ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

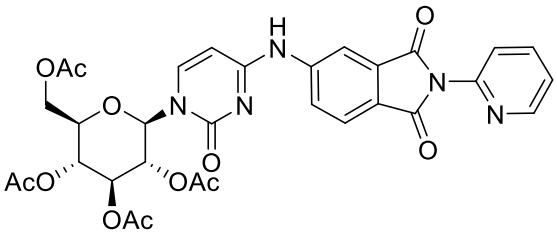
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ανάπτυξη συνθετικής μεθοδολογίας για τη σύνθεση *N*^{1}-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-*N*^{4}-(2-αρυλο-1,3-διοξοϊσοινδολιν-5-υλο)κυτοσινών



Των φοιτητών:

Εμμανουήλ Μπρουμίδη (ΑΜ:1111201200071)

Νικόλαου Γιαννόπουλου (ΑΜ:1111201100013)

Επιβλέπων: Γκιμήσης Αθανάσιος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Αθήνα 2016

Περιεχόμενα

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ……...4

1.1 Ο Σακχαρώδης διαβήτης……....4

1.2 Η Φωσφορυλάση του Γλυκογόνου……..……...7

1.3 Ανάπτυξη φαρμάκων και εφαρμογές στη θεραπεία του σακχαρώδη διαβήτη……..……..…11

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ……...……24

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ……25

3.1 Καθαρισμός 4-νιτροφθαλικού οξέος……28

3.2 Σύνθεση 4-νιτροφθαλικού ανυδρίτη……..……...28

3.3 Καθαρισμός 4-νιτροφθαλικού ανυδρίτη……..……28

3.4 Σύζευξη 4-νιτροφθαλικού ανυδρίτη με αμίνες……...29

3.5 Υδρογόνωση αμινών……30

3.6 Υποκατάσταση της ομάδας του 1,2,4-τριαζολίου από αρωματικές αμίνες...31

3.7 Σύζευξη αμινών με τη 2,4-διχλωροπυριμιδίνη……32

3.8 Ενεργοποίηση ετεροκυκλικής βάσης……...33

3.9 Σύνθεση της 2’,3’,4’,6’-τετρα-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο -Ν-ουρακίλης (Ν-γλυκοζυλίωση, σύζευξη τύπου Vorbrüggen)……34

3.10 Χλωρίωση γλυκοουρακίλης……35

3.11 Συμπεράσματα……36

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ……37

4.1 4-Νιτροφθαλικός ανυδρίτης……..…..37

4.2 5-νιτρο-2-(πυριμιδιν-2-υλο)ισοϊνδολιν-1,3-διόνη (1)……..……38

4.3 5-νιτρο-2-(πυριμιδιν-2-υλο)ισοϊνδολιν-1,3-διόνη (2)……..39

4.4 5-αμινο-2-(πυριμιδιν-2-υλο)ισοϊνδολιν-1,3-διόνη……40

4.5 Προσπάθειες σύνθεσης τηςN^1-(2,3,4,6-τετρα-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-N^4-(2-πυριμιδινο-1,3-διοξοϊσοινδολιν-5-υλο)κυτοσίνης ……..…41

4.6 5-νιτρο-2-(πυριδιν-2-υλο)ισοϊνδολιν-1,3-διόνη ……..……..…42

4.7 5-αμινο-2-(πυριδιν-2-υλο)ισοϊνδολιν-1,3-διόνη ……..……43

4.8 N^1-(2,3,4,6-τετρα-*O*-ακετυλο-*β*-D-γλυκοπυρανοζυλο)-N^4-(πυριδιν-2-υλο-1,3-διοξοϊσοινδολιν-5-υλο)κυτοσίνη ……..……...44

4.9 Προσπάθεια σύνθεσης της 5-((2-χλωροπυριμιδιν-4-υλο)αμινο)-2-(πυριμιδιν-2-υλο)ισοϊνδολιν-1,3-διόνης…….…….…..46

4.10 Προσπάθεια σύνθεσης της 5-((2-χλωροπυριμιδιν-4-υλο)αμινο)-2-(πυριδιν-2-υλο)ισοϊνδολιν-1,3-διόνης …….....47

4.11 Προσπάθεια σύνθεσης της 6-((2-χλωροπυριμιδιν-4-υλο)αμινο)-αμινοουρακίλης ……..……48

4.12 2,4-Ο-δις-(τριμεθυλοσιλυλο)-ουρακίλη……..……..……..……49

4.13 2,3,4,6-Τετρα-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλοουρακίλη……50

5. ΑΝΑΦΟΡΕΣ……..51

6. ΦΑΣΜΑΤΑ……53

1.Θεωρητικό μέρος

1.1. Ο Σακχαρώδης διαβήτης

Σακχαρώδης: Αναφέρεται στην παρουσία του σακχάρου στα ούρα των ασθενών που πάσχουν από τη νόσο. Το σακχαρώδης διακρίνει τη νόσο αυτή από τον άποιο διαβήτη, ο οποίος προκαλείται από ελαττωμένη νεφρική επαναπορρόφηση του νερού.

Διαβήτης: Ονομασία που δόθηκε από τα αρχαία χρόνια, λόγω της πολυουρίας[1]

Με τον όρο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) αναφερόμαστε σε μια μεταβολική διαταραχή πολλαπλών αιτίων η οποία χαρακτηρίζεται από χρόνια υπεργλυκαιμία με ταυτόχρονες επιπλοκές στον μεταβολισμό των υδατανθράκων, λιπαρών οξέων και πρωτεϊνών λόγω της ανεπαρκούς έκκρισης ή/και δράσης της ορμόνης ινσουλίνης. Ο ΣΔ επηρεάζει περίπου το 5% του παγκόσμιου πληθυσμού και θεωρείται ότι είναι το πιο σοβαρό μεταβολικό νόσημα στον κόσμο, αφού προσβάλλει εκατοντάδες εκατομμυρίων ατόμων. Η μακροχρόνια επίδραση του ΣΔ μπορεί να οδηγήσει, μεταξύ άλλων σε ζημία και δυσλειτουργία ζωτικών οργάνων και οδηγεί σταδιακά σε λήθαργο, κόμμα και σε περίπτωση που μείνει αθεράπευτος, θάνατο. Συχνά, στα πρώιμα στάδια της ασθένειας τα συμπτώματα δεν είναι τόσο σοβαρά ή μπορεί και να απουσιάζουν εντελώς. Σταδιακά όμως ο ΣΔ μπορεί να οδηγήσει σε εκφυλιστική πάθηση του αμφιβληστροειδούς και τύφλωση, νεφροπάθεια και νεφρική ανεπάρκεια, νευροπάθεια, μειωμένη ροή του αίματος στα άκρα και κυρίως στα πόδια κάτι το οποίο μπορεί να απαιτήσει ακρωτηριασμό και προβλήματα στις αρθρώσεις. Πολλές παθογονικές πορείες εμπλέκονται στην εμφάνιση της ασθένειας και σε πολλές περιπτώσεις δεν είναι γνωστός ο μηχανισμός που λαμβάνει χώρα. Μερικές από τις πορείες αυτές περιλαμβάνουν την καταστροφή των κυπάρων-β του παγκρέατος που έχει ως συνέπεια την ανεπάρκεια στην παραγωγή ινσουλίνης και άλλες που οδηγούν σε αντίσταση

στην δράση της. Οι ανωμαλίες στον μεταβολισμό των υδατανθράκων, λιπών και πρωτεϊνών οφείλονται στην μη αποτελεσματική δράση της ινσουλίνης στους ιστούς-στόχους λόγω είτε της έλλειψης της είτε της ελαπωμένης ευαισθησίας σε αυτή.[2]

Για να κατανοηθεί καλύτερα η ασθένεια, πρώτα πρέπει να κατανοήσουμε πως η γλυκόζη επεξεργάζεται φυσιολογικά από το σώμα.

Η ινσουλίνη είναι μια ορμόνη η οποία προέρχεται από έναν αδένα που βρίσκεται πίσω και κάτω από το στομάχι, στο πάγκρεας. Η πορεία που ακολουθείται είναι η εξής:

- Το πάγκρεας εκκρίνει ινσουλίνη στο αίμα
- Η ινσουλίνη κυκλοφορεί μέσα στο σώμα, επιτρέποντας στα σάκχαρα να εισέλθουν μέσα στα κύπαρα
- Η ινσουλίνη μειώνει έτσι το επίπεδο των σακχάρων που βρίσκονται στο αίμα
- Όσο μειώνονται τα επίπεδα της ινσουλίνης στο αίμα, τόσο αυξάνεται και η έκκριση της από το πάγκρεας

Ανάλογα, μπορούμε να αναφερθούμε και στην πορεία που ακολουθεί η γλυκόζη, η οποία και αποτελεί πηγή ενέργειας για τα κύπαρα, μέσα στο σώμα:

- Η γλυκόζη προέρχεται από δυο κύριες πηγές. Από την τροφή και από το ήπαρ.
- Τα σάκχαρα απορροφούνται από το αίμα όπου και εισάγονται κατόπιν στα κύπαρα με την βοήθεια της ινσουλίνης.
- Το συκώτι μπορεί να αποθηκεύει γλυκογόνο και να παράγει γλυκόζη.
- Όταν τα επίπεδα γλυκόζης είναι χαμηλά, όπως σε περιπτώσεις νηστείας, τότε το ήπαρ μετατρέπει αποθηκευμένο γλυκογόνο σε

γλυκόζη έτσι ώστε να διατηρηθούν τα επίπεδα της στο αίμα σε φυσιολογικά επίπεδα.[3]

Διαβήτης τύπου Ι : Ο διαβήτης τύπου Ι προκαλείται από την αυτοάνοση καταστροφή των κυττάρων β του παγκρέατος που εκκρίνουν ινσουλίνη και συνήθως εμφανίζεται πριν από την ηλικία των 20 ετών. Ο διαβήτης τύπου 1 αναφέρεται και ως ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης που σημαίνει ότι το άτομο που έχει προσβληθεί χρειάζεται τη χορήγηση ινσουλίνης για να ζήσει. Αντιθέτως, οι περισσότεροι διαβητικοί έχουν φυσιολογικά ή και αυξημένα επίπεδα ινσουλίνης στο αίμα τους, αλλά δεν αποκρίνονται σχεδόν καθόλου στην ορμόνη, ένα χαρακτηριστικό που ονομάζεται αντίσταση στην ινσουλίνη. Δεν είναι γνωστά τα αίτια που οδηγούν στην εκδήλωση της ασθένειας, ο λόγος δηλαδή που το ανοσοποιητικό σύστημα επιτίθεται στα β κύτταρα. Πιστεύεται ότι προκαλείται από έναν συνδυασμό γενετικής προδιάθεσης καθώς και περιβαντολλογικών παραγόντων, αν και δεν είναι ξεκάθαρο ποιοι συγκεκριμένοι παράγοντες είναι ζημιογόνοι.[1,3]

Διαβήτης τύπου ΙΙ: Ο διαβήτης τύπου ΙΙ αντιπροσωπεύει περίπου το 90% των περιπτώσεων του διαβήτη σε ολόκληρο τον κόσμο και είναι η πιο συχνή μεταβολική νόσος. Είναι η κύρια αίτια τύφλωσης, νεφρικής ανεπάρκειας και μη τραυματικού ακρωτηριασμού. Επιπλέον, η παχυσαρκία είναι ένας σημαντικός προδιαθεσικός παράγοντας για την ανάπτυξη του διαβήτη τύπου ΙΙ, αλλά δεν είναι όλα τα άτομα που πάσχουν από αυτόν υπέρβαρα. Στον προδιαβήτη- που μπορεί να οδηγήσει στον διαβήτη τύπου ΙΙ – αλλά και στον διαβήτη τύπου ΙΙ τα κύτταρα στο σώμα γίνονται ανθεκτικά στην δράση της ινσουλίνης και ταυτόχρονα το πάγκρεας δεν είναι ικανό για να παράξει αρκετή έτσι ώστε να αυξηθεί η δράση της. Έτσι, αντί να εισάγονται μέσα στα κύτταρα, όπου χρειάζονται για την παραγωγή ενέργειας τα σάκχαρα συσσωρεύονται στο αίμα.

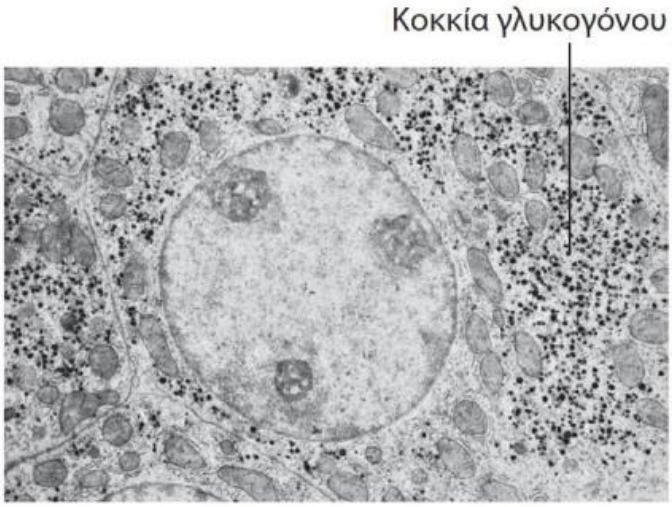
Διαβήτης κύησης(gestational): Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, παράγονται από τον πλακούντα ορισμένες ορμόνες οι οποίες βοηθούν στην ομαλή εξέλιξη της εγκυμοσύνης. Αυτές οι ορμόνες μπορεί να κάνουν τα

κύπαρα πιο ανθεκτικά στην δράση της ινσουλίνης. Κανονικά το πάγκρεας αντιδρά σε αυτή την κατάσταση αυξάνοντας την παραγωγή της ινσουλίνης για να αντισταθμίσει την μειωμένη δράση της, όμως ορισμένες φορές δεν μπορεί να παράξει αρκετή ορμόνη με αποτέλεσμα να εισάγονται πολύ μικρές ποσότητες γλυκόζης στα κύπαρα, κάτι το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση της ασθένειας.

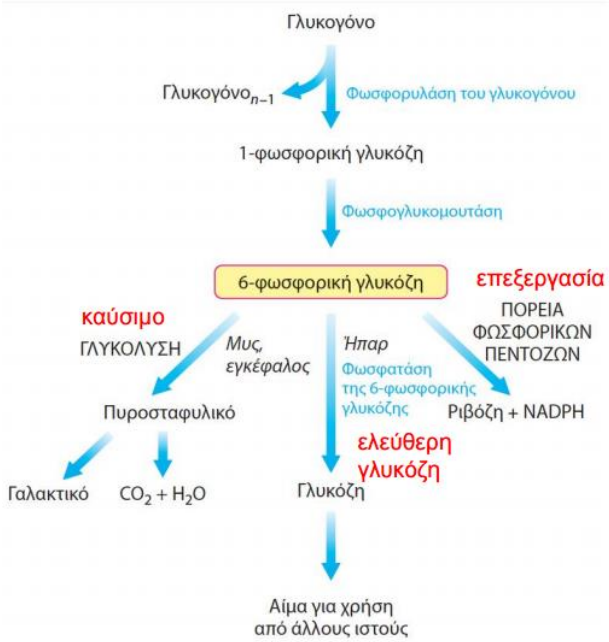
1.2 Η Φωσφορυλάση του γλυκογόνου

Το γλυκογόνο είναι μια άμεσα κινητοποιούμενη μορφή αποθήκευσης της γλυκόζης. Είναι ένα πολύ μεγάλο, διακλαδισμένο πολυμερές καταλοίπων γλυκόζης, το οποίο μπορεί να αποικοδομηθεί και να αποδώσει γλυκόζη όταν υπάρχει ενεργειακή ανάγκη. Ένα μόριο γλυκογόνου έχει κατά προσέγγιση 12 στοιβάδες ολιγομερών γλυκόζης και μπορεί να φθάσει σε μέγεθος τα 40 nm. Τα περισσότερα κατάλοιπα γλυκόζης στο γλυκογόνο συνδέονται μεταξύ τους με γλυκοζιτικούς δεσμούς α-1,4. Οι διακλαδώσεις που απαντούν περίπου κάθε 10 κατάλοιπα δημιουργούνται μέσω γλυκοζιτικών δεσμών α-1,6. Αν και οι περισσότεροι ιστοί αποθηκεύουν μικρές ποσότητες γλυκογόνου οι δύο κύριες θέσεις αποθήκευσης γλυκογόνου είναι το ήπαρ και οι σκελετικοί μύες. Η συγκέντρωση του γλυκογόνου είναι υψηλότερη στο ήπαρ παρά στους μυς (10% έναντι 2% κατά βάρος), αλλά περισσότερο γλυκογόνο αποθηκεύεται στους σκελετικούς μυς συνολικά, λόγω της πολύ μεγαλύτερης μάζας τους. Το γλυκογόνο απαντά στο κυπαρόπλασμα με τη μορφή κοκκίων. Στο ήπαρ, η σύνθεση και αποικοδόμηση του γλυκογόνου ρυθμίζονται έτσι ώστε να διατηρούνται τα απαιτούμενα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα για την κάλυψη των αναγκών του οργανισμού ως συνόλου. Αντιθέτως, στους μυς οι διεργασίες αυτές ρυθμίζονται για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών μόνο των μυών. Η αποικοδόμηση και η σύνθεση του γλυκογόνου είναι σχετικά απλές βιοχημικές διεργασίες. Η αποικοδόμηση συνιστάται από τρία βήματα: (1) απελευθέρωση 1-φωσφορικής γλυκόζης από το γλυκογόνο, με τη βοήθεια του ενζύμου φωσφορυλάση του γλυκογόνου (2) ανακατασκευή του υποστρώματος του γλυκογόνου για να υποστεί περαιτέρω αποικοδόμηση και

(3) μετατροπή της 1-φωσφορικής γλυκόζης σε 6-φωσφορική γλυκόζη για περαιτέρω μεταβολισμό[1]



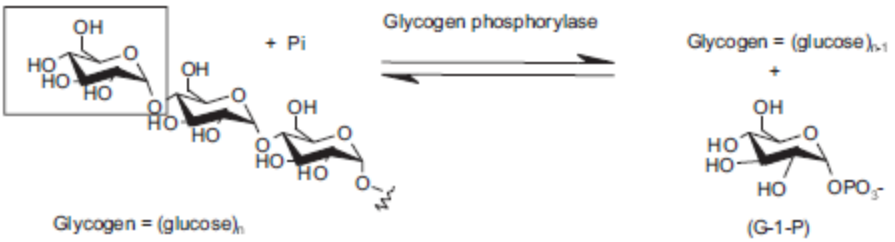
Εικόνα 1: Ηλεκτρονιομικρογραφία ενός ηπατικού κυττάρου στην οποία διακρίνονται κοκκία γλυκογόνου



Εικόνα 2 : Η πορεία του γλυκογόνου και ο ρόλος της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου[1]

Εμφάνιση και ιδιότητες της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (Glycogen Phosphorylase, GP).

