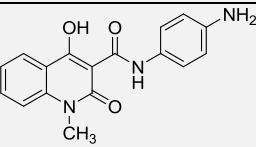
Αξιολόγηση της βιολογικής δράσης των νέων ενώσεων

6.1 Προσδιορισμός της ικανότητας των νέων ενώσεων να αναστέλλουν τη δράση της λιποξυγονάσης από σόγια

Στο παρόν κεφάλαιο γίνεται παρουσίαση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της βιολογικής δράσης των ενώσεων που συντέθηκαν. Σκοπός της συγκεκριμένης αξιολόγησης είναι να εξετασθεί κατά πόσο η βιοϊσοστερής υποκατάσταση που εφαρμόστηκε είναι επιτυχής.

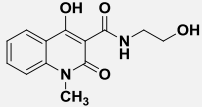
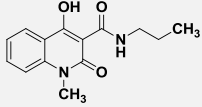
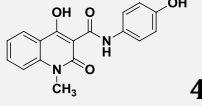
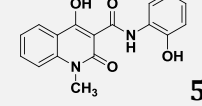
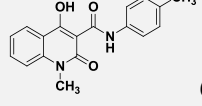
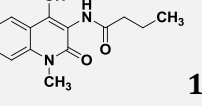
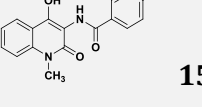
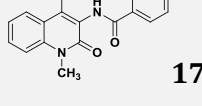
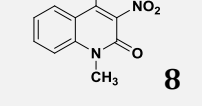
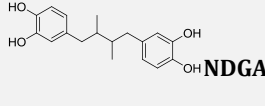
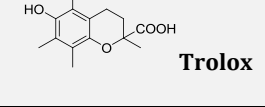
Στον Πίνακα 10 παρατίθενται τα αποτελέσματα προσδιορισμού της βιολογικής δράσης των αρχικών καρβοξαμιδίων του τύπου (I) στα οποία βασίστηκε ο σχεδιασμός των νέων αναλόγων.

Πίνακας 10: Προσδιορισμός βιολογικής δράσης των καρβοξαμιδίων του τύπου (I) [30]

Ένωση	Αναστολή λιποξυγονάσης από σόγια % 100μM	DPPH 100μM 20/60 min
 (Iα)	99.5	6/12
 (Iβ)	71.3	6/14
 (Iγ)	50.8	90/88

Στον Πίνακα 11 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του προσδιορισμού της ικανότητας των νέων μορίων να αναστέλλουν τη δράση της λιποξυγονάσης από σόγια και της αντιοξειδωτικής τους δράσης.

Πίνακας 11: Αποτελέσματα βιολογικής δράσης των ενώσεων της σειράς A και B

Ένωση	Αναστολή λιποξυγονάσης από σόγια		DPPH (100μM) 20/60 min	Αναστολή λιπιδικής υπεροξειδωσης (AAPH)	
	IC ₅₀ (μM)	% (100μM)		IC ₅₀ (mM)	%(100 μM)
 2		93.2	3/11	0.00525	
 3	60		2/12	0.0525	
 4	0.0485		39/49	0.058	
 5	100	50	33/47		32.8
 6	45		3/3		0
 14	81		24/31		83
 15	100	52	27/32		88
 17	82.5		25/28		88
 8	78		19/5		100
 NDGA	40		81/83		
 Trolox				63	

Ως ενώσεις αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν το νορδιϋδρογουαϊαρετικό οξύ (nordihydroguaiaretic acid, NDGA) και το υδατοδιαλυτό ανάλογο της βιταμίνης E, Trolox.

Αρχικά αξιολογείται η κλασική βιοϊσοστερής υποκατάσταση που εφαρμόστηκε στις ενώσεις **Ia**, **Ib**, **Iγ** και οδήγησε στις ενώσεις **2-6** με σύγκριση των αποτελεσμάτων της ικανότητας αναστολής της λιποξυγονάσης και αντιοξειδωτικής δράσης του DPPH. Υπενθυμίζεται ότι η κλασική βιοϊσοστερής υποκατάσταση των παραπάνω ενώσεων περιλαμβάνει την αντικατάσταση της αμινομάδας με υδροξύλιο και μεθύλιο.

- Σε ότι αφορά την ένωση **Ia**, η βιοϊσοστερής υποκατάσταση φαίνεται πως είναι επιτυχής και οδηγεί σε πιο δραστικά ανάλογα. Συγκεκριμένα η ένωση **2** που προκύπτει με υποκατάσταση της αμινομάδας με υδροξύλιο παρουσιάζει παρόμοια ικανότητα αναστολής της λιποξυγονάσης και αντιοξειδωτική δράση με την ένωση **Ia**. Αντίθετα, η ένωση **3** εμφανίζεται ως πολύ ισχυρός αναστολέας της λιποξυγονάσης ($IC_{50}=60\mu M$), ενώ η αντιοξειδωτική της δράση είναι παρόμοια με αυτή της αρχικής ένωσης **Ia**.
- Η υποκατάσταση της ορθο-αμινομάδας της ένωσης **Ib** με υδροξύλιο οδηγεί στο ανάλογο **5** το οποίο εμφανίζει μειωμένη ικανότητα αναστολής του ενζύμου σε συγκέντρωση $100\mu M$ (50 % έναντι 71 % της **Ib**) αλλά σημαντικά βελτιωμένη αντιοξειδωτική δράση έναντι της ρίζας DPPH.
- Η βιοϊσοστερής υποκατάσταση της αμινομάδας της ένωσης **Iγ** μπορεί με βάση τα ανωτέρω αποτελέσματα να θεωρηθεί αρκετά επιτυχής. Το βιοϊσοστερές ανάλογο **4**, που περιέχει ομάδα υδροξυλίου αντί της αμινοομάδας, εμφανίζει πολλές τάξεις μεγέθους καλύτερη δράση έναντι της λιποξυγονάσης ($IC_{50}=0.0485\mu M$), αλλά και βελτιωμένη ικανότητα ως αντιοξειδωτικό με βάση τη μέθοδο του DPPH. Παρόμοια, το βιοϊσοστερές ανάλογο **6**, με μεθυλο-ομάδα στη θέση της αμινοομάδας, εμφανίζει πολύ καλύτερη δράση σε σχέση με το αρχικό μόριο **Iγ** και στις δύο βιοδοκιμασίες.

