

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ, ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ, ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ, ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ, ΓΕΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ

ΔΙΑΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΟΡΓΑΝΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΧΗΜΙΚΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΥΒΡΙΔΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΒΕΝΖΟΞΑΖΙΝΩΝ/ΑΚΥΛΟΫΔΡΑΖΟΝΩΝ ΜΕ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

ΙΩΑΝΝΗΣ ΧΡΙΣΤΟΠΟΥΛΟΣ ΧΗΜΙΚΟΣ

AOHNA

ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2013

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΥΒΡΙΔΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΒΕΝΖΟΞΑΖΙΝΩΝ/ΑΚΥΛΟΫΔΡΑΖΟΝΩΝ ΜΕ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ

ΙΩΑΝΝΗΣ ΧΡΙΣΤΟΠΟΥΛΟΣ

A.M.: 111505

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Δρ. Γεώργιος Κόκοτος, Καθηγητής, ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δρ. Γεώργιος Κόκοτος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Δρ. Θεοδώρα Καλογεροπούλου, Διευθύντρια Ερευνών, ΕΙΕ

Δρ. Θωμάς Μαυρομούστακος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2013

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε ο σχεδιασμός και η σύνθεση νέων υβριδικών ενώσεων 1,4-βενζοξαζινών/άκυλοϋδραζονών με αντιμικροβιακή και αντιμυκητιασική δράση. Η σύνθεση των τελικών προϊόντων πραγματοποιήθηκε με δύο μεθόδους, με όξινα καταλυόμενες συνθήκες σε θερμοκρασία δωματίου και με χρήση μικροκυμάτων.

Στην συνέχεια έγινε ταυτοποίηση των δυνατών ισομερών των υδραζονών λόγω διαμορφωμερών του αμιδικού δεσμού με τη συνδυασμένη χρήση ομοπυρηνικών και ετεροπυρηνικών πειραμάτων Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) μιας και δύο διαστάσεων (COSY, HSQC, HMBC). Δεν παρατηρήθηκαν γεωμετρικά ισομερή στα τελικά προϊόντα. Επίσης με χρήση δυναμικής φασματοσκοπίας ¹Η NMR μελετήθηκε η εναλλαγή των διαμορφωμερών σε θερμοκρασίες 25°C – 85°C (λήψη φάσματος ανά 10°C) και πραγματοποιήθηκε διαμορφωτική ανάλυση στο δραστικό ανάλογο 3,4-διϋδρο-2*H*-1,4-βενζοξαζινο-2-υδροξυ-φαινυλο-2-καρβο-υδραζόνη (**3**).

Η δράση των νέων ενώσεων αποτιμήθηκε έναντι gram θετικών και αρνητικών βακτηριδίων καθώς και διαφόρων παθογόνων μυκήτων. Η πλειοψηφία των νέων ενώσεων ήταν πιό δραστικές από τις αντίστοιχες ενώσεις αναφοράς. Η ένωση 3,4-διϋδρο-2*H*-1,4-βενζοξαζινο-2-υδροξυ-φαινυλο-2-καρβο-υδραζόνη (**3**) έδειξε την καλύτερη αντιβακτηριακή και αντιμυκητιασική δράση.

Επιπρόσθετα, μελετήθηκε ο μηχανισμός αντιμυκητιασικής δράσης μέσω πιθανής αλληλεπίδρασης με το κυτόχρωμαΡ450 (CYP51) για τον μύκητα *Candida albicans* με χρήση φωτομετρικής μεθόδου και φασματοσκοπίας NMR Διαφορικής Μεταφοράς Κορεσμού (Saturation Transfer Difference).

Τέλος, μελετήθηκε *in silico* η ικανότητα πρόσδεσης (docking) των δραστικών μορίων στο ενεργό κέντρο του ενζύμου με χρήση του προγράμματος Glide (SP) του λογισμικού πακέτου Schrödinger. Τα κριτήρια επιλογής ήταν η ενέργεια πρόσδεσης, η απόσταση του ετεροατόμου του αρωματικού δακτυλίου της ακυλοϋδραζόνης από το μεταλλοκατιόν του Fe²⁺, αλληλεπιδράσεις με αμινοξέα (AA) του ενεργού κέντρου καθώς σε σχέση με την ένωση αναφοράς κετοκοναζόλη.

3

- **ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ**: Μοριακή Μοντελοποίηση, Οργανική Σύνθεση και Φασματοσκοπία NMR
- ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Οργανική σύνθεση με μικροκύματα, ακυλοϋδραζόνες, 1,4βενζοξαζίνες, διαμορφωτική ανάλυση, φασματοσκοπία NMR δύο διαστάσεων (2D NMR), STD NMR, μοριακή πρόσδεση, αντιμικροβιακή δράση

ABSTRACT

The present thesis involves the design and synthesis of new 1,4-benzoxazine/acyl hydrazone hybrids with antibacterial and antifungal activity. The preparation of the final products was performed by two methods, a) using acid catalysis at room temperature and b) using microwave-assisted synthesis.

Subsequently, we performed the identification of all possible isomers of the new compounds due to the different conformations of the amide bond, using 1D and 2D Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy (COSY, HSQC, HMBC). Geometrical isomers of the final products were not observed. In addition, dynamic ¹H NMR spectroscopy, was employed to study the conformer interchange and/or to determine the coalescence of duplicated signals using a temperature range of 25 °C – 85 °C (spectra were collected every 10 °C). Furthermore, conformational analysis of the active analog 3,4-dihydro-2*H*-1,4-benzoxazine-2-hydroxy-phenyl-2-carbo-hydrazone (**3**) was performed in support to NMR NOE data.

The antimicrobial activity of the new compounds was evaluated against gram positive and negative bacteria and various pathogenic fungal strains. The majority of new compounds were more active than the corresponding reference compounds with 3,4-dihydro-2*H*-1,4-benzoxazine-2-hydroxy-phenyl-2-carbo-hydrazone (**3**) being the most active.

To get an insight on the mechanism of action of the new compounds we investigated their interaction with cytochrome P450 (CYP51) of *Candida albicans* using a spectrophotometric method and Saturation Transfer Difference NMR (STD NMR).

Finally, *in silico* docking studies of the new compounds were performed at the active site of the enzyme, using the software package Glide SP of Schrödinger. The criteria for selection was the binding energy, the distance of the heteroatom of the acyl hydrazone aromatic ring from the Fe²⁺ cation, interactions with active site amino acids (AA) in comparison to the reference compound ketoconazole.

SUBJECT AREA: Molecular Modeling, Organic Synthesis and NMR Spectroscopy

KEYWORDS: Microwave-assisted synthesis, acyl hydrazones, 1,4-benzoxazines, conformational analysis, molecular docking, two-dimensional NMR Spectroscopy (2D NMR), STD NMR, antimicrobial activity

ΑΦΙΕΡΩΜΕΝΟ

ΣΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΚΑΙ ΤΟΝ ΑΔΕΡΦΟ ΜΟΥ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας ερευνητικής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Διευθύντρια Ερευνών του Τμήματος Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας, του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών και μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής Δρ Θεοδώρα Καλογεροπούλου για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, για τη συνεργασία της και την επιστημονική καθοδήγηση για την ολοκλήρωση της.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ερευνητή Γ΄ Δρ Παναγιώτη Ζουμπουλάκη για την καθοδήγησή του στις μελέτες μοριακής πρόσδεσης, διαμορφωτικής ανάλυσης και συνεισφορά στην ανάλυση των φασματοσκοπικών δεδομένων Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού. Θα ήθελα επίσης να τον ευχαριστήσω για τη βοήθεια του και τις παρατηρήσεις του σε όλη τη διάρκεια των σπουδών και για την εισήγησή του να διεκπεραιώσω την μεταπτυχιακή μου εργασία στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον Δρ Κυριάκο Προυσή για την αμέριστη βοήθεια του σε όλα τα θέματα και δυσκολίες που προέκυψαν κατά τη διάρκεια της εργασίας μου, την υπομονή του και τις πολύτιμες συμβουλές.

Επίσης, ευχαριστώ τον Καθηγητή κ. Γεώργιο Κόκοτο, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, Καθηγητή κ. Θωμά Μαυρομούστακο, και τη Διευθύντρια Ερευνών κ. Καλογεροπούλου Θεοδώρα.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους Ερευνήτρια Β΄ Δρ Μαρία Ζερβού, τον Δρ Κωνσταντίνο Ποταμίτη, MSc Ευτυχία Κρίτση, MSc Κατερίνα Κόκκοτου, MSc Ελένη Σιάπη τόσο για την επιστημονική τους βοήθεια όσο και για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας που δημιούργησαν στο εργαστήριο Μοριακής Ανάλυσης του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

Επίσης, ευχαριστώ όλα τα μέλη της ομάδας Φαρμακευτικής Χημείας του ΙΒΦΧΒ για τη βοήθειά τους και το κλίμα συνεργασίας καθώς επίσης και τη γραμματέα του Ινστιτούτου Φωτεινή Καλατζή.

Τέλος, τις θερμότερες ευχαριστίες και την πιο βαθιά ευγνωμοσύνη μου αξίζει η οικογένεια μου, που με κάθε τρόπο ηθικό, υλικό, συναισθηματικό με βοηθάει όλα αυτά τα χρόνια, προκειμένου να επιτύχω κάθε φορά το στόχο μου, και χωρίς την ύπαρξη της και την εμψύχωση της οποίας δε θα είχα φτάσει έως εδώ.

8

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΑΤΑΛ	ΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ12
ΚΑΤΑΛ	ΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ18
ΠΡΟΛΟ	ΓΟΣ20
ΚΕΦΑΛ	AIO 121
1.1	Εισαγωγή στα μικρόβια21
1.2	ΟΙ μυκητιασικές λοιμώξεις22
1.2.	1 Παθογόνα-Κλινικές εκδηλώσεις22
1.3	Candida albicans23
1.4	Παθογένεια και κλινικές δοκιμές24
1.5	Aspergillus fumigatus25
1.6	Κλινικά συμπτώματα και διάγνωση αναπνευστικής ασπεργίλωσης26
ΚΕΦΑΛ	AIO 227
2.1	Αντιμυκητιακά φάρμακα27
2.1.	1 Φάρμακα για επιφανειακές μυκητιάσεις27
2.1.	2 Φάρμακα για υποδόριες και συστηματικές μυκητιάσεις
2.2	Γενικά για τις αζόλες30
2.2.	1 Φλουκοναζόλη31
2.2.	2 Ιτρακοναζόλη και Βορικοναζόλη32
2.3	Κριτήρια για την επιλογή αντιμυκητιασικού φαρμάκου33
Σκοπός	της Ερευνητικής Εργασίας35
ΚΕΦΑΛ	AIO 3
3.1	Σχεδιασμός νέων υβριδικών ενώσεων 1,4-Βενζοξαζινών/ακυλοϋδραζονών36
3.1.	1 Γενικά για τις βενζοξαζίνες36
3.1.	2 Μέθοδοι σύνθεσης βενζοξαζινών37

3.	1.3 Εύρος βιολογικής δράσης βενζοξαζινών38
3.	1.4 Βιολογική δράση ακυλοϋδραζονών39
3.2	Δομές νέων αναλόγων της ερευνητικής εργασίας42
КЕФА	AAIO 4
4.1	Σύνθεση νέων 1,4-Βενζοξαζινικών αναλόγων43
КЕФА	AAIO 5
5.1	Εισαγωγή52
5.2	Αποτίμηση κορυφών των τελικών ακυλοϋδραζονών
5.3	Διαμορφωτική ανάλυση της ένωσης 377
5.4 2-ко	Διαμορφωτική ανάλυση της 3,4-διϋδρο-2 <i>Η</i> -1,4-βενζοξαζινο-2-υδροξυ-φαινυλο- αρβο-υδραζόνης (3) με τη μέθοδο της Τυχαίας Αναζήτησης
5.5 Ανα	Διαμορφωτική ανάλυση της ένωσης 3 με τη μέθοδο της Συστηματικής ζήτησης81
5.6	Σύγκριση αναλογίας διαμορφωμερών της ένωσης 3 σε διαφορετικούς διαλύτες 85
КЕФА	AAIO 6
6.1	Αντιβακτηριακή δράση87
6.2	Αποτίμηση αντιμυκητιασικής δράσης92
6.3	Αντιμυκητιασική δραστικότητα σε μύκητες του γένους <i>Candida</i> 96
КЕФА	AAIO 7100
7.1	Εισαγωγή: Ένζυμο CYP51100
7.2	Μέτρηση της ικανότητας πρόσδεσης των νέων ενώσεων στο ένζυμο CYP51101
7.3	NMR Διαφορικής Μεταφοράς Κορεσμού (Saturation-Transfer-Difference-STD) 105
ΚΕΦΑ	AAIO 8
8.1	Εισαγωγή στη Μοριακή Πρόσδεση109

8.2	In silico μελέτη της ικανότητας πρόσδεσης (docking) βιοδραστικών μορίων στο			
ενεργ	γό κέντρο του ενζύμου CYP51110			
8.3	Πειράματα Μοριακής Πρόσδεσης112			
8.4	Αποτελέσματα μελετών μοριακής πρόσδεσης113			
КЕФА	AAIO 9117			
9.1	Όργανα – Διαλύτες – Αντιδραστήρια117			
9.2 συνθ	Σύνθεση των ακυλοϋδραζονών 3, 6, 7, 8, 9, 10, 13 με όξινα καταλυόμενες ήκες			
9.3	Σύνθεση με χρήση μικροκυμάτων των ακυλοϋδραζονών 3-14124			
ΣΥΜΠΕ	ΕΡΑΣΜΑΤΑ148			
ΠΑΡΑΙ	РТНМА І149			
ΑΝΑΦΟΡΕΣ				

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1: Candida Albicans24
Εικόνα 1.2: Aspergillus fumigatus26
Εικόνα 2.1: Χημικές δομές ιμιδαζολών και τριαζολών
Εικόνα 3.1: Γενικός τύπος νέων υβριδικών ενώσεων βενζοξαζινών/ακυλοϋδραζονών
Εικόνα 3.2: Χημική δομή των ενώσεων 2Η-1,4-βενζοξαζιν-3(4Η)-όνης και 3,4-διϋδρο- 2Η-1,4-βενζοξαζίνη
Εικόνα 3.3: Σύνθεση της 3,4-διϋδρο-3-οξο-2 <i>Η</i> -1,4-βενζοξαζίνης με πρόδρομη ένωση την 2-αμινοφαινόλη ή τη 2-νιτροφαινόλη
Εικόνα 3.4: Παράγωγα της 5,7,8-τριμεθυλο-1,4-βενζοξαζίνης με υποκατάσταση στη C6
θέση38
Εικόνα 3.5: 5,7,8-Τριμεθυλο-1,4-βενζοξαζινικά αμινοαμίδια
Εικόνα 3.6: Ν-ακυλοϋδραζόνες με αναλγητική και αντι-φλεγμονώδη δράση40
Εικόνα 3.7: Υδραζόνες με αντικαρκινική δράση40
Εικόνα 3.8: Παράγωγα ακυλοϋδραζονών με αντιθρομβωτική δράση41
Εικόνα 3.9: Υδραζονικά παράγωγα με αντιμικροβιακή / μυκητοκτόνο δράση41
Εικόνα 3.10: Υδραζονικά παράγωγα με αντιβακτηριακή δράση41
Εικόνα 3.11: Χημικές δομές των νέων ενώσεων που συντέθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας42
Εικόνα 4.1: Συνθετική πορεία για την παρασκευή των ακυλοϋδραζονών 3-1445
Εικόνα 4.2: Μηχανισμός σύνθεσης του εστέρα 148
Εικόνα 4.3: Μηχανισμός σύνθεσης του άκυλο υδραζιδίου 249
Εικόνα 4.4: Μηχανισμός σύνθεσης τελικών ακυλοϋδραζονών με όξινα καταλυόμενες συνθήκες
Εικόνα 4.5: Μηχανισμός σύνθεσης τελικών ακυλοϋδραζονών με την επίδραση μικροκυμάτων 3-14

Εικόνα 5.1: Γενική δομή και διαμόρφωση του αμιδικού δεσμού των (<i>E</i>) ακυλοϋδραζονών
Εικόνα 5.2: Φασματοσκοπική περιοχή (4.5 – 12.0 ppm) ¹ Η (300 MHz) σε θερμοκρασίες 25°C - 85 °C
Εικόνα 5.3: Πιθανά διαμορφωμερή και γεωμετρικά ισομερή της ένωσης 1456
Εικόνα 5.4: Φάσμα ¹ Η NMR της ένωσης 14 σε DMSO-d657
Εικόνα 5.5: Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 14 σε DMSO-d658
Εικόνα 5.6: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης 14 σε DMSO-d6. Μεγεθυμένη η αρωματική περιοχή (δεξιά)
Εικόνα 5.7: Ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης 14 σε DMSO-d661
Εικόνα 5.8: Ετεροπυρηνικό φάσμα ΗΜΒC της ένωσης 14 σε DMSO-d663
Εικόνα 5.9: Φάσμα ¹ Η NMR της ένωσης 3 σε DMSO-d6. Μεγεθυμένη η περιοχή των πρωτονίων Η10 και Η8 (δεξιά)66
Εικόνα 5.10: Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 3 σε DMSO-d667
Εικόνα 5.11: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης 3 σε DMSO-d6. Μεγεθυμένη περιοχή μεθυλενικών πρωτωνίων (δεξιά)71
Εικόνα 5.12: Ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης 3 σε DMSO-d673
Εικόνα 5.13: Ετεροπυρηνικό φάσμα ΗΜΒC της ένωσης 3 σε DMSO-d675
Εικόνα 5.14: Διαγραμματική αναπαράσταση της πορείας που ακολουθήθηκε για τη διαμορφωτική ανάλυση του μελετώμενου μορίου
Εικόνα 5.15: Φάσμα 2D NOESY της ένωσης 3 σε DMSO-d6, στους 25 °C, σε φασματογράφο Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) 600 MHz80
Εικόνα 5.16: Τριδιάστατη απεικόνιση (3D) των εναντιομερών της ένωσης 3, όπως προέκυψαν από την τυχαία αναζήτηση με βάση τα δεδομένα από φασματοσκοπία 2D NOESY-NMR. Αριστερά απεικονίζεται το (<i>R</i>) και δεξιά το (<i>S</i>) εναντιομερές80
Εικόνα 5.17: Ενεργειακό διάγραμμα και διαμορφώσεις στα δύο ενεργειακά ελάχιστα για

την τ₁ δίεδρη γωνία της διαμόρφωσης (*R*).....82

Εικόνα 5.18: Ενεργειακό διάγραμμα και διαμορφώσεις στα δύο ενεργειακά ελάχιστα για την τ ₁ δίεδρη γωνία της διαμόρφωσης (<i>S</i>)82
Εικόνα 5.19: (1) αρχική διαμόρφωση, (2) διαμόρφωση στο ενεργειακό ελάχιστο για την R διαμόρφωση στη τ ₁ δίεδρη83
Εικόνα 5.20: (1) αρχική διαμόρφωση, (2) διαμόρφωση στο ενεργειακό ελάχιστο για την S διαμόρφωση στη τ ₁ δίεδρη84
Εικόνα 5.21: Φάσμα ¹ Η NMR της ένωσης 3 σε DMSO-d685
Εικόνα 5.22: Φάσμα ¹ Η NMR της ένωσης 3 σε χλωροφόρμιο85
Εικόνα 5.23: Φάσμα ¹ Η NMR της ένωσης 3 σε ακετόνη86
Εικόνα 7.1: α) Λανοστερόλη, β) Εργοστερόλη, γ) Χοληστερόλη
Εικόνα 7.2: Σύμπλοκο αναστολέα με το σίδηρο101
Εικόνα 7.3: Φασματοσκοπική απόκριση Τύπου ΙΙ του απομονωμένου CaCYP51 (1 μΜ) στην ένωση 12 (10-600 μΜ). Ως ένθετη εμφανίζεται η καμπύλη τιτλοδότησης (ΔΑ = ΔΑ ₄₂₈₋₄₁₁)
Εικόνα 7.4: Απεικόνιση της φασματοσκοπικής τεχνικής STD-NMR105
Εικόνα 7.5: α) Φάσμα ¹ Η NMR, β) Κορεσμός σημάτων πρωτεΐνης, γ) STD-NMR 106
Εικόνα 7.6: Φάσμα ¹ Η NMR της ένωσης 12 σε DMSO-d6107
Εικόνα 7.7: STD-NMR της ένωσης 12 σε DMSO-d6 παρουσία του ενζύμου CaCYP51
Εικόνα 8.1: Τριδιάστατη δομή του ενζύμου CYP51 από το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης στο οποίο έχει βασιστεί η δομή του ομόλογου μοντέλου από τον <i>Candida</i> albicans
Εικόνα 8.2: Τριδιάστατη δομη του ενζύμου CYP51 από Candida albicans που χρησιμοποιήθηκε για τις μελέτες πρόσδεσης. Στο ενεργό κέντρο φαίνεται ο πορφυρινικός δακτύλιος της αίμης

Εικόνα 8.3: Ενώσεις που μελετήθηκαν για την ικανότητα πρόσδεσης τους112

Εικόνα 8.4: Διαγράμματα αλληλεπιδράσεων μοριακής πρόσδεσης: (Ι) εναντιομερές (R)trans the two 3, (II) evantion β (R)-trans the two 11, (III) evantion β (S)trans the twooner 11, (IV) evantious (R)-cis the twooner 12, (V) evantious (S)*trans* της ένωσης **12**115 Εικόνα 8.5: Θέση του μορίου της 3,4-διϋδρο-2Η-1,4-βενζοξαζίνο-4-πυριδινο-2-καρβουδραζόνης (12) στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα......116 Εικόνα Π.1: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 1 σε DMSO......149 Εικόνα Π.3: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης **4** σε DMSO-d6......150 Εικόνα Π.4: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης **4** σε DMSO-d6......150 Εικόνα Π.5: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης 4 σε DMSO-d6......151 Εικόνα Π.6: Ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης 4 σε DMSO-d6......151 Εικόνα Π.7: Ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC της ένωσης 4 σε DMSO-d6......152 **Εικόνα Π.8:** Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης **5** σε DMSO-d6......152 Εικόνα Π.9: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης **5** σε DMSO-d6......153 Εικόνα Π.10: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης 5 σε DMSO-d6......153 Εικόνα Π.11: Ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC της ένωσης 5 σε DMSO-d6......154 Εικόνα Π.12: Ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης 5 σε DMSO-d6......154 **Εικόνα Π.13:** Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης **6** σε DMSO-d6......155 **Εικόνα Π.14:** Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης **6** σε DMSO-d6......155 Εικόνα Π.15: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης 6 σε DMSO-d6......156 Εικόνα Π.16: Ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης 6 σε DMSO-d6......156 Εικόνα Π.17: Ετεροπυρηνικό φάσμα ΗΜΒC της ένωσης 6 σε DMSO-d6......157 **Εικόνα Π.18:** Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης **7** σε DMSO-d6......157 Εικόνα Π.19: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης 7 σε DMSO-d6......158 Εικόνα Π.20: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης 7 σε DMSO-d6......158 Εικόνα Π.21: Ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης 7 σε DMSO-d6......159

Εικόνα Π.22: Ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC της ένωσης 7 σε DMSO-d6......159 **Εικόνα Π.23:** Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης **8** σε DMSO-d6......160 Εικόνα Π.24: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης **8** σε DMSO-d6......160 Εικόνα Π.25: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης 8 σε DMSO-d6......161 Εικόνα Π.26: Ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης 8 σε DMSO-d6......161 Εικόνα Π.27: Ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC της ένωσης 8 σε DMSO-d6......162 **Εικόνα Π.28:** Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης **9** σε DMSO-d6......162 **Εικόνα Π.29:** Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης **9** σε DMSO-d6......163 Εικόνα Π.30: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης 9 σε DMSO-d6......163 Εικόνα Π.31: Ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης 9 σε DMSO-d6......164 Εικόνα Π.32: Ετεροπυρηνικό φάσμα ΗΜΒC της ένωσης 9 σε DMSO-d6......164 **Εικόνα Π.33:** Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης **10** σε DMSO-d6......165 Εικόνα Π.35: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης 10 σε DMSO-d6......166 Εικόνα Π.36: Ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης 10 σε DMSO-d6......166 Εικόνα Π.37: Ετεροπυρηνικό φάσμα ΗΜΒC της ένωσης 10 σε DMSO-d6......167 **Εικόνα Π.38:** Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης **11** σε DMSO-d6......167 **Εικόνα Π.39:** Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης **11** σε DMSO-d6......168 Εικόνα Π.40: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης 11 σε DMSO-d6......168 Εικόνα Π.41: Ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης 11 σε DMSO-d6......169 Εικόνα Π.42: Ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC της ένωσης 11 σε DMSO-d6......169 **Εικόνα Π.43:** Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης **12** σε DMSO-d6......170 Εικόνα Π.44: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης **12** σε DMSO-d6......170 Εικόνα Π.45: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης 12 σε DMSO-d6......171 Εικόνα Π.46: Ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης 12 σε DMSO-d6......171 Εικόνα Π.47: Ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC της ένωσης 12 σε DMSO-d6......172

Εικόνα Π.48: Φάσμα ¹ Η NMR της ένωσης 13 σε DMSO-d6	.172
Εικόνα Π.49: Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 13 σε DMSO-d6	.173
Εικόνα Π.50: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης 13 σε DMSO-d6	.173
Εικόνα Π.51: Ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης 13 σε DMSO-d6	.174
Εικόνα Π.52: Ετεροπυρηνικό φάσμα ΗΜΒC της ένωσης 13 σε DMSO-d6	.174

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 2.1: Αντιμυκητιασικά φάρμακα34
Πίνακας 4.1: Χημικές δομές τελικών προϊόντων46
Πίνακας 4.2: Σύγκριση αποδόσεων των συνθετικών μεθόδων Α και Β47
Πίνακας 5.1: Αλληλεπιδράσεις γειτονικών πρωτονίων της ένωσης 1458
Πίνακας 5.2: Αλληλεπιδράσεις πρωτονίων με άμεσα συνδεδεμένους άνθρακες της ένωσης 14
Πίνακας 5.3: Αλληλεπιδράσεις πρωτονίων και γειτονικών ατόμων άνθρακα της ένωσης 1462
Πίνακας 5.4: Χημικές μετατοπίσεις υδρογόνων και ανθράκων της ένωσης 1464
Πίνακας 5.5: Αλληλεπιδράσεις γειτονικών πρωτονίων της ένωσης 370
Πίνακας 5.6: Αλληλεπιδράσεις πρωτονίων με άμεσα συνδεδεμένους άνθρακες της ένωσης 3
Πίνακας 5.7: Αλληλεπιδράσεις πρωτονίων και γειτονικών ατόμων της ένωσης 3 74
Πίνακας 5.8: Χημικές μετατοπίσεις υδρογόνων και ανθράκων της ένωσης 376
Πίνακας 5.9: Αποτελέσματα που προέκυψαν από την περιστροφή της δίεδρης γωνίας τ1
Πίνακας 5.10: Ποσοστό trans διαμορφωμερούς σε διαφορετικούς διαλύτες86
Πίνακας 6.1: Αντιβακτηριακή δράση των νέων ενώσεων
Πίνακας 6.2: Αντιμυκητιασική δραστικότητα των νέων ενώσεων σε μύκητες του γένους Aspergillus
Πίνακας 6.3: Αντιμυκητιασική δράση των ενώσεων 3-13 έναντι μυκήτων του γένους Candida
Πίνακας 7.1: Προσδιορισμός φαινόμενης σταθεράς διάστασης (<i>K</i> _d) για το ένζυμο CYP51 από <i>Candida</i> albicans103
Πίνακας 7.2: Προσδιορισμός φαινόμενης σταθεράς διάστασης (<i>K</i> _d) για το ένζυμο CYP51 βοδιού

Πίνακας	7.3:	Προσδιορισμός	φαινόμενης	σταθεράς	διάστασης	(K_d)	για	то	ένζυμο
CYP251 (από ά	νθρωπο							104
Πίνακας 8.1: Αποτελέσματα (Standard Precision-SP Docking)113									

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Οργανική Σύνθεση και Εφαρμογές στη Χημική Βιομηχανία» που οργανώνει το Τμήμα Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο Τμήμα Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών τα ακαδημαϊκά έτη 2011-2013.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Εισαγωγή στα μικρόβια

Ο όρος "μικρόβιο" ή "μικροοργανισμός" αφορά σε ένα σύνολο έμβιων όντων από διάφορες ταξονομικές ομάδες με ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά. Οι μικροοργανισμοί είναι αόρατοι με γυμνό οφθαλμό, με μικροσκοπικές διαστάσεις μεγαλύτερες από τη διακριτική ικανότητα του μικροσκοπίου. Γενικά, πρόκειται για μονοκύτταρους ή κοινοκυτταρικούς οργανισμούς χωρίς εγκάρσια τοιχώματα ή και πολυκυτταρικούς χωρίς όμως διαφοροποίηση των κυττάρων για σχηματισμό οργάνων ή ιστών. Τα μικρόβια περιλαμβάνουν τα βακτήρια, τους μύκητες και τα πρωτόζωα.