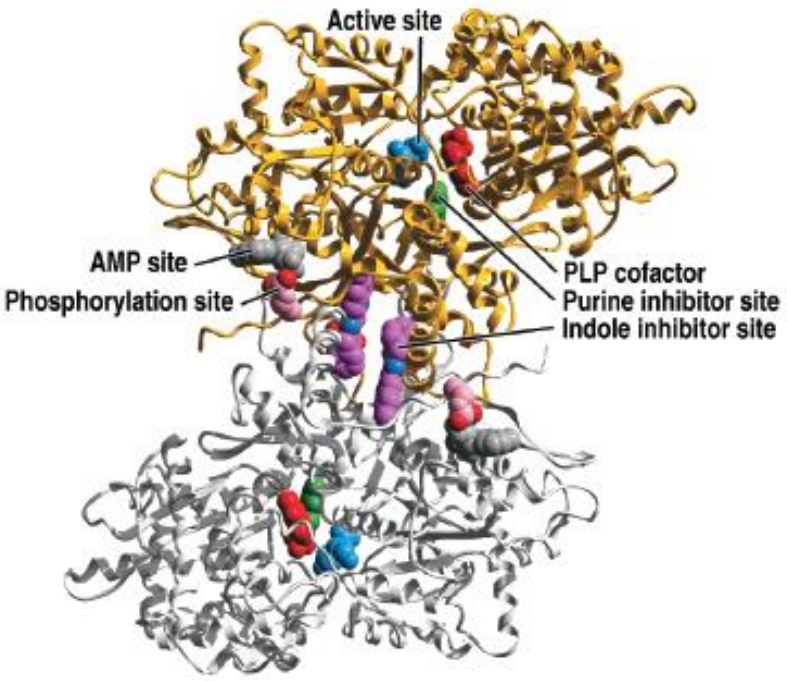
Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, το ένζυμο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου αλληλεπιδρά με το μακρομόριο του γλυκογόνου και καταλύει την προσθήκη φωσφορικού οξέος στον 1,4-ανωμερικό δεσμό, απελευθερώνοντας 1-φωσφορική γλυκόζη και ένα μακρομόριο γλυκογόνου μικρότερο κατά ένα κατάλοιπο σακχάρου (γλυκόζης).



Εικόνα 3 : Η δράση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου[4]

Οι άνθρωποι καθώς και άλλα θηλαστικά είδη εκφράζουν τρεις διακριτές μορφές του ενζύμου, στο συκώτι, εγκέφαλο και στους σκελετικούς μύες. Αυτές οι πρωτεΐνες είναι προϊόντα από συγκεκριμένα γονίδια τα οποία στους ανθρώπους βρίσκονται στα χρωμοσώματα 14, 20, και 11, αντίστοιχα. Όλες οι ανθρώπινες μορφές της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου έχουν μοριακό βάρος περίπου 97 kDa (για την μονομερή μορφή) και μοιράζονται περίπου κατά 80 % τα ίδια αμινοξέα. Η ενεργή μορφή του ενζύμου είναι ένα ομοδιμερές που αποτελείται από δυο ταυτόσημες μορφές των μονομερικών υπομονάδων (194 kDa συνολικά) και σχετίζονται με μεγάλη συγγένεια η μια με την άλλη. Η δραστικότητα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ρυθμίζεται φυσιολογικά από ορμονικά και νευρονικά σήματα τα οποία αλλάζουν την φωσφορυλίωση στην σερίνη 14 σε κάθε υπομονάδα. Στο συκώτι το ένζυμο βρίσκεται στην μορφή a (GPa) στην πλειοψηφία του η οποία αποτελεί και την δραστική μορφή. Η καταλυτική δυνατότητα της μη φωσφορυλιωμένης

μορφής της φωσφορυλάσης του ήπατος, GPb δεν είναι καθόλου ισχυρή σε σχέση με την μορφή a.[4]



Εικόνα 4 : Η τρισδιάστατη δομή του ομοδιμερούς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου[4]

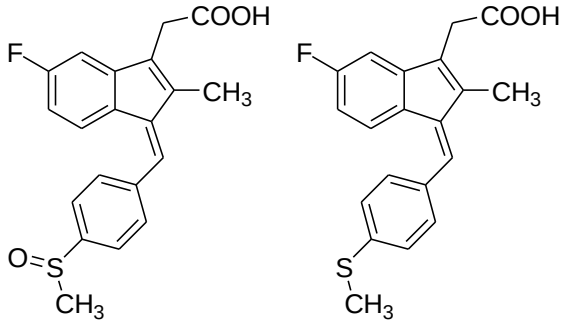
Η φωσφορυλάση b (GPb), η οποία συνήθως είναι ανενεργή, μετατρέπεται στην ενεργό μορφή GPa με τη φωσφορυλίωση ενός μόνο κατάλοιπου σερίνης σε κάθε υπομονάδα. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο κινάση της φωσφορυλάσης. Η μορφή b στους μύες μπορεί να ενεργοποιηθεί επίσης με τη δέσμευση της AMP μια δράση που την ανταγωνίζονται η ATP και η 6-φωσφορική γλυκόζη. Η μορφή a στο συκώτι αναστέλλεται από τη γλυκόζη. Οι θέσεις δέσμευσης της AMP και της φωσφορυλίωσης εντοπίζονται στην επιφάνεια επαφής μεταξύ των υπομονάδων. Στους μύες, η φωσφορυλάση ενεργοποιείται για να παράγει γλυκόζη προς χρήση μέσα στο κύπαρο ως καυσίμου για τη συσταλτική δράση. Αντιθέτως, η φωσφορυλάση του ήπατος ενεργοποιείται για να απελευθερώσει γλυκόζη προς εξαγωγή σε άλλα όργανα, όπως οι σκελετικοί μύες και ο εγκέφαλος.

1.3 Ανάπτυξη φαρμάκων και εφαρμογές στην θεραπεία του σακχαρώδους διαβήτη

Κύριες μέθοδοι ανάπτυξης φαρμάκων.

Τυχαία ανακάλυψη (serendipitous). Το 1928 ο Alexander Fleming παρατήρησε μια πράσινη μούχλα να αναπτύσσεται σε μια καλλιέργεια του βακτηρίου Staphylococcus aureus και στα σημεία που υπήρχε μούχλα τα βακτήρια είχαν πεθάνει. Αυτή η παρατήρηση οδήγησε στην ανακάλυψη της πενικιλίνης, η οποία και παράγεται από μύκητες. Μετά από αυτό το εύρημα, ο Fleming προσπάθησε πολλές φορές να επαναλάβει το πείραμα αλλά χωρίς αποτέλεσμα. Τελικά ο συνάδελφος του Dr Ronald Hare κατάφερε να επαναλάβει επιτυχώς το πείραμα του Fleming, το οποίο για να πετύχει θα έπρεπε να γίνει κάτω από έναν συνδυασμό από απίθανα γεγονότα, όπως έγινε και την πρώτη φορά: 1) Το τρυβλίο που χρησιμοποιήθηκε μολύνθηκε τυχαία και ταυτόχρονα από τα σπόρια μυκήτων. 2) Όταν έφυγε για διακοπές, αντί να τοποθετήσει το τρυβλίο στο ψυγείο, όπως πάντα έκανε, το άφησε καταλάθος στον πάγκο του εργαστηρίου. Όταν γύρισε τον άλλο μήνα παρατήρησε νεκρά βακτήρια. 3) Η συνηθισμένη πενικιλίνη δεν σκοτώνει τα βακτήρια, απλώς επιβραδύνει την ανάπτυξη τους και δεν έχει επίδραση αν προστεθεί αφού τα βακτήρια έχουν αναπτυχθεί. Όμως στο διάστημα που έλειπε ο Fleming ο καιρός ήταν ασυνήθιστα κρύος, και αυτό επιβράδυνε την ανάπτυξη των βακτηρίων, επιτρέποντας έτσι στους μύκητες να δράσουν πάνω τους. 4) Το στέλεχος της μούχλας που είχε αναπτυχθεί στο τρυβλίο του Fleming, ήταν ένας σχετικά καλός παραγωγός πενικιλίνης, αν και τα περισσότερα στελέχη αυτού του μύκητα (Penicillium) δεν παράγουν καθόλου πενικιλίνη. 5) Τα σπόρια πρέπει να προήλθαν από το εργαστήριο στον από κάτω όροφο από αυτό του Fleming, στο οποίο εκείνη την περίοδο πραγματοποιούσανε πειράματα με τέτοιους μύκητες. Η περίπτωση του Fleming είναι μια από τις πολλές, όπου έχει πραγματοποιηθεί μια ανακάλυψη φαρμάκου με τυχαίο τρόπο, και για πολύ καιρό ήταν ο μόνος τρόπος παρασκευής ενός νέου φαρμάκου.

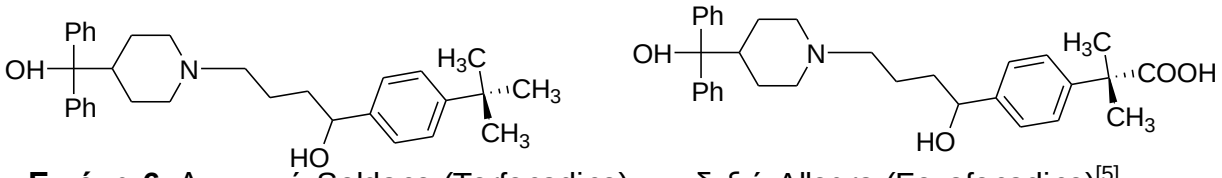
Ανακάλυψη μέσω μελέτης του μεταβολισμού. Κατά τη διάρκεια τέτοιων μελετών, οι μεταβολίτες που προκύπτουν, τα προϊόντα που προκύπτουν δηλαδή, από τον μεταβολισμό στο σώμα, απομονώνονται και μελετώνται ξεχωριστά για να καθοριστεί εάν η δραστικότητα που παρατηρείται προέρχεται από το ίδιο το φάρμακο, ή από τους μεταβολίτες του. Για παράδειγμα το αντιφλεγμονώδες φάρμακο sundilac δεν είναι το ενεργό συστατικό, αλλά το προϊόν που προκύπτει μετά από τον μεταβολισμό του.



Εικόνα 5 : Sindulac και μεταβολίτης(ενεργή ουσία)[5]

Το αντιισταμινικό φάρμακο Seldane (terfenadine) είχε βρεθεί να προκαλεί αρρυθμίες σε ορισμένους χρήστες που ελάμβαναν κάποια αντιμυκητιακά φάρμακα ταυτόχρονα, τα οποία και βρέθηκε ότι μπλοκάρουν το ένζυμο που μεταβολίζει το Seldane, κάτι το οποίο είχε ως αποτέλεσμα να συσσωρεύονται μεγάλες ποσότητες από αυτό στο σώμα, και να προκαλούν τις αρρυθμίες. Κατόπιν το Seldane σταμάτησε να κυκλοφορεί στην αγορά.

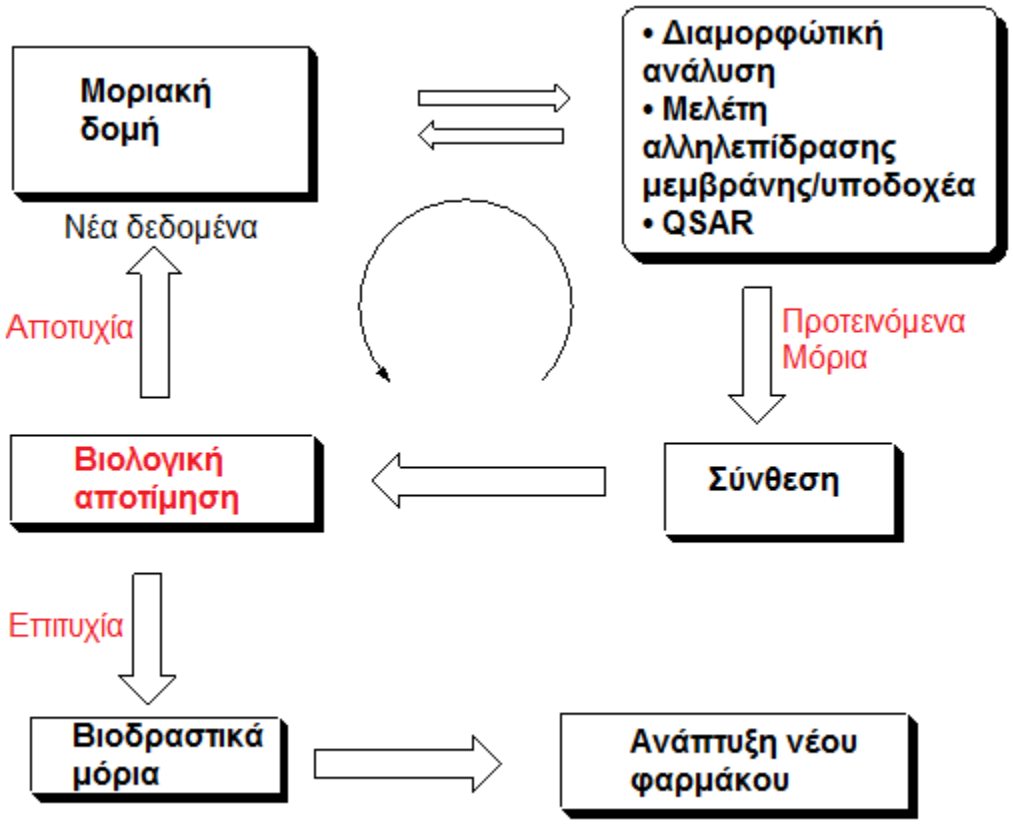
Όμως, στην συνέχεια βρέθηκε ότι ένας από τους μεταβολίτες του Seldane, ο fexofenadine (Allegra) ,βρέθηκε να έχει επίσης τις επιθυμητές αντιισταμινικές ιδιότητες με το Seldane αλλά και ότι μπορεί να μεταβολιστεί ακόμα και με την ταυτόχρονη παρουσία αντιμυκητιακών φαρμάκων. Σε βάθος χρόνου, το Allegra αντικατέστησε πλήρως το Seldane



Εικόνα 6: Αριστερά Seldane (Terfenadine) και δεξιά Allegra (Fexofenadine)[5]

Ανακάλυψη μέσω κλινικών παρατηρήσεων. Μερικές φορές, ένα υποψήφιο φάρμακο κατά τη διάρκεια κλινικών δοκιμών, μπορεί να βρεθεί ότι παρουσιάζει παραπάνω από μια φαρμακολογική ιδιότητα, κοινώς μπορεί να παρουσιάζει παρενέργειες. Στη συνέχεια αυτή η ένωση μπορεί να μελετηθεί για τη χρήση της ως φάρμακο για κάποια διαφορετική πάθηση από αυτή που αρχικά είχε χρησιμοποιηθεί. Υπάρχουν πολλαπλά παραδείγματα από κλινικές δοκιμές φαρμάκων που οδήγησαν στην ανακάλυψη μη αναμενόμενων ιδιοτήτων τους. Για παράδειγμα το αντικαταθλιπτικό φάρμακο Wellbutrin, βρέθηκε να βοηθά ασθενείς να σταματήσουν το κάπνισμα και έγινε έτσι το πρώτο φάρμακο που πωλήθηκε ως βοήθημα για το κόψιμο του καπνίσματος, Zyban. Στην περίπτωση αυτή το Wellbutrin και το Zyban είχαν την ίδια δραστική ουσία, Bupropion hydrochloride. Μια άλλη περίπτωση που μπορεί να αναφερθεί είναι αυτή του φαρμάκου sildenafil citrate (Viagra). Αρχικά είχε σχεδιασθεί από την φαρμακευτική εταιρία Pfizer να δρα κατά της καρδιοπάθειας και της υπέρτασης ,μπλοκάροντας το ένζυμο φωσφοδιερεστάση-5 το οποίο υδρολύει την κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη (cGMP), μια αγγειοδιασταλτική ένωση που αυξάνει την ροή του αίματος. Το 1991 η ένωση πέρασε στην φάση I των κλινικών δοκιμών για την καρδιοπάθεια. Στην φάση II δεν ήταν τόσο αποτελεσματική κατά της καρδιοπάθειας όσο η Pfizer πίστευε ότι θα είναι, και έτσι το φάρμακο επέστρεψε στην φάση I των κλινικών δοκιμών για να διαπιστωθεί πόσο υψηλή δόση μπορούσε να χρησιμοποιηθεί πριν το φάρμακο γίνει επικίνδυνο. Σε αυτή την δοκιμή οι εθελοντές ανέφεραν αυξημένη στυτική λειτουργία, ως παρενέργεια. Έτσι δεδομένου ότι είχε μικρή ή και καθόλου δράση κατά της καρδιοπάθειας, αποφασίστηκε να γίνουν έλεγχοι για να διαπιστωθεί αν η ένωση θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως φάρμακο κατά της στυτικής δυσλειτουργίας, κάτι το οποίο βρέθηκε ότι ισχύει.[5]

Ανακάλυψη με βάση την τρισδιάστατη δομή-Ορθολογικός σχεδιασμός. Πολλά φάρμακα προσδένονται στους στόχους τους με έναν τρόπο που θυμίζει το κλειδί και την κλειδαριά (μοντέλο Fischer). Ως εκ τούτου, θα πρέπει να είμαστε σε θέση να σχεδιάσουμε ένα κλειδί, έχοντας αρκετές γνώσεις για το σχήμα και τη χημική σύσταση της κλειδαριάς. Στην ιδανική περίπτωση, θα θέλαμε να σχεδιάσουμε ένα μικρό μόριο το οποίο να είναι συμπληρωματικό στο σχήμα και την ηλεκτρονιακή δομή της πρωτεΐνης-στόχου, έτσι ώστε να προσδένεται αποτελεσματικά στη στοχευμένη θέση. Η πρόβλεψη της συγγένειας πρόσδεσης απαιτεί μια λεπτομερή κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ μιας χημικής ένωσης και του μορίου. Ο σχεδιασμός φαρμάκων που βασίζεται στη δομή έχει αποδειχθεί ένα ισχυρό εργαλείο στην ανάπτυξη φαρμάκων.[1,6]

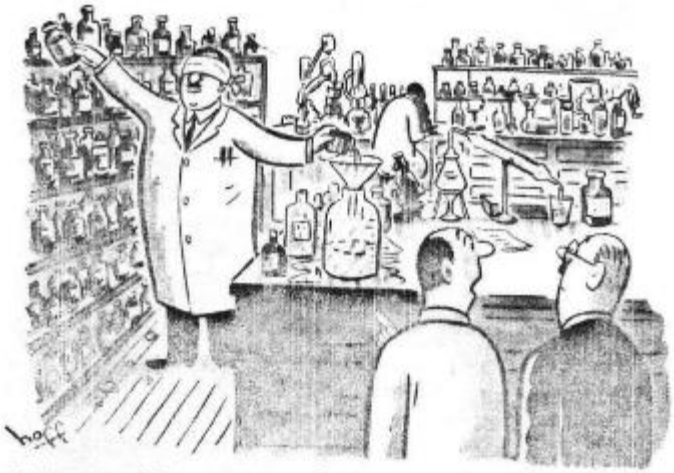


Εικόνα 7 : Διάγραμμα ροής του ορθολογικού σχεδιασμού[6]

Για υποψήφια φάρμακα που είναι αναστολείς, οι όροι που συχνά χρησιμοποιούνται είναι η IC_{50} και η IC_{90} για να περιγράψουν τις συγκεντρώσεις του αναστολέα που απαιτούνται για να ελαπωθεί μια απόκριση αντίστοιχα στο 50% ή 90% της τιμής της απουσία του αναστολέα. Αντίστοιχα χρησιμοποιείται και ο όρος EC_{50} και ο EC_{90} όπου είναι η συγκέντρωση του υποψήφιου φαρμάκου που απαιτείται για να αποσπάσει το 50% της μέγιστης βιολογικής απόκρισης, και αντίστοιχα για το 90%. Τιμές όπως IC_{50} και EC_{50} είναι ένα μέτρο της ισχύος του υποψήφιου φαρμάκου στο να τροποποιεί τη δραστικότητα ενός βιολογικού στόχου. Επιπλέον, εισάγεται ο όρος K_i που ονομάζεται σταθερά αναστολής, και είναι η τάση ενός αναστολέα να προσδένεται στον στόχο του, προσδιορίζεται από την σχέση K_i=[R][L]/[RL], οπού [R] συγκέντρωση του ελεύθερου υποδοχέα, [L] η συγκέντρωση του ελεύθερου προσδέματος και [RL] η συγκέντρωση του συμπλόκου υποδοχέα-προσδέματος. Για να εμποδιστούν ανεπιθύμητες επιπτώσεις που συχνά καλούνται παρενέργειες, τα ιδανικά υποψήφια φάρμακα δεν πρέπει σε οποιαδήποτε έκταση να προσδένουν βιομόρια διαφορετικά από τον στόχο τους[5]