Στη συνέχεια, γίνεται αξιολόγηση της αντιφλεγμονώδους και αντιοξειδωτικής δράσης των ενώσεων που προκύπτουν από εφαρμογή της μη-κλασικής βιοϊσοστερούς υποκατάστασης και συγκεκριμένα του αντίστροφου αμιδίου.

- Το βιοϊσοστερές ανάλογο **14**, που προκύπτει από εφαρμογή του αντίστροφου αμιδίου στην ένωση **3**, παρουσιάζει μειωμένη δραστηριότητα και ως αναστολέας της λιποξυγονάσης ($IC_{50}=81\mu M$ και $60\mu M$, αντίστοιχα) αλλά και ως αντιοξειδωτικό με τη μέθοδο του DPPH συγκρινόμενο με την αρχική ένωση **3**.
- Το βιοϊσοστερές ανάλογο **15** που αποτελεί το αντίστροφο αμίδιο της ένωσης **6** παρουσιάζει ασθενέστερη ικανότητα αναστολής του ενζύμου ($IC_{50}=100$ και $45\mu M$, αντίστοιχα) και ελαττωμένη αντιοξειδωτική (με βάση το DPPH) δράση.
- Η εφαρμογή της μη-κλασικής βιοϊσοστερούς υποκατάστασης του αντίστροφου αμιδίου στην ένωση **5** χαρακτηρίζεται ως μάλλον ανεπιτυχής εφόσον το ανάλογο **17** έχει βελτιωμένη δράση έναντι της λιποξυγονάσης ($IC_{50}=82.5$ αντί $100\mu M$), αλλά μικρότερη αντιοξειδωτική δράση.

Η αξιολόγηση της δράσης του αντίστροφου αμιδίου **16**, το οποίο αποτελεί βιοϊσοστερές ανάλογο του πιο δραστικού καρβοξαμιδίου **4** από τη Σειρά A, είναι υπό εξέλιξη.

Τα νέα παράγωγα **2-17** αξιολογήθηκαν επίσης για την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη λιπιδική υπεροξειδωση του λινελαϊκού οξέος, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του AAPH. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα του Πίνακα 11 την καλύτερη δράση έναντι της λιπιδικής υπεροξειδωσης εμφανίζει το αμίδιο **2** με ($IC_{50}=0.00525\mu M$). Τα αμίδια **3** και **4** παρουσιάζουν επίσης αξιόλογη δράση, σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή της ένωσης αναφοράς trolox. Η θέση του υδροξυλίου στον αρωματικό δακτύλιο της θέσης 3 της κινολινόνης φαίνεται ότι επηρεάζει σημαντικά τη δράση έναντι της λιπιδικής υπεροξειδωσης, αφού το ανάλογο **5** με το υδροξύλιο στην ορθο-θέση εμφανίζει πολύ ελαττωμένη δράση (32.8% σε συγκέντρωση 0.1mM) σε σχέση με το ανάλογο **4** που έχει το υδροξύλιο σε παρα-θέση ($IC_{50}=0.058\mu M$). Η βιοϊσοστερής υποκατάσταση της ομάδας υδροξυλίου σε παρα-θέση από ομάδα μεθυλίου οδηγεί στο μη δραστικό παράγωγο **6**.

Εφαρμογή της μη κλασικής βιοϊσοστερούς υποκατάστασης στα λιγότερο δραστικά έναντι της λιπιδικής υπεροξειδωσης ανάλογα **5** και **6** έχει ως αποτέλεσμα τα αντίστροφα αμίδια **17** και **15**, αντίστοιχα, τα οποία εμφανίζουν σαφώς βελτιωμένη δράση (αναστολή 88% σε συγκέντρωση 0.1mM).

Θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε, με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, ότι η θέση του αμιδικού καρβονυλίου παίζει σημαντικό ρόλο στην βιολογική δράση των μορίων, στις βιοδοκιμασίες που εφαρμόστηκαν. Εμφανώς μεγαλύτερη ικανότητα αναστολής της λιποξυγονάσης όσο και της λιπιδικής υπεροξειδωσης παρουσιάζουν οι ενώσεις στις οποίες το καρβονύλιο αναπτύσσει πιο ισχυρό δεσμό υδρογόνου με το υδροξύλιο του συστήματος της κινολινόνης (αμίδια της Σειράς A).