Τα βακτήρια είναι μικροσκοπικοί μονοκύτταροι οργανισμοί, που πολλαπλασιάζονται με διαίρεση. Είναι ετερότροφοι, αγενείς, χωρίς διακριτό κυτταρικό πυρήνα, χωρίς χλωροφύλλη και με σφαιρικό (κοκώδες), ραβδόμορφο ή σπειροειδές σχήμα. Τα βακτήρια, ανάλογα με τη χρώση τους κατά Gram, διακρίνονται σε θετικά (+), αν η τελική χρώση τους είναι κυανοϊώδης, και σε αρνητικά (-) αν είναι κόκκινη. Η χρώση κατά Gram εξαρτάται από τη σύσταση και τη στρωμάτωση του βακτηριακού τοιχώματος και είναι θεμελιακή ιδιότητα που συνδέεται με διαφορετική συμπεριφορά όσον αφορά την παθογένεια, την αντοχή στα αντιβιοτικά και άλλους παράγοντες.

Οι συχνότερα απαντώμενες κατηγορίες μυκήτων είναι οι ζυμομύκητες και οι ευρωτομύκητες (μούχλες). Οι ζυμομύκητες εμφανίζουν ελλειψοειδείς, σφαιρικούς ή ραβδόμορφους σχηματισμούς. Το μέγεθός τους κυμαίνεται από 2-6 μm, ενώ ο πολλαπλασιασμός τους γίνεται με εκβλάστηση, διχοτόμηση (σχιζομύκητες) ή σπορογονία (δυσμενείς συνθήκες). Επίσης οι ζυμομύκητες έχουν τα εξής χαρακτηριστικά: είναι αερόβιοι, ανθεκτικοί σε χαμηλό pH, ευαίσθητοι στη θερμοκρασία και προκαλούν αλλοιώσεις, αλλά όχι παθογένειες. Η δεύτερη κατηγορία μυκήτων είναι οι ευρωτομύκητες, οι οποίοι είναι πολυκύτταροι μικροοργανισμοί νηματοειδούς μορφής και έχουν τα ίδια χαρακτηριστικά με τους ζυμομύκητες [1].

1.2 ΟΙ μυκητιασικές λοιμώξεις

Η συχνότητα των μυκητιασικών λοιμώξεων, ιδιαίτερα των συστηματικών, έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια, με αποτέλεσμα η έγκαιρη διάγνωση να είναι καθοριστική στην πρώιμη έναρξη της κατάλληλης αντιμυκητιασικής αγωγής και κατ' επέκταση, για την τελική έκβαση της νόσου. Δυστυχώς, μεγάλο εμπόδιο στην επιτυχή θεραπεία των λοιμώξεων αυτών αποτελεί η έλλειψη διαγνωστικών μεθόδων. ευαίσθητων και ειδικών Or παραδοσιακές μικροβιολογικές, ιστολογικές και απεικονιστικές μέθοδοι, αν και αποτελούν τον ακρογωνιαίο λίθο στη διάγνωση, δεν είναι επαρκώς ευαίσθητες και ειδικές, με αποτέλεσμα η συμβολή τους στη θεραπευτική αντιμετώπιση του ασθενούς να είναι περιορισμένης αξίας. Οι ορολογικές δοκιμασίες για την ανίχνευση κυκλοφορούντων μυκητιασικών αντιγόνων και οι μοριακές τεχνικές ανίχνευσης του γενετικού υλικού του μύκητα, προσφέρουν επιπλέον πληροφόρηση και «ενίστε» αποτελούν τα μοναδικά μέσα διάγνωσης [2].

Οι συστηματικές μυκητιασικές λοιμώξεις αποτελούν σημαντική αιτία νοσηρότητας και θνητότητας σε αιματολογικούς και μεταμοσχευμένους ασθενείς [4-7]. Σε ορισμένες περιπτώσεις η αντιμετώπιση με αντιβιοτικά είναι ικανοποιητική. Ωστόσο η αυξανόμενη ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών στα χρησιμοποιούμενα φάρμακα καθιστά αναγκαία τη συνέχιση της έρευνας για την ανακάλυψη νέων αντιμικροβιακών ουσιών [3].

1.2.1 Παθογόνα-Κλινικές εκδηλώσεις

Την τελευταία δεκαετία έχουν παρατηρηθεί αλλαγές στην επιδημιολογία των συστηματικών μυκητιάσεων. Τα είδη Candida, Aspergillus και Cryptococcus, εξακολουθούν να απομονώνονται συχνότερα, ενώ παρατηρείται αύξηση λοιμώξεων από είδη Mucor, Fusarium, Scedosporium καθώς και άλλους σπανιότερους υαλοϋφομύκητες και φαιοϋφομύκητες [4-7]. Ο Aspergillus fumigatus είναι από τους πλέον απειλητικούς μύκητες για τους ανοσοκατασταλμένους ασθενείς. Λιγότερο συχνά ενοχοποιούνται οι *A. flavus, A. terreus* και *A. niger*, ενώ αυξάνονται οι συστηματικές μυκητιάσεις από στελέχη Aspergillus ανθεκτικά στην αμφοτερικίνη (*A. terreus*), που χαρακτηρίζονται από αυξημένη θνητότητα. Οι πνεύμονες αποτελούν την

συνηθέστερη εντόπιση, απ' όπου μπορεί να ακολουθήσει διασπορά. Η πνευμονική ασπεργίλλωση χαρακτηρίζεται από πυρετό, βήχα, αιμόπτυση, δύσπνοια, πλευριτικό άλγος, αναπνευστική δυσχέρεια και διαταραχή επιπέδου συνείδησης. Στον βαριά ανοσοκατασταλμένο ασθενή τα συμπτώματα αρχικά μπορεί να είναι αβληχρά, άτυπα ή και απόντα [4,6,7]. Παρ' ότι συνολικά οι καντιντιάσεις μειώνονται παρατηρείται αύξηση λοιμώξεων από στελέχη non-albicans, πιθανότατα λόγω της προφυλακτικής χορήγησης αζολών σε ασθενείς υψηλού κινδύνου [4,5]. Οι καντιντιάσεις εμφανίζονται ως μυκηταιμία, περιτονίτιδα, ενδοφθαλμίτιδα, οισοφαγίτιδα και λοιμώξεις του ουροποιητικού, με συχνότερες εκδηλώσεις πυρετό, καταβολή και λευκοκυττάρωση [4,5].

1.3 Candida albicans

Από τα 81 είδη του γένους Candida, λοιμώξεις συνήθως προκαλεί το είδος Candida albicans. Πρόκειται για ένα μύκητα ο οποίος προκαλεί κυρίως ευκαιριακές λοιμώξεις σε ανθρώπους αλλά και συστηματικές λοιμώξεις σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς (π.χ. ασθενείς με AIDS, ασθενείς που λαμβάνουν χημειοθεραπεία και μεταμόσχευση). Οι μύκητες του γένους Candida προκαλούν λοιμώξεις του δέρματος, των βλεννογόνων, των ονύχων και μπορούν να προκαλέσουν οξεία ή χρόνια λοίμωξη. Ο μύκητας αυτός βρίσκεται φυσιολογικά στο δέρμα και στους βλεννογόνους της αναπνευστικής, γαστρεντερικής οδού καθώς και του γεννητικού συστήματος της γυναίκας. Η Candida albicans είναι ένας από τους μύκητες που αποτελούν τη φυσιολογική εντερική χλωρίδα. Η Candida albicans ανιχνεύεται στο 80% των ανθρώπων, χωρίς όμως να προκαλεί συμπτώματα. Υπό φυσιολογικές συνθήκες η ποσότητα της συνήθως είναι μικρή, καθώς ελέγχεται από το ανοσοποιητικό σύστημα και από τη φυσιολογική μικροχλωρίδα που υπάρχει στον πεπτικό σωλήνα, δηλαδή από τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς του εντέρου. Όμως, η ισορροπία ανάμεσα στην Candida albicans και στα υπόλοιπα βακτήρια μπορεί να διαταραχθεί από διάφορες αιτίες (π.χ. αντιβιοτικά, στρες, κ.λ.π.). Η υπεραύξηση όμως της Candida albicans οδηγεί στην καντινίαση.



Εικόνα 1.1: Candida Albicans

1.4 Παθογένεια και κλινικές δοκιμές

Τα στελέχη C. albicans προκαλούν συχνότερα λοιμώξεις στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ) και χαρακτηρίζονται από το φαινόμενο του διμορφισμού, δηλαδή απαντώνται με δύο μορφές: α) τη ζύμη (yeast) και β) το μυκηλιακό (mycelial) τύπο. Οι μορφές αυτές διαφέρουν ως προς την αντιγονική έκφραση, τις προσκολλητικές ιδιότητες στα επιθηλιακά κύτταρα του ξενιστή, την έκκριση πρωτεασών και την ανθεκτικότητα στην οξειδωτική δράση των ουδετεροφίλων λευκοκυττάρων. Η C. albicans αποτελεί το πιο συχνό αίτιο αποικισμού των βλεννογόνων του γαστρεντερικού και ουρογεννητικού συστήματος. Οι μυκητιάσεις από Candida albicans εμφανίζονται σε ασθενείς με εξασθενημένη αντίσταση, περισσότερο με διαταραγμένη κυτταρική ανοσία. Συχνότερα προσβάλλονται οι βλεννογόνοι, σπανιότερα το εξωτερικό δέρμα και τα σπλάχνα. Οι παράγοντες που ευνοούν την ανάπτυξη λοιμώξεων από Candida είναι: χορήγηση αντιβιοτικών με ευρύ φάσμα δράσης, η ορμονοθεραπεία, η παρατεταμένη θεραπεία με κορτικοειδή, υπεργλυκαιμία – οξέωση, βακτηριαιμία, αιμοκάθαρση, βαριές χειρουργικές επεμβάσεις, στρες [8].

Η C. tropicalis είναι το δεύτερο συχνότερο αίτιο λοιμώξεων και προσβάλλει κυρίως τους ασθενείς που πάσχουν από κακοήθειες του αίματος και σακχαρώδη διαβήτη (συχνά εκδηλώνεται με εμβολικές βλάβες του δέρματος). Η C. parapsilosis απομονώνεται στους μη ογκολογικούς ασθενείς, συχνότερα στους ασθενείς που λαμβάνουν ολική παρεντερική διατροφή και φέρουν

κεντρικούς ενδοφλέβιους καθετήρες, έχει μικρή σχετικά λοιμογόνο δύναμη και η λοίμωξη που οφείλεται σ΄ αυτή εμφανίζει περισσότερο αξιόπιστη πρόγνωση. Η *C. krusei* εμφανίζεται με συχνότητα 1-3% στους ουδετεροπενικούς ασθενείς, σε όσους πάσχουν από κακοήθειες του αίματος και είναι ανθεκτική στη φλουκοναζόλη [9]. Η *C. glabrata* (tolouropsis) ανευρίσκεται μόνο υπό μορφή ζύμης και αποικίζει τους βλεννογόνους του γαστρεντερικού και ουρογεννητικού συστήματος. Παρουσιάζει ασθενή λοιμογόνο ισχύ και προσβάλλει κυρίως τους χειρουργικούς ασθενείς, όσους πάσχουν από νεφρική ανεπάρκεια, από σακχαρώδη διαβήτη και τους ασθενείς με συμπαγείς όγκους [10].

1.5 Aspergillus fumigatus

Ο Aspergillus fumigatus είναι ένας μύκητας της κατηγορίας των σαπροφύτων που παίζει ουσιαστικό ρόλο στην ανακύκλωση του περιβαλλοντικού άνθρακα και αζώτου. Φυσική οικολογική θέση του μύκητα είναι το χώμα, όπου επιβιώνει και αναπτύσσεται με οργανικά υπολείμματα. Είναι ένα από τα πιο συχνά εμφανιζόμενα είδη στον άνθρωπο και μεταφέρεται με αιωρούμενα κονίδια. Κάθε κονιδιακό κεφάλι παράγει χιλιάδες κονίδια που έχουν μικρή διάμετρο (2-3μm), απελευθερώνονται στην ατμόσφαιρα και μπορούν να φτάσουν στις κυψελίδες των πνευμόνων. Κατά τα τελευταία 10 χρόνια στις προηγμένες χώρες, ο Aspergillus fumigatus έχει γίνει ο πιο διαδεδομένος αερομεταφερόμενος παθογόνος μύκητας και προκαλεί σοβαρές και συνήθως θανατηφόρες λοιμώξεις σε ανοσοκατεσταλμένους ξενιστές. Μολονότι ο μύκητας αυτός είναι ο πιο κοινός αιτιολογικός παράγοντας που είναι υπεύθυνος για περίπου το 90% των ανθρώπινων λοιμώξεων, δεν είναι το μόνο παθογόνο σε αυτό το γένος. Ο *Α. flavus, Α. terreus, Α. niger,* και *Α. nidulans* μπορούν να προκαλέσουν λοιμώξεις στον άνθρωπο [11].



Εικόνα 1.2: Aspergillus fumigatus

1.6 Κλινικά συμπτώματα και διάγνωση αναπνευστικής ασπεργίλωσης

Για τους περισσότερους ασθενείς η κύρια πύλη εισόδου της λοίμωξης από τον *Aspergillus fumigatus* είναι το αναπνευστικό σύστημα. Έχουν όμως περιγραφεί και άλλες περιοχές εμφάνισης των λοιμώξεων τόσο σε φυσιολογικούς όσο και σε ανοσοκατεσταλμένους ξενιστές, όπως το δέρμα, το περιτόναιο, τα νεφρά, τα οστά, τα μάτια και ο γαστρεντερικός σωλήνας. Οι πνευμονικές ασθένειες που προκαλούνται από τον *Aspergillus fumigatus* μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με τη θέση της νόσου εντός της αναπνευστικής οδού και την έκταση του μυκηλιακού αποικισμού, τα οποία επηρεάζονται από την ανοσολογική κατάσταση του ξενιστή. Αλλεργικές παθήσεις, όπως το άσθμα ή η αλλεργική ιγμορίτιδα συμβαίνουν μετά την επαναλαμβανόμενη έκθεση σε κονίδια ή αντιγόνα του *Aspergillus* απουσία μυκηλιακού αποικισμού. Σε αντίθεση με την αλλεργική βρογχοπνευμονική ασπεργίλλωση, ασπεργίλλωμα και σύνδρομα που περιλαμβάνουν την ανάπτυξη του μυκηλίου του *Aspergillus fumigatus* στο σώμα, συνήθως απαιτούν θεραπευτική παρέμβαση [11].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΣΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

2.1 Αντιμυκητιακά φάρμακα

Οι λοιμώδεις ασθένειες που προκαλούνται από μύκητες ονομάζονται μυκητιάσεις και μπορεί να είναι είτε επιφανειακές που αφορούν στο δέρμα, είτε συστηματικές που είναι απειλητικές για τη ζωή.

2.1.1 Φάρμακα για επιφανειακές μυκητιάσεις

Η γκριζεοφουλβίνη χρησιμοποιείται για την θεραπεία επιφανειακών μυκητιάσεων. Αλληλεπιδρά με τους μικροσωληνίσκους των μυκήτων καταστρέφοντας την μιτωτική άτρακτο και αναστέλλοντας την μίτωση. Η νυστατίνη είναι αντιβιοτικό για την στοματική καντινίαση και η μικοναζόλη είναι φάρμακο που δρα τοπικά.



2.1.2 Φάρμακα για υποδόριες και συστηματικές μυκητιάσεις

Αμφοτερικίνη Β



Η αμφοτερικίνη Β είναι ένα μακρολιδικό αντιβιοτικό που παράγεται από τον *Streptomyces nodosus* και χορηγείται για τη θεραπεία των υποδόριων και συστηματικών μυκητιάσεων.

Συνδέεται με την εργοστερόλη της κυτταρικής μεμβράνης του μύκητα και σχηματίζει πόρους ή διαύλους. Έτσι ηλεκτρολύτες και μικρά μόρια διαφεύγουν από το κύτταρο και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο. Η φθοροοκυτοσίνη είναι συνθετικός αντιμεταβολίτης της πυριμιδίνης που χορηγείται σε συνδυασμό με την αμφοτερικίνη Β για τη θεραπεία συστηματικών μυκητιάσεων.



Το φάρμακο εισέρχεται στα κύτταρα των μυκήτων και μετατρέπεται σε 5φθοριοδεοξυουριδυλοϊκό οξύ. Το ψευδές αυτό νουκλεοτίδιο αναστέλλει τη θυμιδυλική συνθετάση, στερώντας έτσι τον οργανισμό από το θυμιδυλικό οξύ, ένα σημαντικό συστατικό του DNA. Αυτή η μη φυσική πυριμιδίνη μεταβολίζεται επίσης στο νουκλεοτίδιο 5-FUTP και ενσωματώνεται στο RNA του μύκητα για να προκαλέσει διαταραχή της σύνθεσης των πρωτεϊνών και των νουκλεϊνικών οξέων. Η συμβατική αμφοτερικίνη Β έχει ισχυρή βιολογική δράση για ευρύ φάσμα μυκήτων αλλά και αρκετές τοξικές παρενέργειες. Η δράση της συμβατικής αμφοτερικίνης Β συγκρίθηκε με τη δράση των λιποσωμιακών παραγώγων της τα οποία θεωρείται οτι έχουν βελτιωμένη φαρμακοκινητική συμπεριφορά και βρέθηκε οτι εμφανίζει παρόμοια αποτελεσματικότητα [12,13]. Η χορήγηση των λιποσωμιακών παραγώγων έδειξε μικρότερη συχνότητα υποτροπής της λοίμωξης και μικρότερα ποσοστά διακοπής της αντιμυκητιασικής αγωγής λόγω τοξικότητας της θεραπείας [13]. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες από τη χορήγηση των λιποσωμιακών παραγώγων της αμφοτερικίνης Β αφορούν κυρίως στην εμφάνιση νεφροτοξικότητας (19%), υποκαλιαιμίας (25%) και συμπτωμάτων που σχετίζονται με την έγχυση του φαρμάκου (πυρετός, ρίγος) (14%) ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά μετά από χορήγηση της συμβατικής αμφοτερικίνης Β είναι 27%, 18% και 43% [12]. Η υπεροχή της λιποσωμιακής αμφοτερικίνης σε σύγκριση με την "κλασσική" της μορφή στον έλεγχο των μυκητιάσεων σχετίζεται επίσης και με τη χορήγηση της πρώτης σε μεγαλύτερες δόσεις (>3 mg/kg), λόγω της μεγαλύτερης ανοχής και της μικρότερης τοξικότητας.

2.2 Γενικά για τις αζόλες

Εξαιτίας του μικρού θεραπευτικού εύρους της αμφοτερικίνης Β και της νεφροτοξικότητας που προκαλούσε συντέθηκαν οι ιμιδαζόλες και οι τριαζόλες. Πρώτα κυκλοφόρησε η κετοκοναζόλη και ύστερα οι πρώτης γενιάς τριαζόλες φλουκοναζόλη και ιτρακοναζόλη. Οι τελευταίες έχουν πιο ευρύ θεραπευτικό φάσμα και είναι περισσότερο ασφαλείς για τον ασθενή. Παρ' όλη την παγκόσμια χρήση τους παρουσιάστηκαν κάποιοι σημαντικοί κλινικοί προβληματισμοί όπως η εμφάνιση αντοχής, η επικίνδυνη αλληλεπίδραση με άλλα φάρμακα, το προβληματικό φαρμακολογικό τους προφίλ και η τοξικότητά τους. Οι παρενέργειες αυτές οδήγησαν στην ανάπτυξη τριαζολών δεύτερης γενιάς τριαζόλες (βορικοναζόλη, ποσακοναζόλη, αλμπακοναζόλη).



Εικόνα 2.1: Χημικές δομές ιμιδαζολών και τριαζολών

2.2.1 Φλουκοναζόλη



Η φλουκοναζόλη εμφανίζει ισχυρή βιολογική δράση κατά των λοιμόξεων από τα περισσότερα στελέχη *Candida* εκτός από τα στελέχη *C. glabrata* και *C. krusei* τα οποία θεωρείται *a priori* ότι εμφανίζουν αντοχή [19]. Σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα η εμπειρική χορήγηση της φλουκοναζόλης ενδείκνυται σε ασθενείς: α) που δεν έλαβαν προηγούμενη χημειοθεραπεία με αζόλες ή είναι χαμηλού κινδύνου για την

ανάπτυξη λοίμωξης με ανθεκτικά στελέχη στη φλουκοναζόλη, β) είναι χαμηλού κινδύνου για την ανάπτυξη διεισδυτικής ασπεργίλλωσης και γ) δεν έχουν σημεία και συμπτώματα συστηματικής ασπεργίλλωσης [14,15-16]. Τρεις μεγάλες τυχαιοποιημένες μελέτες σύγκριναν τη φλουκοναζόλη με τη συμβατική αμφοτερικίνη Β αποδεικνύοντας ισοδύναμη δραστικότητα, αλλά ασφαλέστερη χορήγηση της φλουκοναζόλης (συγκρίσιμη με εκείνη των λιπιδιακών συμπλεγμάτων της αμφοτερικίνης Β) ως προς την εμφάνιση ανεπιθύμητων ενεργειών [17]. Στις μελέτες αυτές οι ασθενείς που τυχαιοποιήθηκαν ήταν χαμηλού κινδύνου για την εμφάνιση λοιμώξεων από στελέχη Aspergillus. Η από του στόματος χορήγηση αζόλης σε μυκητιασική οισοφαγίτιδα, δυνητικά συστηματική μυκητίαση, φαίνεται ότι είναι εξίσου αποτελεσματική με παλαιότερα πρωτόκολλα θεραπείας που περιλάμβαναν τοπικές πλύσεις με νυστατίνη ή/και ενδοφλέβια χορήγηση αμφοτερικίνης Β φαρμακοκινητικές ιδιότητες της φλουκοναζόλης (επαρκής [14]. Or βιοδιαθεσιμότητα, μεγάλος χρόνος ημίσειας ζωής, μικρή τοξικότητα και ελάχιστες αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα) την καθιστούν θεραπεία εκλογής στη μυκητιασική οισοφαγίτιδα. Η κετοκοναζόλη προτείνεται για τη συνέχιση της αγωγής σε ασθενείς με υποτροπιάζουσα στοματοφαρυγγική καντιντίαση καθώς και όταν η συμπτωματική οισοφαγίτιδα επιβεβαιωθεί με ενδοσκοπικό ή ακτινολογικό έλεγχο [18].

31

2.2.2 Ιτρακοναζόλη και Βορικοναζόλη



Н ιτρακοναζόλη βορικοναζόλη συνδυάζουν και η την κλινική αποτελεσματικότητα και την ασφαλή χορήγηση με μικρά ποσοστά διακοπής της θεραπείας σε λοιμώξεις από Aspergillus spp. και Candida spp., όπως και σε λοιμώξεις που οφείλονται σε στελέχη ανθεκτικά στη φλουκοναζόλη [19]. Η χορήγηση της βορικοναζόλης χαρακτηρίζεται από ισχυρότερη αποτελεσματικότητα (53%) στη διεισδυτική ασπεργίλλωση σε σχέση με την αμφοτερικίνη Β (32%) και μεγαλύτερη επιβίωση [20]. Η βορικοναζόλη βρέθηκε επιπλέον ότι εμφανίζει την ίδια αποτελεσματικότητα με τη λιποσωμιακή αμφοτερικίνη στις περισσότερες μυκητιάσεις και χαρακτηρίζεται από λιγότερες υποτροπές των λοιμώξεων και μικρότερο ποσοστό ανεπιθύμητων ενεργειών (με εξαίρεση τις παροδικές οπτικές διαταραχές και τις παραισθήσεις σε ποσοστά 22% και 4%, αντίστοιχα) [17]. Για τους παραπάνω λόγους η βορικοναζόλη θεωρείται φάρμακο επιλογής στην εμπειρική αντιμετώπιση και την πρόληψη των υποτροπών μυκητιασικών λοιμώξεων σε λήπτες μοσχεύματος μυελού των οστών και ασθενείς με λευχαιμία [14,17]. Η ισχυρότερη αποτελεσματικότητα της βορικοναζόλης στον έλεγχο της διηθητικής ασπεργίλλωσης, αλλά και των λοιμώξεων από κοινά στελέχη Candida έχει αποδοθεί στον ικανοποιητικό βαθμό διείσδυσης της συγκεκριμένης αζόλης στους βλεννογόνους και στην ισχυρή δραστικότητα in vitro που αποδεικνύεται από τις χαμηλές τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (minimum inhibitory concentration, MIC) [20,21].

Σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση των ασθενειών που προκαλούνται από τον Aspergillus fumigatus κατέχουν οι αντιμυητιασικοί παράγοντες της κατηγορίας των αζολών και συγκεκριμένα η ιτρακοναζόλη (Itraconazole), η βορικοναζόλη (Voriconazole) και η ποσακοναζόλη (Posaconazole). Έχει γίνει

32

εμφανές ότι ο μύκητας αυτός μπορεί να αναπτύξει αντίσταση στις τριαζόλες, η οποία οφείλεται συνήθως σε μεταλλάξεις του γονιδίου CYP51A, που κωδικοποιεί το ένζυμο στόχο. Ασθενείς οι οποίοι κυρίως πάσχουν από ασπεργίλλωμα, μπορούν κατά τη διάρκεια της θεραπείας με τη χορήγηση αζολών, να αναπτύξουν αντίσταση στις τριαζόλες [22].

2.3 Κριτήρια για την επιλογή αντιμυκητιασικού φαρμάκου

Σε ασθενείς με πυρετό (>38°C) που επιμένει για >4 ημέρες και δεν ανταποκρίνεται σε προηγούμενη χορήγηση αντιβιοτικών ευρέως φάσματος, η έναρξη εμπειρικής αντιμυκητιασικής αγωγής περιλαμβάνει τη χορήγηση αμφοτερικίνης Β, εφόσον δεν υπάρχουν αντενδείξεις ή υποψία για λοίμωξη από στελέχη Aspergillus. Σε περιπτώσεις που η τοξικότητα της "κλασσικής" αμφοτερικίνης Β αποτελεί αιτία διακοπής της θεραπείας ή και η νεφρική λειτουργία του ασθενούς είναι παθολογική, συνιστάται αγωγή με λιποσωμιακή αμφοτερικίνη. Η βορικοναζόλη ή η ιτρακοναζόλη ενδείκνυνται για την αντιμετώπιση των ανθεκτικών μυκητιασικών λοιμώξεων στη χορήγηση αμφοτερικίνης (συμβατικής ή λιποσωμιακής), καθώς και σε περιπτώσεις νεφρικής ανεπάρκειας. Οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες της βορικοναζόλης την καθιστούν φάρμακο επιλογής στους ασθενείς της ΜΕΘ με αποδεκτό κόστος θεραπείας (Πίνακας 2.1) [17]. Η κασποφουγκίνη χορηγείται όταν οι προηγούμενες επιλογές αντιμυκητιασικής θεραπείας έχουν αποτύχει ή υπάρχουν επιδημιολογικά δεδομένα που αποδεικνύουν οτι η λοίμωξη οφείλεται σε ανθεκτικά στελέχη στην αμφοτερικίνη Β και στις αζόλες.