Ένα από τα πολλά πλεονεκτήματα του ορθολογικού σχεδιασμού είναι ότι για την κατανόηση των βιολογικών στόχων, συνήθως εμπλέκεται η χρήση θεωρητικών υπολογισμών που επιτελούνται από ισχυρούς ηλεκτρονικούς υπολογιστές[6]. Μέχρι και την δεκαετία του 80΄ η μεγάλη πλειοψηφία των φαρμάκων στην αγορά προερχόντουσαν από ελέγχους μεγάλης κλίμακας, είτε χειροκίνητους είτε με τη βοήθεια ρομποτικών συστημάτων. Τέτοια ρομποτικά συστήματα μπορούσαν να πραγματοποιήσουν χιλιάδες δοκιμές κάθε μέρα με τη χρήση ραδιοσήμανσης ή με φασματοσκοπία. Με αυτό τον τρόπο μπορούσε να γίνει έλεγχος μιας ολόκληρης βάσης δεδομένων ενώσεων για πιθανή φαρμακολογική δράση, η οποία μπορεί να περιείχε 100.000 με 500.000 ενώσεις σε λιγότερο από ένα χρόνο. Με αυτό τον τρόπο βρέθηκαν και τα πρώτα φάρμακα κατά του ιού HIV καθώς και τα πρώτα ανεπτυγμένα αντιβιοτικά. Η μεγάλη επανάσταση στον χώρο ήρθε με την ανάπτυξη των ηλεκτρονικών υπολογιστών. Από την αρχή της δεκαετίας του

90’ υπήρχαν εξειδικευμένα προγράμματα υπολογιστών, όπως το DOCK τα οποία μπορούσαν να προσφέρουν γρήγορους και έγκυρους υπολογισμούς γεωμετρικών χαρακτηριστικών πιθανών στόχων-βιομορίων. Πιθανοί υποκαταστάτες- αναστολείς ελεγχόντουσαν για πιθανή ενεργότητα σε ρυθμό 10 με 100 το λεπτό ,καθιστώντας δυνατό το σκανάρισμα βάσεων δεδομένων μέγεθος 100.000 μορίων σε λιγότερο από μια εβδομάδα ,με τη χρήση ενός ισχυρού υπολογιστή. Εφαρμογή αυτής της πορείας σε έναν υπερ-υπολογιστή της εποχής επέτρεπε τον έλεγχο 500.000 ενώσεων σε μια μέρα[7]

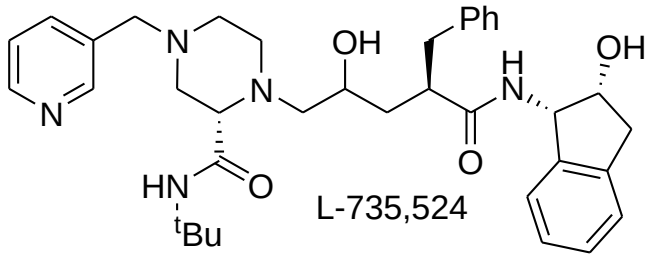


‘That’s Dr Arnold Moore. He’s conducting an experiment to test the theory that most great scientific discoveries were hit on by accident.’
Drawing by Hoff; © 1957
The New Yorker Magazine, Inc.

Εικόνα 8: Σκίτσο που χλευάζει την ανακάλυψη φαρμάκων χωρίς ορθολογικό σχεδιασμό [5]

Μια τέτοια έρευνα-σταθμός- της εφαρμογής του ορθολογικού σχεδιασμού, πραγματοποιήθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 90 για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων για τον ιό HIV που προκαλεί το AIDS. Η ιική ομοδιμερική ασπάρτυλο πρωτεάση, ένα ένζυμο υπεύθυνο για την παραγωγή ορισμένων γονιδιακών προϊόντων τα οποία επιτρέπουν τη σωστή οργάνωση σημαντικών δομικών πρωτεϊνών και την έκλυση ιικών ενζύμων, επιλέχθηκε ως στόχος. Η αναστολή αυτού το ενζύμου έχει ως αποτέλεσμα την αποτροπή της ανάπτυξης και της αντιγραφής του ιού μέσα στα κύπαρα. Συνοπτικά, το

αποτέλεσμα αυτής της προσπάθειας ήταν η επιτυχής ανάπτυξη μιας ένωσης (L-735,524) η οποία εμφανίζει πολύ καλή αναστολή των ενζύμων HIV-1PR και HIV-2PR (πρωτεάσες) με τιμές K_i 0.52 και 3.3. nM αντίστοιχα. Η συγκεκριμένη ένωση βρέθηκε ότι αναστέλλει αποτελεσματικά την εξάπλωση του στελέχους $HIV\text{-}1_{IIIb}$ σε λεμφοειδή κύτταρα σε συγκεντρώσεις 50nM. Επιπλέον βρέθηκε ότι η συγκεκριμένη ένωση είναι εκλεκτικός αναστολέας μόνο των επιθυμητών ενζύμων και δεν εμφανίζει ανασταλτική δράση σε άλλες ανθρώπινες πρωτεάσες όπως τις ρενίνη καθεψίνη-D πεψίνη και χυμοσίνη σε συγκεντρώσεις που ξεπερνούν τα 10μM, και επιπλέον δεν παρατηρήθηκαν προβλήματα υγείας σε πειραματόζωα[8]



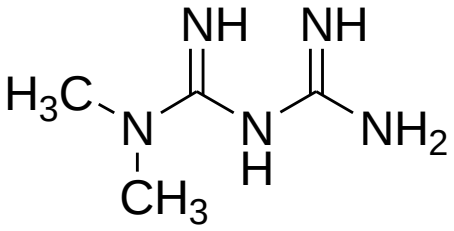
Εικόνα 9: Ο αναστολέας που αναπτύχθηκε[8]

Για την θεραπεία του σακχαρώδους διαβήτη εκτός από την ινσουλίνη που λαμβάνεται υποδόρια ή και ενδοφλέβια, υπάρχουν και μια σειρά από φάρμακα, τα οποία ανάλογα με την κατηγορία που ανήκουν έχουν και διαφορετικό τρόπο δράσης.[9]

Σουλφονυλουρίες. Χρησιμοποιούνται ως αντιδιαβητικά φάρμακα εδώ και πολλές δεκαετίες. Ο τρόπος λειτουργίας τους είναι η αύξηση της παραγωγής της ινσουλίνης από το πάγκρεας. Αυτό επιτυγχάνεται προσδένοντας σε μια ειδική θέση στα β παγκρεατικά κύτταρα. Με αυτό τον τρόπο κλείνει ένα συγκεκριμένο κανάλι καλίου με αποτέλεσμα της μείωσης της πολικότητας του β κυτάρου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη ροή ασβεστίου μέσα στο β-

κύπαρο το οποίο και ενεργοποιεί ορισμένους εκκριτικούς αδένες που βρίσκονται στην επιφάνεια του κυπάρου οι οποίοι παράγουν την ινσουλίνη.

Μετφορμίνη. Η ένωση αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για πάνω από 40 χρόνια για την καταπολέμηση του διαβήτη και θεωρείται από τα φάρμακα "πρώτης γραμμής" για τους ασθενείς με πρόσφατη διάγνωση. Ο μηχανισμός δράσης περιλαμβάνει την αύξηση της ευαισθησίας των ηπατικών και περιφερειακών ιστών (κυρίως των μυών) στην επίδραση της ινσουλίνης. Η μετφορμίνη αναστέλλει την ηπατική γλυκονεογένεση και σε συνθήκες *in vivo* και *in vitro*. Σε μοριακό επίπεδο η δράση της μετφορμίνης μπορεί να εξηγηθεί (μερικώς) από πολλαπλές δράσεις, όπως αυξημένη δραστικότητα του ενζύμου κινάση της τυροσίνης (υποδοχέας ινσουλίνης), αυξημένος αριθμός μεταφοράς και δραστικότητας του ενζύμου GLUT4, το οποίο είναι μεταφορέας της γλυκόζης στο κύπαρο, καθώς και βελτιωμένη σύνθεση γλυκογόνου. Επιπλέον είναι γνωστό ότι η ένωση δεν έχει επίδραση στα β κύπαρα του παγκρέατος. Παρόλα αυτά, ο κύριος υποδοχέας στο ήπαρ και τους μυς στον οποίο η μετφορμίνη προσδένεται και οφείλει την ισχυρή αντιδιαβητική δράση της δεν έχει βρεθεί ακόμα.



Εικόνα 10: Μετφορμίνη

Η Ακαρβόζη, είναι μια ουσία που ανήκει στην ομάδα των αναστολέων της α-γλουκοσιδάσης και εισήχθη στην αγορά σχετικά πρόσφατα σε σχέση με τα 2 προηγούμενα φάρμακα που αναφέρθηκαν. Η Ακαρβόζη αναστέλλει εντελώς την λειτουργία των ενζύμων μαλτάση, ισομαλτάση, σουκράση και γλυκοαμυλάση τα οποία βρίσκονται στο μικρό έντερο. Τα ένζυμα αυτά διασπούν ολιγοσακχαρίτες και δισακχαρίτες σε μονοσακχαρίτες. Με αυτό τον τρόπο μειώνεται ο ρυθμός της απορρόφησης από το έντερο οπότε και

καθυστερεί η εισαγωγή της γλυκόζης στο αίμα, δίνοντας έτσι χρόνο στα β κύπαρα του παγκρέατος να αυξήσουν τον ρυθμό παραγωγής της ινσουλίνης. Η ένωση δεν επιδρά στο βάρος του σώματος και έχει βρεθεί ότι προκαλεί μια μικρή αλλαγή στα τριγλυκερίδια του πλάσματος και ενδείκνυται για μονοθεραπεία.

Η Τρογλιταζόνη, είναι ένα υπογλυκαιμικό φάρμακο, που ανήκει σε μία ομάδα ενώσεων που ονομάζονται θειαζολιδινοδιόνες. Η δυνατότητα μείωσης των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα, οφείλεται στην ιδιότητα της ένωσης να αυξάνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη. Δρα ανάλογα με την μετφορμίνη, και επηρεάζει και το συκώτι και τους μύες. Μηχανιστικές μελέτες έδειξαν ότι κάθε ασθενής που είχε διαβήτη τύπου ΙΙ και αντιμετωπίστηκε με την ένωση αυτή, εμφάνισε αυξημένη ευαισθησία στην ινσουλίνη ,κυρίως στους μύες. Όμως μόνο αυτοί στους οποίους η παραγωγή της ηπατικής γλυκόζης μειώθηκε είδαν σημαντική μείωση στα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα. Η ένωση αυτή, όπως και άλλες από την ίδια κατηγορία δρουν ανασταλτικά και συνδέονται με έναν υποδοχέα που ονομάζεται γ ενεργοποιημένος αναπαραγωγός του υπεροξυσώματος, και οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης ενός μεταφορέα της γλυκόζης.

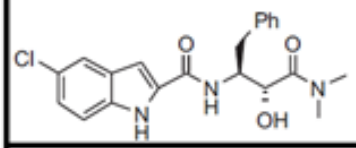
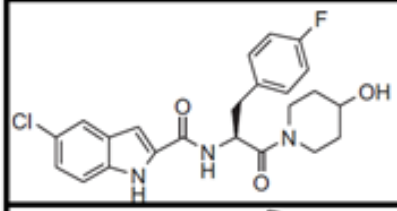
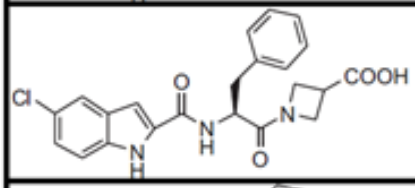
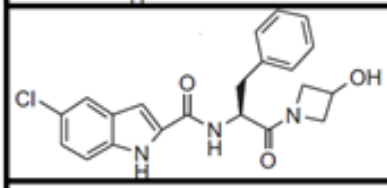
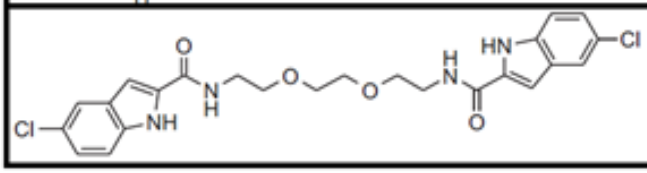
Ρεπαγλινίδη. Πρόκειται για παράγωγο του βενζοϊκού οξέος το οποίο αυξάνει την παραγωγή της ινσουλίνης, και χρησιμοποιείται κυρίως σε ασθενείς με διαβήτη τύπου ΙΙ. Η Ρεπαγλινίδη επάγει την παραγωγή ινσουλίνης μπλοκάροντας ένα κανάλι Καλίου στα β-παγκρεατικά κύπαρα. Έχουν βρεθεί τουλάχιστον δυο και πιθανόν τρείς θέσεις πρόσδεσης στα β κύπαρα. Μια από αυτές τις θέσεις σύνδεσης, χρησιμοποιείται και από τις σουλφονουρίες. Δεν είναι ακόμα γνωστό εάν οι δυο ενώσεις μπορούν να δράσουν συνδυαστικά, για να εμφανιστεί αυξημένη συνολικά παραγωγή της ινσουλίνης.[9] Σε πολλές περιπτώσεις έχει βρεθεί ότι σε περίπτωση συνδυασμού ορισμένων από τα παραπάνω φάρμακα σε συγκεκριμένες δόσεις, μπορεί να έχει θετική επίδραση στην πορεία του ασθενή, σε σχέση με το αν ακολουθούσε μονοθεραπεία. Όμως δεν υπάρχει κάποιος συνδυασμός

που να είναι «πανάκεια» για τον ασθενή, και για αυτό το λόγο πραγματοποιούνται εκτεταμένες έρευνες για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων και μεθόδων για την καταπολέμηση της ασθένειας.

Εκτός από τα φάρμακα, η διατροφή και ο τρόπος ζωής είναι επίσης σημαντικοί παράγοντες πρόληψης αλλά και διαχείρισης του διαβήτη. Από κλινική άποψη, η πρόληψη του διαβήτη είναι πολύ σημαντική, ιδιαίτερα για άτομα με υψηλό ρίσκο να αναπτύξουν την ασθένεια, όπως αυτά με μειωμένη αντοχή στην γλυκόζη. Πολλές ελεγχόμενες δοκιμές οι οποίες ακολούθησαν τους συμμετέχοντες που είχαν διαφορετική ηλικία, φύλο, βάρος και εθνικότητα για μια περίοδο από 2.5- 20 χρόνια, πραγματοποιήθηκαν για να αξιολογήσουν την αποτελεσματικότητα της δίαιτας και της άσκησης ως προληπτικά μέτρα για τον διαβήτη. Αν και τα διάφορα πρωτόκολλα που έχουν εφαρμοστεί εμφανίζουν αρκετές διαφορές σε σχέση με την ποσότητα της σωματικής άσκησης, διατροφής και άλλων παραγόντων, ο κύριος στόχος ήταν η αύξηση της άσκησης, μείωση της πρόσληψης ενέργειας και η υιοθέτηση υγιεινών διατροφικών συνηθειών. Τα αποτελέσματα από τέτοιες δοκιμές παρέχουν αποδείξεις που δείχνουν ότι ο έλεγχος του τρόπου ζωής μειώνει το ρίσκο για την ανάπτυξη διαβήτη τύπου ΙΙ ανάμεσα στα άτομα υψηλού κινδύνου κατά 30-70% . Συγκεκριμένα, το πρόγραμμα πρόληψης του διαβήτη στις ΗΠΑ τερματίστηκε πρώιμα μετά από 2.8 χρόνια λόγω της σημαντικής βελτίωσης που παρατηρήθηκε στην ομάδα των συμμετεχόντων. Ένα ακόμα ενδιαφέρον εύρημα που προέκυψε, είναι ότι η διαχείριση του τρόπου ζωής βρέθηκε να είναι εξίσου, αν όχι και παραπάνω αποτελεσματική από την κλασική θεραπεία με την μετφορμίνη, για την πρόληψη της ασθένειας. Ο συνδυασμός των δυο δεν βρέθηκε να βελτιώνει τα ποσοστά, σε σχέση με την διαχείριση του τρόπου ζωής από μόνο του.[10]

Αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, ως αντιδιαβητικά φάρμακα. Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει προσπάθειες σύνθεσης νέων ενώσεων που εμφανίζουν ανασταλτική δράση ως προς το ένζυμο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, με την αναστολή του ενζύμου,

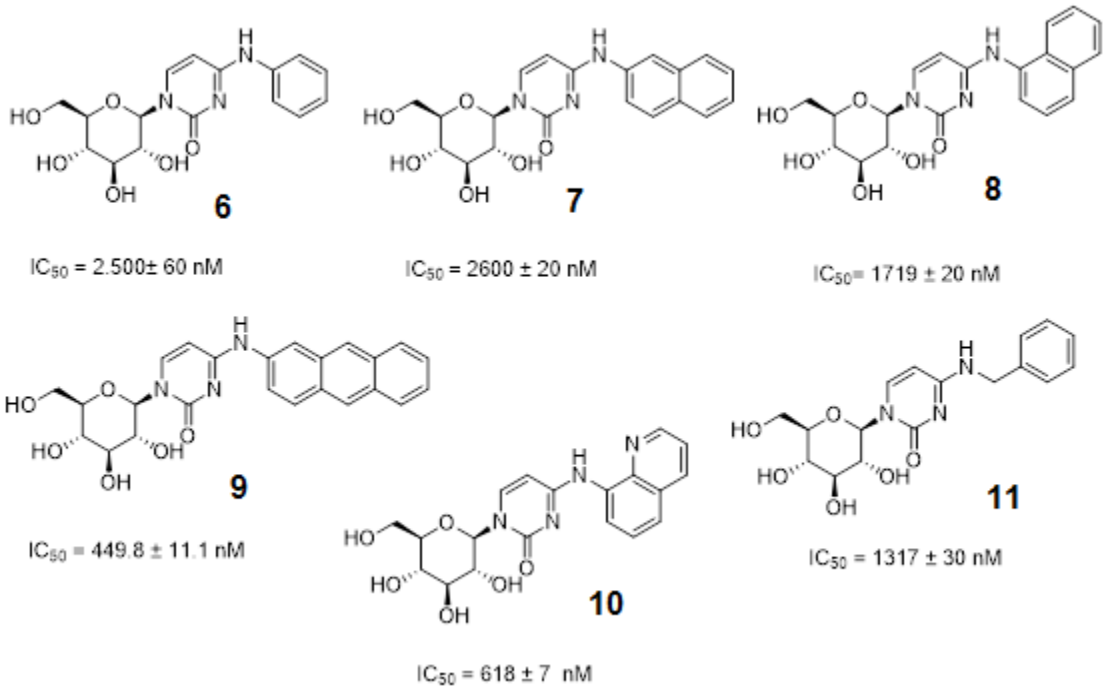
έχουμε και αναστολή παραγωγής γλυκόζης από το γλυκογόνο, και κατά συνέπεια μειωμένα επίπεδα σακχάρου στο αίμα. Τέτοια μόρια-αναστολείς σχεδιάζονται ήδη από την αρχή της προηγούμενης δεκαετίας, κυρίως μέσω του ορθολογικού σχεδιασμού και με την βοήθεια μοντέλων από προγράμματα προσομοίωσης ηλεκτρονικών υπολογιστών. Όπως αναφέρεται στην βιβλιογραφία οι πρώτες σχετικές προσπάθειες έγιναν στα τέλη της δεκαετίας του 90, και ένα από τα πρώτα μόρια αναστολείς που βρέθηκαν ήταν το CP-91149 όπου βρέθηκε ότι είναι αναστολέας της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου τύπου a (GPa) στο ανθρώπινο ήπαρ. Η δομή του προέκυψε μετά από υπολογιστικό έλεγχο > 300.000 μορίων. Αφού προτάθηκε η ανασταλτική ικανότητα του θεωρητικά, έγινε σύνθεση του μέσω στερεοειδικής συνθετικής πορείας που ήταν ήδη γνωστή στη βιβλιογραφία, σε ποσότητες γραμμάριου. Βρέθηκε, όπι το συγκεκριμένο μόριο αναστέλλει την GPa με τιμή IC_{50} = 0.13 μM με ταυτόχρονη παρουσία 7.5 mM γλυκόζης. Πραγματοποιήθηκαν μελέτες σε ποντίκια για να βρεθεί η ενεργότητα της ένωσης, και τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική μείωση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα[11]. Έκτοτε έχουν αναφερθεί πολλοί νέοι αναστολείς με βελτιωμένες τιμές πρόσδεσης και βιολογικής συμβατότητας. Προκλινικές δοκιμές παρέχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η αναστολή της ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως μια αποτελεσματική μέθοδος για την μείωση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα ασθενών που πάσχουν από διαβήτη. Το τμήμα της έρευνας και ανάπτυξης της φαρμακευτικής εταιρίας Pfizer έχει προχωρήσει σε κλινικές μελέτες φάσης II, ενώσεων που πιστεύεται ότι θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν για την αναστολή της GP και τα μέχρι τώρα αποτελέσματα δείχνουν την μεγάλη δυνατότητα που εμφανίζουν για την μείωση της γλυκόζης στο αίμα με ταυτόχρονη προστασία από πιθανή υπογλυκαιμία[4]. Στον παρακάτω πίνακα εμφανίζονται ορισμένες ενώσεις που έχει βρεθεί από την βιβλιογραφία[4] ότι αναστέλλουν την GP.