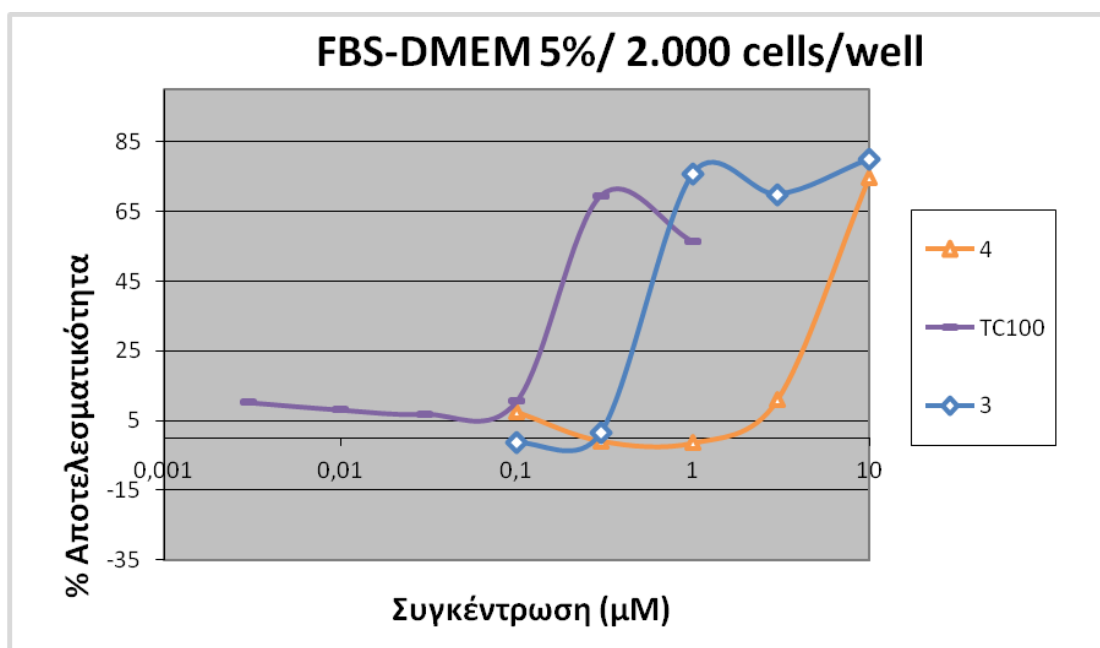
Η βιοϊσοστερής υποκατάσταση του αμιδικού δεσμού της θέσης 3 της κινολινόνης από αντίστροφο αμίδιο απομακρύνει το καρβονύλιο από το ενολικό υδροξύλιο της θέσης 4 ελαττώνοντας την ισχύ του δεσμού υδρογόνου και τροποποιώντας την ικανότητα του μορίου να συμπλέκει ιόντα Fe^{3+} . Με βάση προκαταρκτικά αποτελέσματα της μελέτης πρόσδεσης των μορίων (docking) στη λιποξυγονάση, που πραγματοποιείται σε συνεργασία με το Ινστιτούτο Μοριακής Ανάλυσης του ΕΙΕ, φαίνεται ότι η ικανότητα των ενώσεων αυτής της κατηγορίας να συμπλέκουν τα ιόντα Fe^{3+} στο ενεργό κέντρο της λιποξυγονάσης συμβάλλει στη δράση τους ως αναστολέων του ενζύμου.

*Μεταξύ όλων των μορίων που παρουσιάζονται στους παραπάνω πίνακες, η ένωση **4** παρουσιάζει τη καλύτερη συνδυασμένη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση, μπορεί λοιπόν να αποτελέσει το 'μόριο-οδηγό' για περαιτέρω μελέτη και έρευνα.*

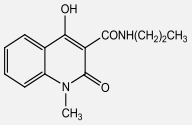
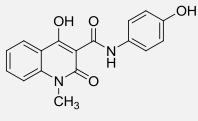
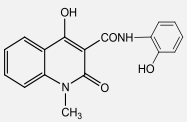
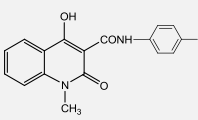
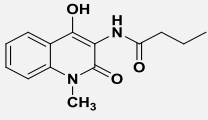
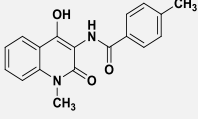
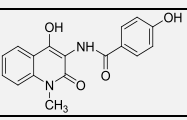
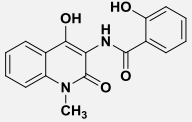
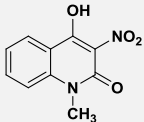
6.1 Προσδιορισμός της ικανότητας των νέων ενώσεων να προστατεύουν τα κύτταρα HT22 από το οξειδωτικό στρες

Στον Πίνακα 12 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της προστασίας των κυττάρων HT22 έναντι του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από το γλουταμικό για όσες ενώσεις της σειράς A και B μελετήθηκαν. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % βιωσιμότητα των κυττάρων HT22 παρουσία γλουταμικού και των υπό δοκιμή ενώσεων σε συγκέντρωση 10Μμ σε σχέση με τη βιωσιμότητα των κυττάρων απουσία γλουταμικού αλλά παρουσία των ενώσεων σε συγκέντρωση 10 μΜ. Για όσες ενώσεις δεν παρατηρήθηκε προστασία των κυττάρων έναντι του οξειδωτικού στρες, σημειώνεται ‘-’ στην αντίστοιχη στήλη.

Το παρακάτω διάγραμμα αποτελεσματικότητας (%)- συγκέντρωσης (μΜ) περιλαμβάνει τις καμπύλες των ενώσεων με την μεγαλύτερη ικανότητα προστασίας των HT22 κυττάρων από το οξειδωτικό στρες. Θα πρέπει να σημειωθεί πως οι συγκεκριμένες καμπύλες είναι ενδεικτικές από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν και οι τιμές αποτελεσματικότητας στα 10 μΜ δεν είναι οι ίδιες με τον παραπάνω πίνακα.



Πίνακας 12: Αποτελέσματα προστασίας των κυττάρων HT22 έναντι του οξειδωτικού στρες

Ένωση	Βιωσιμότητα των κυττάρων HT22
	% (της βιωσιμότητας απουσία γλουταμικού)
 <p style="text-align: center;">3</p>	50
 <p style="text-align: center;">4</p>	70
 <p style="text-align: center;">5</p>	–
 <p style="text-align: center;">6</p>	–
 <p style="text-align: center;">14</p>	–
 <p style="text-align: center;">15</p>	20
 <p style="text-align: center;">16</p>	–
 <p style="text-align: center;">17</p>	–
 <p style="text-align: center;">8</p>	–