Πίνακας 2.1: Αντιμυκητιασικά φάρμακα

Αντιμυητιασικό φάρμακο	Οδός χορήγησης	Ημερήσια δόση (mg/kgr)	Ημερήσιο κόστος (€)
Συμβατική αμφοτερικίνη Β	IV	1	8
Λιποσωμιακή αμφοτερικίνη Β	IV	3	629
Λιπιδιακό σύμπλεγμα αμφοτερικίνης Β	IV	5	405
Φλουκοναζόλη	IV	400 mg	60
Φλουκοναζόλη	PO	200 mg	11
Ιτρακοναζόλη	IV	40 mg	40
Βορικοναζόλη	IV	40 mg	407
Βορικοναζόλη	PO	40 mg	84
Κασποφουγκίνη	IV	70 mg	644

Σκοπός της Ερευνητικής Εργασίας

Οι συστηματικές μυκητιάσεις έχουν αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια, λόγω του αυξανόμενου πληθυσμού των ανοσοκατασταλμένων ασθενών. Σε ορισμένες περιπτώσεις η αντιμετώπιση με αντιβιοτικά είναι ικανοποιητική. Ωστόσο η αυξανόμενη ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών στα χρησιμοποιούμενα φάρμακα καθιστά αναγκαία τη συνέχιση της έρευνας για την ανακάλυψη νέων αντιμικροβιακών ουσιών.

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι ο σχεδιασμός και η σύνθεση νέων ενώσεων, με πιθανή αντιμυκητιασική και αντιβακτηριακή δράση, με μακροπρόθεσμο στόχο την ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών ουσιών για την αντιμετώπιση των μικροβιακών λοιμώξεων.

0 υβριδικών στόχος μας ήταν η σύνθεση ενώσεων 1.4βενζοξαζινών/ακυλοϋδραζονών και η μελέτη σχέσεων δομής των αντιμικροβιακής δράσης. Συγκεκριμένα, τα νέα ανάλογα με γενικό τύπο Ι προέκυψαν από υποκατάσταση στη θέση C2 του δακτυλίου της βενζοξαζίνης (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1: Γενικός τύπος νέων υβριδικών ενώσεων βενζοξαζινών/ακυλοϋδραζονών

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 Σχεδιασμός νέων υβριδικών ενώσεων 1,4-Βενζοξαζινών/ακυλοϋδραζονών

Ο σχεδιασμός μας για τις ενώσεις της παρούσας εργασίας βασίστηκε στο μοριακό υβριδισμό. Ο μοριακός υβριδισμός αποτελεί μια προσέγγιση για το σχεδιασμό και την ανάπτυξη νέων φαρμάκων, η οποία βασίζεται στο συνδυασμό φαρμακοφόρων ομάδων βιοδραστικών μορίων για την σύνθεση ενός νέου υβριδικού μορίου με βελτιωμένη ενεργότητα και αποτελεσματικότητα σε σύγκριση με τις αρχικές ενώσεις. Επιπρόσθετα, η στρατηγική αυτή μπορεί να οδηγήσει σε ενώσεις με βελτιωμένη εκλεκτικότητα, διαφορετικό ή διπλό μηχανισμό δράσης και μειωμένες παρενέργειες [23].

Οι νέες ενώσεις συνδυάζουν σε ένα μόριο δύο κατηγορίες φαρμακοφόρων ομάδων, οι οποιες εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση, τις 1,4-βενζοξαζίνες και τις ακυλοϋδραζόνες.

3.1.1 Γενικά για τις βενζοξαζίνες

Οι βενζοξαζίνες αποτελούν μια τάξη ενώσεων με μεγάλο εύρος βιολογικών ιδιοτήτων και εφαρμογών και έχουν χαρακτηρισθεί ως «προνομιακές ενώσεις» (privileged structures). Ειδικότερα, οι 2*H*-1,4-βενζοξαζιν-3(4*H*)-όνες και οι 3,4-διϋδρο-2*H*-1,4-βενζοξαζίνες έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας λόγω των βιολογικών τους ιδιοτήτων και έχουν χρησιμοποιηθεί συχνά ως δομικές μονάδες για το σχεδιασμό και τη σύνθεση νέων ενώσεων ή αναλόγων φυσικών προϊόντων με μεγάλο εύρος δράσεων. Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε η σύνθεση παραγώγων της 3,4-διϋδρο-2*H*-1,4-βενζοξαζίνης με υποκατάσταση στη θέση 2 [24].


Εικόνα 3.2: Χημική δομή των ενώσεων 2Η-1,4-βενζοξαζιν-3(4Η)-όνης και 3,4-διυδρο-2Η-1,4-βενζοξαζίνη

3.1.2 Μέθοδοι σύνθεσης βενζοξαζινών

Από συνθετικής άποψης, η 3,4-διυδρο-3-οξο-2*Η*-1,4-βενζοξαζίνη είναι ένα ετεροκυκλικό σύστημα με θέσεις δομικής μετατροπής, τον αρωματικό δακτύλιο, το άζωτο και τους άνθρακες C2 και C3.



Εικόνα 3.3: Σύνθεση της 3,4-διϋδρο-3-οξο-2*Η*-1,4-βενζοξαζίνης με πρόδρομη ένωση την 2-αμινοφαινόλη ή τη 2-νιτροφαινόλη

Οι 2-νιτροφαινόλες έχουν ευρέως χρησιμοποιηθεί ως πρόδρομες ενώσεις για τη σύνθεση των 3,4-διϋδρο-2*H*-1,4-βενζοξαζινών και 2*H*-1,4-βενζοξαζιν-3- (4*H*)-ονών. Εναλλακτικά τα 1,4-βενζοξαζινικά ανάλογα συντίθενται μέσω κυκλοσυμπύκωνσης αμινοφαινολών με δι-αλογόνο ενώσεις ή με αλογονοϋποκατεστημένα ακυλοβρομίδια μετά από αναγωγή της λακτάμης που παράγεται. Επίσης συντίθενται μέσω διάνοιξης εποξειδίων με διάνοιξη το βιάνοιξη εποξειδίων με αμινοφαινόλες ακολουθούμενη από κυκλοσυμπύκωνση [25].

3.1.3 Εύρος βιολογικής δράσης βενζοξαζινών

Ο βενζοξαζινικός δακτύλιος έχει χρησιμοποιηθεί ως βάση για την ανάπτυξη νέων βιοδραστικών ενώσεων με ευρύ φάσμα δράσης, όπως ζιζανιοκτόνα, μυκητοκτόνα, ενεργοποιητές διαύλων καλίου, αντιδιαβητικά, των νευροπροστατευτικά, αντικαταθλιπτικά αγχολυτικά, και καρδιαγγειακά φάρμακα. Ειδικότερα η ομάδα Φαρμακευτικής Χημείας του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Ε.Ι.Ε. έχει δραστηριοποιηθεί στο σχεδιασμό και στη σύνθεση νέων βιοδραστικών βενζοξαζινικών αναλόγων. Ειδικότερα, συνέθεσε αρυλο-υποκατεστημένα παράγωγα της 5,7,8-τριμεθυλο-1,4-βενζοξαζίνης μέσω της αντίδρασης Suzuki-Miyara, τα οποία εμφανίζουν ισχυρή δράση έναντι του παθογόνου Toxoplasma gondii που είναι ο αιτιολογικός παράγοντας της τοξοπλάσμωσης [26].



Εικόνα 3.4: Παράγωγα της 5,7,8-τριμεθυλο-1,4-βενζοξαζίνης με υποκατάσταση στη C6 θέση

Επίσης, συνέθεσε 5,7,8-τριμεθυλο-1,4-βενζοξαζινικά αμινοαμίδια, τα οποία εμφανίζουν προστατευτική δράση έναντι των αρρυθμιών που σχετίζονται με βλάβη από ισχαιμική επαναιμάτωση [27].



Εικόνα 3.5: 5,7,8-Τριμεθυλο-1,4-βενζοξαζινικά αμινοαμίδια

Επιπρόσθετα, 5,7,8-τρμεθυλο-1,4-βενζοξαζινικά ανάλογα ρυθμίζουν τη σηματοδότηση μέσω του συστήματος AtoSC [28] και εμποδίζουν το σχηματισμό των ανώμαλων ισομορφών της πρωτεΐνης PrP^{Sc} [29].

3.1.4 Βιολογική δράση ακυλοϋδραζονών

Οι ακυλοϋδραζόνες αποτελούν μια κατηγορία χημικών ενώσεων οι οποίες εμφανίζουν μεγάλο εύρος βιολογικών δράσεων συμπεριλαμβανομένων της αντιτρυπανοσωμικής, αναλγητικής και αντιφλεγμονώδους δράσης (Εικόνα 3.6) [30, 31].



Εικόνα 3.6: Ν-ακυλοϋδραζόνες με αναλγητική και αντι-φλεγμονώδη δράση

Επίσης, τα ανάλογα της Εικόνας 3.7 παρουσιάζουν *in vitro* αντικαρκινική δράση έναντι 60 κυτταρικών σειρών [32, 33].



Εικόνα 3.7: Υδραζόνες με αντικαρκινική δράση

Παράγωγα ακυλοϋδραζονών έχουν αντιθρομβωτική δράση αναστέλοντας τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων σε πλάσμα κουνελιού, το οποίο έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε αιμοπετάλια (Εικόνα 3.8) [34].



Εικόνα 3.8: Παράγωγα ακυλοϋδραζονών με αντιθρομβωτική δράση

Επίσης, πολλά παράγωγα ακυλοϋδραζονών εμφανίζουν ισχυρή αντιμικροβιακή και μυκητοκτόνο δράση, έναντι του του μύκητα *Candida albicans* (Εικόνα 3.9) και του βακτηρίου SA και *Escherichia coli* (Εικόνα 3.10) [35].



Εικόνα 3.9: Υδραζονικά παράγωγα με αντιμικροβιακή / μυκητοκτόνο δράση



Εικόνα 3.10: Υδραζονικά παράγωγα με αντιβακτηριακή δράση

3.2 Δομές νέων αναλόγων της ερευνητικής εργασίας

Τα νέα ανάλογα είναι παράγωγα του 1,4-βενζοξαζινο-2-καρβοϋδραζιδίου με αρωματικές και ετεροαρωματικές αλδεΰδες και παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.11.



Εικόνα 3.11: Χημικές δομές των νέων ενώσεων που συντέθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΥΒΡΙΔΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ 1,4-BENZOΞΑΖΙΝΩΝ ΚΑΙ *Ν*-ΑΚΥΛΟΫΔΡΑΖΟΝΩΝ

4.1 Σύνθεση νέων 1,4-Βενζοξαζινικών αναλόγων

Η πρόδρομη ένωση για τη σύνθεση των νέων αναλόγων **3-13** είναι η 2-αμινοφαινόλη (**II**), η οποία κατά την αντίδρασή της με τον 2,3-διβρωμοπροπανικό αιθυλεστέρα, παρουσία ανθρακικού καλίου, σε ακετόνη οδηγεί στον 3,4-διϋδρο-2*H*-1,4-βενζοξαζινο-2-καρβοξυλικό αιθυλεστέρα (**1**), ο οποίος απομονώνεται ως υδροχλωρικό αλάτι (**III**) με απόδοση 91%.



Αντιδραστήρια και Συνθήκες: i) (Br)CH₂CH(Br)COOCH₂CH₃, Ανθρακικό κάλιο, Ακετόνη, 60 °C, ii) μεθανόλη, HCl 37%.

Στη συνέχεια η ένωση **ΙΙΙ** με επίδραση υδραζίνης σε απόλυτη αιθανόλη οδηγεί στο 3,4-διϋδρο-2*H*-1,4-βενζοξαζίνο-2-καρβοϋδραζίδιο (**2**) με απόδοση 85%.



Αντιδραστήρια και Συνθήκες: i) Υδραζίνη, Απόλυτη αιθανόλη, θερμοκρασία δωματίου.

Η σύνθεση των τελικών ακυλοϋδραζονών **3-14** πραγματοποιήθηκε με τη χρήση δύο μεθόδων: Α) με όξινα καταλυόμενες συνθήκες σε θερμοκρασία δωματίου και Β) με την επίδραση μικροκυμάτων (Εικόνα 4.1 και Πίνακας 4.1). Η σύνθεση με τη Μέθοδο Α δεν έδωσε τα επιθυμητά προϊόντα σε όλες τις περιπτώσεις.

Η θέρμανση με μικροκύματα αποτελεί μια μέθοδο γρήγορη, καθαρή, οικονομική και φιλική προς το περιβάλλον. Η οργανική σύνθεση με τη βοήθεια μικροκυμάτων (Microwave Assisted Organic Synthesis – MAOS) αποτελεί μια τεχνική με διαρκώς επεκτεινόμενες εφαρμογές στην οργανική και φαρμακευτική χημεία. Σύμφωνα με πολλές δημοσιευμένες εργασίες, έχει αποδειχθεί ότι μέσω της οργανικής σύνθεσης με μικροκύματα, επιτυγχάνονται:

- Αισθητή μείωση του χρόνου αντίδρασης.
- Αύξηση της απόδοσης των προϊόντων.
- Παραγωγή καθαρότερων προϊόντων μέσω της μείωσης των ανεπιθύμητων παράπλευρων αντιδράσεων σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους θέρμανσης.

Η θέρμανση με χρήση μικροκυμάτων (microwave dielectric heating) χρησιμοποιεί την ικανότητα ορισμένων υλικών (διαλύτες ή αντιδραστήρια) να απορροφήσουν την ενέργεια των μικροκυμάτων και να την μετατρέψουν σε θερμότητα, αυξάνοντας την κινητική ενέργεια της αντίδρασης. Η τεχνολογία αυτή, προσφέρει νέες ευκαιρίες στον τομέα της συνθετικής χημείας, παρέχοντας τη δυνατότητα πραγματοποίησης χημικών αντιδράσεων που δεν θα ήταν δυνατές με τη χρήση της συμβατικής θέρμανσης.

44



Εικόνα 4.1: Συνθετική πορεία για την παρασκευή των ακυλοϋδραζονών 3-14

Αντιδραστήρια και συνθήκες: Μέθοδος Α i) ArCHO, HCl 37%, Απόλυτη αιθανόλη, θερμοκρασία δωματίου **Μέθοδος Β** i) ArCHO, Απόλυτη αιθανόλη, μw 240W, 140 °C, 52min.



Πίνακας 4.1: Χημικές δομές τελικών προϊόντων

Από τον Πίνακα 4.2 καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι με τη χρήση της μεθόδου Β (χρήση μικροκυμάτων), παρήχθησαν όλα τα επιθυμητά προϊόντα με καλύτερες αποδόσεις από την μέθοδο Α (όξινα καταλυόμενες συνθήκες). Επιπρόσθετα, με τη μέθοδο Β συντέθηκαν τα ανάλογα **4**, **5**, **11**, **12** και **14**, τα οποία δεν ελήφθησαν με τη μέθοδο Α.

Ακυλοϋδραζόνες	Μέθοδος Α	Μέθοδος Β
3	70%	80%
4	-	82%
5	-	60%
6	68%	72%
7	66%	78%
8	76%	94%
9	93%	97%
10	90%	89%
11	-	88%
12	-	71%
13	91%	80%
14	-	70%

Πίνακας	; 4.2: Σύ	γκριση	αποδόσεων	των συνθετικών	μεθόδων Α και	B
---------	------------------	--------	-----------	----------------	---------------	---

Ο μηχανισμός της αντίδρασης σύνθεσης του εστέρα **1** (Εικόνα 4.2) περιλαμβάνει την πυρηνόφιλη προσβολή του βρωμιωμένου πρωτοταγούς άνθρακα από το άζωτο της αμινομάδας της 2-αμινοφαινόλης και στη συνέχεια κλείσιμο του δακτυλίου μετά από προσβολή του βρωμιωμένου δευτεροταγούς άνθρακα από το οξυγόνο του υδροξυλίου της 2-αμινοφαινόλης.



Εικόνα 4.2: Μηχανισμός σύνθεσης του εστέρα 1

Ο μηχανισμός της αντίδρασης σύνθεσης του άκυλο υδραζιδίου **2** (Εικόνα 4.3) περιλαμβάνει την προσβολή του καρβονυλίου του εστέρα από το άζωτο της υδραζίνης και απομάκρυνση της αιθόξυ ομάδας ως εύκολα αποχωρούσας ομάδας.



Εικόνα 4.3: Μηχανισμός σύνθεσης του άκυλο υδραζιδίου 2

Ο μηχανισμός σύνθεσης των τελικών ακυλοϋδραζονών με όξινα καταλυόμενες συνθήκες (Εικόνα 4.4) περιλαμβάνει την προσβολή του καρβονυλίου της αλδεϋδης από το άζωτο του άκυλο υδραζιδίου. Η παρουσία πυκνού υδροχλωρικού οξέος στο μείγμα της αντίδρασης έχει ως αποτέλεσμα την πρωτονίωση του υδροξυλίου και τη μετατροπή του σε εύκολα αποχωρούσα ομάδα με σκοπό το σχηματισμό διπλού δεσμού μεταξύ του αζώτου και του άνθρακα της αλδεΰδης.



Εικόνα 4.4: Μηχανισμός σύνθεσης τελικών ακυλοϋδραζονών με όξινα καταλυόμενες συνθήκες

Όσον αφορά τη σύνθεση των τελικών ακυλοϋδραζονών με την χρήση μικροκυμάτων, ο μηχανισμός παρατίθεται στην Εικόνα 4.5.



Εικόνα 4.5: Μηχανισμός σύνθεσης τελικών ακυλοϋδραζονών με την επίδραση μικροκυμάτων 3-14

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΜΟΡΦΩΜΕΡΩΝ ΤΟΥ ΑΜΙΔΙΚΟΥ ΔΕΣΜΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΓΕΩΜΕΤΡΙΚΩΝ ΙΣΟΜΕΡΩΝ ΣΤΑ ΑΝΑΛΟΓΑ 3-14

5.1 Εισαγωγή

Είναι γνωστό ότι οι ακυλοϋδραζόνες μπορεί να υπάρχουν ως μίγμα γεωμετρικών ισομερών όσον αφορά τον διπλό δεσμό μεταξύ άνθρακα – αζώτου (Ε/Ζ) και ως διαμορφωμερή ως προς τον αμιδικό δεσμό (*cis/trans*). Το διαμορφωμερές Ζ_{N-N} δε σχηματίζεται λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης [36]. Επίσης η μη επίπεδη διαμόρφωση του τμήματος C=N-NH δεν υφίσταται διότι θα παραβιαζόταν η n-π-συζυγία [36]. Επομένως, οι ακυλοϋδραζόνες υφίστανται μόνο ως Ε_{N-N} διαμορφωμερή, το οποίο έχει επιβεβαιωθεί βιβλιογραφικά και από μελέτες ακτίνων X [36].

Στα φάσματα ¹Η όλων των ακυλοϋδραζονών που συντέθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας παρατηρήθηκε η εμφάνιση διπλών κορυφών που μπορεί να οφείλονται στην παρουσία Ε, Ζ γεωμετρικών ισομερών ή διαμορφωμερών του αμιδικού δεσμού. Χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία NMR ¹H και ¹³C οι Palla et al έδειξαν ότι οι ακυλοϋδραζόνες, παράγωγα ακυλοϋδραζιδίων και αρωματικών αλδεϋδών, σε διάλυμα απαντώνται ως τα Ε γεωμετρικά ισομερή που είναι λιγότερο στερεοχημικά παρεμποδισμένα σε σχέση με τα Ζισομερή [37]. Επομένως, τα διπλά σήματα θα μπορούσαν να αποδοθούν στα διαμορφωμερή του αμιδικού δεσμού. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώνεται από τα πειράματα δυναμικής φασματοσκοπίας NMR με την οποία μελετήθηκε η συμπεριφορά των διπλών κορυφών σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία. Δεδομένου ότι η περιστροφή γύρω από τον δεσμό C-N στα αμίδια είναι παρεμποδισμένη, λόγω του φαινομένου της μεσομέρειας όπου ο δεσμός C-N λαμβάνει επίπεδη διάταξη και έχει χαρακτήρα διπλού δεσμού, αυτά απαντώνται σε δύο διαμορφωμερή trans ή antiperiplanar και cis ή synperiplanar (Εικόνα 5.1) [38].

52



Μελετήθηκε το φαινόμενο της εναλλαγής μεταξύ των δύο διαμορφωμερών της 3,4-διϋδρο-2H-1,4-βενζοξαζινο-2-υδροξυ-φαινυλο-2-καρβο-υδραζόνης (**3**) σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία. Ελήφθησαν φάσματα ¹Η NMR σε DMSO-d6 σε θερμοκρασίες 25 °C – 85 °C, ανά 10 °C. Στην Εικόνα 5.2 παρουσιάζεται η φασματοσκοπική περιοχή (4.5–12.0 ppm) για όλες τις θερμοκρασίες.



Εικόνα 5.2: Φασματοσκοπική περιοχή (4.5 – 12.0 ppm) ¹Η (300 MHz) σε θερμοκρασίες 25 °C – 85 °C

Όπως διαπιστώθηκε με την αύξηση της θερμοκρασίας προκαλείται αύξηση της ταχύτητας εναλλαγής μεταξύ των δύο διαμορφωμερών. Παρατηρείται ότι στην Εικόνα 5.2 με την άνοδο της θερμοκρασίας οι κορυφές που αντιστοιχούν στο αμιδικό πρωτόνιο των δύο διαμορφώσεων H21 (11.69 και 11.48 ppm) αρχικά διευρύνονται και στη συνέχεια συγχωνεύονται στους 85 °C στα 11.20 ppm. Το ίδιο παρατηρείται για το πρωτόνιο ενωμένο με το άζωτο της βενζοξαζίνης H10 (5.89 και 5.79 ppm), το οποίο συγχωνεύεται στα 5.69 ppm στους 85 °C. Οι κορυφές του βινυλικού πρωτονίου Η13 (8.60 και 8.30 ppm) διευρύνονται και στους 85 °C εμφανίζεται μόνο μια ευρεία κορυφή στα 8.61 ppm. Τέλος οι κορυφές του πρωτονίου H8 (5.32 και 4.71 ppm) επίσης διευρύνονται και στους 85 ° C εμφανίζεται μόνο μια ευρεία κορυφή στα 4.70 ppm. Επομένως, οι διπλές κορυφές που παρατηρούνται στο φάσμα ¹Η NMR οφείλονται στα διαμορφωμερή του αμιδικού δεσμού. Η αποτίμηση των κορυφών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση πειραμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού μίας και δύο διαστάσεων 1D (¹Η και ¹³C) και 2D (COSY, HSQC, HMBC).

Σε αντίθεση με τα ανάλογα των ακυλοϋδραζονών **3-13** που εμφανίζουν μόνο διαμορφωμερή του αμιδικού δεσμού, το ανάλογο 3,4-διϋδρο-2*H*-1,4βενζοξαζινο-2-πυριδινο-2-καρβο-υδραζόνη (**14**) εμφανίζει εκτός από διαμορφωμερή του αμιδικού δεσμού και *Ε*, *Ζ* γεωμετρικά ισομερή. Στην Εικόνα 5.3 φαίνονται όλα τα πιθανά διαμορφωμερή και γεωμετρικά ισομερή της ένωσης **14**.



Εικόνα 5.3: Πιθανά διαμορφωμερή και γεωμετρικά ισομερή της ένωσης 14

Στις Εικόνες 5.4 και 5.5 φαίνονται τα φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ¹Η και ¹³C αντίστοιχα, της ένωσης **14**. Όπως μπορούμε να διαπιστώσουμε από το φάσμα ¹Η, παρατηρούμε την εμφάνιση τριών ομάδων κορυφών σε όλο το εύρος του φάσματος, που αντιστοιχούν στα τρία διαμορφωμερή trans E, trans Z, cis E (Εικόνα 5.3). Επικεντρώνοντας στην περιοχή των αμιδικών πρωτονίων βλέπουμε την εμφάνιση μίας απλής κορυφής στα 14.97 ppm που αντιστοιχεί στο αμιδικό πρωτόνιο του trans-Z διαμορφωμερούς. Το πρωτόνιο αυτό είναι αρκετά αποθωρακισμένο λόγω του δεσμού υδρογόνου που εκδηλώνει με το άζωτο της πυριδίνης. Στην συγκεκριμένη περιοχή πρωτονίων παρατηρούμε την εμφάνιση δύο απλών κορυφών στα 11.69 και 11.73 ppm, που αντιστοιχούν στα αμιδικά πρωτόνια των διαμορφωμερών trans-E και cis-E αντίστοιχα. Μία ακόμα χαρακτηριστική περιοχή κορυφών στο φάσμα ¹Η είναι η περιοχή των βυνιλικών πρωτονίων στην οποία παρατηρούμε τρεις απλές κορυφές στα 8.42 ppm (trans-E), 8.04 ppm (*cis*-E) και 7.64 ppm (*trans*-Z). Επίσης στο φάσμα 13 C παρατηρούμε τρεις κορυφές στην περιοχή των αμιδικών καρβονυλίων στα 169.7 ppm (cis-E), 166.8 ppm (trans-Z), 165.3 ppm (trans-E).



Εικόνα 5.4: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 14 σε DMSO-d6



Εικόνα 5.5: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης 14 σε DMSO-d6

Στο ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης **14** (Εικόνα 5.6) παρατηρούνται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ γειτονικών πρωτονίων (Πίνακας 5.1). Στο φάσμα (Εικόνα 5.6) έχουν σημειωθεί οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γειτονικών πρωτονίων του δακτυλίου της πυριδίνης.

Major (M) (<i>trans</i> -E)	Minor (m) (<i>cis</i> -E)	Trans-Z
3.36/3.49 και 4.70	3.41/3.54 και 5.41	3.41/3.51 και 4.96
6.55 και 6.84	6.52 και 6.74	6.54 και 6.84
7.92 και 7.40/7.74	7.91 και 7.42/7.74	8.06 και 7.78/7.55
7.40 και 7.91/8.62	7.42 και 7.91/8.59	7.55 και 8.06/8.76

Πίνακας 5.1: Αλληλεπιδράσεις γειτονικών πρωτονίων της ένωσης 14



Εικόνα 5.6: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης 14 σε DMSO-d6. Μεγεθυμένη η αρωματική περιοχή (δεξιά)

Στο ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης **14** (Εικόνα 5.7) παρατηρούνται οι παρακάτω αλληλεπιδράσεις (Πίνακας 5.2) μεταξύ πρωτονίων και άμεσα συνδεδεμένων ατόμων άνθρακα. Στο φάσμα έχουν σημειωθεί ενδεικτικά τα σήματα που αντιστοιχούν στο πρωτόνιο (H8), το οποίο είναι άμεσα συνδεδεμένο με τον άνθρακα (C8) του ασύμμετρου κέντρου στα τρία διαμορφωμερή.