Ένωση		IC_{50}
	**1**	110nM
	**2**	240nM
	**3**	45nM
	**4**	6nM
	**5**	55nM

Πίνακας 1 : Αναστολείς της GP και οι τιμές IC_{50} τους αντίστοιχα[4]

Στο εργαστήριο της οργανικής χημείας του Εκπα, έχουν γίνει εκτεταμένες έρευνες για την εύρεση νέων αναστολέων της GP από τη σύνθεση παραγώγων της *β*-D-γλυκόζης. Για την εύρεσή των ενώσεων που μας ενδιαφέρουν γίνεται χρήση των αρχών του ορθολογικού σχεδιασμού. Ο καθορισμός της πιθανής δομής των αναστολέων γίνεται με βοήθεια υπολογιστικών προγραμμάτων, που μας δίνουν στοιχεία για τις ιδιότητες (γεωμετρικές, ηλεκτρονιακές) που θα πρέπει να έχει η ένωση που θα συνθέσουμε για να έχει την μέγιστη ανασταλτική ικανότητα. Ήδη έχει γίνει σημαντική πρόοδος, και έχουν συντεθεί αναστολείς με τιμές IC_{50} στην κλίμακα των nM[12]. Η παρούσα εργασία επιχειρεί να συμβάλει στην παραπάνω προσπάθεια με τη σύνθεση νέων ενώσεων-αναστολέων που μπορεί να εμφανίζουν βελτιωμένες ιδιότητες.

Στο παρακάτω σχήμα παρατίθενται επιλεγμένα παράγωγα *β*-D-γλυκοπυρανοζυλοπυριμιδινών, που έχουν συντεθεί στο εργαστήριο μας[13] τα οποία εμφανίζουν σημαντικές μεταβολές στην σταθερά αναστολής, και οι οποίες φαίνονται να σχετίζονται με συγκεκριμένες αλλαγές στα δομικά χαρακτηριστικά του μορίου.



Εικόνα 11: Αναστολείς του καταλυτικού κέντρου της GP η σύνθεση των οποίων έχει πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο μας.[13]

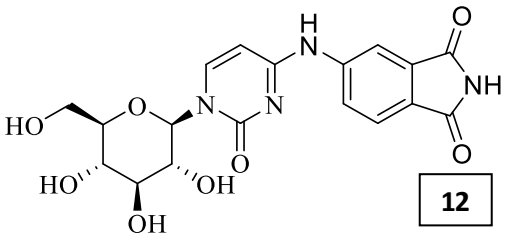
Μελέτη των παραπάνω δεδομένων ακολουθούμενη από ανάλυση και της επιρροής συγκεκριμένων δομικών χαρακτηριστικών στη σταθερά αναστολής, μπορεί να λειτουργήσει ως βάση για τον σχεδιασμό και τη σύνθεση ενώσεων-αναστολέων με ισχυρότερη σύνδεση στο καταλυτικό κέντρο της GP.

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Όπως αναφέρθηκε, στο εργαστήριο μας, έχουν γίνει εκτεταμένες έρευνες για την εύρεση νέων αναστολέων της GP από τη σύνθεση παραγώγων της *β*-D-γλυκόζης. Η προσέγγιση για την εύρεσή των ενώσεων που μας ενδιαφέρουν γίνεται χρήση των αρχών του ορθολογικού σχεδιασμού.

Οι *β*-D-γλυκοπυρανοζυλοπυριμιδίνες, παράγωγα φυσικών νουκλεοζιτών αποτελούν αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.[12] Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τα δεδομένα, κινητικά και κρυσταλλογραφικά, που έχουμε συλλέξει στο εργαστήριο μας αποτελεί πρόκληση για την σύνθεση νέων ενώσεων, ισχυρότερων αναστολέων του καταλυτικού κέντρου της GP.

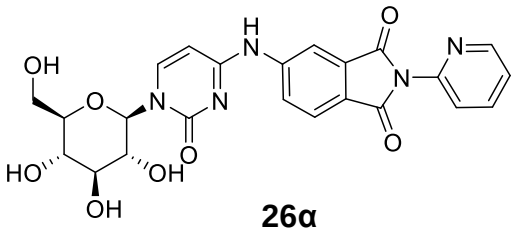
Βασιζόμενοι σε προηγούμενες μελέτες, παρατηρείται ότι η ύπαρξη συμπυκνωμένου αρωματικού συστήματος που φέρει γέφυρα καρβονυλίου καθώς και αμιδική γέφυρα οδήγησε σε έναν από τους ισχυρότερους αναστολείς, για το καταλυτικό κέντρο, που έχει συντεθεί μέχρι σήμερα στο εργαστήριο μας την N^1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-N^4-(1,3-διοξοϊσοινδολιν-5-υλο)κυτοσίνη (ένωση **12**). Επειδή άλλοι ισχυροί αναστολείς που έχουν συντεθεί στο εργαστήριό μας περιέχουν μια φαινυλομάδα στη θέση που βρίσκεται το άζωτο της ισοϊνδολινόνης, αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε την **12** ως ένωση οδηγό για τη σύνθεση 2-άρυλο- και 2-ετεροάρυλο- παραγώγων.



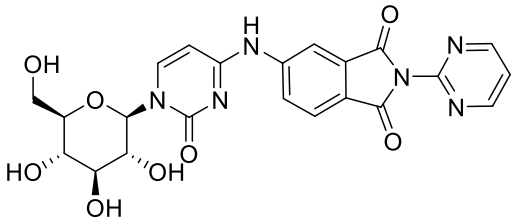
12 IC_{50} = 170 ± 8 nM

Στην παρούσα εργασία έγιναν προσπάθειες σύνθεσης ενώσεων με τα παραπάνω χαρακτηριστικά. Χρησιμοποιήθηκαν αμίνες οι οποίες δεν ήταν εμπορικά διαθέσιμες, επομένως η σύνθεση επικεντρώθηκε στη σύνθεση των συγκεκριμένων αμινών. Ωστόσο, λόγω του ότι οι συγκεκριμένες αμίνες ήταν απενεργοποιημένες ως προς μια πυρηνόφιλη προσβολή (οι ομάδες –C=O, έλκουν ηλεκτρονιακή πυκνότητα) δεν κατέστη

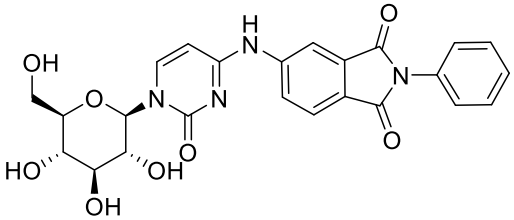
δυνατό το τελευταίο στάδιο της σύνθεσης. Επομένως αναζητήθηκαν νέες συνθετικοί οδοί οι οποίες θα αναλυθούν στο επόμενο κεφάλαιο. Παρακάτω παρουσιάζονται οι προτεινόμενες νέες ενώσεις, δυνάμει αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου



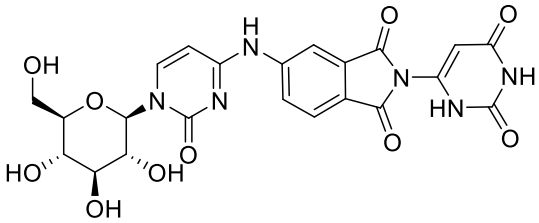
26α



26β



26γ



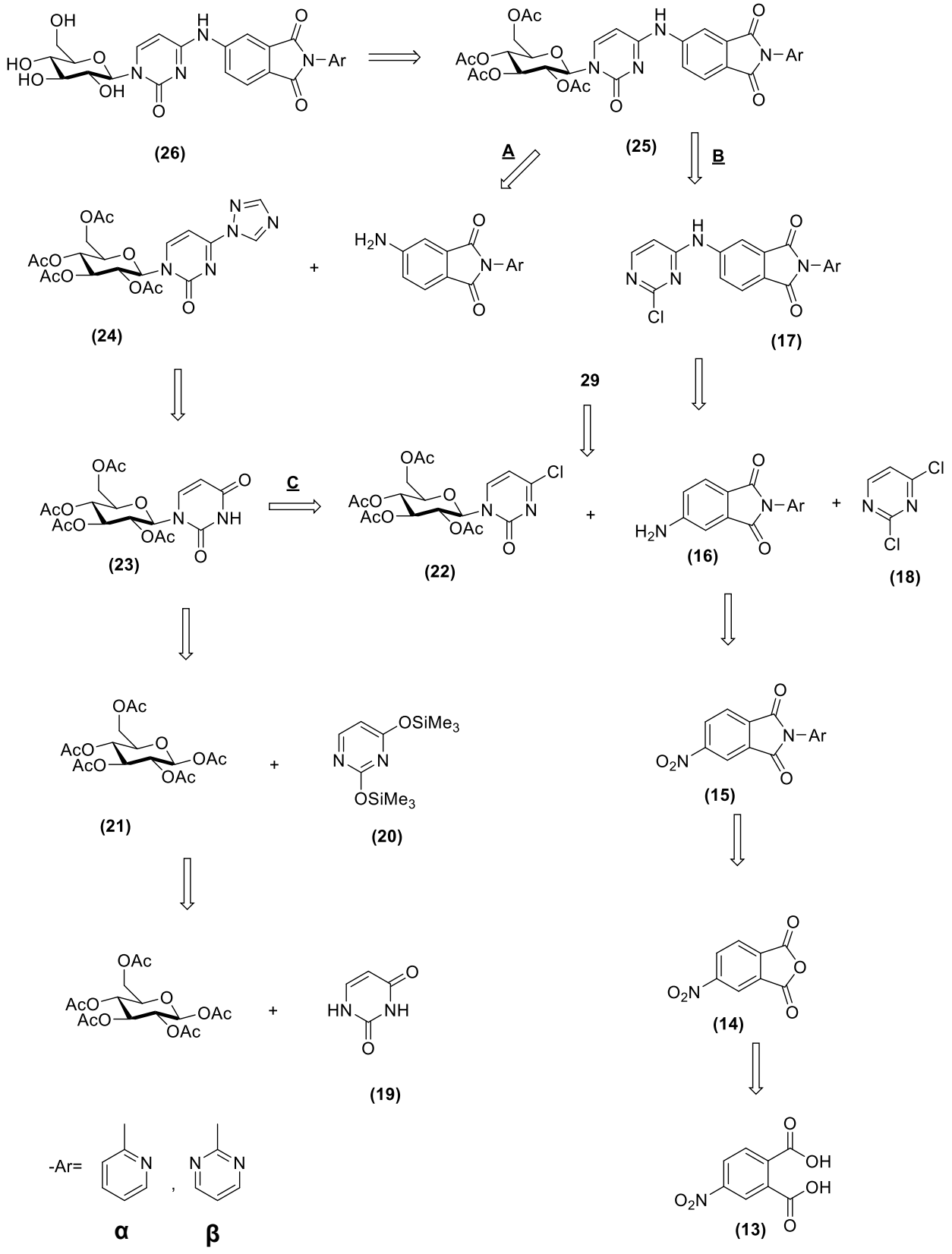
26δ

Εικόνα 12 : Πιθανοί νέοι αναστολείς της GP

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

Στο σημείο αυτό θα αναπτυχθεί το συνολικό προτεινόμενο συνθετικό σχήμα για την σύνθεση των νέων N^1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-N^4-(2-αρυλο-1,3-διοξοϊσοινδολιν-5-υλο)κυτοσινών, εν δυνάμει αναστολέων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

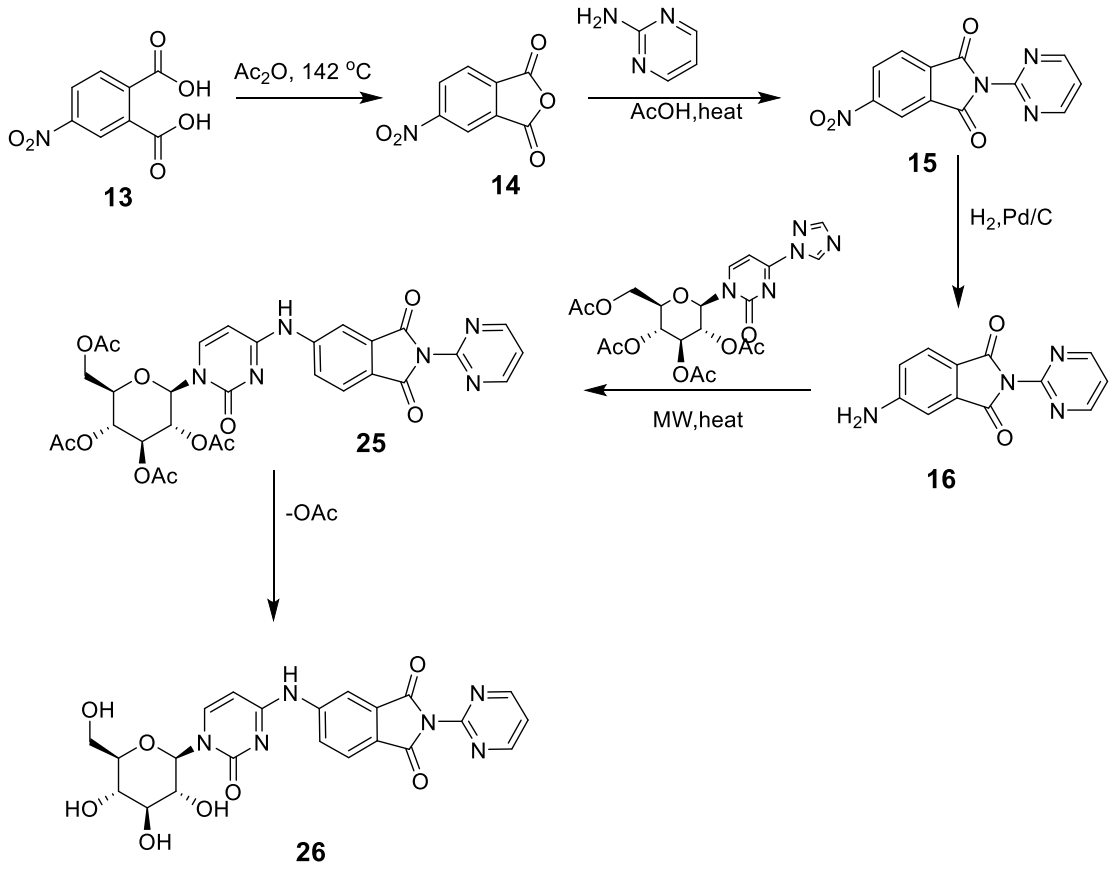
Η σύνθεση βασίζεται σε συνθετική πορεία που έχει αναπτυχθεί με επιτυχία στο εργαστήριο μας και περιλαμβάνει το σχηματισμό ενός σταθερού 1,2,4-τριαζολο παραγώγου (ένωση **28**). Παρακάτω παρουσιάζεται το συνολικό ρετροσυνθετικό σχήμα:


(26)
(25)
A
B
(24)
(17)
29
(23)
C
(22)
(16)
(18)
(21)
(20)
(15)
(19)
(14)
(13)
-Ar=
α
β

Η πορεία των πειραμάτων μας οδήγησε στην αναζήτηση εναλλακτικών συνθετικών οδών προκειμένου να συντεθούν οι επιθυμητές ενώσεις. Δοκιμάσαμε, επομένως, τρεις συνολικά συνθετικές πορείες (**A, B, C**) όπως φαίνεται στο παραπάνω σχήμα.

Πρώτο βήμα ήταν η σύνθεση των αμινών καθώς δεν ήταν εμπορικά διαθέσιμες προκειμένου να πραγματοποιηθεί σύζευξη είτε με το τριαζολοπαράγωγο (**24**) είτε με τη 1-(2,3,4,6-τετρα-*O*-ακετυλο-*β*-D-γλυκοπυρανοζυλο)-4-χλωροπυριμιδιν-2-όνη (**22**) είτε με τη 2,4-διχλωροπυριμιδίνη (**18**). Για να πραγματοποιηθεί η σύνθεση των αμινών ήταν απαραίτητος ο καθαρισμός της πρώτης ύλης (4-νιτροφθαλικό οξύ) ώστε να εξασφαλιστεί καθαρό προϊόν που δε θα δημιουργούσε προβλήματα στη μετέπειτα πορεία της σύνθεσης.

Α Συνθετικό πλάνο



3.1 Καθαρισμός 4-νιτροφθαλικού οξέος[14]

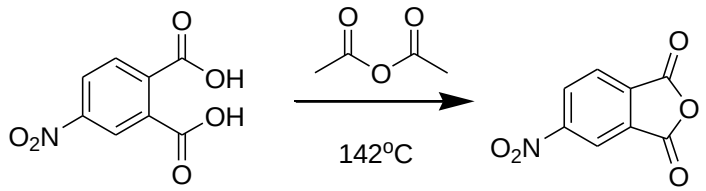
Όπως έγινε εμφανές κατά τη διάρκεια των αρχικών πειραμάτων, το εμπορικά διαθέσιμο 4-νιτροφθαλικό οξύ (πρώτη ύλη) περιείχε μικρές ποσότητες του 3-ισομερούς ως πρόσμιξη. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκαν προσπάθειες καθαρισμού με ανακρυστάλλωση από διαιθυλαιθέρα, ή τολουόλιο, χωρίς να βελτιωθεί η εικόνα του προϊόντος, οπότε οδηγηθήκαμε σε δοκιμασίες εξάχνωσης και πάλι όμως χωρίς ιδιαίτερη επιτυχία. Δοκιμάσαμε να εξουδετερώσουμε με όξινο ανθρακικό νάτριο, με το σκεπτικό, ότι αν έχουμε μίγμα του 3- και 4- ισομερούς, το 3- θα είναι πιο όξινο οπότε θα καταβυθιστει το άλας του πρώτα και πάλι όμως χωρίς επιτυχία.

Οι παραπάνω αναποτελεσματικές προσπάθειες κατέστησαν αδύνατο τον καθαρισμό της πρώτης ύλης και επομένως προχωρήσαμε την πορεία της σύνθεσης με σκοπό τον καθαρισμό του προϊόντος στο επόμενο βήμα.

3.2 Σύνθεση 4-νιτροφθαλικού ανυδρίτη[15]

Η σύνθεση του ανυδρίτη από 4-νιτροφθαλικό οξύ πραγματοποιήθηκε μέσω κυκλοποίησης του δικαρβοξυλικού οξέος παρουσία οξικού ανυδρίτη και υπό υψηλή θερμοκρασία (142 ^{o}C).