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 12 και συνδυάζοντάς τα με τα δεδομένα των Πινάκων 10 και 11, μπορούμε να εξαγάγουμε τα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Η ένωση **4** η οποία συνδυάζει την υψηλότερη αναστολή του ενζύμου λιποξυγονάση ($IC_{50} = 0.0485 \mu M$) και την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση έναντι του DPPH και της λιπιδικής υπεροξειδωσης, παρουσιάζει επίσης και την ισχυρότερη προστασία των κυττάρων HT22 έναντι του οξειδωτικού στρες (αποτελεσματικότητα 70%). Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες που αναφέρουν πως οι ενώσεις που εμφανίζουν ικανότητα αναστολής της λιποξυγονάσης, παρέχουν και τη δυνατότητα προστασίας των κυττάρων HT22 από το οξειδωτικό στρες. [53, 54]. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι ο μηχανισμός προστασίας των κυττάρων HT22 από την ένωση **4** είναι συνδυασμός της ικανότητας αναστολής της λιποξυγονάσης και της αντιοξειδωτικής δράσης.
- Η ένωση **3** παρουσιάζει αποτελεσματικότητα 50% στην προστασία των κυττάρων HT22 έναντι του οξειδωτικού στρες, όπως επίσης και σημαντική ικανότητα αναστολής της λιποξυγονάσης ($IC_{50} = 60 \mu M$) και της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Επομένως είναι πιθανό ο μηχανισμός προστασίας των HT22 από το οξειδωτικό στρες από την ένωση **3** να είναι συνδυασμός της ικανότητας αναστολής της λιποξυγονάσης και της αντιοξειδωτικής δράσης και ειδικότερα της αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Αυτό ενισχύεται από την παρατήρηση ότι το αντίστροφο αμίδιο **14** το οποίο εμφανίζει χαμηλότερη αναστολή της λιποξυγονάσης ($IC_{50} = 81 \mu M$) και πολύ χαμηλότερη αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης σε σχέση με το αμίδιο **3** δε παρουσιάζει νευροπροστατευτική δράση.
- Το αμίδιο **6** δεν εμφανίζει προστατευτική δράση έναντι του οξειδωτικού στρες στα HT22 αν και παρουσιάζει ικανοποιητική αναστολή της λιποξυγονάσης ($IC_{50} = 45 \mu M$). Το συγκεκριμένο μόριο όμως δεν εμφανίζει αντιοξειδωτική δράση σε καμία από τις δυο δοκιμασίες που πραγματοποιήθηκαν (αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης 0%). Σε σχέση με το αμίδιο **6**, το αντίστροφο αμίδιο **15** εμφανίζει ελαττωμένη ικανότητα αναστολής της λιποξυγονάσης ($IC_{50} = 100 \mu M$) συνδυασμένη με σημαντική αντιοξειδωτική δράση (αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης 88%). Η ένωση **15** εμφανίζει επίσης αποτελεσματικότητα 20% στην προστασία των HT22 έναντι του οξειδωτικού στρες. Στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι πιθανό ο μηχανισμός δράσης να επηρεάζεται σε μεγαλύτερο βαθμό από την αντιοξειδωτική ικανότητα της ένωσης και σε μικρότερο από την ικανότητά της να αναστέλλει τη δράση της λιποξυγονάσης.

6.2 Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Τα ενδιαφέροντα συμπεράσματα που προκύπτουν από τη μελέτη της ικανότητας αναστολής της λιποξυγονάσης, της αντιοξειδωτικής και νευροπροστατευτικής δράσης των νέων αναλόγων των κινολινονών, καθιστούν ιδιαίτερα ελκυστικό το σχεδιασμό και τη σύνθεση νέων παραγώγων για μελλοντική έρευνα, με στόχο τη σύνθεση νέων υποκατεστημένων κινολινονών και τη περαιτέρω μελέτη της σχέσης βιολογικής δομής-δράσης.

I. Μελέτη δομικών τροποποιήσεων στους αρωματικούς δακτυλίους του συστήματος της κινολιμόνης

Το σύστημα συμπυκνωμένων δακτυλίων της κινολιμόνης ανήκει στην κατηγορία των 'προνομιούχων' δομών αφού προσφέρει μεγάλες δυνατότητες χημικών τροποποιήσεων, με αποτέλεσμα να είναι εφικτή η σύνθεση μεγάλου αριθμού αναλόγων ενώσεων ώστε να διευκολύνεται η μελέτη της σχέσης δομής-βιολογικής δράσης.

- a. Μια πιθανή δομική τροποποίηση είναι η προσθήκη διάφορων υποκαταστατών στους αρωματικούς δακτυλίους. Οι υποκαταστάτες μπορεί να επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τη διαμόρφωση των μορίων στο χώρο, την υδροφιλικότητα ή λιποφιλικότητα των μορίων.
- b. Διατηρώντας τη δομή της κινολιμόνης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία, θα μπορούσε να γίνει αλλαγή του υποκαταστάτη στο άτομο του αζώτου, όπως αντικατάσταση του μεθυλίου με υδρογόνο ή αλκυλο- ομάδες που φέρουν άτομα δότες ή δέκτες ηλεκτρονίων.

II. Μελέτη της επίδρασης του αριθμού και της θέσης των αρωματικών υδροξυλίων (-OH) του συστήματος της κινολιμόνης.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το μόριο με την μεγαλύτερη ικανότητα αναστολής της λιποξυγονάσης, την καλύτερη αντιοξειδωτική και νευροπροστατευτική δράση είναι εκείνο με το υδροξύλιο σε πάρα- θέση.

Θα μπορούσε λοιπόν να μελετηθεί κατά πόσο η προσθήκη και άλλων ομάδων υδροξυλίων επηρεάζει τη βιολογική δράση του μορίου και τη σχέση δομής- δράσης.

III. Μελέτη της σιδηροδεσμευτικής ικανότητας των μορίων

Όπως είδαμε και στο κεφάλαιο της βιολογικής μελέτης των νέων αναλόγων, ένας από τους τρόπους αναστολής της δράσης της λιποξυγονάσης είναι η δέσμευση του ατόμου του σιδήρου στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.