Πίνακας	5.2:	Αλληλεπιδράσεις	πρωτονίων	με	άμεσα	συνδεδεμένους
άνθρακες	της έν	ωσης 14				

Major (M) (<i>trans</i> -E) Minor (m) (<i>ci</i>		m) (<i>cis</i> -E)	(cis-E) trans-Z		
¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)
3.36 και 3.49	41.8	3.41 και 3.54	41.5	3.41 Kai 3.51	41.0
4.70	72.9	5.41	70.5	4.96	74.1
6.62	115.0	6.58	115.0	6.60	115.2
6.84	116.4	6.52	117.3	6.84	116.4
6.55	117.0	6.74	115.8	6.54	117.8
7.92	119.9	7.91	119.6	8.06	138.5
6.72	121.5	6.68	120.7	6.73	121.5
7.40	124.5	7.42	124.3	7.55	124.8
7.74	126.45	7.74	126.46	7.78	126.46
τεταρτοταγής	134.2	τεταρτοταγής	134.1	τεταρτοταγής	134.2
τεταρτοταγής	142.0	τεταρτοταγής	143.2	τεταρτοταγής	141.5
8.42	148.5	8.04	144.14	7.64	139.6
8.62	149.5	8.59	149.5	8.76	148.2
τεταρτοταγής	153.0	τεταρτοταγής	152.8	τεταρτοταγής	151.5
	165.2		169.6		166.7



Εικόνα 5.7: Ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης 14 σε DMSO-d6

Στο ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC της ένωσης **14** (Εικόνα 5.8) παρατηρούνται οι παρακάτω αλληλεπιδράσεις (Πίνακας 5.3) μεταξύ πρωτονίων και γειτονικών ατόμων άνθρακα. Στο φάσμα έχουν σημειωθεί οι αλληλεπιδράσεις του βυνιλικού πρωτονίου των τριών διαμορφωμερών καθώς επίσης και οι αλληλεπιδράσεις του αμιδικού πρωτονίου του διαμορφωμερούς *trans-Z* με τον άνθρακα του καρβονυλίου (C11) και τον βυνιλικό άνθρακα (C13). Τα σήματα του H20 μας δίνουν ένα ακόμα στοιχείο για την ταυτοποίηση της ύπαρξης και του τρίτου διαμορφωμερούς.

Major (M) (trans-E)		Minor (m) (<i>cis</i> -E)		trans-Z		
'H(ppm)	^{1°} C(ppm)	'H(ppm)	'°C(ppm)	'H(ppm)	^{'°} C(ppm)	
3.36/3.49	72.9, 134.2 και	3.41/3.54	134.1 και 169.6	3.41/3.51	74.1, 134.2	
	165.2				και 166.7	
4.70	41.8, 142.0 και	5.41	41.5, 143.2 και	4.96	41.0, 141.5	
	165.2		169.6		και 166.7	
5.91	72.9, 115.0 και	5.80	70.5, 115.0 και	5.87	74.1, 115.2	
	142.0		143.2		και 141.5	
6.55	115.0, 121.5,	6.74	120.7, 134.1 και	6.54	115.2,	
	134.2 και 142.0		143.2		134.1 και	
					141.5	
6.62	117.1, 121.5 και	6.58	117.3, 120.7 και	6.60	117.0,	
	142.0		143.2		121.5 και	
					141.5	
6.72	116.4, 134.2 και	6.68	115.8, 134.1 και	6.73	116.4,	
	142.0		143.2		134.2 και	
					141.5	
6.84	121.5, 134.2 και	6.52	115.0, και 143.2	6.84	121.5,	
	142.0				134.2 και	
					141.5	
7.40	119.9 και 149.5	7.42	119.6 και 149.5	7.55	126.46 και	
					148.2	
7.74	124.5	7.74	124.3	7.78	139.6 και	
					151.5	
7.92	124.5 και 153.0	7.91	124.3 και 152.8	8.06	148.2 και	
					151.5	
8.42	119.9 και 153.0	8.04	119.6 και 152.8	7.64	126.46,	
					148.2 και	
					151.2	
8.62	124.5 και 153.0	8.59	124.3 και 152.8	8.76	124.8,	
					138.5 και	
					151.5	
				14.97	139.6 και	
					166 7	

Πίνακας 5.3: Αλληλεπιδράσεις πρωτονίων και γειτονικών ατόμων άνθρακα της ένωσης 14



Εικόνα 5.8: Ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC της ένωσης 14 σε DMSO-d6

Μετά την επεξεργασία όλων των φασματοσκοπικών δεδομένων προκύπτει ο Πίνακας 5.4 με τις χημικές μετατοπίσεις των υδρογόνων και των ανθράκων των τριών διαμορφωμερών.



Πίνακας 5.4: Χημικές μετατοπίσεις υδρογόνων και ανθράκων της ένωσης 14

5.2 Αποτίμηση κορυφών των τελικών ακυλοϋδραζονών

3,4-Διϋδρο-2Η-1,4-βενζοξαζινο-2-υδροξυ-φαινυλο-2-καρβο-υδραζόνη (3)

Παρακάτω ακολουθεί η πλήρης αποτίμηση των κορυφών του διαμορφωμερούς που βρίσκεται σε μεγαλύτερη αναλογία (Μ) σε DMSO-d6. Με τον ίδιο τρόπο γίνεται και η αποτίμηση των κορυφών για το διαμορφωμερές που βρίσκεται σε μικρότερη αναλογία (m).

Στην Εικόνα 5.9 φαίνεται το φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ¹Η της τελικής ένωσης 3. Στο φάσμα αυτό παρατηρούμε, δύο απλές κορυφές στα 11.69 και 11.48 ppm οι οποίες αντιστοιχούν στα αμιδικά πρωτόνια των δύο διαμορφωμερών M και m, αντίστοιχα,ενώ η απλή κορυφή στα 11.09 ppm αντιστοιχεί στο υδροξύλιο και των δύο διαμορφωμερών. Οι απλές κορυφές στα 8.61 και 8.30 ppm αντιστοιχούν στο βινυλικό πρωτόνιο των διαμορφωμερών M και m, αντίστοιχα. Οι κορυφές στα 4.71 και 5.31 ppm είναι διπλές διπλών και αντιστοιχούν στο πρωτόνιο της θέσης C8 στο διαμορφωμερές Μ και m, αντίστοιχα, ενώ οι απλές κορυφές στα 5.89 και 5.79 ppm αντιστοιχούν στο πρωτόνιο της αμίνης του βενζοξαζινικού δακτυλίου στο Μ και m διαμορφωμερές, αντίστοιχα. Τα μεθυλενικά πρωτόνια της θέσης C9 συντονίζονται στα 3.37 ppm (πολλαπλή) και στα 3.49 ppm (τριπλή) για το διαμορφωμερές M, ενώ για το διαμορφωμερές m συντονίζονται στα 3.40 ppm (πολλαπλή) και στα 3.53 ppm (πολλαπλή). Η διαφορά στην πολλαπλότητα των κορυφών των μεθυλενικών πρωτονίων, οφείλεται στο γεγονός ότι αυτά συντονίζονται κοντά στην κορυφή που απορροφά το νερό του DMSO-d6. Όσον αφορά τα αρωματικά πρωτόνια του δακτυλίου της βενζοξαζίνης για το διαμορφωμερές Μ παρατηρούμε δύο διπλές κορυφές στα 6.84 και 6.62 ppm, όπως επίσης και δύο πολλαπλές στα 6.72 και 6.56 ppm, ενώ για την διαμόρφωση που βρίσκεται σε μικρότερη αναλογία (m) παρατηρούμε δύο διπλές κορυφές στα 6.72 και 6.54 ppm, όπως επίσης και δύο πολλαπλές στα 6.67 και 6.56 ppm. Τέλος, για τα αρωματικά πρωτόνια της ακυλοϋδραζόνης παρατηρούμε στα 7.51 ppm (διπλή), 6.92 ppm (διπλή), στα 7.30 ppm (πολλαπλή) και στα 6.91 ppm (πολλαπλή) για το διαμορφωμερές Μ, ενώ για το διαμορφωμερές m παρατηρούμε στα 7.65 ppm (διπλή), στα 6.90 ppm (διπλή), στα 7.24 ppm (τριπλή) και στα 6.84 ppm (πολλαπλή).



Εικόνα 5.9: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 3 σε DMSO-d6. Μεγεθυμένη η περιοχή των πρωτονίων Η10 και Η8 (δεξιά)

Στο φάσμα ¹³C της ένωσης 3 παρατηρούμε ότι για την διαμόρφωση που είναι σε μεγαλύτερη αναλογία (M), οι τεταρτοταγείς άνθρακες συντονίζονται στα 141.9, 134.3, 118.6 ppm, ο βυνιλικός στα 148.8 ppm, οι αρωματικοί στα 157.4, 131.6, 129.4, 121.5, 119.4, 117.1, 116.4, 116.4, 114.9 ppm. O ασύμμετρος άνθρακας στη θέση C8 του δακτυλίου της βενζοξαζίνης συντονίζεται στα 72.9 ppm και ο μεθυλενικός άνθρακας C9 στα 41.8 ppm. O άνθρακας του καρβονυλίου συντονίζεται στα 165.0 ppm. Στην περίπτωση της διαμόρφωσης με τη μικρότερη αναλογία (m) οι τεταρτοταγείς άνθρακες συντονίζονται στα 143.2, 134.2 και 120.1 ppm, ο βυνιλικός στα 141.1 ppm και οι αρωματικοί στα 156.4, 131.3, 126.1, 120.8, 119.45, 117.2, 116.2, 115.8, 115.1 ppm. Τέλος ο ασύμμετρος άνθρακας C8 συντονίζεται στα 70.7 ppm και οι μεθυλενικός άνθρακας του καρβονυλίου συντονίζεται στα 41.4 ppm. Ο άνθρακας του καρβονυλίου συντονίζεται στα 169.1 ppm.



Εικόνα 5.10: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης 3 σε DMSO-d6

Από το ετεροπυρηνικό φάσμα ΗΜΒC παρατηρείται για το διαμορφωμερές Μ ότι το βυνιλικό πρωτόνιο H13 (8.61 ppm) αλληλεπιδρά με τρεις γειτονικούς αρωματικούς άνθρακες που συντονίζονται στα 118.6, 129.4 και 157.4 ppm ταυτοποιηθέντες αντίστοιχα ως C14, C15, C19. Δεδομένου ότι ο άνθρακας C14 δεν συντονίζεται με κάποιο πρωτόνιο στο ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC. είναι τεταρτοταγής άνθρακας προσαρτημένος στον φαινολικό δακτύλιο της ακυλοϋδραζόνης, όπως επίσης και ο άνθρακας που συντονίζεται στα 157.4 ppm C19, ο οποίος είναι αρκετά αποθωρακισμένος που σημαίνει ότι είναι ενωμένος με το υδροξύλιο. Από το φάσμα HSQC παρατηρείται ότι το πρωτόνιο H13 είναι άμεσα συνδεδεμένο με τον άνθρακα που συντονίζεται στα 148.8 ppm και ταυτοποιήθηκε ως C13. Από το φάσμα HMBC παρατηρείται ότι το πρωτόνιο στα 7.51 ppm H15 αλληλεπιδρά με τους άνθρακες στα 116.4, 131.6, 148.8 και 157.4 ppm που ταυτοποιούνται ως C18, C17, C13, C19. Το πρωτόνιο H15 είναι άμεσα συνδεδεμένο με τον άνθρακα στα 129.4 ppm που ταυτοποιείται ως C15. Από το φάσμα HSQC παρατηρείται ότι οι άνθρακες C18 και C17 είναι άμεσα συνδεδεμένοι με τα πρωτόνια στα 6.92 ppm που ταυτοποιημένο ως H18 και 7.30 ppm ταυτοποιημένο ως H17. Στο ετεροπυρηνικό φάσμα ΗΜΒC παρατηρείται ότι το πρωτόνιο Η17 αλληλεπιδρά με τους άνθρακες στα 116.4, 118.6, 129.4 και 157.4 ppm ταυτοποιημένοι αντίστοιχα ως C18, C14, C15, C19, ενώ τα πρωτόνια στα 6.92 ppm ταυτοποιημένο ως H18 και στα 6.91 ppm ταυτοποιημένο ως H16 αλληλεπιδρούν με τους ίδιους άνθρακες στα 118.6, 129.4, 131.6 ppm, το βυνιλικό C13 και τον τεταρτοταγή C19. Από το φάσμα COSY παρατηρείται ότι το πρωτόνιο στα 7.51 ppm ταυτοποιημένο ως H15 αλληλεπιδρά με το γειτονικό του πρωτόνιο στα 6.91 ppm ταυτοποιημένο ως H16, το οποίο με τη σειρά του αλληλεπιδρά με το γειτονικό του πρωτόνιο στα 7.30 ppm ταυτοποιημένο ως H17. Επίσης το πρωτόνιο στα 6.92 ppm ταυτοποιημένο ως H18 αλληλεπιδρά με το γειτονικό του πρωτόνιο στα 7.30 ppm ταυτοποιημένο ως H17, όπως παρατηρούμε από το φάσμα COSY.

Στο φάσμα HMBC παρατηρείται ότι το πρωτόνιο στα 4.71 ppm ταυτοποιημένο ως H8 αλληλεπιδρά με τους άνθρακες στα 41.8, 142.0 και 165.0 ppm ταυτοποιηθέντες αντίστοιχα ως C9, C4, C11. Από το φάσμα HSQC

παρατηρείται ότι το πρωτόνιο H8 είναι άμεσα συνδεδεμένο με τον άνθρακα στα 72.9 ppm ταυτοποιημένος ως C8. Ο άνθρακας C4 δεν συντονίζεται με κάποιο πρωτόνιο στο φάσμα HSQC που σημαίνει ότι είναι τεταρτοταγής. Από το ομοπυρηνικό φάσμα COSY μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι το πρωτόνιο H8 αλληλεπιδρά με τα γειτονικά του πρωτόνια στα 3.37 ppm και 3.49 ppm ταυτοποιημένα ως Η9, όπως επίσης και πως τα πρωτόνια Η9 αλληλεπιδρούν μεταξύ τους στο φάσμα COSY. Τα μεθυλενικά πρωτόνια H9 από το φάσμα ΗΜΒC παρατηρείται ότι αλληλεπιδρούν με τους άνθρακες στα 72.9, 134.3 και 165.0 ppm ταυτοποιηθέντες αντίστοιχα ως C8, C5, C11. Ο άνθρακας C5 δεν συντονίζεται με κάποιο πρωτόνιο στο φάσμα HSQC, οπότε είναι τεταρτοταγής άνθρακας. Το πρωτόνιο ενωμένο στο άζωτο της βενζοξαζίνης στα 5.89 ppm ταυτοποιημένο ως Η10 αλληλεπιδρά με τους άνθρακες στα 72.9, 115.1 και 142.0 ppm ταυτοποιημένοι αντίστοιχα ως C8, C6, C4, ενώ στο ομοπυρηνικό φάσμα COSY παρατηρούμε ότι το πρωτόνιο H10 αλληλεπιδρά με τα γειτονικά πρωτόνια H9. Στο ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC παρατηρούμε ότι ο άνθρακας στα 115.1 ppm ταυτοποιημένος ως C6 είναι άμεσα συνδεδεμένος με το πρωτόνιο στα 6.62 ppm ταυτοποιημένο ως H6, το οποίο πρωτόνιο με τη σειρά του αλληλεπιδρά με τους άνθρακες στα 117.1, 121.5, 134.3 και 142.0 ppm ταυτοποιηθέντες αντίστοιχα ως C2, C1, C5, C4. Από το φάσμα HSQC οι άνθρακες C2 και C1 είναι άμεσα συνδεδεμένοι με τα πρωτόνια στα 6.56 ppm ταυτοποιημένο ως H2 και 6.72 ppm ταυτοποιημένο ως H1, αντίστοιχα. Από το ετεροπυρηνικό φάσμα ΗΜΒC παρατηρείται ότι το πρωτόνιο Η1 αλληλεπιδρά με τους άνθρακες στα 115.1, 116.4, 134.3 και 142.0 ppm ταυτοποιηθέντες αντίστοιχα ως C6, C3, C5, C4, ενώ το πρωτόνιο H2 αλληλεπιδρά με τους άνθρακες στα 115.1, 116.4, 121.6, 134.3 και 142.0 ppm ταυτοποιηθέντες αντίστοιχα ως C6, C3, C1, C5, C4. Από το φάσμα HSQC παρατηρούμε ότι το πρωτόνιο στα 6.84 ppm ταυτοποιημένο ως H3 είναι άμεσα συνδεδεμένο με τον άνθρακα στα 116.4 ppm ταυτοποιημένος ως C3, το οποίο πρωτόνιο με τη σειρά του αλληλεπιδρά με τους άνθρακες στα 121.5, 134.3 και 142.0 ppm ταυτοποιηθέντες αντίστοιχα ως C1, C5, C4, όπως παρατηρείται στο φάσμα HMBC. Από το φάσμα COSY μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι το πρωτόνιο Η2 αλληλεπιδρά με το γειτονικό του πρωτόνιο Η3 και το πρωτόνιο Η6

αλληλεπιδρά με το πρωτόνιο Η1. Έτσι ολοκληρώνεται η πλήρης αποτίμηση όλων των κορυφών της ένωσης **3**.

Στο ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης **3** (Εικόνα 5.11) παρατηρούνται οι παρακάτω αλληλεπιδράσεις μεταξύ γειτονικών πρωτονίων (Πίνακας 5.5).

Major (M)	Minor (m)
3.49 (t, J= 2.9 Hz, 1H) και 4.71 (dd, J=6.9,	3.53 (m, 1H) και 5.79 (s, 1H)
2.9 Hz, 1H)	
3.37 (m, 1H) και 4.71 (dd, J=6.9, 2.9 Hz,	3.40 (m, 1H) και 5.79 (s, 1H)
1H)	
3.49 (t, J= 2.9 Hz, 1H) каı 5.89 (s, 1H)	3.53 (m, 1H) και 5.31 (dd, J=5.1, 3.2
	Hz, 1H)
3.37 (d, J= 11.8 Hz, 1H) και 5.89 (s, 1H)	3.40 (m, 1H) και 5.31 (dd, J=5.1, 3.2
	Hz, 1H)
3.37 (d, J=11.8 Hz, 1H) ка 3.49 (t, J= 2.9	3.40 (m, 1H) και 3.53 (m, 1H)
Hz, 1H)	
6.91 (d, J= 7.2 Hz, 1H) και 7.51 (d, J= 7.6	3.40(m, 1H) και 5.31 (dd, J=5.1, 3.2
Hz, 1H)	Hz, 1H)
6.91 (d, J= 7.2 Hz, 1H), 7.30 (t, J= 8.5 Hz,	6.84 (d, J=7.8 Hz, 1H) και 7.64 (d, J=9
1H) και 7.50 (d, J=7.6 Hz, 1H)	Hz, 1H)
6.54 (m, 1H) και 6.84 (d, J= 7.8 Hz, 1H)	6.90 (d, J=7.9 Hz, 1H) ка 7.24 (t,
	J=7.7 Hz,1H)
6.62 (d, J= 7.9 Hz, 1H) ка 6.72 (t, J= 7.6	6.84 (m, 1H) και 7.24 (t, J=7.7 Hz, 1H)
Hz, 1H)	
	6.54 (m, 1H) και 6.73 (t, J= 7.6Hz, 1H)

Πίνακας 5.5: Αλληλεπιδράσεις γειτονικών πρωτονίων της ένωσης 3



Εικόνα 5.11: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης 3 σε DMSO-d6. Μεγεθυμένη περιοχή μεθυλενικών πρωτονίων (δεξιά)

Στο ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης **3** (Εικόνα 5.12) παρατηρούνται οι παρακάτω αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτονίων και άμεσα συνδεδεμένων ατόμων άνθρακα (Πίνακας 5.6).

Πίνακας 5.6: Αλληλεπιδράσεις πρωτονίων με άμεσα συνδεδεμένους άνθρακες της ένωσης **3**

Majo	r (M)	Minor (m)		
¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)	
3.37 και 3.49	41.8	3.40 και 3.53	41.4	
4.71	72.9	5.31	70.7	
6.62	115.1	6.54	114.9	
6.84	116.4	6.73	115.8	
6.92	116.4	6.56	116.2	
6.54	117.1	6.84	117.2	
τεταρτοταγής	118.6	6.90	119.4	
6.91	119.4	τεταρτοταγής	120.1	
6.72	121.5	6.67	120.8	
7.51	129.4	7.65	126.1	
7.30	131.6	7.24	131.3	
τεταρτοταγής	134.3	τεταρτοταγής	134.2	
τεταρτοταγής	141.9	8.30	141.1	
8.61	148.8	τεταρτοταγής	143.3	
τεταρτοταγής	157.4	τεταρτοταγής	156.4	
	165.0		169.1	


Εικόνα 5.12: Ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης 3 σε DMSO-d6

Στο ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC της ένωσης **3** (Εικόνα 5.9) παρατηρούνται οι παρακάτω αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτονίων και γειτονικών ατόμων άνθρακα (Πίνακας 5.7).

Πίνακας 5.7: Αλληλεπιδράσεις πρωτονίων και γειτονικών ατόμων άνθρακα της ένωσης 3

	Major (M)		Minor (m)	
¹ H(ppm)	¹³ C(ppm)	¹ H(ppm)	¹³ C(ppm)	
3.37/3.49	72.9, 134.3 και 164.9	3.40/3.53	41.4, 70.7, 134.2 και	
			169.1	
4.71	41.8, 142.0 και 164.9	5.32	169.1	
5.89	72.9, 115.1 και 142.0	5.79	70.7 και 143.3	
6.54	115.1, 116.4, 121.6,	6.54	115.8, 134.2 και	
	134.3 και 142.0		143.2	
6.62	117.1, 121.5, 134.3	6.56	115.8, 120.8 και	
	και 141.9		143.2	
6.72	115.1, 116.4, 134.3	6.67	115.8 και 143.2	
	και 141.9			
6.84	121.5, 134.3 και	6.73	114.9, 116.2, 120.8	
	141.9		και 143.2	
6.91/6.92	118.6, 129.4, 131.6,	6.86	120.1 και 156.4	
	148.8 και 157.4			
7.30	118.6, 116.4, 129.4	6.90	131.3 και 156.4	
	και 157.4			
7.51	116.4, 131.6, 148.8	7.24	126.1 και 156.4	
	και 157.4			
8.61	118.6, 129.4 και	7.65	131.3, 141.1 και	
	157.4		156.4	
		8.30	120.1, 126.1 και	
			156.4	



Εικόνα 5.13: Ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC της ένωσης 3 σε DMSO-d6

$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$									
Major	(M)	12	Minor (m)	12					
No	'H(ppm)	¹³ C(ppm)	'H(ppm)	¹³ C(ppm)					
1	6.72	121.5	6.67	120.8					
2	6.54	117.1	6.56	116.2					
3	6.84	116.4	6.73	115.8					
4		141.9		143.3					
5		134.3		134.2					
6	6.62	115.1	6.54	114.9					
8	4.71	72.9	5.31	70.7					
9	3.37	41.8	3.40	41.4					
	3.49		3.53						
10	5.89		5.79						
11		165.0		169.1					
13	8.61	148.8	8.30	141.1					
14		118.6		120.1					
15	7.51	129.4	7.65	126.1					
16	6.91	119.4	6.84	117.2					
17	7.30	131.6	7.24	131.3					
18	6.92	116.4	6.90	119.4					
19		157.4		156.4					
20	11.09		11.09						
21	11.69		11.48						

Πίνακας 5.8: Χημικές μετατοπίσεις υδρογόνων και ανθράκων της ένωσης 3

5.3 Διαμορφωτική ανάλυση της ένωσης 3

Η μελέτη του διαμορφωτικού χώρου ενός μορίου είναι η εύρεση όλων (ή αντιπροσωπευτικών) ενεργειακά χαμηλών διαμορφώσεων του μορίου. Στην περίπτωση των ενώσεων, που συντέθηκαν στα πλαίσια της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής παρατηρούμε την ύπαρξη διαμορφωμερών ως προς το αμιδικό καρβονύλιο (*cis/trans*). Πραγματοποιήθηκε διαμορφωτική ανάλυση της ένωσης **3** με χρήση του προγράμματος Maestro του λογισμικού Schrödinger Suite 2013 με στόχο την εύρεση ενεργειακά χαμηλών διαμορφωμερών (τοπικά ελάχιστα) χαρακτηριστικά της επιφάνειας δυναμικής ενέργειας του μορίου. Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 5.14) περιγράφεται η διαδικασία που ακολουθήθηκε [39].



Εικόνα 5.14: Διαγραμματική αναπαράσταση της πορείας που ακολουθήθηκε για τη διαμορφωτική ανάλυση της ένωσης 3

5.4 Διαμορφωτική ανάλυση της 3,4-διϋδρο-2*Η*-1,4-βενζοξαζινο-2υδροξυ-φαινυλο-2-καρβο-υδραζόνης (3) με τη μέθοδο της Τυχαίας Αναζήτησης

Η μέθοδος τυχαίας αναζήτησης (random sampling) βασίζεται στην αναζήτηση του διαμορφωτικού χώρου του μορίου με τυχαία επιλογή των δίεδρων γωνιών. Οι διαμορφώσεις που προκύπτουν ελαχιστοποιούνται ενεργειακά, όπως συμβαίνει και στην περίπτωση της συστηματικής αναζήτησης. Η τυχαία αναζήτηση σταματά όταν δεν παράγονται νέες διαμορφώσεις ή όταν συμπληρωθεί συγκεκριμένος αριθμός κύκλων [40].

Αρχικά, η ένωση 3, σχεδιάστηκε σε διδιάστατη απεικόνιση (2D) των δύο πιθανών εναντιομερών, τα οποία ελαχιστοποιήθηκαν ενεργειακά (Energy Minimization) με τις ακόλουθες παραμέτρους: Ενεργειακό πεδίο (Force Field) : OPLS 2005, διαλύτης: διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), διηλεκτρική σταθερά μορίου 45 (ώστε να γίνει προσομοίωση του περιβάλλοντος του DMSO, το οποίο είναι ένας αμφοτερικός διαλύτης), αριθμός Επαναλήψεων (Iterations): 1000, κριτήριο Σύγκλισης (Convergence thresshold):0.001 kJ [60], ώστε να απαλειφθούν οι στερεοχημικές παρεμποδίσεις ή επαφές μεταξύ των ατόμων που προκαλούν απώσεις και έδωσαν τις παρακάτω τριδιάστατες απεικονίσεις (3D) (Εικόνα 5.16) [41]. Στη συνέχεια εφαρμόσθηκε προετοιμασία προσδέτη του μορίου (Ligand Preparation) ώστε να βρεθούν οι ταυτομερείς δομές οι οποίες προκύπτουν σε pH 6.4 ± 0.2 [42]. Ακολούθησε διαμορφωτική ανάλυση με τη μέθοδο της Τυχαίας Αναζήτησης. Συγκεκριμένα, από ένα σύνολο 81 διαμορφώσεων, επιλέγηκε μία διαμόρφωση με στερεοχημική απεικόνιση R στο ασύμμετρο κέντρο με αποστάσεις (CH-CONH πρωτόνιο 3.67Å και CH-NH 3.57Å), ενώ για το διαμορφωμερές με στερεοχημική απεικόνιση S υπολογίσθησαν οι αποστάσεις (CH-CONH πρωτόνιο 3.67Å και CH-NH 3.57Å). Η επιλογή των δύο διαμορφώσεων έγινε με βάση ένα σήμα NOESY μεταξύ του αμιδικού πρωτονίου και του πρωτόνιου του C8 όπως μπορούμε να δούμε στο παρακάτω φάσμα.



Εικόνα 5.15: Φάσμα 2D NOESY της ένωσης 3 σε DMSO-d6, στους 25°C, σε φασματογράφο Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) 600 MHz



Εικόνα 5.16: Τριδιάστατη απεικόνιση (3D) των εναντιομερών της ένωσης 3, όπως προέκυψαν από την τυχαία αναζήτηση με βάση τα δεδομένα από φασματοσκοπία 2D NOESY-NMR. Αριστερά απεικονίζεται το (*R*) και δεξιά το (*S*) εναντιομερές

5.5 Διαμορφωτική ανάλυση της ένωσης 3 με τη μέθοδο της Συστηματικής Αναζήτησης

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε συστηματική αναζήτηση στη δίεδρη γωνία του αμιδικού δεσμού τ1 στα δύο εναντιομερή της ένωσης **3**.



Έτσι, προκύπτουν τα παρακάτω ενεργειακά διαγράμματα σε συνάρτηση με την δίεδρη γωνία και οι αντίστοιχες διαμορφώσεις στα ενεργειακά ελάχιστα [39].