Σχήμα αντίδρασης:



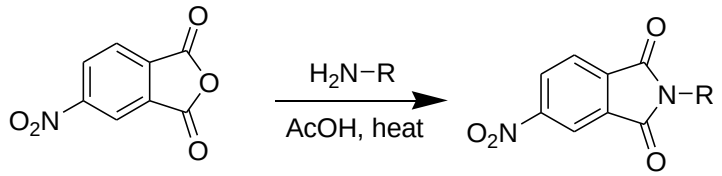
3.3 Καθαρισμός 4-νιτροφθαλικού ανυδρίτη[14]

Πραγματοποιήθηκαν προσπάθειες καθαρισμού του 4-νιτροφθαλικού ανυδρίτη με ανακρυστάλλωση από τολουόλιο και διαιθυλαιθέρα και τα καλύτερα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στο τολουόλιο αν και απαιτούνται πολλαπλές ανακρυσταλλώσεις για πλήρη καθαρισμό.

3.4 Σύζευξη 4-νιτροφθαλικού ανυδρίτη με αρυλαμίνες[15]

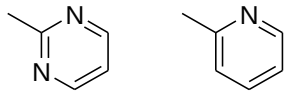
Το επόμενο στάδιο είναι η σύνθεση διαφόρων 2-αρυλο-5-νιτροϊσοινδολιν-1,3-διονών. Λόγω μεγάλης ευαισθησίας του προϊόντος απαιτούνται αυστηρά άνυδρες συνθήκες και επομένως η αντίδραση πραγματοποιείται υπό ατμόσφαιρα αργού.

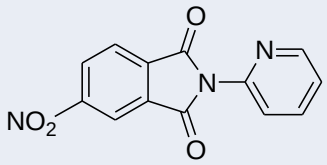
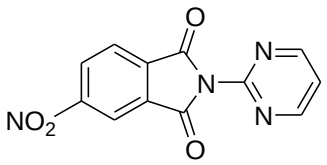
Τα πρώτα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε διαλύτη μεθανόλη. Η αντίδραση οδήγησε όμως σε μίγματα δύο προϊόντων και το παραπροϊόν βρέθηκε ότι είναι αποτέλεσμα της αντίδρασης του 4-νιτροφθαλικού ανυδρίτη με τη μεθανόλη. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε οξικό οξύ ως διαλύτης.



14 **15**

όπου:

R- = 

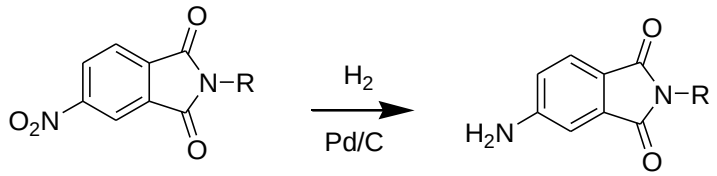
Προϊόν	Θερμοκρασία	Χρόνος αντίδρασης	Απόδοση
	130 °C	90 min	68%
	140 °C	Overnight	40%

3.5 Υδρογόνωση αμινών[16]

Η αντίδραση πραγματοποιείται διαβιβάζοντας αέριο υδρογόνο, υπό έντονη ανάδευση και υπεράνω καταλύτη παλλαδίου προσροφημένου σε ενεργό άνθρακα προκειμένου να αυξηθεί η ταχύτητά της.

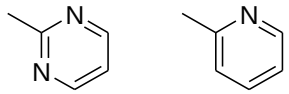
Τα πρώτα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο ενώ το τετραϋδροφουράνιο κρίθηκε καλύτερος διαλύτης καθώς αυξάνει την απόδοση.

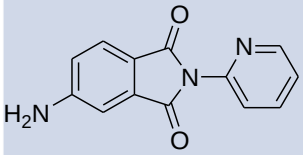
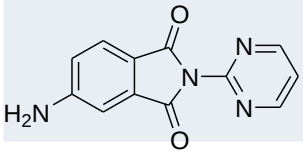
Αφού έχει επιτευχθεί η σύνθεση των αμινών γίνεται καθαρισμός τους με χρωματογραφία στήλης προκειμένου να γίνει το επόμενο στάδιο της σύζευξης με όσο το δυνατόν καθαρότερη αμίνη.



15 **16**

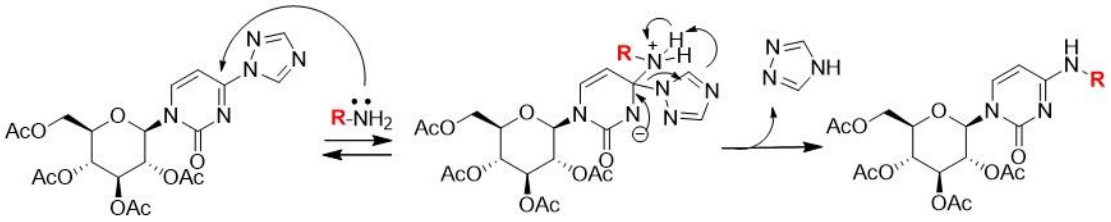
όπου:

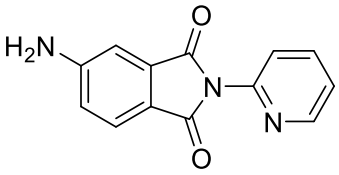
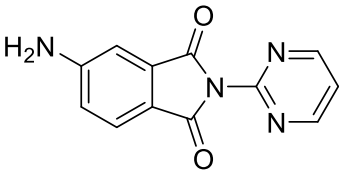
R- = 

Προϊόν	Θερμοκρασία	Χρόνος αντίδρασης	Απόδοση
	25 °C	90 min	83%
	25 °C	100 min	36%

3.6 Υποκατάσταση της ομάδας του 1,2,4-τριαζολίου από αρωματικές αμίνες

Το στάδιο αυτό της συνθετικής πορείας περιλαμβάνει την υποκατάσταση της ομάδας 1,2,4-τριαζολίου του ενδιαμέσου **28** από αρωματικές αμίνες προς σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος **29** και αποτελεί το αντικείμενο έρευνας της παρούσας συνθετικής πορείας. Ο μηχανισμός της αντίδρασης είναι ο ακόλουθος:



R-NH$_2$=  , 

16α **16β**

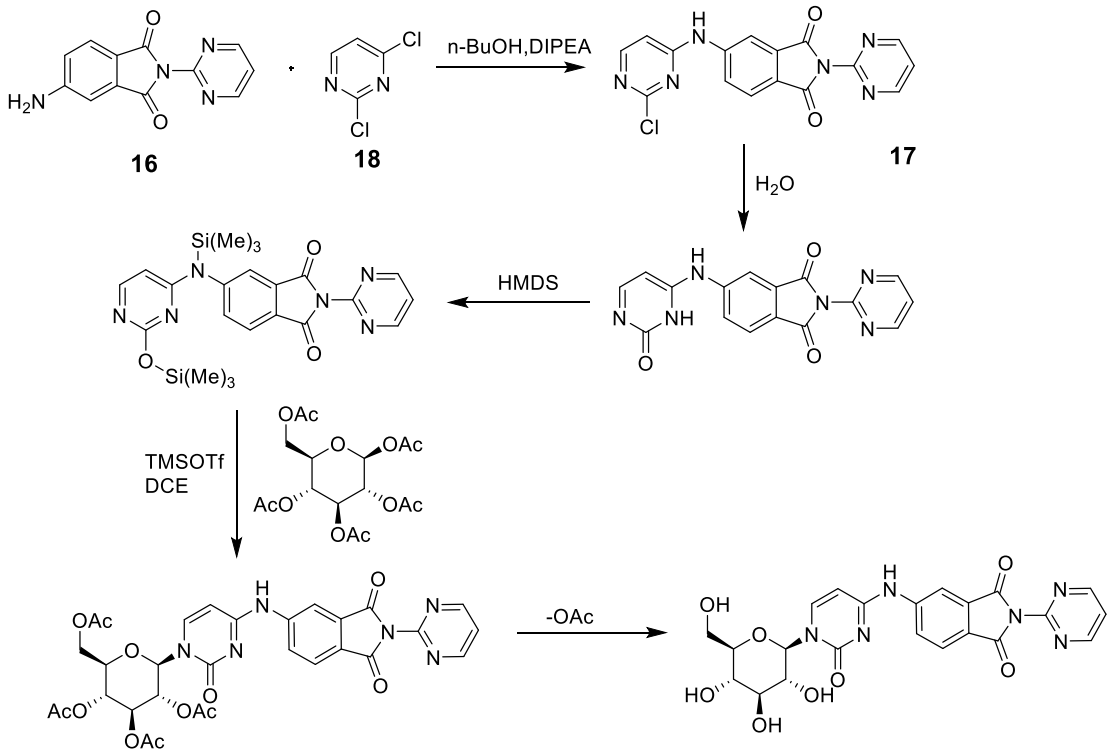
Σχήμα 1: Προτεινόμενος μηχανισμός υποκατάστασης του 1,2,4-τριαζολίου από αρωματικές αμίνες.

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με χρήση μεθόδου που έχει αναπτυχθεί στο εργαστήριο μας, κατά την οποία τα αντιδρώντα διαβρέχονται με μικρή ποσότητα διαλύτη DMSO και ακτινοβολούνται με χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας. Η επιλογή του συγκεκριμένου διαλύτη βασίζεται σε προηγούμενη εργασία προπτυχιακού διπλώματος, κατά την οποία παρουσία του συγκεκριμένου διαλύτη φαίνεται να επιταχύνεται η αντίδραση υποκατάστασης ακόμη και παρουσία μη δραστικών αρυλαμινών.

Ωστόσο, λόγω της χαμηλής δραστικότητας των αμινών που χρησιμοποιήθηκαν (δύο ομάδες –C=O που έλκουν ηλεκτρονιακή πυκνότητα) η αντίδραση υποκατάστασης δεν ήταν δυνατή για την 5-αμινο-2-(πυριμιδιν-2-υλο)ισοϊνδολιν-1,3-διόνη ενώ με χρήση της 5-αμινο-2-(πυριδιν-2-υλο)ισοϊνδολιν-1,3-διόνης είχαμε απομόνωση μικρής-μη ικανής-

ποσότητας προϊόντος ώστε να προχωρήσουμε στο επόμενο στάδιο της αποπροστασίας. Επομένως, αναζητήθηκε μια μέθοδος που θα κάνει τις αμίνες περισσότερο δραστικές και για αυτό το λόγο οδηγηθήκαμε σε δεύτερο συνθετικό σχήμα το οποίο παρουσιάζεται παρακάτω.

Β Συνθετικό πλάνο



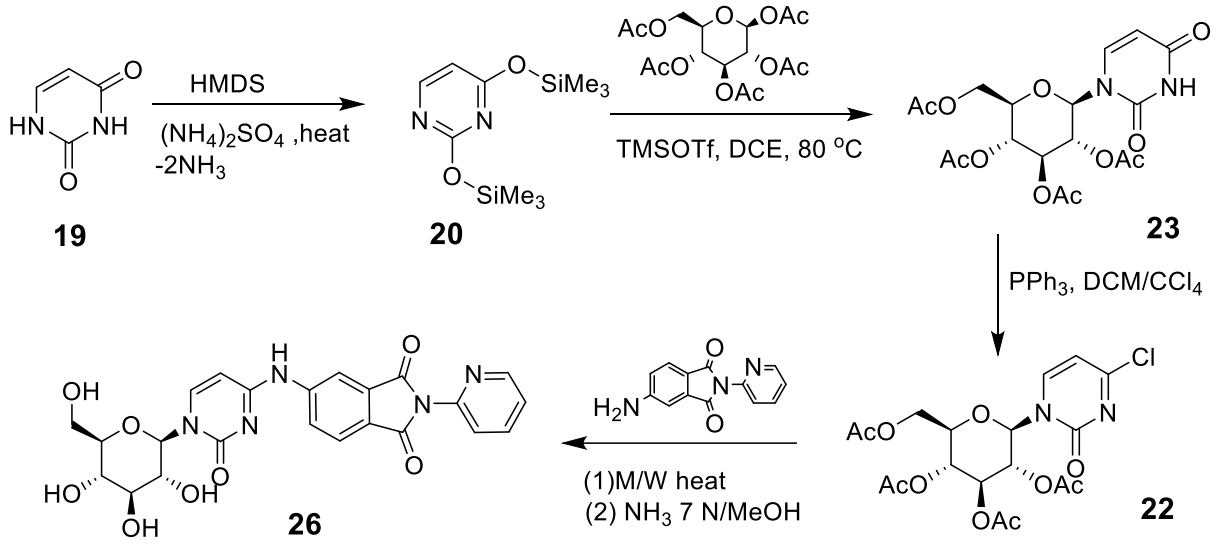
3.7 Σύζευξη αμινών με τη 2,4-διχλωροπυριμιδίνη[17]

Το πρώτο βήμα αποτελεί η εκλεκτική αντίδραση σύζευξης των αμινών με την 4-Cl ομάδα της διχλωροπυριμιδίνης προς σχηματισμό του αναμενόμενου προϊόντος, (2-χλωροπυριμιδιν-4-υλαμινο)-2-αρυλοϊσοινδολιν-1,3-διονη (**17**). Η αντίδραση αυτή επιταχύνεται σημαντικά με τη προσθήκη καταλυτικής ποσότητας (5-10 mg) CuBr (II). Η εκλεκτική αντίδραση της 4-Cl ομάδας βασίζεται στον αυξημένο ηλεκτρονιόφιλο χαρακτήρα της αφού η 2-Cl ομάδα βρίσκεται ανάμεσα σε δυο ηλεκτροδοτικά άζωτα που τη καθιστούν λιγότερο ηλεκτρονιόφιλη από τη 4-Cl ομάδα.

Λόγω της χαμηλής δραστικότητας των αμινών που χρησιμοποιήθηκαν δεν κατέστη δυνατό να απομονώσουμε το επιθυμητό προϊόν.

Επίσης, η εικόνα των φασμάτων έδειξε ότι το προϊόν μας δεν ήταν όσο καθαρό αναμενόταν, ενώ ο καθαρισμός του κατέστη αδύνατος, κάτι το οποίο μας οδήγησε στο να αναζητήσουμε τρίτο συνθετικό σχήμα το οποίο παρουσιάζεται παρακάτω.

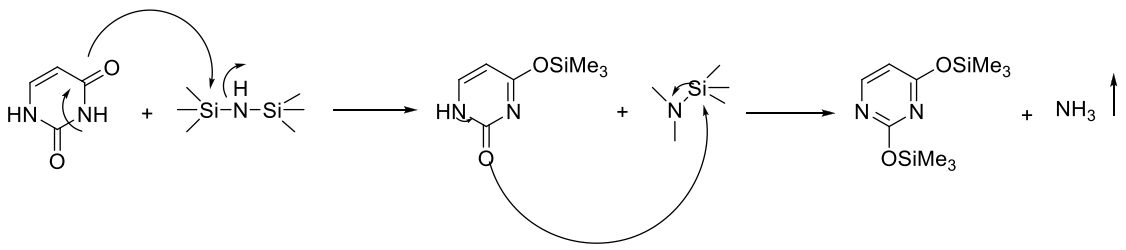
Γ Συνθετικό πλάνο



3.8 Ενεργοποίηση ετεροκυκλικής βάσης

Το πρώτο βήμα αφορά την ενεργοποίηση της ετεροκυκλικής βάσης της ουρακίλης (**19**) ώστε να αντιδράσει με την προστατευμένη γλυκόζη (**21**) (αντίδραση *N*-γλυκοζυλίωσης) προς σχηματισμό της 2,4-*O*-δις(τριμεθυλοσιλυλο)ουρακίλης (**20**) παρουσία σιλυλιωτικού αντιδραστηρίου εξαμεθυλοδισιλαζάνιου (HMDS). Πρόκειται για μία ηλεκτρονιόφιλη υποκατάσταση με ηλεκτρονιόφιλο κέντρο το πυρίτιο του εξαμεθυλοδισιλαζανίου το οποίο λόγω μεγάλης συγγένειας με το οξυγόνο αντιδρά εκλεκτικά με το καρβονύλιο και όχι το άζωτο της ετεροκυκλικής βάσης. Η αντίδραση παρακολουθείται μέσω

εξουδετέρωσης της παραγόμενης αμμωνίας από διάλυμα HCl 1N που περιέχει δείκτη κυανούν της βρωμοθυμόλης. Ο μηχανισμός της αντίδρασης είναι ο ακόλουθος:

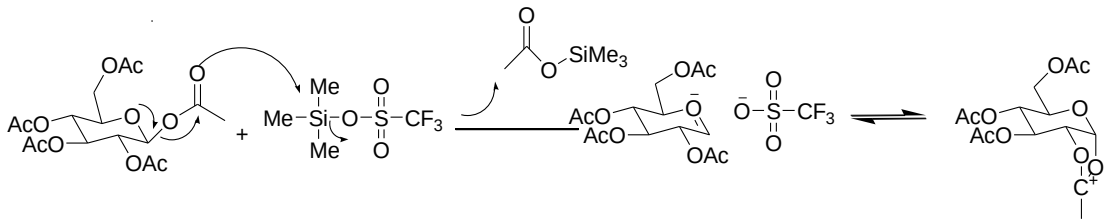


Σχήμα 2: Μηχανισμός σιλυλίωσης.

Λόγω μεγάλης ευαισθησίας του προϊόντος αλλά και του σιλυλιωτικού μέσου στην υγρασία, απαιτούνται αυστηρά άνυδρες συνθήκες και επομένως η αντίδραση πραγματοποιείται υπό ατμόσφαιρα αργού. Επιπλέον, απαραίτητη είναι η πλήρης απομάκρυνση του HMDS διότι δεν ευνοεί την αντίδραση *N*-γλυκοζυλίωσης στο επόμενο στάδιο. Μη προσεκτική απομάκρυνσή του δεν θα επέτρεπε την σύζευξη μεταξύ σακχάρου και βάσης.

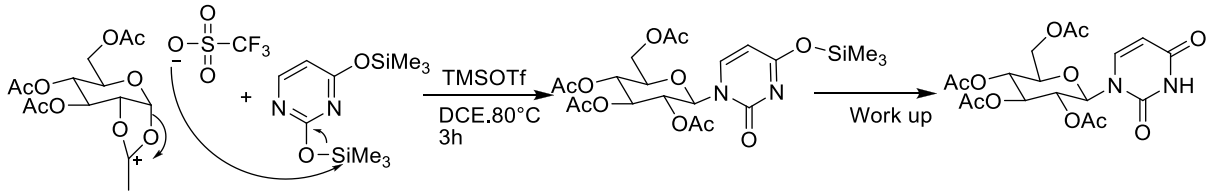
3.9 Σύνθεση της 2’,3’,4’,6’-τετρα-*O*-ακετυλο-*β*-D-γλυκοπυρανοζυλο-*N*-ουρακίλης (*N*-γλυκοζυλίωση, σύζευξη τύπου Vorbrüggen)

Το επόμενο στάδιο περιλαμβάνει την αντίδραση σύζευξης με την ακέτυλο προστατευμένη 1’,2’,3’,4’,6’-πεντα-*O*-ακετυλο-*β*-D-γλυκοπυρανόζη (**21**) προς σχηματισμό της (2’,3’,4’,6’-τετρα-*O*-ακετυλο-*β*-D-γλυκοπυρανοζυλο)ουρακίλης (**23**) η οποία πραγματοποιείται παρουσία οξέος Lewis, του τριφθορομεθυλοσουλφονικου-τριμεθυλοσιλανιου (TMSOTf), καταλύτη της αντίδρασης ο οποίος ενεργοποιεί το προστατευμένο σάκχαρο μέσω σχηματισμού ιόντος οξωνίου σύμφωνα με τον παρακάτω μηχανισμό :



Σχήμα 3: Σχηματισμός ιόντος οξωνίου. Ενεργοποίηση του προστατευμένου σακχάρου με οξύ Lewis.