Επομένως, μια πρόταση για περαιτέρω έρευνα θα μπορούσε να είναι η μελέτη των παραπάνω μορίων ως προς τη σιδηροδεσμευτική τους ικανότητα και με βάση τα

αποτελέσματα αυτής της μελέτης ο σχεδιασμός νέων αναλόγων που να βελτιώνουν τη συγκεκριμένη ικανότητα.

IV. Προσδιορισμός των φαρμακοφόρων ομάδων που ευνοούν τη πρόσδεση των μορίων στη λιποξυγονάση

Με βάση πειράματα μελέτης πρόσδεσης των μορίων (docking) στη λιποξυγονάση, θα μπορούσαν να προσδιοριστούν οι φαρμακοφόρες ομάδες που ευνοούν τη πρόσδεση των μορίων στη λιποξυγονάση. Ο προσδιορισμός των φαρμακοφόρων ομάδων μπορεί να οδηγήσει στο σχεδιασμό νέων αναλόγων με πιθανώς βελτιωμένη δράση.

Βιβλιογραφία

1. R. Bhatia, V. Sharma, B. Shrivastava, R. K. Singla, A Review on Bioisosterism: A Rational Approach for Drug Design and Molecular Modification, *Pharmacologyonline* 1, **2011**, 272-299.
2. C. G. Wermuth, P. Ciapetti, B. Giethlen, P. Bazzini, Bioisosterism, *Elsevier*, **2007**, 650-703.
3. Barreiro, E. J. *Rev. Bras. Farm.*, **1991**, 72,34.
4. L.M Lima, E. J. Barreiro, Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design, *Current Medicinal Chemistry*, **2005**, 12, 23-49.
5. A. Burger, *Medicinal Chemistry*, 3rd Edition, NY, EUA, Wiley, **1970**, p.127.
6. N. A. Meanwell, Synopsis of Some Recent Tactical Application of Bioisosters in Drug Design, *J. Med. Chem.*, **2011**, 54, 2529-2591
7. G. A Patani, E. J. LaVoie, Bioisosterism: A Rational Approach in Drug Design, *Chem Rev*, **1996**, 96, 3147-3176.
8. **a)** S-L. Zhang, Z-S. Huang, Y-M. Li, A. S. C. Chan, L-Q. Gu, Synthesis of zwitterionic 4-hydroxy-2(1H)- quinolinone derivatives, *Tetrahedron*, **2008**, Vol.64, 4403- 4407 **(b)** B. Wolters, U. Eilert, *Planta Med.*, **1981**, 43, 166-174; **(c)** L. K. Basco, S. Mitaku, A.L Skaltsounis, N. Ravelomanantsoa, F. Tillequin, M. Koch, J. Le Bras, , *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, 38,1169-1171.
9. **a)** W. E. Campbell, B. Davidowitz ,G. E. Jackson, Quinolinone Alkaloids from an Agathosma Species, *Phytochemistry*, **1990**, Vol. 29, No 4, 1303-1306. **b)** W. E Campbell, K. P. Finch. P. A. Bean, N. Finkelstein, *Phytochemistry*, **1987**, Vol. 2, p 433
10. **a)** S-L. Zhang, Z-S. Huang, Y-M. Li, A. S. C. Chan, L-Q. Gu, Synthesis of zwitterionic 4-hydroxy-2(1H)- quinolinone derivatives, *Tetrahedron*, **2008**, Vol.64, 4403- 4407 : **b)** Theodoridis, G. U.S. Patent 4,909,829 (Cl. 71-29; A01N43/64); Appl.138,981, 1987: **c)** J. D Koruznjak ,A. Grdis ., M. Slade, N. Zamola, B. Pavelic ´, K. Karminski Zamola, *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 4516-4524 : **d)** R. J. DeVita, D. D. Holings, M. T. Goulet, M. J. Wyvratt, M. H. Fisher, J. L. Lo, Y. T. Yang, K. Cheng, R. G. Smith, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1999**, Vol. 9, 2615-2620
11. **a)** E.L. Ghisalberti. *Phytochemistry*,**1998**, 47, 163 : **b)** P.G. Waterman. *Biochem. Syst. Ecol.*,**1975**,Vol. 3, 149