Εικόνα 5.17: Ενεργειακό διάγραμμα και διαμορφώσεις στα δύο ενεργειακά ελάχιστα για την τ₁ δίεδρη γωνία της διαμόρφωσης (*R*)



Εικόνα 5.18: Ενεργειακό διάγραμμα και διαμορφώσεις στα δύο ενεργειακά ελάχιστα για την τ₁ δίεδρη γωνία της διαμόρφωσης (*S*)

Πίνακας 5.9: Αποτελέσματα που προέκυψαν από την περιστροφή της δίεδρης γωνίας τ1

Διαμόρφωση	т ₁ (0°-360°)	Ενέργεια (kcal/mol)
(α)-R <i>cis</i> -αμίδιο	0°	21.68
(β)-R <i>trans</i> -αμίδιο	180°	20.04
(γ)-S <i>ci</i> s-αμίδιο	0°	21.64
(δ)-S <i>trans</i> -αμίδιο	180°	20.00

Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε από τα αποτελέσματα της διαμορφωτικής ανάλυσης με τη μέθοδο της συστηματικής αναζήτησης στην περίπτωση της διαμόρφωσης (*R*), κατά την περιστροφή της δίεδρης γωνίας τ1 η απόσταση των υδρογόνων CH-CONH ελαττώνεται και από τα 3.67 Å, φτάνει στα 2.65 Å (Εικόνα 5.19). Έτσι με την περιστροφή της τ1 μπορούμε να τεκμηριώσουμε την εμφάνιση του σήματος NOESY, γιατί τα δύο αυτά πρωτόνια πλησιάζουν αρκετά και μπορούν να εκδηλώσουν αλληλεπιδράσεις μέσω χώρου.





Όπως και στο εναντιομερές *R*, έτσι και στο *S* παρατηρούμε μείωση της απόστασης των πρωτονίων CH-CONH από τα 3.67 Å στα 2.65 Å, κατά την περιστροφή και της δίεδρης γωνίας τ1 (Εικόνα 5.20). Έτσι και για τη συγκεκριμένη διαμόρφωση αποδεικνύεται η εμφάνιση του σήματος NOESY, γιατί τα δύο αυτά πρωτόνια εκδηλώνουν αλληλεπιδράσεις μέσω χώρου, εξαιτίας της χωρικής τους εγγύτητας. Επίσης πρέπει να σημειωθεί ότι το σήμα αυτό συσχετισμού το δίνει μόνο το διαμορφωμερές που βρίσκεται σε περίσσεια.



3.67 Å

2.65 Å

Εικόνα 5.20: (1) αρχική διαμόρφωση, (2) διαμόρφωση στο ενεργειακό ελάχιστο για την S διαμόρφωση στη τ₁ δίεδρη

Επομένως, η χρήση θεωρητικής ανάλυσης συνηγορεί ότι το διαμορφωμερές που παρατηρείται σε μεγαλύτερη αναλογία στο DMSO-d6 είναι το *trans* αμίδιο. Επιπρόσθετα, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [34] ο άνθρακας του αμιδικού καρβονυλίου στο *trans* διαμορφωμερές συντονίζεται σε χαμηλότερο πεδίο από τον αντίστοιχο άνθρακα του *cis* διαμορφωμερούς. Στην περίπτωση των ενώσεων **3-14** ο άνθρακας αυτός συντονίζεται στο διαμορφωμερές που βρίσκεται σε περίσσεια στα 164.5-165.2 ppm ενώ για το διαμορφωμερές που βρίσκεται σε μικρότερη αναλογία στα 169.1-169.9 ppm, δηλαδή παρατηρούμε 4.6-4.7 ppm διαφορά στην χημική μετατόπιση σε χαμηλότερο πεδίο.

5.6Σύγκριση αναλογίας διαμορφωμερών της ένωσης 3 σε διαφορετικούς διαλύτες



Εικόνα 5.21: Φάσμα ¹Η NMR (600 MHz) της ένωσης 3 σε DMSO-d6



Εικόνα 5.22: Φάσμα ¹Η NMR (600MHz) της ένωσης 3 σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο



ακετόνη

Πίνακας 5.10: Ποσοστό trans διαμορφωμερούς σε διαφορετικούς διαλύτες

<i>tran</i> s διαμορφωμερές (%)								
DMSO-d6 CDCl ₃ CD ₃ COCD ₃								
76.5	100	100						

Μετά τη λήψη φασμάτων ¹Η NMR σε διαφορετικούς διαλύτες παρατηρήσαμε ότι η αναλογία των διαμορφωμερών μεταβάλλεται. Σε διαλύτη DMSO-d6 παρατηρούμε την εμφάνιση και των δύο διαμορφωμερών με το *trans* να βρίσκεται σε μεγαλύτερη αναλογία (76.5%). Στην περίπτωση που χρησιμοποιήσαμε διαλύτη δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl₃) και δευτεριωμένη ακετόνη (CD₃COCD₃), παρατηρήσαμε την εμφάνιση ενός μόνο διαμορφωμερούς και μάλιστα του *trans* σε ποσοστό 100%.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΥΒΡΙΔΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ 1,4-ΒΕΝΖΟΞΑΖΙΝΩΝ ΚΑΙ Ν-ΑΚΥΛΟϔΔΡΑΖΟΝΩΝ

Η αποτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης των νέων ενώσεων πραγματοποιήθηκε από την ομάδα της Δρ Marina Sokovic στο Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών "Sinisa Stankovic" στο Βελιγράδι, Σερβία.

6.1 Αντιβακτηριακή δράση

Τα κατά Gram (-) βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι: το Enterobacter cloacae (ανθρώπινη απομόνωση), Escherichia coli (ATCC 35210). Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853), Salmonella typhimurium (ATCC 13311) και κατά Gram (+) βακτήρια, Bacillus cereus (κλινική απομόνωση), Listeria monocytogenes (NCTC 7973), Micrococcus flavus (ATCC 10240) και Staphylococcus aureus (ATCC 6538). Η αποτίμηση της αντιβακτηριακής δράσης πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο μικροαραίωσης (CLSI, 2009). Η μικρότερη συγκέντρωση ουσίας με την οποία δεν παρατηρήθηκε ορατή ανάπτυξη (στο διοπτρικό μικροσκόπιο) του βακτηρίου ορίστηκε ως η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MICs). Η μικρότερη συγκέντρωση ουσίας, η οποία προκαλεί 99,5% θάνατο των βακτηρίων ορίστηκε ως η ελάχιστη βακτηριοστατική συγκέντρωση (MBC). Ως ενώσεις αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν αντιβιοτικά στρεπτομυκίνη αμπισιλλίνη. тα και Πραγματοποιήθηκαν τρία ανεξάρτητα πειράματα και το κάθε ένα επαναλαμβανόταν τρεις φορές. Τα αποτελέσματα της αντιβακτηριακής δράσης των νέων αναλόγων 3-13 παρουσιάζονται στον (Πίνακα 6.1). Τα πιο ευαίσθητα είδη βακτηρίων στις νέες ενώσεις ήταν το Bacillus cerues και το Staphylococcus aureus, ενώ η Listeria monocytogenes ήταν το πιο ανθεκτικό. Ως γενική παρατήρηση, όλες οι νέες ενώσεις είναι ποιό δραστικές από τις ενώσεις αναφοράς. Η παρουσία αλογόνου στον αρωματικό δακτύλιο της υδραζόνης οδηγεί σε ανάλογα με μειωμένη δραστικότητα (9, 10). Τα υδροξυυποκατεστημένα ανάλογα είναι δραστικά, ειδικότερα δε οι ορθο και παραυποκαστημένες ενώσεις **3** και **5**, αντίστοιχα, εμφανίζουν ισχυρότερη δράση σε σχέση με το μετα-ανάλογο **4**. Μεθυλίωση της υδροξυλομάδας (ανάλογα **6**,**7**,**8**) οδηγεί σε μείωση της αντιβακτηριακής δράσης. Η παρουσία θεοφαινίου (ένωση **13**) μειώνει τη δράση σε σχέση με τα πυριδινο-υποκατεστημένα ανάλογα (**11** και **12**) [43].

Ένωση		Staphylococcus aureus (µM)	Bacillus cereus (µM)	Micrococcus flavus (µM)	Listeria monocytogenes (µM)	Pseudomonas aeruginosa (µM)	Salmonella typhimurium (µM)	Escherichia coli (µM)	Enterobacter cloacae (µM)
9 NHN	MIC	166±27.7	111±8.3	166±27.7	111±8.3	111±0.0	111±8.3	166±8.3	166±8.3
	MBC	222±8.3	222±19.4	222±5.6	444±8.3	222±8.3	222±8.3	222±0.0	222±5.6
	MIC	31±0.0	63±0.0	190±9.5	253±0.0	126±9.5	126±9.5	190±31.7	126±22.1
	MBC	126±6.3	126±6.3	253±0.0	506±18.9	253±18.9	253±0.0	253±18.7	253±18.7
3 OH	MIC	16±3.2	16±6.4	67±6.7	134±6.7	16±1.9	33±6.6	67±6.7	33±9.9
	MBC	33±9.9	33±0.0	134±10.1	269±10.1	67±6.7	67±10.1	134±6.7	67±6.7
	MIC	33±6.6	33±6.6	67±10.1	134±10.1	33±9.9	33±0.0	67±0.0	33±6.6
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	MBC	134±0.0	134±10.1	134±6.7	269±0.0	67±10.1	134±6.7	134±10.1	67±6.7

5 ON NHN	MIC	16±6.4	16±0.0	100±20.0	134±0.0	16±2.2	33±9.9	100±20.0	33±6.6
	MBC	33±0.0	33±0.0	134±6.7	269±20.2	33±6.6	134±0.0	134±20.1	134±10.1
	MIC	53±10.6	53±10.6	106±7.1	141±7.1	53±10.6	53±10.1	141±0.0	35±0.0
	MBC	70±7.0	70±10.5	141±0.0	283±7.1	70±0.0	70±21.0	283±7.1	70±7.0
	MIC	35±2.5	35±7.0	212±35.3	212±35.3	17±0.0	35±7.0	106±10.6	35±0.0
	MBC	141±10.6	141±10.6	283±10.6	283±17.7	35±7.0	141±10.6	141±0.0	70±7.0
	MIC	69±6.9	69±6.9	139±0.0	278±10.4	69±10.4	69±10.4	139±10.4	69±10.4
	MBC	139±6.9	139±10.4	278±6.95	556±0.0	139±24.3	139±0.0	278±10.4	139±0.0
6 OCH3	MIC	16±2.9	32±6.4	96±9.6	256±0.0	32±0.0	32±0.0	96±9.6	32±9.6
0									

	MBC	128±0.0	128±0.0	128±9.6	513±9.6	128±9.6	128±3.2	128±9.6	128±9.6
7 NHN OCH3	MIC	48±6.4	64±6.4	96±19.2	128±9.6	64±9.6	64±6.4	128±0.0	64±19.2
o	MBC	64±6.4	128±0.0	128±9.6	256±9.6	128±0.0	128±9.6	256±9.6	128±9.6
	MIC	48±6.4	48±9.6	96±6.4	128±9.6	64±0.0	64±6.4	96±9.6	64±19.2
о осн ₃	MBC	64±9.6	64±6.4	128±0.0	256±22.4	128±19.2	128±0.0	128±0.0	128±9.6
Στρεπτομυκίνη	MIC	85±6.8	171±34.2	257±17.1	257±102.8	257±17.1	257±17.1	257±17.1	429±5.1
	MBC	171±5.1	257±17.1	584±10.3	601±10.3	601±0.0	601±10.3	601±10.3	859±17.2
Αμπικιλλίνη	MIC	715±57.2	715±85.8	715±0.0	1144±28.6	2146±8.6	1144±20.0	715±0.0	1001±20.0
	MBC	1144±25.7	1144±28.6	1058±28.6	1430±8.6	3577±8.6	1430±6.6	1430±8.6	2146±8.6

Πίνακας 6.1: Αντιβακτηριακή δράση των νέων ενώσεων

6.2 Αποτίμηση αντιμυκητιασικής δράσης

0 έλεγχος της αντιμυκητιασικής δράσης των νέων ενώσεων πραγματοποιήθηκε έναντι των μυκήτων Aspergillus fumigatus (ATCC 1022), Aspergillus versicolor (ATCC 11730), Aspergillus ochraceus (ATCC 12066), Aspergillus niger (ATCC 6275), Trichoderma viride (IAM 5061), Penicillium funiculosum (ATCC 36839), Penicillium ochrochloron (ATCC 9112) kai Penicillium verrucosum var. cyclopium (Πίνακας 6.2). Επίσης μελετήθηκε η αντιμυκητισική δράση των νέων ενώσεων σε τρία κλινικά απομονωμένα στελέχη Candida spp. (C. albicans, C. glabrata, C. krusei), και ένα στέλεχος ATCC (Candida albicans ATCC 10231) (Πίνακας 6.3).

Η ελάχιστη ανασταλτική (MIC) και ελάχιστη μυκητοκτόνος (MFC) συγκέντρωση, προσδιορίστηκαν με τυποποιημένη τεχνική μικροαραίωσης, NCCLS 2002, με τροποποίησεις. Ως MIC θεωρήθηκε η χαμηλότερη συγκέντρωση της υπό μελέτη ουσίας, η οποία παρεμποδίζει την ανάπτυξη των μυκήτων μετά από μικροσκοπικό έλεγχο. Η MFC προσδιορίστηκε μετά από σειριακή καλλιέργεια και αντιστοιχεί στη συγκέντρωση που θανατώνει το 99,5% της καλλιέργειας. DMSO (5%) χρησιμοποιήθηκε ως αρνητική ένωση διαθέσιμα αναφοράς. Тα εμπορικά αντιμυκητιασικά μπιφοναζόλη, κετοκοναζόλη και νυστατίνη χρησιμοποιήθηκαν ως θετικές ενώσεις αναφοράς (positive control). Ολες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές και το κάθε πείραμα επαναλαμβανόταν τρεις φορές [44].

Ένωση		Aspegillus fumigatus (μM)	Aspergillus versicolor (µM)	Aspergillus ochraceus (µM)	Aspergillus niger (µM)	Trichoderma viride (μM)	Penicillium funiculosum (µM)	Penicillium ochrochlor on (µM)	<i>Ρνς</i> (μΜ)
9 NHN	MIC	111±8.3	13±0.8	13±0.8	111±8.3	6.94·10 ⁻³ ±5.5·10 ⁻⁴	13±0.8	55±0.0	55±165.0
	MFC	444±8.3	55±16.5	55±8.3	222±8.3	27±27.0	55±8.3	111±8.3	111±5.5
	MIC	253±6.3	31±0.0	31±0.0	126±6.3	31±6.2	15±1.8	31±3.1	63±9.5
	MFC	506±0.0	63±6.3	63±0.0	506±9.5	63±6.3	31±9.3	126±18.9	126±9.5
3 NHN OH	MIC	134±0.0	33±99.0	8.4·10 ⁻³ ±6.7·10 ⁻⁴	67±20.1	8.4·10 ⁻³ ±1.01·10 ⁻³	8.4·10 ³ ±6.7·10 ⁴	33±9.9	67±0.0
	MFC	269±6.7	67±10.1	16±1.9	134±10.1	16±1.9	33±0.0	67±6.7	134±20.1
	MIC	134±10.1	33±6.0	33±6.6	134±0.0	33±9.9	33±0.0	67±10.1	67±20.1
	MFC	269±10.1	67±0.0	67±10.1	538±20.2	67±6.7	67±6.7	134±10.1	134±10.1

	MIC	269±20.2	67±201.0	16±1.9	134±10.1	252±3.4	33±6.6	67±20.1	134±6.7
О	MFC	538±20.2	134±20.1	33±6.6	538±0.0	33±6.6	67±20.1	134±0.0	269±0.0
	MIC	566±10.6	141±10.6	141±7.1	283±10.6	35±0.0	70±10.5	283±10.6	283±10.6
	MFC	1133±24.8	283±7.1	283±10.6	1133±20.8	70±10.5	283±10.6	566±10.6	566±35.4
	MIC	212±35.3	35±10.5	17±0.7	70±0.0	14±2.5	17±0.0	70±14.0	141±10.6
	MFC	283±10.6	70±17.5	35±10.5	141±7.1	17±0.7	35±10.5	141±7.1	283±10.6
	MIC	556±20.8	139±0.0	139±20.9	556±20.9	34±10.2	52±10.4	278±0.0	278±0.0
	MFC	1113±34.8	278±6.9	278±6.9	1113±3.5	69±0.0	69±10.4	556±24.3	556±10.4

6 OCH3	MIC	96±19.2	16±0.0	16±0.9	64±9.6	8.03·10 ⁻³ ±0.0	16±0.9	32±6.4	32±6.4
	MFC	128±9.6	64±19.2	64±9.6	128±19.2	32±6.4	32±0.0	64±9.6	128±9.6
7 NHN OCH3	MIC	256±0.0	64±9.6	64±9.6	256±19.2	32±9.6	64±9.6	128±9.6	128±6.4
))	MFC	513±9.6	128±0.0	128±0.0	513±32.1	64±9.6	128±9.6	256±6.4	256±9.6
8 NHN	MIC	128±9.6	32±9.6	16±0.6	96±19.2	8.03·10 ⁻³ ±9.6·10 ⁻⁴	16±9.6	64±9.6	128±19.2
O O O OCH3	MFC	256±0.0	64±9.6	32±9.6	128±9.6	16±0.0	64±0.0	128±0.0	256±0.0
Κετοκουαζόλη	MIC	376±56.4	376±56.4	282±18.8	376±56.4	1881±18.8	376±0.0	1881±376.2	2822±188.1
κειοκοναζολη	MFC	940±37.6	940±37.6	376±37.6	940±56.4	2822±131.7	940±56.4	2822±56.4	3763±188.2
Μπιφογαζόλη	MIC	483±64.4	322±96.6	483±0.0	483±96.6	483±64.4	644±96.6	644±0.0	644±64.4
ικιτιφοναζολη	MFC	644±0.0	644±64.4	644±64.4	644±96.6	644±96.6	805±0.0	805±64.4	966±96.6

Πίνακας 6.2: Αντιμυκητιασική δραστικότητα των νέων ενώσεων σε μύκητες του γένους Aspergillus

Όλοι οι μύκητες έδειξαν ευαισθησία στις δοκιμές των παραπάνω ενώσεων (Πίνακας 6.2). Ο πιο ευαίσθητος μύκητας ήταν το *Trichoderma viride*, ενώ ο *Aspergillus fumigatus* ήταν ο πιο ανθεκτικός μύκητας στις δοκιμαζόμενες ενώσεις. Τα εμπορικά διαθέσιμα προϊόντα μπιφοναζόλη και κετοκοναζόλη σε ήταν λιγότερο δραστικά από τις ενώσεις **3-13**. Υπάρχουν μόνο λίγες εξαιρέσεις στην περίπτωση του *Α. fumigatus*, όπου οι ενώσεις **11** και **13** εμφάνισαν μικρότερη ανασταλτική και μυκητοκτόνο δράση από ό,τι η μπιφοναζόλη. Η ισχυρότερη αντιμυκητιασική δραστικότητα παρατηρείται για την ένωση **3**, ενώ η ένωση **11** παρουσίαζε τη μικρότερη βιολογική δράση [45].

6.3 Αντιμυκητιασική δραστικότητα σε μύκητες του γένους Candida

Kλινικές απομονώσεις των *C. albicans*, *C. krusei* και *C. glabrata*, καθώς και *C. albicans* (ATCC 10231), αποδείχθησαν ότι είναι ευπαθείς στα νέα ανάλογα (Πίνακας 6.3). Οι παράμετροι ευαισθησίας έδειξαν ότι χαμηλότερη ευαισθησία στις νέες ενώσεις έδειξε *C. Albicans*, ενώ ο C. krusei, ήταν ο πιο ευπαθής. Έτσι, σύμφωνα με την ευαισθησία που εμφανίζουν τα είδη *Candida* που δοκιμάστηκαν μπορούν να διαταχθούν στην παρακάτω σειρά: *C. krusei* > *C. glabrata* > *C. albicans* (ATCC 10231).

Ανάμεσα σε όλες τις ενώσεις που δοκιμάστηκαν, με βάση τις τιμές MIC και MFC βρέθηκε ότι είναι η ένωση **3** είναι η πιο δραστική. Η λιγότερο δραστική ένωση είναι η **4**.

Όλα τα ανάλογα που δοκιμάστηκαν εμφάνισαν ισχυρότερη αντιμυκητιασική δράση από τα εμπορικά διαθέσιμα προϊόντα κετοκοναζόλη, μπιφοναζόλη και νυστανίνη, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως ενώσεις αναφοράς, με εξαίρεση την ένωση **4**, η οποία έδειξε ελαφρώς μικρότερη δράση από την κετοκοναζόλη και τη νυστατίνη (Πίνακας 6.3).

Ένωση		Candida albicans clinical (µM)	Candida albicans ATCC (10231) (µM)	Candida glabrata clinical (μΜ)	Candida krusei clinical (µM)
9 NHN	MIC	55±8.3	27±0.0	55±0.0	166±8.3
	MFC	111±8.3	55±8.3	111±5.6	222±5.6
	MIC	126±6.3	126±6.3	253±18.9	253±9.5
	MFC	253±9.5	230±8.6	506±18.9	506±18.9
3 OH	MIC	67±0.0	16±0.7	67±10.1	67±0.0
	MFC	134±6.7	33±0.0	134±0.0	134±0.0
	MIC	67±6.7	67±6.7	201±10.1	538±10.1
	MFC	269±0.0	134±16.8	269±6.7	1076±33.6

	MIC	33±6.6	33±9.9	100±6.7	134±6.7
О	MFC	134±6.7	67±10.1	134±20.1	269±0.0
	MIC	35±7.0	106±0.0	106±0.0	70±7.0
	MFC	141±10.6	141±7.1	141±7.1	141±10.6
	MIC	159±7.1	44±10.6	159±10.6	88±10.6
	MFC	336±7.1	88±7.0	336±106.1	177±10.6
	MIC	87±6.9	43±0.0	87±3.5	87±2.8
	MFC	156±10.4	156±10.4	156±6.9	174±6.9
6 OCH3	MIC	80±6.4	40±0.6	80±6.4	80±1.9

	MFC	144±6.4	80±0.0	144±0.0	160±0.0
	MIC	144±9.6	80±6.4	80±6.4	80±0.9
	MFC	305±0.0	144±6.4	144±9.6	160±9.6
8 NHN	MIC	192±9.6	80±0.0	192±.9.6	80±6.4
	MFC	256±6.4	192±12.8	256±0.0	192±0.0
	MIC	376±0.0	376±37.6	282±0.0	376±37.6
κειοκοναζολη	MFC	940±37.6	940±56.4	376±37.6	940±0.0
M 7(),	MIC	480±64.0	322±64.4	483±9.7	483±0.0
ικιτιφυναζυλη	MFC	644±0.0	644±96.6	644±96.6	644±96.6
Νυστατίνη	MIC	650±32.5	129±7.5	129±10.8	269±21.5
	MFC	129±6.5	269±0.0	269±21.5	539±32.3

Πίνακας 6.3: Αντιμυκητιασική δράση των ενώσεων 3-13 έναντι μυκήτων του γένους Candida

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΙΘΑΝΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

7.1 Εισαγωγή: Ένζυμο CYP51

Το κυτόχρωμα P450 γνωστό ως CYP51 ανήκει στην οικογένεια των ενζύμων που περιλαμβάνει περισσότερα από 9000 πρωτεΐνες καθώς επίσης και μόριο αίμης, γι'αυτό ανήκει και στην οικογένεια των αιμοπρωτεϊνών. Απαντάται σε όλες τις μορφές ζωής, όπως τα ζώα, τα φυτά, τα βακτήρια, στους μύκητες και τον άνθρωπο. Είναι το ένζυμο κλειδί για τη βιοσύνθεση της χοληστερόλης στα ζώα, εργοστερόλης στους μύκητες και φυτοστερόλης στα φυτά (Εικόνα 7.1). Στην περίπτωση των μυκήτων, το εν λόγω ένζυμο παίζει ουσιαστικό ρόλο δεδομένου ότι η εργοστερόλη είναι απαραίτητο συστατικό των κυτταρικών τους μεβρανών. Επομένως, η αναστολή του ενζύμου CYP51 (14αδιμεθυλάση της λανοστερόλης) έχει αποτελέσει βασικό στόχο στο σχεδιασμό νέων αντιμυκητιασικών ενώσεων [46].



Εικόνα 7.1: α) Λανοστερόλη, β) Εργοστερόλη, γ) Χοληστερόλη

Από τη βιβλιογραφία, οι περισσότεροι αναστολείς του ενζύμου σχηματίζουν σύμπλοκο με το άτομο του σιδήρου της αίμης. Συνήθως οι αναστολείς περιλαμβάνουν υποκατεστημένα ιμιδαζόλια και άλλες ετεροκυκλικές ενώσεις. Το σύμπλοκο δημιουργείται μεταξύ του ελεύθερου ζεύγους ηλεκτρονίων του ετεροατόμου του αναστολέα με το κενό τροχιακό του σιδήρου με αποτέλεσμα την αλλαγή του σθένους σιδήρου από δισθενή σε τρισθενή (Εικόνα 7.2) [47].



Εικόνα 7.2: Σύμπλοκο αναστολέα με το σίδηρο

7.2 Μέτρηση της ικανότητας πρόσδεσης των νέων ενώσεων στο ένζυμο CYP51

Τα πειράματα μέτρησης της ικανότητας πρόσδεσης των νέων ενώσεων στο ένζυμο CaCYP51 καθώς και η μελέτη αλληλεπίδρασης της ένωσης **12** στο «εν λόγω» ένζυμο με χρήση STD-NMR, πραγματοποιήθηε από την ομάδα της Δρ Simona Golič Grdadolnik στο Εθνικό Ινστιτούτο Χημείας στη Λιουμπλιάνα, Σλοβενία.

Δεδομένου ότι οι ενώσεις έδειξαν δράση έναντι στελεχών της *Candida* θεωρήσαμε σκόπιμο να μελετήσουμε το μηχανισμό δράσης στο ένζυμο CYP51. Η ικανότητα πρόσδεσης των νέων ενώσεων **3-13** στο ένζυμο CYP51 απομονωμένο από *Candida albicans* προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά. Περιληπτικά, 1μM CYP51 τιτλοδοτήθηκε σταδιακά με την υπό μελέτη ουσία μέχρι να επιτευχθεί η μέγιστη απορρόφηση. Τα φάσματα ελήφθησαν σε εύρος 350-500 nm και οι μεταβολές που προκλήθηκαν από την πρόσδεση των ενώσεων στο ένζυμο καταγράφησαν ως απόκριση οπτικής διαφοράς τύπου II, με μέγιστο στα 428 nm εως τα 411 nm. Το κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές. Ο προσδιορισμός της φαινόμενης σταθεράς διάστασης (*K*_d) πραγματοποιήθηκε με χρήση του προγράμματος GraphPad Prism και εφαρμογή της συνάρτησης μη γραμμικής παλινδρόμησης.

Από τις ενώσεις **3-13**, οι οποίες μελετήθηκαν μόνο τα πυριδινουποκατεστημένα ανάλογα **11** και **12** εμφάνισαν δράση. Στην Εικόνα 7.3 φαίνεται η απόκριση του CaCYP51 στην ένωση **12**.



Εικόνα 7.3: Φασματοσκοπική απόκριση Τύπου ΙΙ του απομονωμένου CaCYP51 (1 μM) στην ένωση 12 (10-600 μM). Ως ένθετη εμφανίζεται η καμπύλη τιτλοδότησης (ΔΑ = ΔΑ₄₂₈₋₄₁₁)

Πίνακας 7.1: Προσδιορισμός φαινόμενης σταθεράς διάστασης (*K_d*) για το ένζυμο CYP51 από Candida albicans

Ενωση	λ _{max} (nm)	λ _{min} (nm)	ΔA _{max} /nmol	Candida albicans CYP51
				<i>K</i> _d (μM)
12	428	411	0,038	53,6±7,0
11	427	411	0,024	741,9±110,2

Περαιτέρω εξετάστηκε η εκλεκτικότητα των ενώσεων **11** και **12** στο ένζυμο του μύκητα έναντι του αντίστοιχου ενζύμου απομονωμένου από βοοειδή και από ανθρώπους.