Το ιόν οξωνίου είναι ένα δραστικό ενδιάμεσο που μόλις σχηματιστεί αντιδρά με την σιλυλιωμένη βάση. Η προσβολή του οξωνίου από τη βάση έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός ενδιάμεσου μονοσιλυλιωμένου προϊόντος, του οποίου η σιλυλομάδα κατόπιν υδατικής κατεργασίας απομακρύνεται ακαριαία και ποσοτικά, δίνοντας το τελικό προϊόν.



Σχήμα 4 : Μηχανισμός αντίδρασης γλυκοζυλίωσης.

Η αντίδραση είναι διαστερεοεκλεκτική. Υπό τις συνθήκες Vorbrüggen και χρησιμοποιώντας ως σάκχαρο τη 4-OAc-*β*-D-γλυκοπυρανόζη, το σύστημα οδηγείται εκλεκτικά προς το σχηματισμό του *β*-ανωμερούς λόγω της γειτονικής υποβοήθησης που επάγει η ακετόξυ ομάδα της 2’ θέσης.

3.10 Χλωρίωση γλυκοουρακίλης[18]

Επόμενη αντίδραση αποτελεί η ενεργοποίηση του 4-CO με PPh_3 και CCl_3 ως πηγή χλωρίου. Μετά το πέρας της αντίδρασης είναι απαραίτητος ο καθαρισμός με στήλη χρωματογραφίας λόγω του σχηματιζόμενου φωσφινοξειδίου ως παραπροϊόν.

Λόγω λάθος χειρισμού κατά τον καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης δεν κατέστη δυνατή η απομόνωση του προϊόντος.

3.11 Συμπεράσματα

Παρόλο που δεν κατέστη δυνατή η απομόνωση κάποιου αναστολέα, η παραπάνω πειραματική πορεία είναι ιδιαίτερα χρήσιμη λόγω των ευρημάτων που έδωσε. Η δυσκολία των παραπάνω πειραμάτων έγκειται στο γεγονός ότι οι αμίνες που χρησιμοποιήθηκαν είχαν πολύ μικρό πυρηνόφιλο χαρακτήρα καθώς είχαν ομάδες C=O οι οποίες έλκουν ισχυρά ηλεκτρόνια λόγω επαγωγικού φαινομένου και μέσω συντονισμού. Επομένως, τα ηλεκτρόνια της $–NH_2$ ομάδας δεν είναι διαθέσιμα για να γίνει το τελευταίο στάδιο που αποτελεί την αντίδραση υποκατάστασης. Βελτίωση των συνθηκών της αντίδρασης όπως αύξηση της θερμοκρασίας στα μικροκύματα ή προσθήκη καταλυτικής ποσότητας δισθενούς χαλκού φαίνεται να έχει καλύτερα αποτελέσματα, ενώ ο καθαρισμός των πρώτων υλών δεν ήταν επιτυχής.

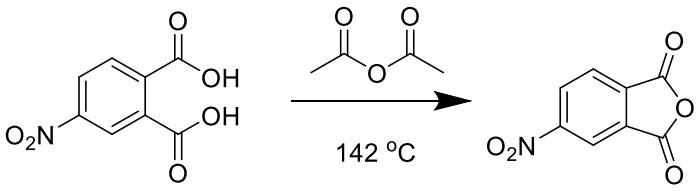
Τα μέχρι στιγμής αποτελέσματα έδωσαν αξιόλογα ευρήματα για περαιτέρω έρευνα:

1. Χρήση μονοσθενούς χαλκού έδειξε να επιταχύνει σημαντικά αντιδράσεις αμίνης με 2,4-διχλωροπυριμιδίνη. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως καταλύτης σε μελλοντικές προσπάθειες.
2. Έγινε δοκιμή μεθόδου σύζευξης αρυλαμίνης με 2,4-διχλωροπυριμιδίνη. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί μελλοντικά ,σε «δύσκολες» αμίνες.
3. Το οξικό οξύ φαίνεται να είναι καταλληλότερος διαλύτης για αντιδράσεις σύνθεσης 2-αρυλο-5-νιτροϊσοινδολιν-1,3-διονών.
4. Η υδρογόνωση των 2-αρυλο-5-νιτροϊσοινδολιν-1,3-διονών φαίνεται να λειτουργεί καλύτερα σε διαλύτη διμεθυλοφορμαμίδιο σε σχέση με διχλωρομεθάνιο.

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σύνθεση και χαρακτηρισμός ενώσεων

4.1 4-Νιτροφθαλικός ανυδρίτης (14)[15]



Σε ξηρή σφαιρική φιάλη προστίθενται το 4-νιτροφθαλικό οξύ (10.0 g, 47.4 mmol, 1 eq) και περίσσεια οξικού ανυδρίτη (17,9 mL) που αποτελεί το διαλύτη και το αντιδραστήριο σύνθεσης του ανυδρίτη. Το μίγμα θερμαίνεται με επαναρροή σε ελαιόλουτρο στους 142 ^{o}C, υπό ατμόσφαιρα αργού και υπό ανάδευση για 30 λεπτά. Κατόπιν προστίθεται τολουόλιο και το αζεοτροπικό μίγμα οξικού ανυδρίτη-τολουολίου απομακρύνεται με τη βοήθεια περιστροφικού συμπυκνωτήρα. Ακολουθεί καθαρισμός με κονιοποίηση από διαιθυλαιθέρα και το λευκό κρυσταλλικό προϊόν ξηραίνεται σε αντλία κενού.

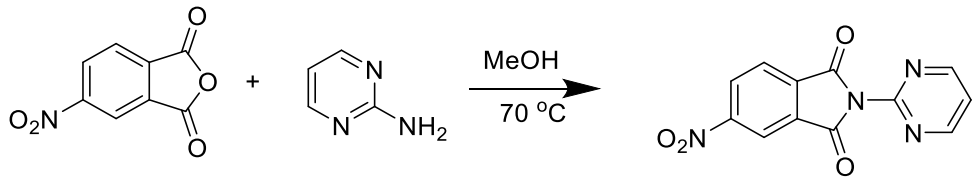
Απομονώθηκαν: 8.05 g. προϊόντος

Απόδοση: 88 %

^{1}H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ 8.84 (dd, *J* = 1.9, 0.6 Hz, 1H, H-3), 8.77 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H,H-5), 8.26 (dd, *J* = 8.2, 0.6 Hz, 1H, H-6).

4.2 5-νιτρο-2-(πυριμιδιν-2-υλο)ισοϊνδολιν-1,3-διόνη (15β)

Αντίδραση σε μεθανόλη[19]

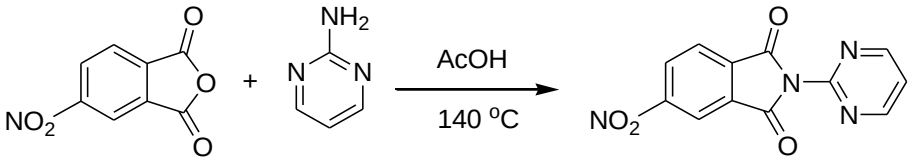


Σε ξηρή σφαιρική φιάλη προστίθενται ο 4-νιτροφθαλικός ανυδρίτης (1.0 g, 5.18 mmol, 1 eq), η 2-αμινοπυριμιδίνη (542 mg, 5.70 mmol, 1.1 eq) και 10.4 mL μεθανόλης που αποτελεί το διαλύτη της αντίδρασης. Για την περάτωση της αντίδρασης προστέθηκε καταλυτική ποσότητα υδατικού διαλύματος 10% καυστικού νατρίου. Το μίγμα θερμαίνεται με επαναρροή σε ελαιόλουτρο στους 70 ^{o}C, υπό ατμόσφαιρα αργού και υπό ανάδευση για 60 λεπτά. Παρατηρείται θόλωμα του μίγματος 10 min από την έναρξη της αντίδρασης. Η αντίδραση παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας κανονικής φάσης σε σύστημα ανάπτυξης μεθανόλη/διχλωρομεθάνιο: 40/60. Το μίγμα αφήνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, υπό ανάδευση, μέχρι την επόμενη ημέρα. Ακολουθεί διήθηση και έκπλυση με μεθανόλη. Τέλος, γίνεται καθαρισμός με ανακρυστάλλωση από αιθανόλη και το προϊόν ξηραίνεται σε αντλία κενού.

Απομονώθηκαν: 0.564 g

Απόδοση: 40.3 %

4.3 5-νιτρο-2-(πυριμιδιν-2-υλο)ισοϊνδολιν-1,3-διόνη (15β)[15]



Σε ξηρή σφαιρική φιάλη προστίθενται ο 4-νιτροφθαλικός ανυδρίτης (1.0 g, 5.18 mmol, 1 eq), η 2-αμινοπυριμιδίνη (0.493 g, 5.18 mmol, 1eq) και 5.2 mL οξικού οξέος που αποτελεί το διαλύτη της αντίδρασης. Το μίγμα θερμαίνεται με επαναρροή σε ελαιόλουτρο στους 140 ^{o}C, υπό ατμόσφαιρα αργού και υπό ανάδευση μέχρι την επόμενη ημέρα. Η αντίδραση παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας κανονικής φάσης σε σύστημα ανάπτυξης 100 % οξικός αιθυλεστέρας. Ο διαλύτης απομακρύνεται με συμπύκνωση σε περιστροφικό συμπυκνωτή. Γίνεται καθαρισμός με ανακρυστάλλωση από μίγμα αιθανόλη/διχλωρομεθάνιο (1:4) και το προϊόν ξηραίνεται σε αντλία κενού.

Απομονώθηκαν: 0.292 g

Απόδοση: 20.9 %

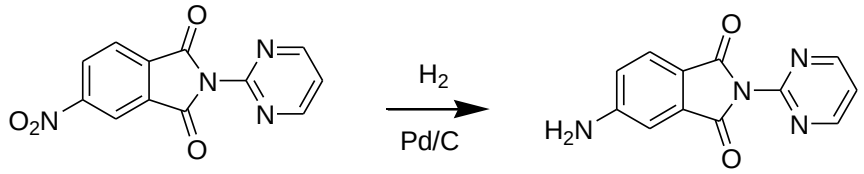
Εναλλακτικά προστίθεται υδατικό διάλυμα 5 % όξινου ανθρακικού νατρίου μέχρι πλήρους εξουδετέρωσης, η οποία διαπιστώνεται με πεχαμετρικό χαρτί, ακολουθούμενη από διήθηση προκειμένου να παραληφθεί το προϊόν το οποίο συμπυκνώνεται σε περιστροφικό συμπυκνωτή και ξηραίνεται σε αντλία κενού.

Απομονώθηκαν: 0.582 g

Απόδοση: 39.5 %

^{1}H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ 8.96 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H, H-6',4'), 8.82 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H-3'), 8.70 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H, H-5'), 8.21 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-6), 7.46 (t, *J* = 4.9 Hz, 1H, H-5').

4.4 5-αμινο-2-(πυριμιδιν-2-υλο)ισοϊνδολιν-1,3-διόνη (16β)[16]



Σε ξηρή σφαιρική φιάλη προστίθενται η 5-νιτρο-2-(πυριμιδιν-2-υλο)ισοϊνδολιν-1,3-διόνη (0.5 g, 1.85 mmol, 1 eq), καταλυτική ποσότητα παλλαδίου σε ενεργό άνθρακα (0.186 g, 0.1 eq) και 37 mL ξηρό διχλωρομεθάνιο που αποτελεί το διαλύτη της αντίδρασης. Χορηγείται αέριο H_2 και το μίγμα αναδεύεται για 60 λεπτά στους 25 ^{o}C. Η αντίδραση παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας κανονικής φάσης σε σύστημα ανάπτυξης μεθανόλη/διχλωρομεθάνιο: 40 %/60 %. Ακολουθεί διήθηση με χρήση κελίτη και ο διαλύτης απομακρύνεται από το διήθημα με τη βοήθεια περιστροφικού συμπυκνωτή. Το προϊόν ξηραίνεται σε αντλία κενού.

Γίνεται καθαρισμός του ακαθάριστου προϊόντος με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα ανάπτυξης μεθανόλη/διχλωρομεθάνιο 3 %/97 % έως 6 %/94 %.

Απομονώθηκαν: 158 mg

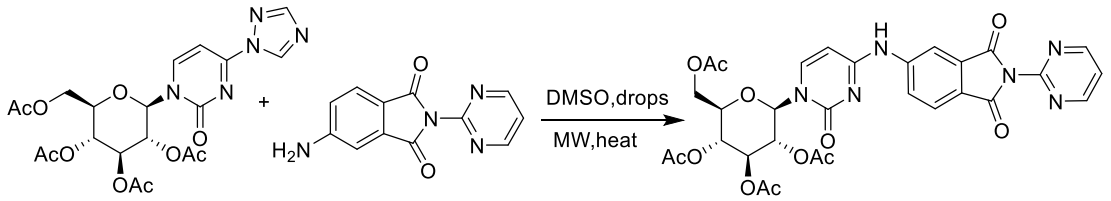
Απόδοση: 35.6 %

Rf: 0.1 σε μεθανόλη/διχλωρομεθάνιο 3/97.

Η παραπάνω αντίδραση πραγματοποιήθηκε 3 φορές. Τις υπόλοιπες δύο δεν πραγματοποιήθηκε καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης και οι αντίστοιχες ακαθάριστες αποδόσεις ήταν 53.1 % και 86.9 %.

^{1}H NMR (200 MHz, DM, HSO) δ 9.00 (dd, *J* = 4.9, 1.4 Hz, 2H,H-4',6'), 7.71 – 7.57 (m, 2H,H-5',6), 7.02 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-3), 6.91 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1H,H-5), 6.71 (s, 2H, $-NH_2$).

4.5 Προσπάθειες σύνθεσης της *N*[1]-(2,3,4,6-τετρα-*O*-ακετυλο-*β*-D-γλυκοπυρανοζυλο)-*N*[4]-(2-πυριμιδινο-1,3-διοξοϊσοινδολιν-5-υλο)κυτοσίνης (25β)



Σε ξηρό δοχείο μικροκυμάτων προστίθεται η (2′,3′,4′,6′-τετρα-*O*-ακετυλο-*β*-D-γλυκοπυρανοζυλο)-4-(1,2,4-τριαζολυλο)πυριμιδιν-2-όνη (0.264 g, 0.54 mmol, 1 eq), η 5-αμινο-2-(πυριμιδιν-2-υλο)ισοϊνδολιν-1,3-διόνη (0.182 g, 0.8 mmol, 1.5 eq) και σταγόνες διμεθυλοσουλφοξειδίου μέχρις ότου επιτευχθεί ομογενοποίηση ομογενοποίηση του μίγματος υπό ανάδευση. Κατόπιν το μίγμα ακτινοβολείται με μικροκυματική ακτινοβολία ισχύος 100 Watt σύμφωνα με τις παρακάτω συνθήκες:

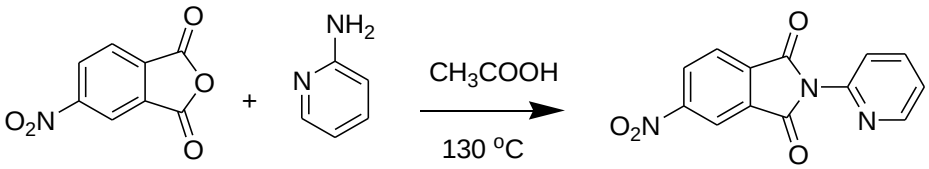
Ονομαστική ισχύς	**Χρόνος θέρμανσης (run time)**	**Χρόνος αντίδρασης (hold time)**	**Θερμοκρασία**
100 Watt	2 min	5 min	80 ^{o}C
100 Watt	2 min	5 min	85 ^{o}C
100 Watt	2 min	10 min	90 ^{o}C
100 Watt	2 min	10 min	100 ^{o}C
100 Watt	2 min	10 min	110 ^{o}C
100 Watt	2 min	15 min	120 ^{o}C
100 Watt	2 min	15 min	130 ^{o}C
100 Watt	2 min	15 min	140 ^{o}C
100 Watt	2 min	25 min	140 ^{o}C
100 Watt	2 min	25 min	140 ^{o}C
100 Watt	2 min	25 min	140 ^{o}C

100 Watt	2 min	25 min	140 ^{o}C
100 Watt	2 min	25 min	140 ^{o}C
100 Watt	2 min	25 min	140 ^{o}C

Η αντίδραση παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας κανονικής φάσης σε σύστημα ανάπτυξης μεθανόλη/διχλωρομεθάνιο 1/99.

Δεν απομονώθηκε ποσότητα καθαρού προϊόντος.

4.6 5-νιτρο-2-(πυριδιν-2-υλο)ισοϊνδολιν-1,3-διόνη (15α)[15]



Σε ξηρή σφαιρική φιάλη προστίθενται ο 4-νιτροφθαλικός ανυδρίτης (1.0 g, 5.18 mmol, 1 eq), η 2-αμινοπυριδίνη (0.731 g, 7.77 mmol, 1.5 eq) και 5.2 mL οξικού οξέος που αποτελεί το διαλύτη της αντίδρασης. Το μίγμα θερμαίνεται με επαναρροή σε ελαιόλουτρο στους 130 ^{o}C, υπό ατμόσφαιρα αργού και υπό ανάδευση για 1 ώρα και 30 λεπτά. Η αντίδραση παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας κανονικής φάσης σε σύστημα ανάπτυξης 100 % οξικός αιθυλεστέρας. Προστίθεται υδατικό διάλυμα 5 % όξινου ανθρακικού νατρίου μέχρι πλήρους εξουδετέρωσης, η οποία διαπιστώνεται με πεχαμετρικό χαρτί. Ακολουθεί διήθηση προκειμένου να παραληφθεί το προϊόν, προστίθεται διχλωρομεθάνιο και συμπυκνώνεται σε περιστροφικό συμπυκνωτή. Το προϊόν ξηραίνεται σε αντλία κενού.

Απομονώθηκαν: 0.943 g

Απόδοση: 67.6 %

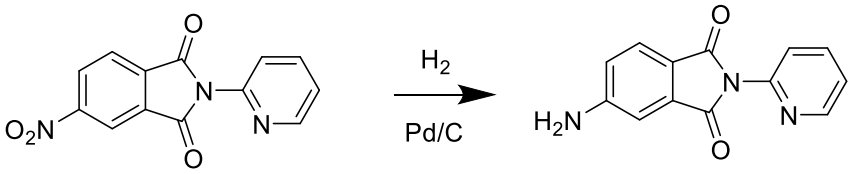
Rf: 0.3 σε οξικό αιθυλεστέρα/πετρελαϊκό αιθυλεστέρα 50/50.

Η παραπάνω αντίδραση πραγματοποιήθηκε 2 φορές υπό τις ίδιες συνθήκες με τη δεύτερη φορά να πραγματοποιείται καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών οξικός αιθυλεστέρας/πετρελαϊκός αιθυλεστέρας 13/87 έως 50/50 και με τελική απόδοση 4.3 %.

^{1}H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ 8.80 (dd, *J* = 2.0, 0.7 Hz, 1H,H-3), 8.69 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 2H, H-5,H-6'), 8.19 (dd, *J* = 8.1, 0.7 Hz, 1H, H-6), 7.94 (ddd, *J* = 8.1, 7.5, 1.9 Hz, 1H, H-4'), 7.57 – 7.32 (m, 2H, H-5',3').

^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ 164,6, 164,4 (2C,2 x C=O), 152,1 (C-4), 149,9 (C-6'), 145,5 (C-2'), 138,7 (C-4'), 136,1 (C-7), 133,1 (C-2), 129,9, 125,4, 124,1, 122,0, 119,5 (5C,Αρωματικοί C, C-5,C-6,C-3',C-5',C-3).