12. **a)** C. Agier, M. Bury, J. Aquette, R. Hocquemiller, P. G. Waterman, New pseudan (2-alkyl-4(1H)-quinolinone) alkaloids from *Boronia ternata* var. *elongata* and *Boronia alulata* (Rutaceae), *Natural Product Research*, **2007**, Vol. 21, No 8, 698-703 : **b)** A.M. Duffield, P.R. Jefferies. *Aust. J. Chem.*, **1963**, Vol. 16, 292
13. **a)** J.P. Michael, Quinoline, quinazoline and acridone alkaloids, *Nat. Prod. Rep.*, **2008**, 25, 166–187 : **b)** D.Staerk, J.R. Kesting, M. Sairafianpour, M. Witt, J. Asili, S. A. Emami, J. W. Jaroszewski, Accelerated dereplication of crude extracts using HPLC–PDA–MS–SPE–NMR: Quinolinone alkaloids of *Haplophyllum acutifolium*, *Phytochemistry*, **2009**, Vol. 70, 1055–1061
14. **a)** S.S. Nazrullaev, I.A. Bessanova, Kh.S. Akhmedkhodzhaeva, Estrogenic activity as a function of chemical structure in *Haplophyllum* quinoline alkaloid, *Chem. Nat. Compd.*, **2001**, Vol. 37, 551–555 : **b)** D.Staerk, J.R. Kesting, M. Sairafianpour, M. Witt, J. Asili, S. A. Emami, J. W. Jaroszewski, Accelerated dereplication of crude extracts using HPLC–PDA–MS–SPE–NMR: Quinolinone alkaloids of *Haplophyllum acutifolium*, *Phytochemistry*, **2009**, Vol. 70, 1055–1061
15. **a)** D.Staerk, J.R. Kesting, M. Sairafianpour, M. Witt, J. Asili, S. A. Emami, J. W. Jaroszewski, Accelerated dereplication of crude extracts using HPLC–PDA–MS–SPE–NMR: Quinolinone alkaloids of *Haplophyllum acutifolium*, *Phytochemistry*, **2009**, Vol.70, 1055–1061 : **b)** S.S. Nazrullaev, I.A. Bessanova, Kh.S. Akhmedkhodzhaeva, Estrogenic activity as a function of chemical structure in *Haplophyllum* quinoline alkaloid, *Chem. Nat. Compd.*, **2001**, Vol. 37, 551–555 : **c)** C.L. Cantrell, K.K. Schrader, L.K. Mamonov, G.T. Sitpaeva, T.S. Kustova, C. Dunbar, D.E. Wedge, Isolation and identification of antifungal and antialgal alkaloids from *Haplophyllum sieversii*. *J. Agric. Food Chem*, **2005**, Vol. 53, 7741–7748 : **d)** M.J. Cheng, K.H. Lee, I.L. Tsai, I.S. Chen, Two new sesquiterpenoids and anti- HIV principles from the root bark of *Zanthoxylum ailanthoides*. *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, Vol. 13, 5915–5920 : **e)** F. Hanawa, N. Fokialakis, A. L. Skaltsounis, Photo-activated DNA binding and antimicrobial activities of furoquinoline and pyranoquinolonealkaloids from Rutaceae. *Planta Med.* **70**, **2004**, 531–535 : **f)** Michael, J.P., Quinoline, quinazoline and acridone alkaloids., *Nat. Prod. Rep.* **20**, **2003**, 476–493.
16. D.Staerk, J.R. Kesting, M. Sairafianpour, M. Witt, J. Asili, S. A. Emami, J. W. Jaroszewski, Accelerated dereplication of crude extracts using HPLC–PDA–MS–SPE–NMR: Quinolinone alkaloids of *Haplophyllum acutifolium*, *Phytochemistry*, **2009**, Vol. 70, 1055–1061
17. C. F. Providelo Sartor, M. Fatima das G.F. da Silva, J.B. Fernandes, P. C. Vieira, E. Rodrigues Fo, D. A. Garcia Cortez, Alkaloids from *Dictyoloma vandellianum*: their chemosystematic significance, *Phytochemistry*, **2003**, Vol. 63, 185-192.
18. X. Liu, F. Xu, C. Shao, Z. Shea, Y. C. Lin, W. L. Chan, Bioactive Metabolites from Marine Microorganisms, *Studies in Natural Products Chemistry, Elsevier*, **2008**, Vol. 35, 213-220

19. **a)** M. Abass, E. A. Mohamed, M. Mohamed Ismail, A. S. Mayas, Substituted quinolinones. Part 16. Preparation and reactions of 3-(4-hydroxy-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydroquinolin-3-yl)-3-oxopropanoic acid, *European Journal of Chemistry*, **2011**, Vol.3, 378-387 : **b)** M. Abass, B. B. Mostafa, *Bioorg. Med. Chem*, **2005**, 13, 6133-6144 : **c)** A.M. El-Shennawy, A. H. Mohamed, M. Abass, *Gen. Med. J.* **2007**, 9, 15-33. : **d)** A. Detsi, D. Bouloubasi, K. C. Prousis, M. Koufaki, G. Athanasellis, G. Melagraki, A. Afantidis, O. Igglesi- Markopoulou, C. Kontogiorgis, D. Hadjipavlou-Litina, *J. Med. Chem*, **2007**, 50, 2450-2458 : **e)** A. Rivkin, Y. R. Kim, M. T. Goulet, N. Bays, A. D. Hill, I. Kariv, S. Kraus, N. Ginanni, P. R. Strack, N. E. Kohl, C. C. Chung, J. P. Varnerin, P. N. Goudreau, A. Chang, M. R. Tota, B. Mumoz, *Bioorg. Med. Chem. Lett*, **2006**, 16, 4620-4623 : **f)** M. Tani, K. Harimaya, Y. Gyobu, T. Sasaki, O. Takenouchi, T. Kawamura, T. Kamimura, *T. J. Antibiot*, **2004**, 57, 89-96.
20. **a)** S. Chimichi, M. Boccalini, M. M. M. Hasan, G. Viola, F. D. Acqua, M. Curini, Synthesis, structural determination and photo-antiproliferate activity of new 3-pyrazolyl orisoxazolyl substituted 4-hydroxy-2 (1H)-quinolinones, *Tetrahedron*, **2006**, 62, 90-96 : **b)** A. Kreimeyer, B. Laube, M. Sturgess, M. Goeldner, *B. J. Med. Chem.* **1999**, 42, 4394-4404. : **c)** R. Fischer, A. Ullmann, C. Erdelen, K. H. Kuck, S. Hillebrand, A. Trautwein, J. Konze, U. Wachendoff-Neumann, WO Patent 2003010145, *Chem. Abstr.*, **2003**, 138, 153-447.
21. **a)** M. Abass, E. A. Mohamed, M. Mohamed Ismail, A. S. Mayas, Substituted quinolinones. Part 16. Preparation and reactions of 3-(4-hydroxy-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydroquinolin-3-yl)-3-oxopropanoic acid, *European Journal of Chemistry*, **2011**, Vol.3, 378-387 : **b)** F. J. Kammerer, U. Gebert, H. D. Alpermann, US Pat. 1981, US 04 258,046, *Chem Abstr*, **1982**, 95
22. S. Chimichi, M. Boccalini, M. M. M. Hasan, G. Viola, F. D. Acqua, M. Curini, Synthesis, structural determination and photo-antiproliferate activity of new 3-pyrazolyl orisoxazolyl substituted 4-hydroxy-2 (1H)-quinolinones, *Tetrahedron*, **2006**, 62, 90-96.
23. **a)** A. Dargue, A. Dumetre, S. Hutter, G. Casano, M. Robin, C. Pannecouque, N. Azas, Synthesis and biological evaluation of new heterocyclic quinolinones as anti-parasite and anti-HIV drug candidates, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **2009**, 19, 5962-5964. : **b)** R. S. McClelland, L. Sangare, W. M. Hassan, L. Lavreys, K. Mandaliya, J. Kiarie, J. Ndinya-Achola, W. Jaoko, J. Baeten, *M. J. Infect. Dis.*, **2007**, 195, 698.
24. **a)** A. Dargue, A. Dumetre, S. Hutter, G. Casano, M. Robin, C. Pannecouque, N. Azas, Synthesis and biological evaluation of new heterocyclic quinolinones as anti-parasite and anti-HIV drug candidates, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **2009**, 19, 5962-5964.
25. **a)** M. Abass, B. B. Mostafa, Synthesis and evaluation of molluscicidal and larvicidal activities of some novel enaminones derived from 4-hydroxyquinolinones, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2005**, 13, 6133-6144 : **b)** F. C. Abreu, F. S. Paula, A. F. Dos Santos, A. E. G. Santana, M. V. Almeida, E. T. Cesar, M. N. Trindade, M. O. F. Goulart, *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, 9, 659