Πίνακας 7.2: Προσδιορισμός φαινόμενης σταθεράς διάστασης (*K*_d) για το ένζυμο CYP51 βοδιού

Ενωση	λ _{max} (nm)	λ _{min} (nm)	ΔA _{max} /nmol	Bovine CYP51 <i>K</i> d (μM)
12	428	412	0,015	325,1±33,8
11	-	-	-	Καμία απόκριση μέχρι συγκέντρωση 1600 μΜ

Πίνακας 7.3: Προσδιορισμός φαινόμενης σταθεράς διάστασης (*K*_d) για το ένζυμο CYP251 από άνθρωπο

Ενωση	λ _{max} (nm)	λ _{min} (nm)	ΔA _{max} /nmol	Human CYP251 <i>K</i> d (µM)
12	-	-	-	Καμία απόκριση μέχρι συγκέντρωση 1600 μΜ
11	-	-	-	Καμία απόκριση μέχρι συγκέντρωση 900 μΜ

Ειδικότερα η ένωση **12** εμφανίζει $K_d = 53,6 \pm 7,0$ μM για το ένζυμο CYP51 απομονωμένο από *Candida albicans*, $K_d = 325,1 \pm 33,8$ μM για το ένζυμο CYP51 βοδιού και $K_d > 1600$ μM για το ανθρώπινο ένζυμο CYP51 γεγονός το οποίο υποδηλώνει εκλεκτικότητα για το ένζυμο από τον μύκητα και επομένως πιθανώς μειωμένες παρενέργειες.

7.3 NMR Διαφορικής Μεταφοράς Κορεσμού (Saturation-Transfer-Difference-STD)

Στη συνέχεια χρησιμοποίηθηκε η τεχνική STD-NMR ως μια φασματοσκοπική μέθοδος επιβεβαίωσης της αλληλεπίδρασης της ένωσης **12** με το ένζυμο CYP51 της *C.albicans.*

Η φασματοσκοπική τεχνική STD-NMR έχει αναδειχθεί ως η πλέον δημοφιλής για την μελέτη των αληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-προσδέτη. Η επιτυχία αυτής της τεχνικής έγκειται στο γεγονός ότι επικεντρώνεται στα σήματα του προσδέτη, χωρίς την ανάγκη επεξεργασίας πληροφοριών σχετικά με τις κορυφές της πρωτεΐνης, χρησιμοποιώντας έτσι μόνο μικρές ποσότητες μη επισημασμένου μακρομορίου [48].

Η μέθοδος βασίζεται στη μεταφορά της μαγνήτισης από την πρωτεΐνη στο δεσμευμένο προσδέτη, η οποία ανιχνεύεται κατά την αποδέσμευσή του από την πρωτεΐνη εμφανίζοντας τις κορυφές του στο φάσμα πρωτονίου (Εικόνα 7.4).



Εικόνα 7.4: Απεικόνιση της φασματοσκοπικής τεχνικής STD-NMR

Αντίθετα, μόρια τα οποία δεν προσδένουν στην πρωτεΐνη, δεν εμφανίζουν κορυφές στο φάσμα STD-NMR. Το μόριο προσδέτης χρησιμοποιείται σε μία

περίπου 100-πλάσια γραμμομοριακή περίσσεια έναντι της πρωτεΐνης (Εικόνα 7.5) [49].

Τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι:

- ✓ Απαιτείται μικρή ποσότητα μη επισημασμένης πρωτεΐνης, που κυμαίνεται σε 1-50 μΜ (25μg - 1,25 mg για μία πρωτεΐνη MB = 50 kDa σε 0.5 ml διαλύματος).
- Απαιτείται μικρή ποσότητα από την ένωση-προσδέτη (Ligand) (L), και συνήθως, περίσσεια σε σχέση με τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης στόχου (Target) (T) της τάξης του [T]: [L] ~ 1:100.



Εικόνα 7.5: α) Φάσμα ¹Η NMR, β) Κορεσμός σημάτων πρωτεΐνης, γ) STD-NMR

Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε στην Εικόνα 7.5, σε κάθε μία ένωση δυνάμει προσδέτη, αντιστοιχεί το φάσμα ¹Η NMR που την χαρακτηρίζει (Εικόνα 7.5α). Κάποιες από αυτές τις ενώσεις εμφανίζουν ικανότητα πρόσδεσης και κάποιες όχι. Κατά την ακτινοβόληση της πρωτεΐνης προκαλείται κορεσμός των σημάτων της (Εικόνα 7.5β) με αποτέλεσμα τα σήματα της πρωτεΐνης να έχουν πλέον απαλειφθεί και να παρατηρούνται μόνο τα σήματα του μορίου που προσδένει (Εικόνα 7.5γ).



Εικόνα 7.7: STD-NMR της ένωσης 12 σε DMSO-d6 παρουσία του ενζύμου CaCYP51

Στην Εικόνα 7.6 παριστάνεται το φάσμα ¹Η NMR για την ένωση **12**, όπου παρατηρούνται οι απορροφήσεις όλων των πρωτονίων της ένωσης και στο STD-NMR (Εικόνα 7.7), εμφανίζονται οι κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια της ένωσης **12**, η οποία προσδένεται στο ένζυμο CaCYP51. Έτσι με τη μέθοδο αυτή αποδεικνύεται η πρόσδεση της συγκεκριμένης ένωσης στο ενζυμο CYP51 απομονωμένο από το *C.albicans*.
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΙΘΑΝΟΥ ΤΡΟΠΟΥ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 12 ΣΤΟ ΕΝΕΡΓΟ ΚΕΝΤΡΟ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ CaCYP51

Δεδομένου ότι η ένωση **12** έδειξε σημαντική ικανότητα πρόσδεσης στο ένζυμο CYP51 του *C. albicans*, όπως περιγράφηκε παραπάνω προχωρήσαμε στη μελέτη του πιθανού τρόπου αλληλεπίδρασής της με το ενεργό κέντρο του ενζύμου χρησιμοποιώντας τεχνικές μοριακής πρόσδεσης.

8.1 Εισαγωγή στη Μοριακή Πρόσδεση

Η μοριακή πρόσδεση (Molecular Docking) ορίζεται ως η πρόβλεψη της δομής ενός συμπλόκου, που προκύπτει από την πρόσδεση ενός μορίου προσδέτη σε ένα μεγαλύτερο μόριο (συνήθως πρωτεϊνικά μόρια, ένζυμα και υποδοχείς). Ο προσδέτης αναφέρεται κυρίως σε φαρμακευτικά μόρια ή δυνάμει φαρμακευτικά μόρια, όπου η γνώση των αλληλεπιδράσεών τους με το μακρομόριο στόχο σε μοριακό επίπεδο είναι ουσιαστική, προκειμένου να σχεδιασθούν καινοτόμα μόρια με βελτιωμένη φαρμακευτική δράση. Δεδομένου ότι ο πρωτεϊνικός στόχος είναι ένα μεγάλο μόριο, είναι λογικό πως το φαρμακευτικό μόριο θα προσδενεται σε κάποια συγκεκριμένη περιοχή του, η οποία ονομάζεται θήκη πρόσδεσης ή ενεργό κέντρο [40].

8.2 In silico μελέτη της ικανότητας πρόσδεσης (docking) βιοδραστικών μορίων στο ενεργό κέντρο του ενζύμου CYP51

Δημιουργία μοντέλου πρωτεΐνης

Για τις μελέτες μοριακής πρόσδεσης χρησιμοποιήθηκε το ομόλογο μοντέλο του κυτοχρώματος P450 14α-διμεθυλάσης της λανοστερόλης (CYP51) του *Candida albicans* με κωδική ονομασία Q9P4W0 από τη βάση UNIPROT. Το ομόλογο μοντέλο, έχει βασιστεί στην κρυσταλλική δομή της ομόλογης πρωτεΐνης του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης (ανάλυση 2,1Å, PDB ID: 1E9X). Επειδή το ομόλογο μοντέλο δεν περιλάμβανε το μόριο της αίμης ούτε και κάποιον αναστολέα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, πραγματοποιήθηκε μεταφορά τους από το μοντέλο του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης δυματίωσης. Στο συγκεκριμένο μοντέλο, το ένζυμο έχει συγκρυσταλλωθεί με ένα μόριο αίμης που περιέχει τρισθενή σίδηρο (Fe³⁺) όπως και με τον αναστολέα 4-φαινυλ-ιμιδαζόλη.

Προετοιμασία πρωτεΐνης για τις μελέτες μοριακής πρόσδεσης

Χρησιμοποιήθηκε η ρουτίνα προετοιμασίας της πρωτείνης (protein preparation wizard) του λογισμικού Maestro. Συγκεκριμένα, τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται ακολούθως:

α) Προσδιορισμός της σειράς των δεσμών (assign bond orders): Η επιλογή αυτή χρησιμεύει στον προσδιορισμό της σειράς των δεσμών των αμινοξέων και ελέγχει αν υπάρχουν ασύνδετα αμινοξέα στην πεπτιδική αλυσίδα.

β) Προσθήκη ατόμων υδρογόνου: Η επιλογή αυτή χρησιμεύει στην προσθήκη όλων των ατόμων υδρογόνου στη μοριακή δομή. Τα άτομα υδρογόνου βοηθούν στον καθορισμό του ιοντισμού και της ταυτομέρειας των αμινοξέων.

γ) Βελτιστοποίηση της πρωτεϊνικής δομής με χρήση αλγορίθμων ελαχιστοποίησης της ενέργειας, μεταβάλλοντας μονο τις θέσεις των ατόμων υδρογόνου των αμινοξέων της πρωτεΐνης.



Εικόνα 8.1: Τριδιάστατη δομή του ενζύμου CYP51 από το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης στο οποίο έχει βασιστεί η δομή του ομόλογου μοντέλου από τον Candida albicans



Εικόνα 8.2: Τριδιάστατη δομη του ενζύμου CYP51 από Candida albicans που χρησιμοποιήθηκε για τις μελέτες πρόσδεσης. Στο ενεργό κέντρο φαίνεται ο πορφυρινικός δακτύλιος της αίμης

<u>Προετοιμασία των ενώσεων 3, 11 και 12 για τις μελέτες μοριακής</u> <u>πρόσδεσης</u>

Πραγματοποιήθηκε προετοιμασία των παραπάνω ενώσεων με χρήση της ρουτίνας LigPrep 2.6 και Glide 5.8 του λογισμικού Maestro 9.3 - Schrödinger Suite 2013. Οι ενώσεις προετοιμάστηκαν στο pH βέλτιστης δράσης του ενζύμου (pH=6.4) και η ελαχιστοποιήση της ενεργείας τους έγινε με τη χρήση του υποπρογράμματος Macromodel χρησιμοποιώντας το πεδίο δυνάμεων OLPS 2005.

8.3 Πειράματα Μοριακής Πρόσδεσης

Τα πειράματα μοριακής πρόσδεσης έγιναν στα ακόλουθα μόρια: **3**, **11** και **12**. Οι ενώσεις **11** και **12** αλληλεπιδρούν με το ένζυμο CYP51 ενώ η ένωση **3** εμφανίζει ισχυρή δράση έναντι στελεχών *Candida* αλλά δεν προσδένεται στο ένζυμο CYP51 όπως προέκυψε από τα πειράματα *in vitro* που αναφέρονται στο κεφάλαιο 6. Κατά τη διαδικασία πρόσδεσης εφαρμόστηκαν οι ακόλουθες τεχνικές: α) πρότυπη ακρίβεια (Standard Precision-SP), β) μοριακή πρόσδεση με τη χρήση του μοντέλου της επαγόμενης προσαρμογής (Induced Fit Docking-IFD). Η πρώτη τεχνική δεν εισάγει διαμορφωτική ευκαμψία στο ένζυμο, ενώ η δεύτερη εισάγει ευκαμψία στις πλευρικές ομάδες των αμινοξέων του ενζύμου. Ο διαμορφωτικός χώρος όπου έγινε η πρόσδεση των ενώσεων ορίστηκε ως ένας κύβος διαστάσεων 10x10x10 Å.



Εικόνα 8.3: Ενώσεις που μελετήθηκαν για την ικανότητα πρόσδεσης τους

Ως κριτήριο επιτυχούς αποτελέσματος των «εν λόγω» μελετών θεωρείται η απόσταση των ενώσεων από το σίδηρο της αίμης και η αλληλεπίδραση κάποιου ετεροατόμου (άζωτο ή οξυγόνο) του μορίου με τον τρισθενή σίδηρο. Καθοριστικής σημασίας είναι και η τιμή της ενέργειας πρόσδεσης (ελεύθερη ενέργεια Gibbs) που οφείλεται κυρίως στις υδρόφοβες και ιοντικές αλληλεπιδράσεις συμπεριλαμβανομένων των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των αμινοξέων της πρωτεΐνης και των προσδετών. Τέτοιου είδους δεσμοί ενισχύουν τη σταθερότητα του συμπλόκου προσδέτη-υποδοχέα, οδηγώντας πιθανώς σε επιτυχέστερη αναστολή του ενζύμου.

8.4 Αποτελέσματα μελετών μοριακής πρόσδεσης

Στα τριδιάστατα μοντέλα παρουσιάζεται το μόριο-προσδέτης στη διαμόρφωση που προβλέπεται υπολογιστικά πως θα λάβει κατά την πρόσδεσή του στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Στα διαγράμματα αλληλεπιδράσεων παρουσιάζεται ο προσδέτης καθώς και τα αμινοξέα του υποδοχέα που βρίσκονται σε απόσταση ως και 5Å.

Χημικές Δομές	Ενέργεια Μοριακής Πρόσδεσης (kcal/mol)	Βαθμονόμησης Μοριακής Πρόσδεσης (kcal/mol)	Απόσταση από Fe (Å)	π-π αλληλεπιδράσεις μεταξύ δακτυλίου φαινόλης ή πυριδίνης με την HIS310
OH O O O O O O O O O O O O O O O O O O	(R) – <i>trans</i> αμίδιο -38.584	(R) <i>– trans</i> αμίδιο -7.163	5.76	OXI
	(R) – <i>trans</i> αμίδιο	(R) – <i>trans</i> αμίδιο	4.06	OXI
	-41.255	-7.363		
	(S) – <i>trans</i> αμίδιο	(S) – <i>trans</i> αμίδιο	4.50	NAI
	-15.199	-5.672		
	(R) – <i>cis</i> αμίδιο	(R) – <i>cis</i> αμίδιο	3.30	NAI
	-18.957	5.910		
	(S) – <i>trans</i> αμίδιο	(S) – <i>trans</i> αμίδιο	3.33	NAI
	-14.915	-5.560		

Πίνακας 8.1: Ενέργεια πρόσδεσης και βαθμονόμηση αποτελεσμάτων μοριακής πρόσδεσης αντιπροσωπευτικών μορίων βενζοξαζινών/ακυλοϋδραζονών. Στον πίνακα αναγράφονται και σημαντικές παρατηρήσεις που καθορίζουν τον τρόπο πρόσδεσης των μορίων









Εικόνα 8.4: Διαγράμματα αλληλεπιδράσεων μοριακής πρόσδεσης: (Ι) εναντιομερές (*R*)-trans της ένωσης 3, (ΙΙ) εναντιομερές (*R*)-trans της ένωσης 11, (ΙΙΙ) εναντιομερές (*S*)-trans της ένωσης 11, (ΙV) εναντιομερές (*R*)-cis της ένωσης 12, (V) εναντιομερές (*S*)-trans της ένωσης 12

Με πράσινο χρώμα συμβολίζονται οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, με γαλάζιο οι πολικές, με ροζ το ανιόν, με μωβ το κατιόν, με μπλε η αλληλεπίδραση με μέταλλο και με πράσινη γραμμή οι π-π αληλεπιδράσεις. Στην περίπτωση της ένωσης **12**, παρατηρείται ότι το άζωτο του δακτυλίου της ακυλοϋδραζόνης προσεγγίζει τον σίδηρο της αίμης σε απόσταση 2.48Å, ενώ το αμινοξύ της HIS310 εκδηλώνει π-π αλληλεπίδραση με το δακτύλιο της ακυλοϋδραζόνης. Η π-π αλληλεπίδραση με το αμινοξύ της HIS310 διατηρείται και στην περίπτωση του (*S*)-*trans* εναντιομερούς της ένωσης **11**. Έτσι συμπεραίνεται ότι τα «εν λόγω» μόρια εισέρχονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και ο δακτύλιος της άκυλοϋδραζόνης που φέρει το άζωτο, προτιμά να πλησιάζει το μόριο της αίμης. Στη συνέχεια εφαρμόσαμε μοριακή πρόσδεση με τη χρήση του μοντέλου επαγόμενης προσαρμογής (Induced Fit Docking-IFD) για τις ενώσεις **3-13** από την οποία προέκυψαν τα κάτωθι αποτελέσματα: α) οι ενώσεις (δραστικές και μη) εμφάνισαν περισσότερες και διαφορετικές διευθετήσεις στο ενεργό κέντρο σε σχέση με την τεχνική SP, β) καμία διευθέτηση δεν περιλάμβανε αλληλεπίδραση με τον δακτύλιο της αίμης και γ) ο δεσμός –N-N- εμφάνιζε cis διαμόρφωση κάτι που όπως αναλύθηκε ανωτέρω δεν υφίσταται για τη συγκεκριμένη κατηγορία ενώσεων.



Εικόνα 8.5: Θέση του μορίου της 3,4-διϋδρο-2*H*-1,4-βενζοξαζίνο-4-πυριδινο-2-καρβο-υδραζόνης (**12**) στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

9.1 Όργανα – Διαλύτες – Αντιδραστήρια

Τα φάσματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) ¹Η ελήφθησαν σε φασματογράφο Varian 600 MHz και τα φάσματα ¹³C σε φασματογράφο Varian 300 MHz. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO-d6). Οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων (δ) μετρήθηκαν με βάση το διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε (2.5 ppm για το ¹Η και 39.5ppm για τον ¹³C).

Για την λήψη των φασμάτων ¹Η των ενώσεων **3-13** χρησιμοποιήθηκαν οι εξής παράμετροι: εύρος (spectral width): 7576 Hz, αριθμός σαρώσεων (number of scans): 16, ενώ για την ένωση 14 χρησιμοποιήθηκαν εύρος (spectral width): 10870 Hz, αριθμός σαρώσεων (number of scans): 16. Για τη λήψη των φασμάτων δύο διαστάσεων χρησιμοποιήθηκαν οι εξής παράμετροι: α) gCOSY: εύρος (spectral width): 7576 Hz, αριθμός σαρώσεων (number of scans): 16, $\pi\epsilon_i \rho \alpha \mu \alpha \tau_i \kappa \dot{\alpha}$ on $\mu\epsilon_i \dot{\alpha}$ (increments): 256, β) ghsqcad: $\epsilon \dot{\nu} \rho \rho \zeta^{-1} H$ (spectral width): 7576 Hz, εύρος ¹³C (spectral width): 30166 Hz, αριθμός σαρώσεων (number of scans): 16, πειραματικά σημεία (increments): 400, γ) ghmbcad: εύρος ¹H (spectral width): 7576 Hz, εύρος ¹³C (spectral width): 36199 Hz, αριθμός σαρώσεων (number of scans): 32, πειραματικά σημεία (increments): 400. Τα φάσματα μάζας ελήφθησαν σε φασματογράφο LC-MSn Fleet Thermo και ο ιοντισμός των ουσιών έγινε μέσω της τεχνικής ηλεκτροψεκασμού (ESI Electron Spray Ionisation). Επίσης τα φάσματα μάζας UHPLC-MSn Orbitrap Velos-Thermo και ο ιοντισμός των ουσιών έγινε μέσω της τεχνικής ηλεκτροψεκασμού (ESI). Οι αντιδράσεις με την επίδραση μικροκυμάτων πραγματοποιήθηκαν σε αντιδραστήρα CEM Discover LabMate. Για τη χρωματογραφία στήλης υπό πίεση χρησιμοποιήθηκε silica gel (200-400 mesh). Για την χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας χρησιμοποιήθηκαν πλάκες με επίστρωση γέλης πυριτίου τύπου Merck F254. Τα σημεία τήξεως προσδιορίστηκαν σε συσκευή μέτρησης σημείου τήξεως Buchi 510.

3,4-Διϋδρο-2Η-1,4-βενζοξαζίνο-2-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (1) [50]



Σε διάλυμα 2-αμινοφαινόλης (I) (18,32 mmol, 2 gr) σε 25 mL ξηρής ακετόνης στους 40 °C προστίθεται ανθρακικό κάλιο (12,09 mmol, 1,6 gr) και στάγδην 2,3-διβρωμοπροπανικός αιθυλεστέρας (6,05 mmol, 1,6 gr). Στη συνέχεια σε χρονικό διάστημα 30 λεπτών πραγματοποιούνται τρεις διαδοχικές προσθήκες ανθρακικού καλίου (42,14 mmol, 5,82 gr) και 2,3-διβρωμοπροπανικού αιθυλεστέρα (18,32 mmol, 4,76 gr) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται με θέρμανση υπό επαναρροή για 20 ώρες (το πέρας της αντίδρασης ελέγχεται με TLC). Το μίγμα της αντίδρασης ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου, αραιώνεται με οξικό αιθυλεστέρα και η οργανική φάση εκχυλίζεται με νερό και κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται με άνυδρο θειϊκό νάτριο και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (μίγμα διαλυτών έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / οξικός αιθυλεστέρας 80:20) και λαμβάνεται το προϊόν (3 gr) ως έλαιο. Το προϊόν διαλύεται σε 5mL μεθανόλης και προστίθενται στάγδην 2mL υδροχλωρικού οξέος 37%. Το μίγμα στερεοποιείται και το υδροχλωρικό αλάτι του εστέρα παραλαμβάνεται με ανακρυστάλλωση από μεθανόλη / αιθέρα ως λευκό στερεό (3.32 gr). Απόδοση 91%

¹**H NMR (600 MHz, DMSO-d6)** δ : 6.75 (d, J = 7.8 Hz, 1H, ArH), 6.68 (m, 1H, ArH), 6.62 (m, 1H, ArH), 6.58 (d, J = 6.0 Hz, 1H, ArH), 4.94 (t, J = 3.8 Hz, 1H, CH), 4.14 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 3.43 (dd, J = 13.4, 5.4 Hz, 1H, CH₂), 3.41 dd, J = 13.4, 5.4 Hz, 1H, CH₂), 1.18 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH₃).

3,4-Διϋδρο-2Η-1,4-βενζοξαζινο-2-καρβοϋδραζίδιο (2) [51]



Σε διάλυμα του υδροχλωρικού άλατος του 3,4-διϋδρο-2*H*-1,4-βενζοξαζίνο-2καρβοξυλικού αιθυλεστέρα (1) (1,64 mmol, 400 mg) σε 4 ml απόλυτη αιθανόλη, προστίθεται στάγδην και υπό αργό ένυδρη υδραζίνη (6,56 mmol, 328 mg). Η αντίδραση αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ώρες. (το πέρας της αντίδρασης ελέγχεται με TLC). Το μίγμα της αντίδρασης αραιώνεται με διχλωρομεθάνιο και η οργανική φάση εκπλύνεται με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου και ξηραίνεται με άνυδρο θειϊκό νάτριο. Ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό και το λευκό στερεό υπόλειμμα χρησιμοποιείται στην επόμενη αντίδραση χωρίς καθαρισμό.

Απόδοση 270 mg (85%)

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d6) δ: 9.21 (s, 1H, CONH), 6.75 (d, J = 7.7 Hz, 1H, ArH), 6.68 (t, J = 7.5 Hz, 1H, ArH), 6.58 (d, J = 6.7 Hz, 1H, ArH), 6.51 (t, J = 8.2 Hz, 1H, ArH), 5.80 (s, 1H, NH), 4.48 (dd, J = 7.1, 2.5 Hz, 1H, CH), 4.32 (s, 2H, NH₂), 3.38 (m, 1H, CH₂), 3.23 (m, 1H, CH₂).

9.2 Σύνθεση των ακυλοϋδραζονών 3, 6, 7, 8, 9, 10, 13 με όξινα καταλυόμενες συνθήκες

Γενική μέθοδος σύνθεσης των ακυλοϋδραζονών 3, 6, 7, 8, 9, 10, 13 με όξινα καταλυόμενες συνθήκες

Σε διάλυμα του άκυλο υδραζιδίου (**2**) (0,21 mmol, 40 mg) σε 2 mL απόλυτης αιθανόλης προστίθεται η κατάλληλη αρωματική αλδεῢδη (0,252 mmol) και τρεις σταγόνες πυκνού διαλύματος υδροχλωρικού οξέος (37%). Η αντίδραση αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά (το πέρας της αντίδρασης ελέγχεται με TLC). Στο μίγμα της αντίδρασης προστίθεται κορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου μέχρι το pH να γίνει 9 και στη συνέχεια προστίθεται πάγος και καταβυθίζεται η επιθυμητή ακυλοϋδραζόνη ως στερεό, το οποίο διηθείται υπό κενό και εκπλύνεται με εξάνιο.

3,4-Διϋδρο-2Η-1,4-βενζοξαζινο-2-υδροξυ-φαινυλο-2-καρβο-υδραζόνη (3)



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής με χρήση 2-υδροξυβενζαλδεῢδης (31 mg) λαμβάνεται η ένωση **3** ως καφέ στερεό.

Απόδοση 44 mg (70%)

```
3,4-Διϋδρο-2Η-1,4-βενζοξαζινο-2-μεθοξυ-φαινυλο-2-καρβο-υδραζόνη (6)
```



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής με χρήση 2-μεθοξυβενζαλδεῢδης (34 mg) λαμβάνεται η ένωση **6** ως καφέ στερεό.

Απόδοση 65 mg (68%)

```
3,4-Διϋδρο-2Η-1,4-βενζοξαζινο-3-μεθοξυ-φαινυλο-2-καρβο-υδραζόνη (7)
```



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής με χρήση 3-μεθοξυβενζαλδεῢδης (34 mg) λαμβάνεται η ένωση **7** ως καφέ στερεό.

Απόδοση 63 mg (66%)

3,4-Διϋδρο-2Η-1,4-βενζοξαζινο-4-μεθοξυ-φαινυλο-2-καρβο-υδραζόνη (8)



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής με χρήση 4-μεθοξυβενζαλδεῢδης (34 mg) λαμβάνεται η ένωση **8** ως καφέ στερεό.

Απόδοση 74 mg (76%)

```
3,4-Διϋδρο-2Η-1,4-βενζοξαζινο-2-βρωμο-φαινυλο-2-καρβο-υδραζόνη (9)
```



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής με χρήση 2-βρωμοβενζαλδεῢδης (47 mg) λαμβάνεται η ένωση **9** ως ανοιχτό καφέ στερεό.

Απόδοση 87 mg (93%)

```
3,4-Διϋδρο-2Η-1,4-βενζοξαζινο-2-χλωρο-φαινυλο-2-καρβο-υδραζόνη (10)
```



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής με χρήση 2-χλωροβενζαλδεῢδης (35 mg) λαμβάνεται η ένωση **10** ως ανοιχτό καφέ στερεό.

Απόδοση 74 mg (90%)

3,4-Διϋδρο-2Η-1,4-βενζοξαζινο-2-θειοφαινο-2-καρβο-υδραζόνη (13)



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής με χρήση 2-θειοφαινο-βενζαλδεῢδης (30 mg) λαμβάνεται η ένωση **13** ως σκούρο καφέ στερεό.