4.7 5-αμινο-2-(πυριδιν-2-υλο)ισοϊνδολιν-1,3-διόνη (16α)[16]



Σε ξηρή σφαιρική φιάλη προστίθενται η 5-νιτρο-2-(πυριδιν-2-υλο)ισοϊνδολιν-1,3-διόνη (0.5 g, 1.86 mmol, 1 eq), καταλυτική ποσότητα παλλαδίου σε ενεργό άνθρακα (0.186 g, 0.1 eq) και 38 mL ξηρό διχλωρομεθάνιο που αποτελεί το διαλύτη της αντίδρασης. Χορηγείται αέριο H_2 και το μίγμα αναδεύεται για 2 ώρες στους 25 ^{o}C. Η αντίδραση παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας κανονικής φάσης σε σύστημα ανάπτυξης μεθανόλη/διχλωρομεθάνιο: 40%/60%. Ακολουθεί διήθηση με χρήση κελίτη και εκπλύσεις από μεθανόλη και ο διαλύτης απομακρύνεται από το διήθημα με τη βοήθεια περιστροφικού συμπυκνωτήρα. Το προϊόν ξηραίνεται σε αντλία κενού.

Η παραπάνω αντίδραση πραγματοποιείται άλλη μία φορά σε μικρότερη κλίμακα και υπό τις ίδιες συνθήκες.

Γίνεται καθαρισμός του crude προϊόντος των δύο αντιδράσεων με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα ανάπτυξης μεθανόλη/διχλωρομεθάνιο 2/98 έως 6/94.

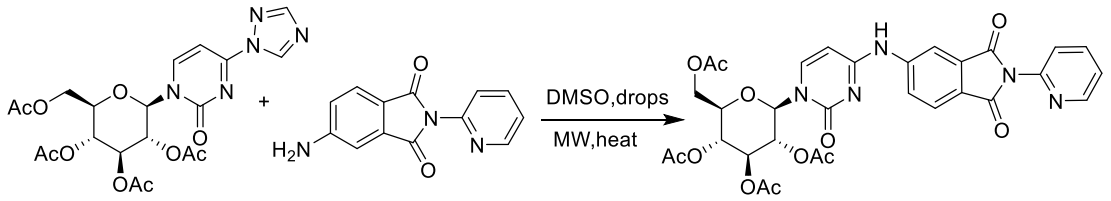
Απομονώθηκαν: 0.420 g

Απόδοση: 83.2 %

Rf: 0.1 σε μεθανόλη/διχλωρομεθάνιο 2/98.

Η παραπάνω αντίδραση πραγματοποιήθηκε άλλη μία φορά σε διαλύτη τετραϋδροφουράνιο με απόδοση 97.5 %.

4.8 *N*^{1}-(2,3,4,6-τετρα-*O*-ακετυλο-*β*-D-γλυκοπυρανοζυλο)-*N*^{4}-(πυριδιν-2-υλο-1,3-διοξοϊσοινδολιν-5-υλο)κυτοσίνη (25α)



Σε ξηρό δοχείο προστίθεται η (2′,3′,4′,6′-τετρα-*O*-ακετυλο-*β*-D-γλυκοπυρανοζυλο)-4-(1,2,4-τριαζολυλο)πυριμιδιν-2-όνη (0.526 g, 1.06 mmol, 1 eq), η 5-αμινο-2-(πυριδιν-2-υλο)ισοϊνδολιν-1,3-διόνη (0.383 g, 1.6 mmol, 1.5 eq) και σταγόνες διμεθυλοσουλφοξειδίου μέχρις ότου επιτευχθεί ομογενοποίηση του μίγματος υπό ανάδευση. Κατόπιν το μίγμα ακτινοβολείται με μικροκυματική ακτινοβολία ισχύος 100 Watt σύμφωνα με τις παρακάτω συνθήκες:

Ονομαστική ισχύς	**Χρόνος θέρμανσης (run time)**	**Χρόνος αντίδρασης (hold time)**	**Θερμοκρασία**
100 Watt	2 min	5 min	80 ^{o}C
100 Watt	2 min	10 min	85 ^{o}C
100 Watt	2 min	10 min	90 ^{o}C
100 Watt	2 min	10 min	95 ^{o}C
100 Watt	2 min	15 min	100 ^{o}C
100 Watt	2 min	20 min	105 ^{o}C
100 Watt	2 min	20 min	110 ^{o}C
100 Watt	2 min	25 min	120 ^{o}C
100 Watt	2 min	30 min	120 ^{o}C
100 Watt	2 min	30 min	120 ^{o}C
100 Watt	2 min	30 min	140 ^{o}C
100 Watt	2 min	30 min	140 ^{o}C

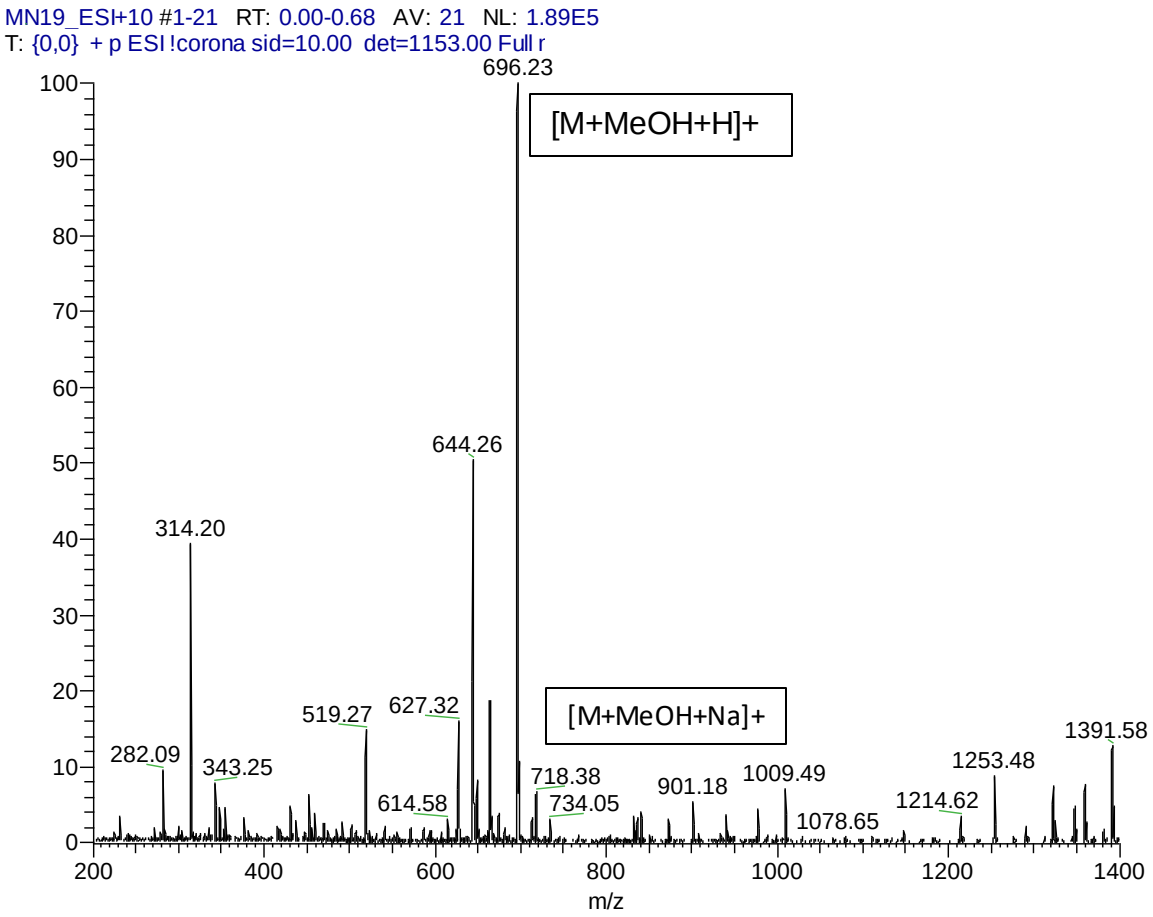
Γίνεται καθαρισμός του crude προϊόντος με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών μεθανόλη/διχλωρομεθάνιο 2 %/98 % έως 6 %/94 %.

Απομονώθηκαν: 0.032 g

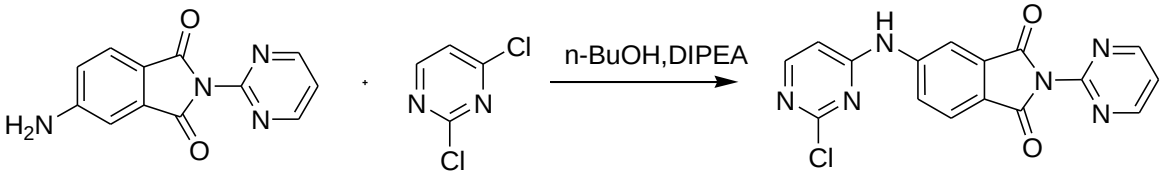
Απόδοση: 4.6 %

Rf: 0.7 σε μεθανόλη/διχλωρομεθάνιο 6 %/94 %.

Λόγω της μικρής ποσότητας που απομονώθηκε δεν ήταν δυνατό να πάρουμε φάσμα ^{1}H-NMR του προϊόντος. Ωστόσο, μπορέσαμε να ταυτοποιήσουμε το προϊόν με το παρακάτω φάσμα μάζας:



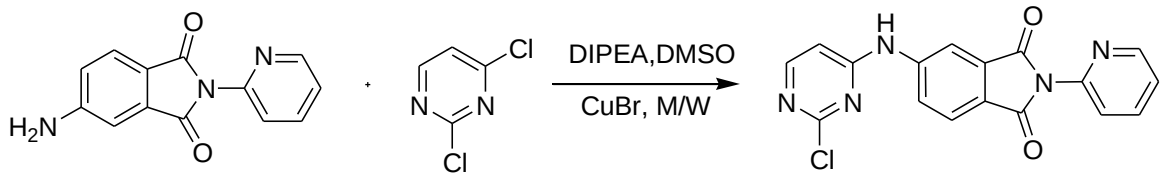
4.9 Προσπάθεια σύνθεσης της 5-((2-χλωροπυριμιδιν-4-υλο)αμινο)-2-(πυριμιδιν-2-υλο)ισοϊνδολιν-1,3-διόνης (17β)[17]



Σε ξηρή σφαιρική φιάλη των 10 mL την οποία κάψαμε υπό κενό προστέθηκε 2,4-διχλωροπυριμιδίνη (0.124 g,0.832 mmol,4 eq), 1.9 mL n-βουτανόλη και έπειτα 5-αμινο-2-(πυριμιδιν-2-υλο)ισοϊνδολιν-1,3-διόνη (0.100 g,0.416 mmol,1 eq) και 0.37 mL DIPEA. Η αντίδραση θερμαίνεται σταδιακά από τους 40 ^{o}C έως τους 100 ^{o}C. Η αντίδραση παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας κανονικής φάσης σε σύστημα

ανάπτυξης μεθανόλη/διχλωρομεθάνιο 1 %/99 %. Γίνεται προσθήκη 1 mL ξηρού DMSO διότι με τις παραπάνω συνθήκες δεν είχε επέλθει πλήρης διάλυση τη αμίνης. Μετά την προσθήκη έιχαμε πλήρη διάλυση του προϊόντος. Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας δείχνει ότι η αντίδραση δεν έχει προχωρήσει ικανοποιητικά μετά από 12 ώρες, και στο σημείο αυτό γίνεται προσθήκη 0.01 g CuBr και η αντίδραση αφήνεται overnight. Μετά από 12 ώρες σύμφωνα με την χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας η αντίδραση έχει περατωθεί. Μετά από workup στο μίγμα της αντίδρασης και αφαίρεση των διαλυτών σε περιστροφικό συμπυκνωτή λαμβάνουμε το προϊόν το οποίο και ξηραίνεται σε αντλία κενού.

4.10 Προσπάθεια σύνθεσης της 5-((2-χλωροπυριμιδιν-4-υλο)αμινο)-2-(πυριδιν-2-υλο)ισοϊνδολιν-1,3-διόνης (17α)[17]



Σε vial μικροκυμάτων προσθέσαμε την 5-αμινο-2-(πυριδιν-2-υλο)ισοϊνδολιν-1,3-διόνη (0.050 g, 0,209 mmol, 1 eq) , 0.5 mL DMSO,DIPEA (0.19 mL, 1,045 mmol, 5 eq), 2,4-διχλωροπυριμιδίνη (0.062 g, 0.418 mmol, 4 eq) και 0.01g CuBr, ως καταλύτη. Κατόπιν το μίγμα ακτινοβολείται με μικροκυματική ακτινοβολία ισχύος 100 Watt σύμφωνα με τις παρακάτω συνθήκες:

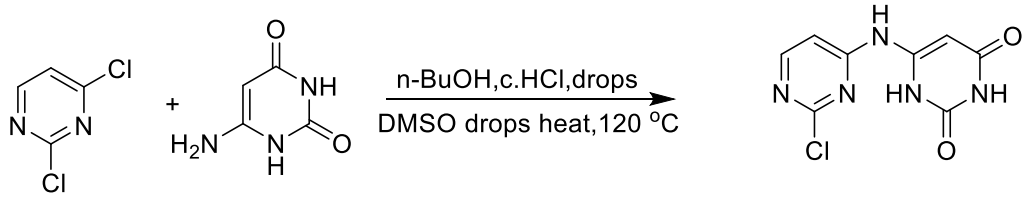
Ονομαστική ισχύς	**Χρόνος θέρμανσης (run time)**	**Χρόνος αντίδρασης (hold time)**	**Θερμοκρασία**
100 Watt	2 min	15 min	120 ^{o}C
100 Watt	2 min	15 min	120 ^{o}C

100 Watt	2 min	15 min	120 ^{o}C
100 Watt	2 min	30 min	120 ^{o}C
100 Watt	2 min	30 min	120 ^{o}C
100 Watt	2 min	30 min	120 ^{o}C
100 Watt	2 min	30 min	120 ^{o}C
100 Watt	2 min	15 min	120 ^{o}C
100 Watt	2 min	30 min	120 ^{o}C

Η αντίδραση παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας κανονικής φάσης σε σύστημα ανάπτυξης μεθανόλη/διχλωρομεθάνιο 3 %/97 %. Στην συνέχεια το μίγμα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη. Κάνουμε εκπλύσεις δυο φορές από νερό, δυο φορές από 10% υδατικό διάλυμα βρωμιούχου καλίου και δυο φορές από κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με χρήση θειικού νατρίου και συμπυκνώνεται σε περιστροφικό συμπυκνωτή.

Ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκε η ίδια αντίδραση με ίδιες ποσότητες, με την διαφόρα ότι χρησιμοποιήθηκε δοχείο αντιδρασης Wheaton. Και σε αυτή την περίπτωση λάβαμε ίδια ποσότητα προϊόντος με την μέθοδο των μικροκυμάτων.

4.11 Προσπάθεια σύνθεσης της 6-((2-χλωροπυριμιδιν-4-υλο)αμινο)-αμινοουρακίλης[17]

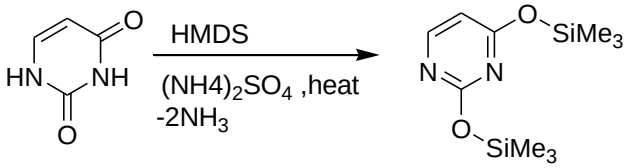


Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη την οποία έχουμε κάψει και προσθέσει αέριο αργό, προσθέτουμε 2,4-διχλώροπυριδίνη (0.05 g, 0.33 mmol, 2 eq), η 6-αμινοουρακίλη (0.021 mg, 0.165 mmol, 1 eq), 1.2 mL n-βουτανόλη, 6-7 σταγόνες πυκνού υδροχλωρικού οξέος και 0.5 mL διμεθυλοσουλφοξειδίου για να επέλθει πλήρη διαλυτοποίηση των αντιδρώντων, τα οποία και θερμαίνονται στους 120 ^{o}C υπό αναρροή. Η αντίδραση

παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας κανονικής φάσης σε σύστημα ανάπτυξης μεθανόλη/διχλωρομεθάνιο: 4/96, και σύμφωνα με αυτή έχουμε περάτωση της αντίδρασης περίπου 1.5 ώρα μετά την έναρξη της. Λόγω των μικρών ποσοτήτων των αντιδρώντων δεν καταφέραμε να απομονώσουμε προϊόν, μετά από το work up.

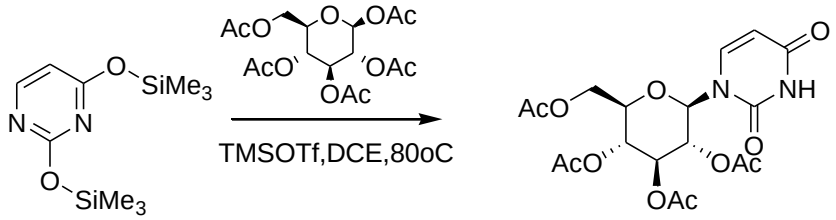
Δεν απομονώθηκε ποσότητα καθαρού προϊόντος.

4.12 2,4-Ο-δις-(τριμεθυλοσιλυλο)-ουρακίλη (20)



Σε ξηρή δίλαιμη σφαιρική φιάλη τοποθετείται η ουρακίλη (1 g, 8.9 mmol, 1 eq), καταλυτική ποσότητα λειοτριβημένου θειικού αμμωνίου (0.094 g, 0.712 mmol, 0.08 eq) και διαλύτη που ταυτόχρονα δρά και ως σιλιωτικό μέσο εξαμεθυλοδισιλοζάνιο (9.32 mL, 44.5 mmol, 5 eq). Κατόπιν ακολουθεί θέρμανση στους 120 ^{o}C υπό αναρροή. Η αντίδραση παρακολουθείται μέσω εξουδετέρωσης της παραγώμενης αμμωνίας από διάλυμα υδροχλωρικού οξέως 1 N (9 mL) που περιέχει δείκτη κυανό της βρωμοθυμόλης.Όταν αλλάξει χρώμα (από κόκκινο σε μπλέ) όλη η ποσότητα του υδροχώρικού οξέος, τότε η αντίδραση ολοκληρώνεται. Μετά από περίπου 1ώρα και 45 λεπτά το οξύ έχει καταναλωθεί. Κατόπιν αφαιρείται η ποσότητα του εξαμεθυλοδισιλαζονίου, προστίθεται ποσότητα τολουολίου το οποίο συναποστάζει με τα υπολείμματα HMDS με χρήση μικροαποστακτικής συσκευής.

4.13 2,3,4,6-Τετρα-*O*-ακετυλο-*β*-D-γλυκοπυρανοζυλοουρακίλη (23)



Σε διάλυμα της σιλυλιωμένης βάσης από την προηγούμενη αντίδραση (2.2 g, 8.9 mmol, 1.5 eq) σε διχλωροαιθάνιο (5 mL) προστέθηκε διάλυμα τριφθορομεθανοσουλφονικό τριμεθυλοσιλάνιο (1.10 mL, 13.3 mmol, 2.25 eq) και β-D-πεντακετυλογλυκόζη (2.31 g, 5.93 mmol, 1 eq) σε 5 mL διχλωροαιθάνιο. Το μίγμα θερμάνθηκε υπό αναρροή και η αντίδραση παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας κανονικής φάσης σε σύστημα ανάπτυξης μεθανόλη/διχλωρομεθάνιο σε αναλογία 5 %/95 %. Μετά από περίπου 2 ώρες η αντίδραση είχε ολοκληρωθεί και στην συνέχεια το μίγμα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη με χρήση διχλωρομεθανίου και εκπλένεται με υδατικό διάλυμα 5 % όξινου ανθρακικού νατρίου, με νερό και τέλος με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Ακολούθησε κατεργασία με διαιθυλαιθέρα για τελικό καθαρισμό.