26. **a)** M. Abass, B. B. Mostafa, Synthesis and evaluation of molluscicidal and larvicidal activities of some novel enamines derived from 4-hydroxyquinolinones, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2005**, 13, 6133-6144 : **b)** P. C. Vieira, I. Kubo, *Phytochemistry* 1990, 29, 813 : **c)** E. A. Mohamed, M. M. Ismail, Y. Gabr, M. Abass, *Chem. Pap.*, **1994**, 48, 285. : **d)** S. Perret, P. Whitfield, *J. Planta Med.*, **1995**, 61, 276.
27. **a)** D. H. Nam, K. S. Lee, S. H. Kim, S. M. Kim, S. Y. Jung, S. H. Chung, H. J. Kim, N. D. Kim, C. Jin, Y. S. Lee, Design and synthesis of 4-quinolinone 2-carboxamides as calpain inhibitors, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **2008**, Vol.18, 205-209 : **b)** H. Sorimachi, S. Ishiura, K. Suzuki, *Biochem. J.*, **1997**, 328, 721: **c)** C. G. Markgraf, N. L. Velayo, M. P. Johnson, D. R. McCarty, S. Medhi, J. R. Koehl, P. A. Chmielwski, M. Linnik, *Stroke*, **1998**, 29, 152 : **d)** B. Boland, V. Campbell, *Neurobiol. Aging*, **2003**, 24, 179
28. **a)** P. Hewawasam, W. Fan, J. Knipe, S. L. Moon, C. G. Boissard, V. K. Gribkoff, J. E. Starrett, The Synthesis and Structure-Activity Relationships of 4-Aryl-3-aminoquinolinil-2-ones: A new class of Calcium-Dependent, Large Conductance, Potassium (Maxi K) Channel Openers Targeted for Post-stroke Neuroprotection, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2002**, 12, 1779-1783 : **b)** D. W. Choi, *Trends Neurosci.*, **1995**, 18, 58 **c)** T. Kristian, B. K. Siesjo, *Stroke*, **1998**, 29, 705
29. **a)** P. Hewawasam, W. Fan, J. Knipe, S. L. Moon, C. G. Boissard, V. K. Gribkoff, J. E. Starrett, The Synthesis and Structure-Activity Relationships of 4-Aryl-3-aminoquinolinil-2-ones: A new class of Calcium-Dependent, Large Conductance, Potassium (Maxi K) Channel Openers Targeted for Post-stroke Neuroprotection, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2002**, 12, 1779-1783 : **b)** A. Butler, S. Tsunoda, D. P. McCobb, A. Wei, L. Salkoff, *Science*, **1993**, 261, 221. **c)** V. K. Gribkoff, J. T. Lum-Ragan, C. G. Boissard, D. J. Post- Munson, N. A. Meanwell, J. E. Starrett, E. S. Kozlowski, J. L. Romine, J. T. Trojnacki, M. C. McKay, J. Zhong, S. I. Dworetzky, *Mol. Pharmacol.*, **1996**, 50, 206.
30. A. Detsi, D. Bouloumbasi, K. C. Prousis, M. Koufaki, G. Athanasellis, G. Melagraki, A. Afantidis, O. Iglessi- Markopoulou, C. Kontogiorgis, D. J. Hadjipavlou-Litina, Design and Synthesis of novel Quinolinone -3-aminoamides and their α -Lipoic acid Adducts as Antioxidant and Antiflammatory Agents, *J. Med. Chem*, **2007**, 50, 2450-2458.
31. W-S. Hong, H-Y. Jung, S-K. Yang, S. J. Myung, J. H. Kim, Y. I. Min, M-H. Chung, H-S. Lee, H. W. Kim, *Pharmacological Research*, **2001**, Vol 44, No 4,
32. F. R. Calabri, V. Colotta, D. Catarzi, F. Varano, O. Lenzi, G. Filacchioni, C. Costagli, A. Galli, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2005**, Vol.40, 897-907.
33. G. M. Coppola, G. E. Hardtmann, O. R. Pfister, *J. Org. Chem*, **1976**, Vol. 41, No 5, 825-831.