Απόδοση 55 mg (91%)

9.3 Σύνθεση με χρήση μικροκυμάτων των ακυλοϋδραζονών 3-14

Γενική μέθοδος σύνθεσης των ακυλοϋδραζονών 3-14 με χρήση μικροκυμάτων

Σε γυάλινο φιαλίδιο με παχύ τοίχωμα προστίθεται διάλυμα του άκυλο υδραζιδίου (2) (0,21 mmol, 40 mg) σε 2 mL απόλυτης αιθανόλης και στη συνέχεια η κατάλληλη αρωματική αλδεῢδη ή κετόνη (0.252 mmol). Το φιαλίδιο σφραγίζεται, τοποθετείται στη συσκευή μικροκυμάτων και ακτινοβολείται στους 140°C για 52 λεπτά, στα 240 W και το πέρας της αντίδρασης ελέγχεται με TLC. Για να παραληφθεί η επιθυμητή ακυλοϋδραζόνη στις περιπτώσεις των ενώσεων 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12 το μίγμα της αντίδρασης αραιώνεται με οξικό αιθυλεστέρα και η οργανική φάση εκχυλίζεται με νερό και κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται με άνυδρο θειϊκό νάτριο και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό και το προϊόν ανακρυσταλλώνεται από μίγμα οξικού αιθυλεστέρα / πετρελαϊκού αιθέρα. Στην περίπτωση των ενώσεων 7, 8, 13 προστίθεται πάγος στο μίγμα της αντίδρασης και καταβυθίζεται το επιθυμητό προϊόν.

3,4-Διϋδρο-2Η-1,4-βενζοξαζινο-2-υδροξυ-φαινυλο-2-καρβο-υδραζόνη (3)



Σύμφωνα με την παραπάνω γενική μέθοδο παρασκευής με χρήση 2-υδροξυβενζαλδεῢδης (31mg) λαμβάνεται η ένωση **3** ως καφέ στερεό μετά από ανακρυστάλλωση με οξικό αιθυλεστέρα / πετρελαϊκό αιθέρα.

Απόδοση 50 mg (80%)

R_f 0.72 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 95:5)

Σ.Τ. 184-186 °C

MS (ESI), m/z 320 [M + Na]⁺

HRMS (ESI) υπολογισθέν για C₁₆H₁₄N₃O₃ [M-H]⁻ 296.1041, ευρεθέν 296.1035.

IR: 3277, 1702, 1610, 1266 cm⁻¹.

Στροφομερές αμιδίου trans

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d6) δ: 11.69 (s, 1H, CONH), 11.09 (s, 1H, OH), 8.61 (s, 1H, N=CH), 7.51 (d, J = 7.6 Hz, 1H, ArH), 7.30 (t, J = 8.5 Hz, 1H, ArH), 6.92 (d, J = 7.2 Hz, 1H, ArH), 6.91 (m, 1H, ArH), 6.84 (d, J = 7.8 Hz, 1H, ArH), 6.72 (t, J = 7.6 Hz, 1H, ArH), 6.62 (d, J = 7.9 Hz, 1H, ArH), 6.56-6.54 (m, 1H, ArH), 5.89 (s, 1H, NH), 4.71 (dd, J = 6.9, 2.9 Hz, 1H, CH), 3.49 (dt, J = 12.0, 2.9 Hz, 1H, CH₂), 3.37-3.34 (m, 1H, CH₂).

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-d6) δ: 165.0, 157.4, 148.8, 141.9, 134.3, 131.6, 129.4, 121.5, 119.4, 118.6, 117.1, 116.4 (C3 και C18), 115.1, 72.9, 41.8.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d6) δ: 11.48 (s, 1H, CONH), 11.09 (s, 1H, OH), 8.30 (s, 1H, N=CH), 7.65 (d, J = 7.9 Hz, 1H, ArH), 7.24 (m, 1H, ArH), 6.90 (d, J = 7.9 Hz, 1H, ArH), 6.84 (m, 1H, ArH), 6.73 (d, J = 6.5 Hz, 1H, ArH), 6.67 (t, J = 8.0 Hz, 1H, ArH), 6.57-6.56 (m, 1H, ArH), 6.54 (d, J = 8.1 Hz, 1H, ArH), 5.79 (s, 1H, NH), 5.31 (dd, J = 5.1, 3.2 Hz, 1H, CH), 3.54-3.52 (m, 1H, CH₂), 3.41-3.39 (m, 1H, CH₂),.

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-d6) δ: 169.1, 156.4, 143.3, 141.3, 134.2, 131.3, 126.1, 120.8, 120.1, 119.4, 117.2, 116.2, 115.8, 114.9, 70.7, 41.4.

3,4-Διϋδρο-2Η-1,4-βενζοξαζινο-3-υδροξυ-φαινυλο-2-καρβο-υδραζόνη (4)



Σύμφωνα με την παραπάνω γενική μέθοδο παρασκευής σε διάλυμα του άκυλο υδραζιδίου (2) (0,098 mmol, 19 mg), προστίθενται από την 3-υδροξυβενζαλδεῢδη (14 mg) και λαμβάνεται η ένωση 4 ως καφέ στερεό μετά από ανακρυστάλλωση με οξικό αιθυλεστέρα / πετρελαϊκό αιθέρα.

Απόδοση 24 mg (82%)

Rf 0.52 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 95:5)

Σ.Τ. 120-122 °C

MS (ESI), m/z 320 [M + Na]⁺

HRMS (ESI) υπολογισθέν για C₁₆H₁₄N₃O₃ [M-H]⁻ 296.1041, ευρεθέν 296.1040.

IR : 3255, 1670, 1602, 1276 cm⁻¹.

Στροφομερές αμιδίου trans

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d6) δ: 11.37 (s, 1H, CONH), 9.62 (s, 1H, OH), 8.30 (s, 1H, N=CH), 7.24 (q, J = 7.6 Hz, 1H, ArH), 7.15 (s, 1H, ArH), 7.06 (d, J= 6.6 Hz, 1H, ArH), 6.83 (d, J = 6.6 Hz, 1H, ArH), 6.82 (d, J = 6.6 Hz, 1H, ArH), 6.73-6.69 (m, 1H, ArH), 6.62 (d, J = 7.7 Hz, 1H, ArH), 6.55 (t, J = 7.1 Hz, 1H, ArH), 5.89 (s, 1H, NH), 4.65 (dd, J = 7.0, 2.7 Hz, 1H, CH), 3.51-3.46 (m, 1H, CH₂), 3.39 (dd, J = 5.1, 2.7 Hz, 1H, CH₂).

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-d6) δ: 164.8, 157.6, 148.5, 142.0, 135.3, 134.2, 129.9, 121.5, 118.8, 117.5, 117.1, 116.4, 115.0, 112.6, 73.0, 41.9.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d6) δ : 11.49 (s, 1H, CONH), 9.62 (s, 1H, OH), 7.92 (s, 1H, N=CH), 7.23 (q, *J* = 7.6 Hz, 1H, ArH), 7.15 (s, 1H, ArH), 7.05 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, ArH), 6.82 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, ArH), 6.75-6.71 (m, 1H, ArH), 6.67 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, ArH), 6.57 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, ArH), 6.54 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, ArH), 5.81 (s, 1H, NH), 5.34 (dd, *J* = 4.7, 3.1 Hz, 1H, CH), 3.52 (dd, *J* = 12.1, 3.1 Hz, 1H, CH₂), 3.43-3.40 (m, 1H, CH₂).

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-d6) δ: 169.3, 157.6, 144.0, 143.2, 135.1, 134.1, 129.9, 120.7, 118.4, 117.3, 117.2, 115.8, 114.9, 112.4, 70.6, 41.4.

3,4-Διϋδρο-2Η-1,4-βενζοξαζινο-4-υδροξυ-φαινυλο-2-καρβο-υδραζόνη (5)



Σύμφωνα με την παραπάνω γενική μέθοδο παρασκευής με χρήση 4-υδροξυβενζαλδεῢδης (33 mg) λαμβάνεται η ένωση **5** με ανακρυστάλλωση από οξικό αιθυλεστέρα / πετρελαϊκό αιθέρα ως καφέ στερεό.

Απόδοση 39 mg (60%)

Rf 0.32 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 95:5)

Σ.T. 229-231 °C

MS (ESI), m/z 320 [M + Na]⁺

HRMS (ESI) υπολογισθέν για C₁₆H₁₄N₃O₃ [M-H]⁻ 296.1041, ευρεθέν 296.1039.

IR: 3324, 1673, 1610, 1278 cm⁻¹.

Στροφομερές αμιδίου trans

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d6) δ: 11.20 (s, 1H, CONH), 9.78 (s, 1H, OH), 8.27 (s, 1H, N=CH), 7.51 (d, J = 8.6 Hz, 1H, ArH-15), 7.51 (d, J = 8.6 Hz, 1H, ArH-19), 6.83 (d, J = 8.5 Hz, 1H, ArH-16), 6.83 (d, J = 8.5 Hz, 1H, ArH-18), 6.81 (d, J = 7.1 Hz, 1H, ArH), 6.73-6.69 (m, 1H, ArH), 6.61 (d, J = 6.5 Hz, 1H, ArH), 6.55 (t, J = 7.1 Hz, 1H, ArH), 5.88 (s, 1H, NH), 4.62 (dd, J = 7.2, 2.8 Hz, 1H, CH), 3.49-3.46 (m, 1H, CH₂), 3.37-3.30 (m, 1H, CH₂).

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-d6) δ: 164.5, 159.6, 148.7, 142.0, 134.2, 128.9 (C15 και C19), 125.0, 121.5, 117.1, 116.4, 115.8 (C16 και C18), 115.0, 73.0, 41.9.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d6) δ: 11.34 (s, 1H, CONH), 9.78 (s, 1H, OH), 7.90 (s, 1H, N=CH), 7.48 (d, J = 8.6 Hz, 1H, ArH-15), 7.48 (d, J = 8.6 Hz, 1H, ArH-19), 6.93 (d, J = 8.5 Hz, 1H, ArH-16), 6.93 (d, J = 8.5 Hz, 1H, ArH-18), 6.75-6.71 (m, 1H, ArH), 6.67 (dd, J = 7.5, 0.9 Hz, 1H, ArH), 6.57 (d, J = 6.6Hz, 1H, ArH), 6.53 (d, J = 7.8 Hz, 1H, ArH), 5.78 (s, 1H, NH), 5.32 (dd, J = 5.0, 3.2 Hz, 1H, CH), 3.54-3.50 (m, 1H, CH₂), 3.40-3.38 (m, 1H, CH₂).

¹³**C NMR (75.5 MHz, DMSO-d6) δ:** 169.3, 159.3, 144.0, 143.3, 134.1, 128.6 (C15 και C19), 125.0, 120.7, 117.3, 115.9 (C16 και C18), 115.8, 114.9, 70.6, 41.5.

3,4-Διϋδρο-2Η-1,4-βενζοξαζινο-2-μεθοξυ-φαινυλο-2-καρβο-υδραζόνη (6)



Σύμφωνα με την παραπάνω γενική μέθοδο παρασκευής με χρήση 2-μεθοξυβενζαλδεῢδης (34 mg) λαμβάνεται η ένωση **6** ως καφέ στερεό μετά από ανακρυστάλλωση με οξικό αιθυλεστέρα / πετρελαϊκό αιθέρα.

Απόδοση 47 mg (72%)

Rf 0.67 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 95:5)

Σ.Τ. 80-82 °C

MS (ESI), m/z 334 [M + Na]⁺

HRMS (ESI) υπολογισθέν για C₁₇H₁₆N₃O₃ [M-H]⁻ 310.1197, ευρεθέν 310.1189.

IR : 1678, 1601, 1251 cm⁻¹.

Στροφομερές αμιδίου trans

¹**H NMR (600 MHz, DMSO-d6)** δ : 11.48 (s, 1H, CONH), 8.73 (s, 1H, N=CH), 7.80 (dd, J = 7.7, 1.5 Hz, 1H, ArH), 7.42 (m, 1H, ArH), 7.10 (d, J = 8.3 Hz, 1H, ArH), 7.01 (d, J = 7.6 Hz, 1H, ArH), 6.83 (d, J = 7.8 Hz, 1H, ArH), 6.73-6.69 (m, 1H, ArH), 6.61 (d, J = 6.5 Hz, 1H, ArH), 6.55 (t, J = 7.1 Hz, 1H, ArH), 6.55 (m, 1H, ArH), 5.88 (s, 1H, NH), 4.63 (dd, J = 7.1, 2.8 Hz, 1H, CH), 3.85 (s, 3H, -OCH₃), 3.48 (dt, J = 12.0, 2.8 Hz, 1H, CH₂), 3.34-3.30 (m, 1H, CH₂).

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-d6) *δ*: 164.8, 157.8, 143.8, 142.0, 134.2, 131.6, 125.5, 122.1, 121.4, 120.7, 117.1, 116.4, 115.0, 111.8, 73.0, 55.7, 41.9.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d6) δ: 11.50 (s, 1H, CONH), 8.34 (s, 1H, N=CH), 7.77 (dd, J = 7.7, 1.2 Hz, 1H, ArH), 7.39 (m, 1H, ArH), 7.09 (d, J = 8.3 Hz, 1H, ArH), 6.98 (d, J = 7.6 Hz, 1H, ArH), 6.75-6.71 (m, 1H, ArH), 6.67 (dd, J = 11.2, 4.6 1H, ArH), 6.58 (d, J = 9.6 Hz, 1H, ArH), 6.54 (d, J = 9.6 Hz, 1H, ArH), 5.79 (s, 1H, NH), 5.35 (dd, J = 5.0, 3.2 Hz, 1H, CH), 3.84 (s, 3H, -OCH₃), 3.52 (dt, J = 11.9, 2.8 Hz, 1H, CH₂), 3.40-3.37 (m, 1H, CH₂),.

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-d6) *δ*: 169.3, 157.6, 143.2, 139.4, 134.1, 131.4, 125.4, 122.0, 120.7, 120.6, 117.2, 115.8, 114.9, 111.9, 70.7, 55.6, 41.5.

3,4-Διϋδρο-2Η-1,4-βενζοξαζινο-3-μεθοξυ-φαινυλο-2-καρβο-υδραζόνη (7)



Σύμφωνα με την παραπάνω γενική μέθοδο παρασκευής με χρήση 3-μεθοξυβενζαλδεῢδης (34 mg) λαμβάνεται η ένωση **7** ως καφέ στερεό μετά την προσθήκη πάγου στο μίγμα της αντίδρασης.

Απόδοση 51 mg (78%)

Rf 0.72 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 95:5)

Σ.Τ. 178-180 °C

MS (ESI), m/z 334 [M + Na]⁺

HRMS (ESI) υπολογισθέν για C₁₇H₁₆N₃O₃ [M-H]⁻ 310.1197, ευρεθέν 310.1186.

IR: 1682, 1598, 1265 cm⁻¹.

Στροφομερές αμιδίου trans

¹**H NMR (600 MHz, DMSO-d6)** δ : 11.48 (s, 1H, CONH), 8.36 (s, 1H, N=CH), 7.36 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, ArH), 7.24 (s, 1H, ArH), 7.20 (s, 1H, ArH), 7.0 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, ArH), 6.83 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, ArH), 6.73-6.69 (m, 1H, ArH), 6.62 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, ArH), 6.55 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H, ArH), 5.89 (s, 1H, NH), 4.66 (dd, *J* = 7.0, 2.8 Hz, 1H, CH), 3.79 (s, 3H, -OCH₃), 3.47 (dt, *J* = 11.9, 2.8 Hz, 1H, CH₂), 3.42-3.39 (m, 1H, CH₂).

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-d6) δ: 165.0, 159.5, 148.4, 142.0, 135.5, 134.2, 130.0, 121.5, 117.1, 116.4, 115.8, 115.0, 111.8, 111.3, 73.0, 55.1, 41.9.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d6) δ: 11.48 (s, 1H, CONH), 7.97 (s, 1H, N=CH), 7.35 (d, J = 8.2 Hz, 1H, ArH), 7.25 (s, 1H, ArH), 7.20 (s, 1H, ArH), 6.99 (d, J =7.1 Hz, 1H, ArH), 6.75-6.71 (m, 1H, ArH), 6.67 (t, J = 7.5 Hz, 1H, ArH), 6.58 (d, J = 6.8 Hz, 1H, ArH), 6.53 (d, J = 10.0 Hz, 1H, ArH), 5.79 (s, 1H, NH), 5.37 (dd, J = 4.6, 3.3 Hz, 1H, CH), 3.78 (s, 3H, -OCH₃), 3.54-3.52 (m, 1H, CH₂), 3.52 (dd, J = 9.5, 3.3 Hz, 1H, CH₂), 3.45-3.43 (m, 1H, CH₂).

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-d6) δ: 169.5, 159.5, 143.5, 143.2, 135.4, 134.1, 130.0, 120.7, 120.0, 117.3, 115.7, 115.6, 114.9, 111.9, 70.7, 55.2, 41.5.

3,4-Διϋδρο-2Η-1,4-βενζοξαζινο-4-μεθοξυ-φαινυλο-2-καρβο-υδραζόνη (8)



Σύμφωνα με την παραπάνω γενική μέθοδο παρασκευής σε διάλυμα του άκυλο υδραζιδίου (**2**) (0,18 mmol, 35 mg) σε 1.7 ml απόλυτης αιθανόλης, προστίθενται από την 4-μεθοξυβενζαλδεῢδη (29 mg) και λαμβάνεται η ένωση **8** ως καφέ στερεό μετά την προσθήκη πάγου στο μίγμα της αντίδρασης.

Απόδοση 53 mg (94%)

Rf 0.66 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 95:5)

Σ.Τ. 153-155 °C

MS (ESI), m/z 334 [M + Na]⁺

HRMS (ESI) υπολογισθέν για C₁₇H₁₆N₃O₃ [M-H]- 310.1197, ευρεθέν 310.1191.

IR : 1673, 1605, 1274 cm⁻¹.

Στροφομερές αμιδίου trans

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d6) δ : 11.41 (s, 1H, CONH), 8.32 (s, 1H, N=CH), 7.62 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, ArH-15), 7.62 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, ArH-19), 7.00 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, ArH-16), 7.00 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, ArH-18), 6.83 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, ArH), 6.73-6.69 (m, 1H, ArH), 6.61 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, ArH), 6.54 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, ArH), 5.88 (s, 1H, NH), 4.63 (dd, *J* = 7.0, 2.4 Hz, 1H, CH), 3.80 (s, 3H, -OCH₃), 3.47 (dd, *J* = 9.4 Hz, 2.6 1H, CH₂), 3.34-3.31 (m, 1H, CH₂).

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-d6) δ: 164.6, 160.9, 148.3, 142.0, 134.2, 128.7, 126.6, 121.5, 117.0, 116.4, 115.0, 114.3, 73.0, 55.3, 41.9.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d6) δ: 11.28 (s, 1H, CONH), 7.95 (s, 1H, N=CH), 7.60 (d, J = 8.8 Hz, 1H, ArH-15), 7.60 (d, J = 8.8 Hz, 1H, ArH-19), 6.98 (d, J =11.0 Hz, 1H, ArH-16), 6.98 (d, J = 11.0 Hz, 1H, ArH-18), 6.75-6.71 (m, 1H, ArH), 6.67 (t, J = 7.3 Hz, 1H, ArH), 6.57 (d, J = 7.7 Hz, 1H, ArH), 6.52 (d, J =8.2 Hz, 1H, ArH), 5.79 (s, 1H, NH), 5.35-5.33 (m, Hz, 1H, CH), 3.79 (s, 3H, -OCH₃), 3.54-3.51 (m, 1H, CH₂), 3.41-3.39 (m, 1H, CH₂).

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-d6) δ: 169.2, 160.7, 143.6, 143.2, 134.1, 128.4, 126.5, 120.7, 117.2, 115.8, 114.9, 114.3, 70.6, 55.3, 41.5.

3,4-Διϋδρο-2Η-1,4-βενζοξαζινο-2-βρωμο-φαινυλο-2-καρβο-υδραζόνη (9)



Σύμφωνα με την παραπάνω γενική μέθοδο παρασκευής με χρήση 2-βρωμοβενζαλδεῢδης (47 mg) λαμβάνεται η ένωση **9** ως ανοιχτό καφέ στερεό μετά από ανακρυστάλλωση με οξικό αιθυλεστέρα / πετρελαϊκό αιθέρα.

Απόδοση 73 mg (97%)

Rf 0.80 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 95:5)

Σ.Τ. 83-85 °C

MS (ESI), m/z 382 [M + Na]⁺

HRMS (ESI) υπολογισθέν για C₁₆H₁₃Br⁷⁹N₃O₂ [M-H]⁻ 358.0197, ευρεθέν 358.0194.

IR : 3338, 3056, 1677, 1609, 744 cm⁻¹.

Στροφομερές αμιδίου trans

¹**H NMR (600 MHz, DMSO-d6)** δ : 11.78 (s, 1H, CONH), 8.76 (s, 1H, N=CH), 7.94 (dd, J = 7.8, 1.4 Hz, 1H, ArH), 7.70-7.68 (m, 1H, ArH), 7.46 (d, J = 7.7 Hz, 1H, ArH), 7.37 (d, J = 6.5 Hz, 1H, ArH), 6.83 (d, J = 7.7 Hz, 1H, ArH), 6.72 (m, 1H, ArH), 6.62 (d, J = 6.6 Hz, 1H, ArH), 6.55-6.53 (m, 1H, ArH), 5.90 (s, 1H, NH), 4.69 (dd, J = 7.1, 2.8 Hz, 1H, CH), 3.52-3.48 (m, 1H, CH₂), 3.36-3.33 (m, 1H, CH₂).

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-d6) δ: 165.2, 146.7, 142.0, 134.2, 133.2, 132.9, 131.9, 128.1, 127.3, 123.7, 121.5, 117.1, 116.4, 115.1, 73.0, 41.9.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d6) δ: 11.74 (s, 1H, CONH), 8.36 (s, 1H, N=CH), 7.91 (dd, *J* = 7.8, 1.1 Hz, 1H, ArH), 7.70-7.68 (m, 1H, ArH), 7.43 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.35 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, ArH), 6.75-6.71 (m, 1H, ArH), 6.69-6.66 (m, 1H, ArH), 6.58 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, ArH), 6.54-6.51 (m, 1H, ArH), 5.79 (s, 1H, NH), 5.39 (dd, *J* = 4.7, 3.3 Hz, 1H, CH), 3.54-3.52 (m, 1H, CH₂), 3.41-3.38 (m, 1H, CH₂).

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-d6) δ: 169.6, 143.2, 142.2, 134.1, 133.2, 132.7, 131.7, 128.2, 127.2, 123.3, 120.7, 117.3, 115.8, 115.0, 70.6, 41.6.

3,4-Διϋδρο-2Η-1,4-βενζοξαζινο-2-χλωρο-φαινυλο-2-καρβο-υδραζόνη (10)



Σύμφωνα με την παραπάνω γενική μέθοδο παρασκευής με χρήση 2-χλωροβενζαλδεῢδης (35 mg) λαμβάνεται η ένωση **10** ως ανοιχτό καφέ στερεό μετά από ανακρυστάλλωση με οξικό αιθυλεστέρα / πετρελαϊκό αιθέρα.

Απόδοση 59 mg (89%)

Rf 0.79 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 95:5)

Σ.Τ. 77-79 °C

MS (ESI), m/z 338 [M + Na]⁺

HRMS (ESI) υπολογισθέν για C₁₆H₁₃Cl³⁵N₃O₂ [M-H]⁻ 310.1197, ευρεθέν 310.1186.

IR : 3338, 3056, 1677, 1609, 744 cm⁻¹.

Στροφομερές αμιδίου trans

¹**H NMR (600 MHz, DMSO-d6)** δ : 11.74 (s, 1H, CONH), 8.81 (s, 1H, N=CH), 7.96 (dd, J = 7.5, 1.2 Hz, 1H, ArH), 7.52 (d, J = 7.7 Hz, 1H, ArH), 7.45 (dd, J =7.2, 1.3 Hz, 1H, ArH), 7.41 (d, J = 7.9 Hz, 1H, ArH), 6.83 (d, J = 7.8 Hz, 1H, ArH), 6.72 (dd, J = 14.5, 7.4 Hz, 1H, ArH), 6.62 (d, J = 7.8 Hz, 1H, ArH), 6.55 (dd, J = 9.6, 5.5 Hz, 1H, ArH), 5.90 (s, 1H, NH), 4.69 (dd, J = 7.0, 2.6 Hz, 1H, CH), 3.52-3.49 (m, 1H, CH₂), 3.37-3.34 (m, 1H, CH₂)

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-d6) δ: 165.2, 144.4, 142.0, 134.2, 133.3, 131.7, 131.4, 129.9, 127.6, 126.9, 121.5, 117.1, 116.4, 115.1, 73.0, 41.8.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d6) δ: 11.73 (s, 1H, CONH), 8.39 (s, 1H, N=CH), 7.93 (dd, J = 7.5, 0.7 Hz, 1H, ArH), 7.53 (d, J = 7.7 Hz, 1H, ArH), 7.46 (dd, J =7.2, 1.3 Hz, 1H, ArH), 7.43 (d, J = 7.6 Hz, 1H, ArH), 6.74 (dd, J = 14.5, 7.4 Hz, 1H, ArH), 6.68 (t, J = 7.4 Hz, 1H, ArH), 6.58 (d, J = 10.1 Hz, 1H, ArH), 6.54 (d, J = 7.9 Hz, 1H, ArH), 5.79 (s, 1H, NH), 5.41-5.38 (m, 1H, CH), 3.54-3.52 (m, 1H, CH₂), 3.41-3.36 (m, 1H, CH₂),.

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-d6) *δ*: 169.6, 143.2, 139.8, 134.1, 132.9, 131.6, 131.2, 129.9, 127.7, 126.8, 120.7, 117.3, 115.8, 115.0, 70.6, 41.5.

3,4-Διϋδρο-2Η-1,4-βενζοξαζινο-3-πυριδινο-2-καρβο-υδραζόνη (11)



Σύμφωνα με την παραπάνω γενική μέθοδο παρασκευής με χρήση 3-πυριδινοκαρβοξαλδεῢδης (27 mg) λαμβάνεται η ένωση **11** ως καφέ στερεό μετά από ανακρυστάλλωση με οξικό αιθυλεστέρα / πετρελαϊκό αιθέρα.

Απόδοση 52 mg (88%)

Rf 0.30 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 95:5)

Σ.Τ. 159-161 °C

MS (ESI), m/z 305 [M + Na]⁺

HRMS (ESI) υπολογισθέν για C₁₆H₁₄N₃O₃ [M-H]⁻ 281.1044, ευρεθέν 281.1043.

IR: 3371, 1679, 1610, 1343 cm⁻¹.

Στροφομερές αμιδίου trans

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d6) δ: 11.61 (s, 1H, CONH), 8.82 (s, 1H, N=CH), 8.61 (d, J = 5.8 Hz, 1H ArH), 8.45 (s, 1H, ArH), 8.09 (d, J = 7.9 Hz, 1H, ArH), 7.47 (d, J = 7.8 Hz, 1H, ArH), 6.83 (d, J = 7.3 Hz, 1H, ArH), 6.72 (dd, J = 7.6, 1.0 Hz, 1H, ArH), 6.62 (d, J = 6.5 Hz, 1H, ArH), 6.55 (dd, J = 7.5, 1.3 Hz, 1H, ArH), 5.90 (s, 1H, NH), 4.70 (dd, J = 6.9, 2.9 Hz, 1H, CH), 3.48 (dt, J = 11.9, 2.9 Hz, 1H, CH₂), 3.37-3.35 (m, 1H, CH₂).

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-d6) δ: 165.2, 150.9, 148.8, 145.8, 142.0, 134.2, 133.5, 130.0, 124.1, 121.5, 117.1, 116.4, 115.0, 72.9, 41.8.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d6) δ: 11.70 (s, 1H, CONH), 8.04 (s, 1H, N=CH), 8.84 (s, 1H ArH), 8.59 (d, J = 5.8 Hz, 1H, ArH), 8.09 (d, J = 7.8 Hz, 1H, ArH), 7.45 (d, J = 7.8 Hz, 1H, ArH), 6.74-6.69 (m, 1H, ArH), 6.69-6.66 (m, 1H, ArH), 6.58 (d, J = 7.4 Hz, 1H, ArH), 6.52 (d, J = 7.4 Hz, 1H, ArH), 5.80 (s, 1H, NH), 5.41 (dd, J = 4.7, 2.7 Hz, 1H, CH), 3.54 (dt, J = 12.0, 2.7 Hz, 1H, CH₂), 3.41-3.38 (m, 1H, CH₂).

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-d6) δ: 169.7, 150.6, 148.5, 143.3, 141.0, 134.1, 133.5, 129.9, 124.1, 120.7, 117.3, 115.8, 115.0, 70.7, 41.5.

3,4-Διϋδρο-2Η-1,4-βενζοξαζινο-4-πυριδινο-2-καρβο-υδραζόνη (12)



Σύμφωνα με την παραπάνω γενική μέθοδο παρασκευής με χρήση 4-πυριδινοκαρβοξαλδεῢδης (27 mg) λαμβάνεται η ένωση **12** ως καφέ στερεό μετα από ανακρυστάλλωση με οξικό αιθυλεστέρα / πετρελαϊκό αιθέρα.

Απόδοση 42 mg (71%)

R_f 0.30 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 95:5)

Σ.Τ. 75-77 °C

MS (ESI), m/z 305 [M + Na]⁺

HRMS (ESI) υπολογισθέν για C₁₆H₁₄N₃O₃ [M-H]⁻ 281.1044, ευρεθέν 281.1040.

IR: 3368, 1679, 1610, 1343 cm⁻¹.

Στροφομερές αμιδίου trans

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d6) δ: 11.72 (s, 1H, CONH), 8.64 (brs, 2H, Ar-H15/Ar-H19), 8.40 (s, 1H, N=CH), 7.62 (brs, 2H, Ar-H16/Ar-H18), 6.84 (d, J = 7.8 Hz, 1H, ArH), 6.71 (t, J = 7.8 Hz, 1H, ArH), 6.62 (d, J = 7.7 Hz, 1H, ArH), 6.56-6.52 (m, 1H, ArH), 5.91 (s, 1H, NH), 4.71 (dd, J = 6.6, 2.5 Hz, 1H, CH), 3.51-3.48 (m, 1H, CH₂), 3.37-3.35 (m, 1H, CH₂).

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-d6) δ: 165.4, 150.3, 146.1, 141.9, 141.3, 134.2, 121.5, 120.7, 117.1, 116.4, 115.1, 73.0, 41.8.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d6) δ: 11.81 (s, 1H, CONH), 8.64 (brs, 2H, Ar-H15/Ar-H19), 7.98 (s, 1H, N=CH), 7.62 (brs, 2H, Ar-H16/Ar-H18), 6.74 (d, J = 8.6 Hz, 1H, ArH), 6.68 (t, J = 7.7 Hz, 1H, ArH), 6.58 (d, J = 7.7 Hz, 1H, ArH), 6.52 (d, J = 7.4 Hz, 1H, ArH), 5.80 (s, 1H, NH), 5.42-5.41 (m, 1H, CH), 3.56-3.52 (m, 1H, CH₂), 3.40-3.38 (m, 1H, CH₂).

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-d6) δ: 169.9, 150.3, 143.2, 141.3, 141.2, 134.1, 121.1, 120.7, 117.3, 115.8, 115.0, 70.7, 41.5.
3,4-Διϋδρο-2Η-1,4-βενζοξαζινο-2-θειοφαινο-2-καρβο-υδραζόνη (13)



Σύμφωνα με την παραπάνω γενική μέθοδο παρασκευής με χρήση 2-θειοφαινοκαρβοξαλδεῢδης (28 mg) λαμβάνεται η ένωση **13** ως σκούρο καφέ στερεό μετά την προσθήκη πάγου στο μίγμα της αντίδρασης.

Απόδοση 48 mg (80%)

R_f 0.72 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 95:5)

Σ.Τ. 210-212 °C

MS (ESI), m/z 310 [M + Na]⁺

HRMS (ESI) υπολογισθέν για C₁₄H₁₂N₃O₂S [M-H]⁻ 286.0656, ευρεθέν 286.0651.

IR : 3370, 3110, 1675, 1606, 707 cm⁻¹.

Στροφομερές αμιδίου trans

¹**H NMR (600 MHz, DMSO-d6)** δ : 11.40 (s, 1H, CONH), 8.59 (s, 1H, N=CH), 7.66 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, ArH), 7.43 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H, ArH), 7.14-7.12 (m, 1H, ArH), 6.83 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, ArH), 6.61 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, ArH), 6.75-6.**71** (m, 1H, ArH), 6.54-6.51 (m, 1H, ArH), 5.88 (s, 1H, NH), 4.65 (dd, *J* = 7.0, 2.7 Hz, 1H, CH), 3.48-3.46 (m, 1H, CH₂), 3.34-3.31 (m, 1H, CH₂)

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-d6) δ: 164.8, 143.6, 141.9, 138.8, 134.2, 131.2, 129.2, 127.9, 121.5, 117.1, 116.4, 115.0, 73.0, 41.8.

Στροφομερές αμιδίου cis

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d6) δ: 11.52 (s, 1H, CONH), 8.18 (s, 1H, N=CH), 7.62 (d, J = 5.0 Hz, 1H, ArH), 7.44 (d, J = 3.2 Hz, 1H, ArH), 7.14-7.12 (m, 1H, ArH), 6.73-6.69 (m, 1H, ArH), 6.67 (t, J = 7.5 Hz, 1H, ArH), 6.57 (d, J = 9.6Hz, 1H, ArH), 6.53 (d, J = 9.6 Hz, 1H, ArH), 5.80 (s, 1H, NH), 5.24 (dd, J =4.8, 3.3 Hz, 1H, CH), 3.52-3.50 (m, 1H, CH₂), 3.38-3.35 (m, 1H, CH₂),.

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-d6) *δ*: 169.1, 143.2, 138.8, 138.7, 134.1, 130.6, 128.6, 128.0, 120.7, 117.3, 115.8, 114.9, 70.5, 41.4.

3,4-Διϋδρο-2Η-1,4-βενζοξαζινο-2-πυριδινο-2-καρβο-υδραζόνη (14)



Σύμφωνα με την παραπάνω γενική μέθοδο παρασκευής με χρήση 4-πυριδινοκαρβοξαλδεῢδης (27 mg) λαμβάνεται η ένωση **12** ως λευκό στερεό μετα από ανακρυστάλλωση με οξικό αιθυλεστέρα / πετρελαϊκό αιθέρα.

Απόδοση: 42 mg (70%)

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η σύνθεση νέων υβριδικών ενώσεων βενζοξαζινών/ακυλοϋδραζονών με χρήση μικροκυμάτων πλεονεκτεί έναντι της μεθόδου με όξινα καταλυόμενες συνθήκες σε θερμοκρασία δωματίου, όσον αφορά στις αποδόσεις και στο εύρος των λαμβανομένων προϊόντων.

Οι νέες υβριδικές ενώσεις έδειξαν ισχυρότερη αντιβακτηριακή και αντιμυκητιασική δράση έναντι των ενώσεων αναφοράς. Η υποκατάσταση στον αρωματικό δακτύλιο της υδραζόνης επηρεάζει τη βιολογική δράση των νέων ενώσεων.

Όσον αφορά την αντιβακτηριακή τους δράση, η παρουσία αλογόνου στον αρωματικό δακτύλιο της υδραζόνης οδηγεί σε ανάλογα με μειωμένη δραστικότητα (9, 10). Τα υδροξυ-υποκατεστημένα ανάλογα είναι δραστικά, ειδικότερα δε οι ορθο και παρα-υποκαστημένες ενώσεις 3 και 5, αντίστοιχα, εμφανίζουν ισχυρότερη βιολογική δράση σε σχέση με το μετα-ανάλογο 4. Μεθυλίωση της υδροξυλομάδας (ανάλογα 6,7,8) οδηγεί σε μείωση της αντιβακτηριακής δράσης. Η παρουσία θεοφαινίου (ένωση 13) μειώνει τη δράση σε σχέση με τα πυριδινο-υποκατεστημένα ανάλογα (11 και 12).

Στην περίπτωση της αντιμυκητιασικής δραστικότητας των παραπάνω ενώσεων παρατηρούμε ότι, οι ενώσεις **3** και **5** εμφανίζουν ισχυρότερη βιολογική δράση σε σχέση με το ανάλογο **4**, στην περίπτωση δε μεθυλίωσης της υδροξυλομάδας η δράση ποικίλει με το ανάλογο **6**, να εμφανίζει ισχυρότερη βιολογική δράση σε σχέση με τα ανάλογα **7** και **8**. Η παρουσία θειφαινίου στο ανάλογο **13** μειώνει τη δράση, ενώ το 3-πυρίδινουποκατεστημένο ανάλογο εμφανίζει τη μικρότερη βιολογική δραστικότητα σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ενώσεις. Η παρουσία βρωμίου στον αρωματικό δακτύλιο της υδραζόνης, δίνει ανάλογο (ένωση **9**) με ισχυρότερη βιολογική ότι με την εμφάνιση χλωρίου στον συγκεκριμένο δακτύλιο (ένωση **10**).

Το ανάλογο με την ισχυρότερη αντιβακτηριακή και αντιμυκητιασή δράση είναι η 3,4-διϋδρο-2*H*-1,4-βενζοξαζίνο-2-υδροξυ-φαινυλο-2-καρβο-υδραζόνη (**3**),

Πιθανός μηχανισμός της αντιμυκητιασικής δράσης της ένωσης 3,4-διϋδρο-2*H*-1,4-βενζοξαζινο-4-πυριδινο-2-καρβο-υδραζόνης (**12**), είναι η αλληλεπίδρασή της με το ένζυμο CYP51 της *Candida albicans*, όπως δείχθηκε πειραματικά φασματοφωτομετρικά και με πειράματα φασματοσκοπίας NMR (STD-NMR) και θεωρητικά με *in silico* μελέτη της ικανότητας πρόσδεσης (docking) της ένωσης **12** στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

3,4-διϋδρο-2Η-1,4-βενζοξαζίνο-2-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (1)



Εικόνα Π.1: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 1 σε DMSO-d6

3,4-διϋδρο-2Η-1,4-βενζοξαζίνο-2-καρβοϋδραζίδιο (2)



Εικόνα Π.2: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 2 σε DMSO-d6

3,4-Διϋδρο-2Η-1,4-βενζοξαζινο-3-υδροξυ-φαινυλο-2-καρβο-υδραζόνη (4)



Εικόνα Π.4: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης 4 σε DMSO-d6



Εικόνα Π.5: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης 4 σε DMSO-d6



Εικόνα Π.6: Ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης 4 σε DMSO-d6



Εικόνα Π.7: Ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC της ένωσης 4 σε DMSO-d6 3,4-Διϋδρο-2*H*-1,4-βενζοξαζινο-4-υδροξυ-φαινυλο-2-καρβο-υδραζόνη (5)



Εικόνα Π.8: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 5 σε DMSO-d6







Εικόνα Π.11: Ετεροπυρηνικό φάσμα ΗΜΒC της ένωσης 5 σε DMSO-d6



Εικόνα Π.12: Ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης 5 σε DMSO-d6



3,4-Διϋδρο-2Η-1,4-βενζοξαζινο-2-μεθοξυ-φαινυλο-2-καρβο-υδραζόνη (6)





Εικόνα Π.15: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης 6 σε DMSO-d6



Εικόνα Π.16: Ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης 6 σε DMSO-d6



Εικόνα Π.17: Ετεροπυρηνικό φάσμα ΗΜΒC της ένωσης 6 σε DMSO-d6

3,4-Διϋδρο-2Η-1,4-βενζοξαζινο-3-μεθοξυ-φαινυλο-2-καρβο-υδραζόνη (7)



Εικόνα Π.18: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 7 σε DMSO-d6



Εικόνα Π.20: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης 7 σε DMSO-d6



Εικόνα Π.21: Ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης 7 σε DMSO-d6



Εικόνα Π.22: Ετεροπυρηνικό φάσμα ΗΜΒC της ένωσης 7 σε DMSO-d6



3,4-Διϋδρο-2Η-1,4-βενζοξαζινο-4-μεθοξυ-φαινυλο-2-καρβο-υδραζόνη (8)





Εικόνα Π.25: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης 8 σε DMSO-d6



Εικόνα Π.26: Ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης 8 σε DMSO-d6



Εικόνα Π.27: Ετεροπυρηνικό φάσμα ΗΜΒC της ένωσης 8 σε DMSO-d6





Εικόνα Π.28: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 9 σε DMSO-d6



Εικόνα Π.30: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης 9 σε DMSO-d6



Εικόνα Π.31: Ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης 9 σε DMSO-d6



Εικόνα Π.32: Ετεροπυρηνικό φάσμα ΗΜΒC της ένωσης 9 σε DMSO-d6



3,4-Διϋδρο-2Η-1,4-βενζοξαζινο-2-χλωρο-φαινυλο-2-καρβο-υδραζόνη (10)



Εικόνα Π.35: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης 10 σε DMSO-d6



Εικόνα Π.36: Ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης 10 σε DMSO-d6



Εικόνα Π.37: Ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC της ένωσης 10 σε DMSO-d6

3,4-Διϋδρο-2Η-1,4-βενζοξαζινο-3-πυριδινο-2-καρβο-υδραζόνη (11)



Εικόνα Π.38: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 11 σε DMSO-d6



Εικόνα Π.40: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης 11 σε DMSO-d6



Εικόνα Π.41: Ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης 11 σε DMSO-d6



Εικόνα Π.42: Ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC της ένωσης 11 σε DMSO-d6



3,4-Διϋδρο-2Η-1,4-βενζοξαζινο-4-πυριδινο-2-καρβο-υδραζόνη (12)



Εικόνα Π.45: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης 12 σε DMSO-d6



Εικόνα Π.46: Ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης 12 σε DMSO-d6



Εικόνα Π.47: Ετεροπυρηνικό φάσμα ΗΜΒC της ένωσης 12 σε DMSO-d6

3,4-Διϋδρο-2Η-1,4-βενζοξαζινο-2-θειοφαινο-2-καρβο-υδραζόνη (13)



Εικόνα Π.48: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 13 σε DMSO-d6







Εικόνα Π.51: Ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης 13 σε DMSO-d6



Εικόνα Π.52: Ετεροπυρηνικό φάσμα ΗΜΒC της ένωσης 13 σε DMSO-d6

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1) M.R. Adams, M.O. Moss Royal Society of Chemistry, "Food microbiology", , **2000.**

2) TJ. Walsh, J. Hiemenz , PA. Pizzo: Editioral response: "Evolving risk factors for invasive fungal infections. All neutropenic are not the same", *Clin. Infect. Dis.* **1994**, *18*, 793-798.

3) Α. Αντωνιάης, Ν. Λεγάκης, Α. Μαυρίδης, Α. Μανιάτης, Ι. Τσελέντης,
 "Ιατρική Μικροβιολογια", Τόμος ΙΙ, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδη, **2000**.

4) AK. Person, DP. Kontoyiannis, BD. Alexander, "Fungal infections in transplant and oncology patients", Hematology/Oncology *Clinics of North America* **2011**, *25*, 193-213.

5) PG. Pappas, BD. Alexander, DR. Andes, "Invasive fungal infections among organ transplant recipients: results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET)", *Clin. Infect. Dis.*, **2010**, *50*, 1101-1111.

6) AG. Freifeld, EJ. Bow, KA. Sepkowitz, "Clinical practice guideline for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer: 2010 update by the infectious diseases society of America" *Clin. Infect. Dis.*, **2011**, *52*, 56-93.

7) Prevention and treatment of cancer-related infections. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) guidelines in oncology. www.nccn.org (Accessed on February 04, 2011).

8) Γ. Δημόπουλος, Α. Καραμπίνης, "Μυκητιασικές λοιμώξεις στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (Μ.Ε.Θ.)", ΠΝΕΥΜΩΝ, Τρίμηνη Ιατρική Έκδοση, 2002, Τεύχος 1, Ιανουάριος-Απρίλιος.

9) JH. Rex, JE Bennett, SC. Sugar, DR. Weber, "Heparosplachnic candidiasis: succesful treatment with fluconazole", *Am. J. Med. Genet.*, **1991**, *91*, 142-50.

10) SV. Komshian, A. Uwaydah, JD Sobel, LR. Crane, "Fungemia caused by Candida species and toluropsis glabrata in the hospitalized patients. Frequency, characteristics and evaluation of factors influencing outcome", *Rev. Infect. Dis.*, **1989**, *11*, 379-90.

11) Jean-Paul Latgė, "Aspergillus fumigatus and Aspergillosis" *Clin. Microbiol. Rev.*, **1999**, *12*, 310-350.

12) MH. White, RA. Bowden, ES. Sandler, ML. Graham, GA. Noslin, JR. Wingard, M. Goldman, JA vanBurik, A. McCabe, JS. Lin, M. Gurwith, CB. Miller, "Randomized, double-blind clinical trial of amphotericin B colloidal dispersion vs. amphotericin B in the empirical treatment of fever and neutropenia", *Clin. Infect. Dis.*, **1998**, *27*, 296-302.

13) TJ. Walsh, RW. Finberg, C. Arndt, J. Hiemenz, C. Schwartz, D. Bodensteiner, P. Pappas, N. Seibel, RN. Greenberg, S. Dummer, M. Schuster, JC. Holcenberg, National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group. "Liposomal amphotericin B for empirical therapy in patients with persistent fever and neutropenia" *New Engl. J. Med.*, **1999**, *340*, 764-71.

14) P. Pappas, J. Rex, J. Sobel, S. Filler, W. Dismukes, T. Walsh, J. Edwards, "Guidelines for treatment of candidiasis" *Clin. Infect. Dis.*, **2004**, *38*, 161-89.

15) C. Viscoli, E. Castagnola, MT. Van Lint, C. Moroni, A. Garaventa, MR. Rossi, R. Fanci, F. Menichetti, D. Caselli, M. Giacchino, M. Congiu, "Fluconazole versus amphotericin B as empirical antifungal therapy of unexplained fever in granulocytopenic cancer patients: a pragmatic, multicenter, prospective and randomised clinical trial", *Eur. J. Cancer*, **1996**, *32A*, 814-20.

16) DJ. Winston, JW Hathom, MG. Schuster, GJ. Schiller, MC. Territo, "A multicenter, randomised trial of fluconazole versus amphotericin B for empiric antifungal therapy of febrile neutropenic patients with cancer", *Am. J. Med. Genet.*, **2000**, *108*, 282-9.

17) TJ. Walsh, P. Pappas, DJ. Winston, HM. Lazarus, F. Petersen, J. Raffali, S. Yanorich, P. Stiff, R. Greenberg, G. Donowitz, National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group. 'Voriconazole compared with liposomal amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with neutropenia and persistent fever" *New Engl. J. Med.*, **2002**, *346*, 225-34.

176

18) C. Wilcox, W. Karowe, "Esophageal infections: etiology, diagnosis and management" *Gastroenterology*, **1994**, *2*, 188-206.

19) J. Klastersky, "Empirical antifungal therapy" *Int. J. Antimicrob. Ag.*, **2004**, 23, 105-12.

20) R. Herbrecht, DW. Denning, TF. Patterson, JE Bennett, RE Greene, JW Oestmann, WV. Kein, KA. Marr, P. Ribaud, O. Lortholary, Invasive Fungal Infectious Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Global Aspergillus Study Group. "Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis" *New Engl. J. Med.*, **2002**, *347*, 408-15.

21) E. Bergogne-Berecin, "New concepts in the pulmonary disposition of antibiotics" *Pulm. Pharmacology*, **1995**, *8*, 65-81.

22) E. Snelders, S. M. T. Camps, A. Karawajczyk, G. Schaftenaar, G. H. J. Kema, Henrich A. van der Lee, C. H. Klaassen, W. J. G. Melchers, P. E. Verweij "Triazole Fungicides Can Induce Cross-Resistance to Medical Triazoles in *Aspergillus fumigatus*", *PLoS One* **2012**, *7*, 1-11.

23) C. Viegas-Junior, A. Danuello, V. da Silva Bolzani, E.J. Barreiro and C.A.M. Fraga, "Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes", *Curr. Med. Chem.*, **2007**, *14*, 1829-1852.

24) J. Iliaš, P. Štefanič Anderluh, M.S. Dolenc and D. Kikelj, "Recent advances in the synthesis of 2H-1,4-benzoxazine-3-(4H)-ones and 3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazines" *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 7325-7348.

25) Gaofeng Feng, Jinlong Wu and Wei-Min Dai, "One-pot regioselective annulation toward 3,4-dihydro-3-oxo-2H-1,4-benzoxazine scaffolds under controlled microwave heating", *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 4635-4642.

26) E.N. Koini, N. Avlonitis, E.S. Martins-Duarte, W. de Souza, R.C. Vommaro, T. Calogeropoulou, "Divergent synthesis of 2,6-diaryl-substituted 5,7,8-trimethyl-1,4-benzoxazines via microwave-promoted pallaium-catalyzed Suzuki-Miyaura cross coupling and biological evaluation", *Tetrahedron*, **2012**, *68*, 10302-10309.

27) E.N. Koini, P. Papazafiri, A. Vassilopoulos, M. Koufaki, Z. Horvath, I. Kooncz, L. Virag, G.J. Papp, A. Varro, T. Calogeropoulou, "5,7,8-Trimethyl-

benzopyran and 5,7,8-trimethyl-1,4-benzoxazine aminoamide derivatives as novel antiarrhytmics against ischemia-reperfusion injury", *J.Med.Chem.* **2009**, *52*, 2328-2340.

28) P.S. Filippou, E.N. Koini, T. Calogeropoulou, P. Kalliakmani, C.A. Panagiotidis, D.A. Kyriakidis, "Regulation of the Escherichia coli AtoSC two component system by synthetic biologically active 5,7,8-trimethyl-1,4-benzoxazine analogues" *Bioorg. Med. Chem.*, **2011**, *19*, 5061-507.

29) F. Koukouli, I. Paspaltsis, E. Salta, K. Xanthopoulos, E. N. Koini, T. Calogeropoulou, T. Sklaviadis, "Inhibition of PrP^{Sc} formation in scrapie infected N2a cells by 5,7,8-trimethyl-3,4-dihydro-2*H*-1,4-benzoxazine derivatives" *Prion* **2012**, *6*, 470-476.

30) A. C. Cunha, J. M. Figueiredo, J. L. M. Tributino, A. L. P. Miranda, H. C. Castro, R. B. Zingali, C. A. M. Fraga, M. C. B. V. Souza, V. F. Ferreira, E. J. Barreiro, "Antiplatelet properties of novel N-substituted-phenyl-1,2,3-triazole-4-acylhydrazone derivatives" *Bioorg. Med. Chem.*, **2003**, *11*, 2051-2059.

31) A. Almasirad, M. Tajik, D. Bakhtiari, A. Shafiee, M. Abdolahi, Zamani, "Synthesis and analgesic activity of N-Arylhydrazone derivatives of mefenamic acid" *J. Pharm. Sci.*, **2005**, *8*, 419-425.

32) N. Terzioglu, A. Gürsoy, "Synthesis and anticancer evaluation of some new hydrazine derivatives of 2,6-dimethylimidazo[2,1-b-]-[1,3,4]thiadiazole-5-carbohydrazide" *Eur.J.Med.Chem.*, **2003**, *38*, 781-786.

33) A. Andreani, A. Leoni, A. Locatelli, R. Morigi, M. Rambaldi, M. Recenatini and V. Garaliene, "Potential Antitumor Agents.Part 29¹: Synthesis and Potential Coanthracyclinic Activity of Imidazo[2,1-b]thiazole Guanylhydrazones" *Bioorg. Med. Chem.*, **2000**, *8*, 2359-2366.

34) A.G.M. Fraga, C.R. Rodrigues, A.L.P. de Miranda, E.J. Barreiro, C.A.M. Fraga, "Synthesis and pharmacological evaluation of novel heterotricyclic acylhydrazone derivatives, designed as PAF antagonists" *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2000**, *11*, 285-290.

35) K.A. Metwaly, L.M. Abdel-Aziz, E.M. Lashine, M.I. Husseiny and R.H. Badawy, "Hydrazones of 2-aryl-quinoline-4-carboxylic acid hydrazides:

Synthesis and preliminary evaluation as antimicrobial agents" *Bioorg.*. *Med. Chem.*, **2006**, *14*, 8675-8682.

36) V.V Syakaev, S.N. Podyachev, B.I. Buzykin, S.K. Latypov, W.D. Habicher, A.I. Konovalov, "NMR study of conformation and isomerization of aryl- and heteroarylaldehyde 4-tert-butylphenoxyacetylhydrazones" *J. Mol. Struct.*, **2006**, *788*, 55-62.

37) G. Palla, G.Predieri, P. Domiano, "Conformational behavior and E/Z isomerization of N-acyl and N-aroylhydrazones" *Tetrahedron*, *4*2, **1986**, 3649-3654.

38) A.B. Lopes, E. Miguez, A.E. Kmmerle, V.M. Rumjanek, C.A.M. Fraga, E.J. Barreiro, "Characterization of Amide Bond Conformers for a Novel Heterocyclic Template of *N*-acylhydrazone Derivatives" *Molecules*, **2013**, *18*, 11683-11704.

39) Schrödinger LLC, Maestro 9.2 User Manual, 2011, NY

40) Θ. Μαυρομούστακος και Π. Ζουμπουλάκης, Μοριακή Μοντελοποίηση:
 Εφαρμογές στην Οργανική και Φαρμακευτική Χημεία, Εκδόσεις Παρισιάνος,
 2008, 84-148

41) Schrödinger LLC, Macromodel 9.9 Quick Start Quide, 2011, NY

42) Schrödinger LLC, Ligprep 2.5 User Manual, 20011, NY

43) Clinical and Laboratory Standards Institute, "Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically". Approved standard, 8th ed. CLSI publication M07-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2009.

44) A. Espinel-Ingroff "Comparation of the E-test with the NCCLS M38-P method for antifungal susceptibility testing of common and emerging pathogenic filamentous fungi". *J. Clin. Microbiol.*, **2001**, 1360-1367.

45) T. Tsukatani, H. Suenaga, M. Shiga, K. Noguchi, M. Ishiyama, T. Ezoe, "Comparison of the WST-8 colorimetric method and the CLSI broth microdilution method for susceptibility testing against drug-resistant bacteria", *J. Microbiol Methods*, **2012**, 160-166

46) L.M. Podust, T.L.Poulos, M.R. Waterman "Crystal structure of cytochrome P450 14α-sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium*

tuberculosis in complex with azole inhibitors" *Proc. Natl. Acad Sci U S A*, **2001**, *98*, 3068-3073.

47) Thomas L Poulos, "Cytophrome P450", *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1995**, *5*, 767-774.

48) A. Viegas, J. Manso, L. Franklin, Nobrega and J. Cabrita, "Saturation-Transfer Difference (STD) NMR: A Simple and Fast Method for Ligand Screening and Characterization of Protein Binding", *J. Chem. Educ*, **2011**, *88*, 990–994.

49) B. Meyer, T. Peters, "NMR Spectroscopy Techniques for Screening and Indentifying Ligand Binding to Protein Receptors", *Angew. Chem.Int. Ed.*,
2003, *42*, 864-890.

50) F. Touzeau, A. Arrault, G. Guillaumet, E. Scalbert, B. Pfeiffer, M.-C. Rettori, P. Renard, J.-Y. Mérour "Synthesis and Biological Evaluation of New 2-(4,5-Dihydro-1H-imidazol-2-yl)-3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazine Derivatives" J. Med. Chem. 2003, *46*, 1962-1979

51) G.S. Predvoditeleva, M.N. Shchukina, J. Gen. Chem. USSR (Engl. Transl.), 1963, 33, 145-150, 138-142.