34. A. Kamal, B. A. Kumar, M. Arifuddin, M. Patrick, *Ultrasonics Sonochemistry*, **2004**, Vol. 11, 455-457
35. P. Roschger, W. Fiala, W. Stadlbauer, *J. Heterocyclic Chem.*, **1992**, Vol.29, 225-231
36. N.Nishiwaki, Chemistry of nitroquinolinones and synthetic application to unnatural 1-methyl-2-quinolone derivatives, *Molecules*, **2010**, Vol.15, 5174-5195
37. O. A. Sofanova, I. Ya, O. I. Ageeva, V. I. Shredov, R. D. Syubaev, G. Ya Shvarts, . A. Silin, UDC 615.212.3:547.587.11.012.
38. J. McMurry, Οργανική Χημεία Τόμος ΙΙ, *Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης*, **2006**
39. Μ.Οξενκιουν-Πετροπουλου, Φασματομετρικές Μέθοδοι, *Εκδόσεις ΕΜΠ*, Αθήνα **2008**
40. Shridhar, D. R.; Sastry, C. V. Reddy; Mehrotra, A. K.; Rao, C. Seshagiri; Taneja, V. Anti-inflammatory agents. Part II. Synthesis and anti-inflammatory activity of 3,4-disubstituted 2-oxo-1,2-dihydroquinolines, *Indian Journal of Chemistry*, **1979**, 488-490;
41. P. Molyneux, The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarín J. Sci. Tech.*, **2004**, Vol. 26, 211-219
42. **a)** L. M. Magalhaes, M. A Segundo, S. Reis, J. L.F.C. Lima, *Analytica Chimica Acta*, **2008**, Vol. 613, 1-19 : **b)** M.C. Foti, C. Daquino, C. Geraci, *J. Org. Chem.*, **2004**, 2309 : **d)** L.M. Magalhaes, M.A. Segundo, C. Siquet, S. Reis, J.L.F.C., Lima, *Microchim. Acta*, **2007**, 113 : **e)** A. Stasko, V. Brezova, S. Biskupic, V. Misik, *Free Radic. Res.*, **2007**, 41,379.
43. **a)** L. M. Magalhaes, M. A Segundo, S. Reis, J. L.F.C. Lima, *Analytica Chimica Acta*, **2008**, Vol. 613, 1-19 : **b)** D.J. Huang, B.X. Ou, R.L. Prior, *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 1841.
44. K. Suzuki, M. Nakamura, Y. Hatanaka, Y. Kayanoki, H. Tatsumi, N. Taniguchi, *J. Biochem.*, **1997**, Vol. 122, 1260-1264
45. H. J. Forman, M. Torres, Redox signaling in macrophages, *Elsevier*, **2001**, Vol.22, 189-216

46. H. Yin, L. Xu, N. A. Porter, Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis, *Chem. Rev.*, **2011**, Vol. 111, 5944-5972.
47. D. Huang, B. Ou, R. L. Prior, The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays, *J. Agric. Food. Chem.*, **2005**, Vol.53, 1841-1856
48. J. Z. Haeggstrom, C. D. Funk, Lipoxygenase and Leukotriene Pathways: Biochemistry, Biology and Roles in Disease, *Chem. Rev.*, **2011**, Vol.111, 5866-5898
49. O. Werz, Inhibition of 5-lipoxygenase Product Synthesis by Natural Compounds of Plant Origin, *Planta Med.*, **2007**, Vol. 73, 1331-1357.
50. O. Werz, D. Steinhilber, Therapeutic options for 5-lipoxygenase inhibitors, *Pharmacology & Therapeutics*, **2006**, Vol. 112, 701-718
51. **a)**S. Pallast, K. Arai, X. Wang, E. H. Lo, K. van Leyen, 12/15- Lipoxygenase targets neuronal mitochondria under oxidative stress, *Journal of Neurochemistry*, **2009**, Vol. 111, 882-889 : **b)** M. Sahin , A. Saxena., P. Joost J. Lewerenz ,A. Methner , Induction of Bcl-2 by functional regulation of G-protein coupled receptors protects from oxidative glutamate toxicity by increasing glutathione. *Free Radic. Res.* ,**2006**, 40, 1113-1123.
52. **a)**S. Pallast, K. Arai, X. Wang, E. H. Lo, K. van Leyen, 12/15- Lipoxygenase targets neuronal mitochondria under oxidative stress, *Journal of Neurochemistry*, **2009**, Vol. 111, 882-889 : **b)**E. H. Lo., M. A. Moskowitz, T. P. Jacobs Exciting, radical, suicidal: how brain cells die after stroke., *Stroke*, **2005**, 36, 189-192.
53. **a)** P. A. Lapchak, P. Maher, D. Schubert, J. A. Zivin, Baicalein, an antioxidant 12/15-Lipoxygenase inhibitor improves clinical rating scores following multiple infarct embolic strokes, *Neuroscience*, **2007**, Vol. 150, 585-591 : **b)** K. van Leyen, H. Y. Kim, S. R. Lee,G. Jin ,K. Arai , E. H. Lo , Baicalein and 12/15-lipoxygenase in the ischemic brain., *Stroke* ,**2006**, 37,3014-3018.
54. **a)** P. A. Lapchak, P. Maher, D. Schubert, J. A. Zivin, Baicalein, an antioxidant 12/15-Lipoxygenase inhibitor improves clinical rating scores following multiple infarct embolic strokes, *Neuroscience*, **2007**, Vol. 150, 585-591 : **b)**Y. Li , P. Maher , D.

Schubert A role for 12-lipoxygenase in nerve cell death caused by glutathione depletion., *Neuron* , **1997**, Vol. 19, 453-463

55. C. Kontogiorgis, D. Hadjipavlou-Litina, *J.Enzyme Inhib.Med.Chem* **2003** 18, 63.

56. C. Liegeois , C. G. Lermusieau ,S. J. Collin ,*Agric. Food. Chem* **2000** 48 1129

57. G. P. Gasic, M. Hollmann, Molecular Neurobiology of glutamate receptors, *Annu. Rev. Physiol.* ,**1992**, Vol. 54, 507-536.

58. Y. Sagara, D. Schubert, The activation of metabotropic glutamate receptors protects nerve cells from oxidative stress, *The Journal of Neuroscience*, **1998**, Vol. 18, 6662-6671

59. P. Maher, J. B. Davis, The role of monoamine metabolism in oxidative glutamate toxicity, *J. Neurosc.*, **1996**, Vol. 16, 6394-6401