Απομονώθηκαν: 2.0 g λευκού κρυσταλλικού στερεού

Απόδοση: 76.3 %

^{1}H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ 8.80 (dd, *J* = 2.0, 0.7 Hz, 1H,H-3), 8.69 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 2H, H-5,H-6'), 8.19 (dd, *J* = 8.1, 0.7 Hz, 1H, H-6), 7.94 (ddd, *J* = 8.1, 7.5, 1.9 Hz, 1H, H-4'), 7.57 – 7.32 (m, 2H, H-5',3').

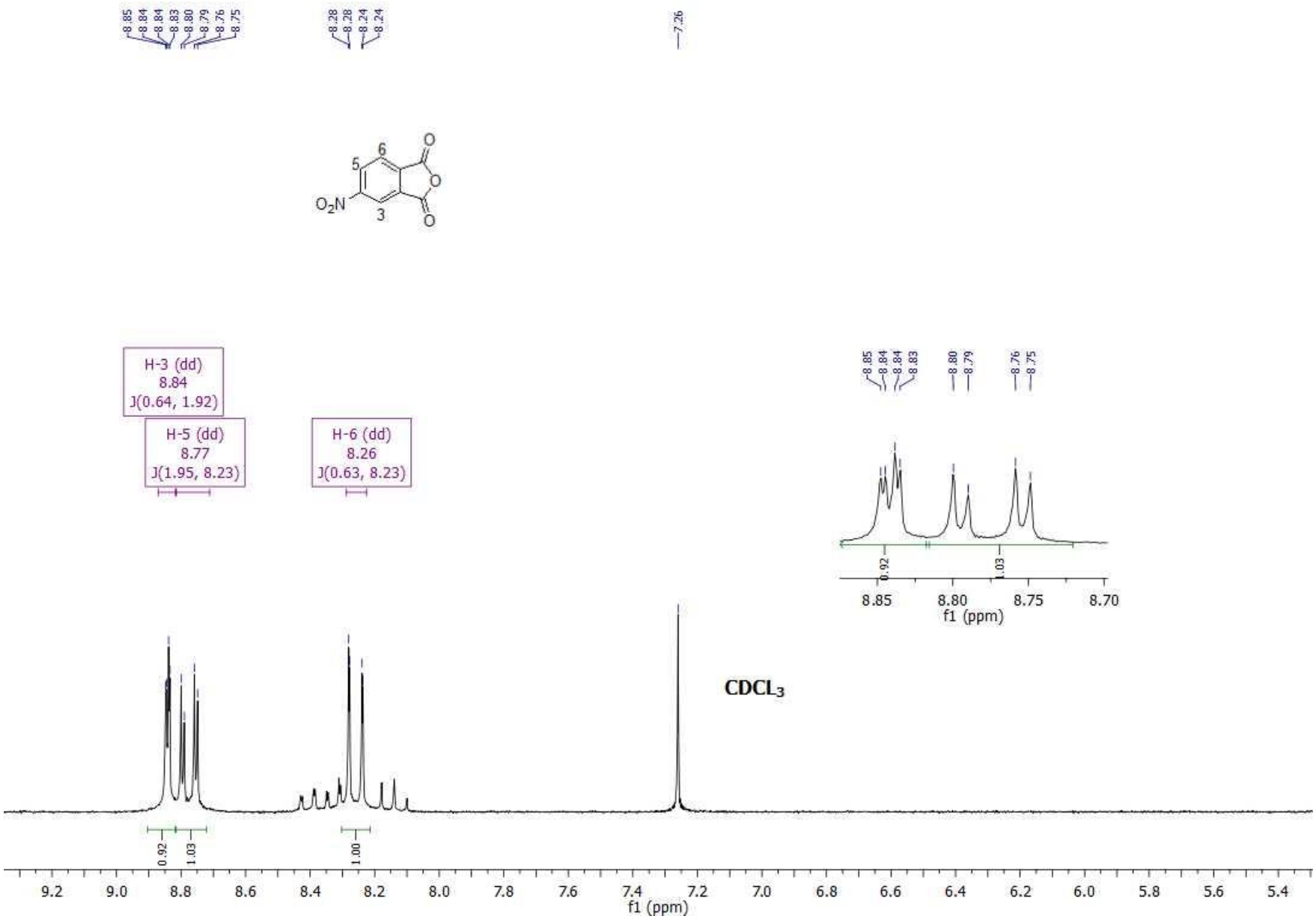
^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ 164,6, 164,4 (2C,2 x C=O), 152,1 (C-4), 149,9 (C-6'), 145,5 (C-2'), 138,7 (C-4'), 136,1 (C-7), 133,1 (C-2), 129,9, 125,4, 124,1, 122,0, 119,5 (5C,Αρωματικοί C, C-5,C-6,C-3',C-5',C-3).

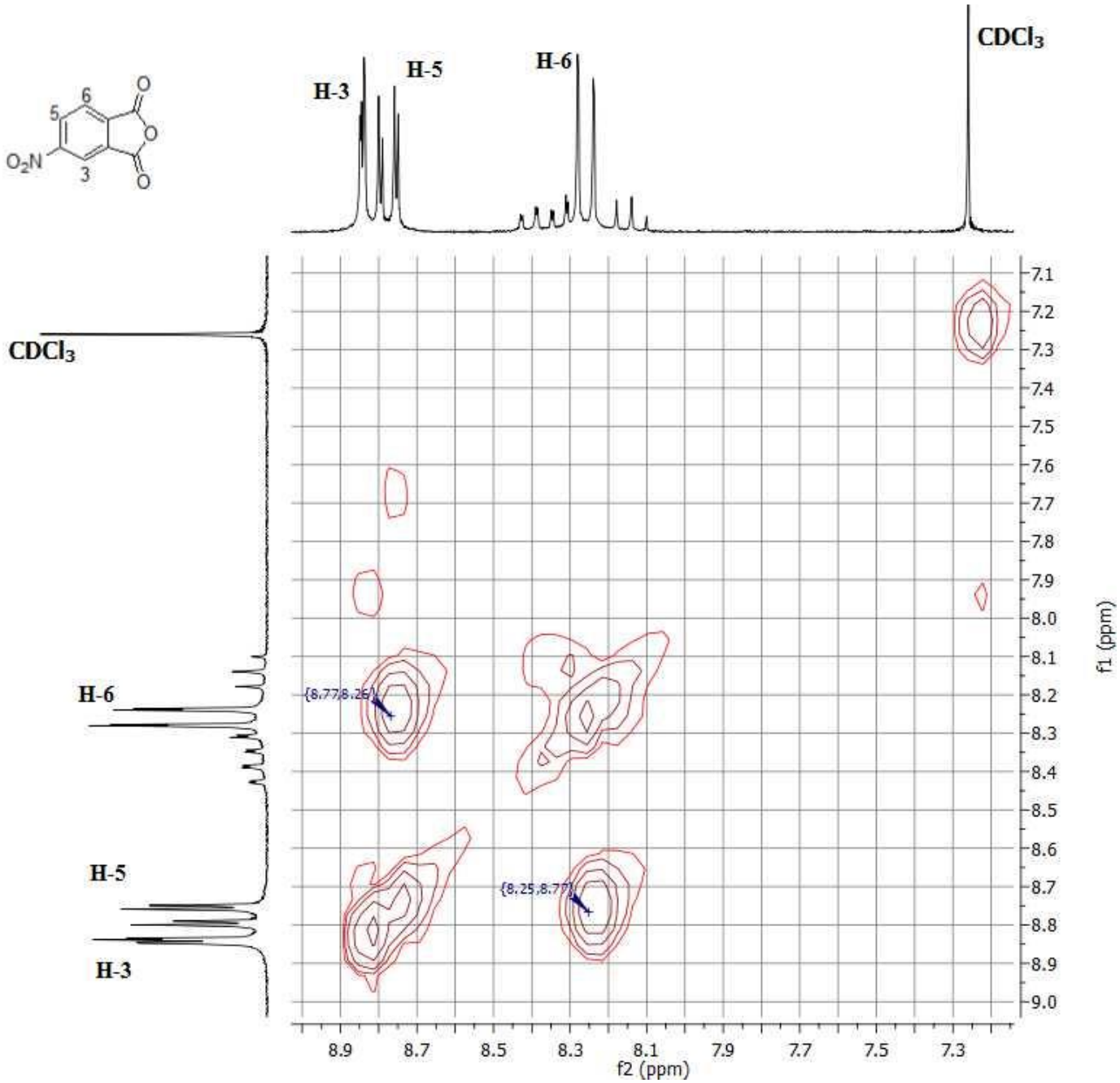
Αναφορές

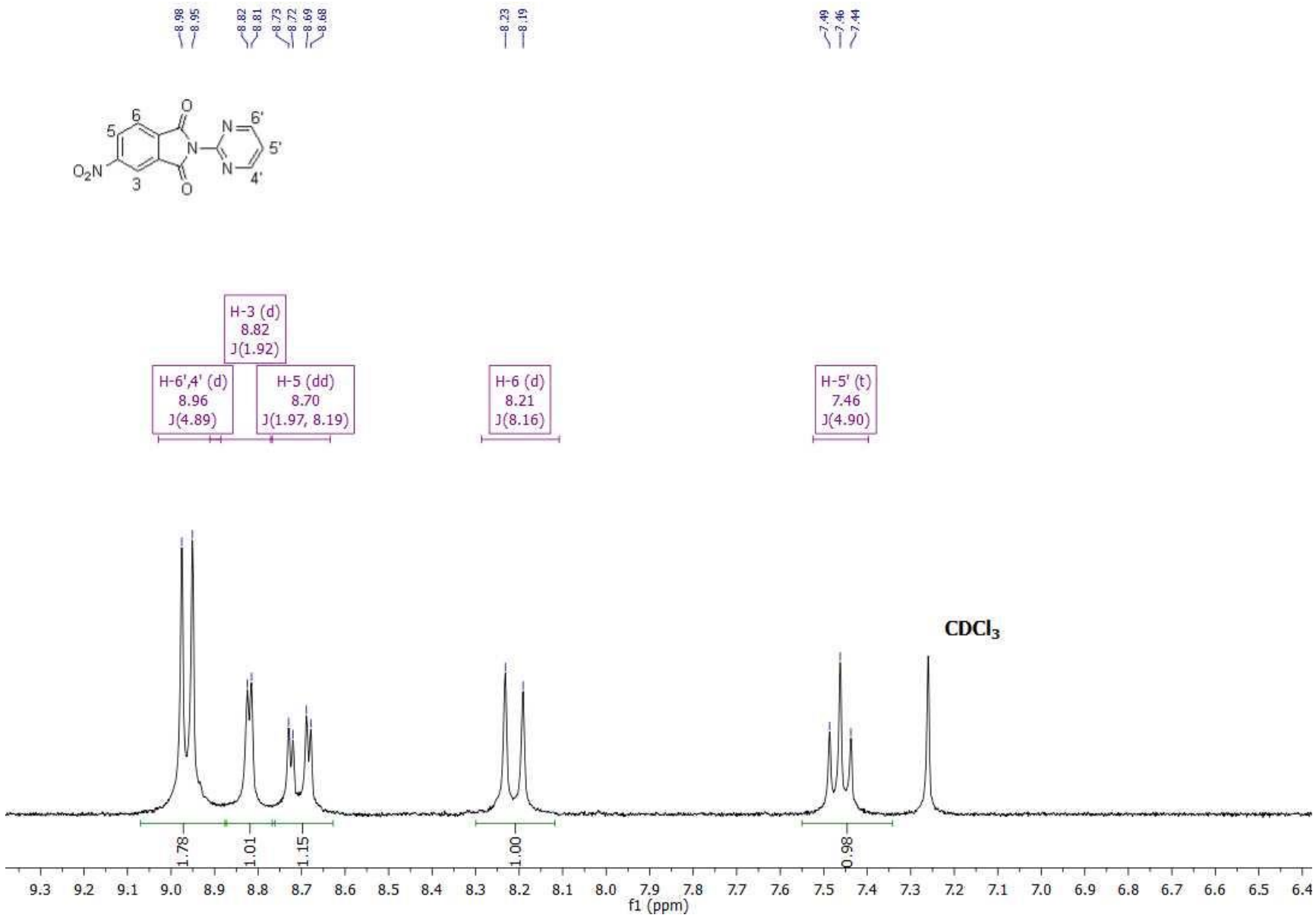
1. Berg J.M.; Tymoczko J.L.; Stryer L., *Biochemistry* 7th ed.; **2012**
2. Alberti, G.M.M; Zimmet, P.Z.; Complications Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Provisional Report of a WHO consultation. *Diabet. Med.***1998,** 15: 539-553.
3. http://www.mayoclinic.org/
4. Treadway, J.L; Mendys, P; Hoover, D.J; Glycogen phosphorylase inhibitors for treatment of type 2 diabetes mellitus. *Exp. Opin. Invest. Drugs.* **2001,** 10 (3), 439-454.
5. Silverman, B.R; Holladay, W.M; *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action* 3rd ed.; **2014**
6. Μαυρομούστακος, Θ; Ζουμπουλάκης, Π; *Μοριακή Μοντελοποίηση: Εφαρμογές στην Οργανική και Φαρμακευτική Χημεία* 1η έκδοση.; **2008**
7. Kuntz, I.D; Structure-Based strategies for drug design and discovery. *Science.* **1992,** 257: 1078-1082.
8. Dorsey, B.D; et al ; L-735,524: The design of a potent and orally bioavailable HIV protease inhibitor. *J. Med. Chem.***1994,** 37: 3443-3451.
9. DeFronzo, A.R; Pharmacologic Therapy for Type 2 Diabetes Mellitus. *Ann. Intern. Med.* **1999,** 131: 281-303.
10. Magkos, F; Yannakoulia, M; Chan, J.L; Mantzoros, C.S; Management of the metabolic syndrome and type 2 diabetes through lifestyle modification. *Annu. Rev. Nutr.* **2009**, 29: 223-256.
11. Martin, H.W; Hoover, J.D; Armento, J.S; Stock, A.I; McPherson, R.K; Danley, E.D; Stevenson, W.R; Barrett, J.E; Treadway, J.L; Discovery of a human liver glycogen phosphorylase inhibitor that lowers blood glucose in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.***1998,** 95: 1776-1781.
12. Mamais, M.; Kouloumoundra, V.; Smyrli, E.; Grammatopoulos, P.; Chrysina, E. D.; Gimisis, T., Synthesis of N4-aryl-β-d-glucopyranosylcytosines: a methodology study. *Tetrahedron Lett.* **2015,** *56* (41), 5549-5552.

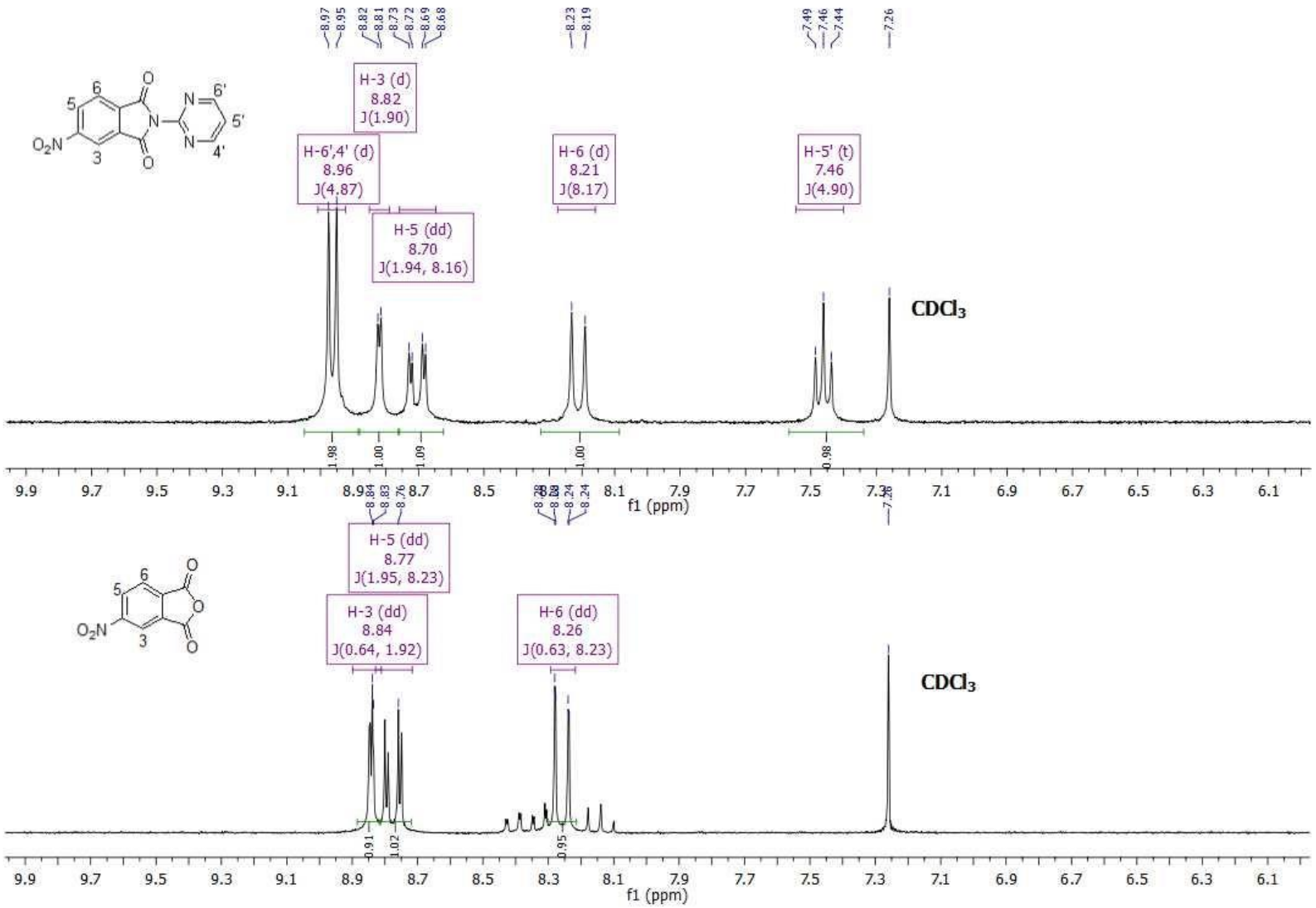
13. Κουλουμούνδρα, Β; *Ερευνητική εργασία διπλώματος ειδίκευσης : Σύνθεση νέων ισυρών αναστολέων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου με χρήση άρυλο-βενζυλαμινών*; **2014**
14. Armarego,W.L.F; Chai, C.L.L;, Purification of Laboratory Chemicals, **2013**, 7th edition,
15. Bailleux, V.; Vallee, L.; Nuyts, J.; Vamecq, J., Synthesis and Anticonvulsant Activity of Some N-Phenylphthalimides. *Chem. Pharm. Bull.* **1994,** 42 (9), 1817-1821.
16. Izakovich, E. N.; Shupik, A. N.; Shul'ga, Yu. M.; Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR, Division of Chemical Science (English Translation), **1989,** 38, 1370 – 1374
17. Mohamed, T.; Zhao, X.; Habib, L.K.; Yang, J.; Rao, P.; Praveen, P.N; Design, synthesis and structure activity (SAR) studies of 2,4-disubstituted pyrimidine derivatives: dual activity as cholinesterase and Aβ-aggregation inhibitors, Bioorganic & Medicinal Chemistry, **2011**, 19, 2269–2281
18. Hobartner, C.; Sicoli, G.; Wachowius, F.; Gophane, D.B.; Sigurdsson, S.T.; Synthesis and Characterization of RNA Containing a Rigid and Nonperturbing Cytidine-Derived Spin Label. *J. Org. Chem.* **2012,** 77, 7749−7754.
19. Varala R.; Thesis submitted for the degree of doctor of philosophy in chemistry: a facile synthesis of biologically active phthalimides and its analogues; **2006**

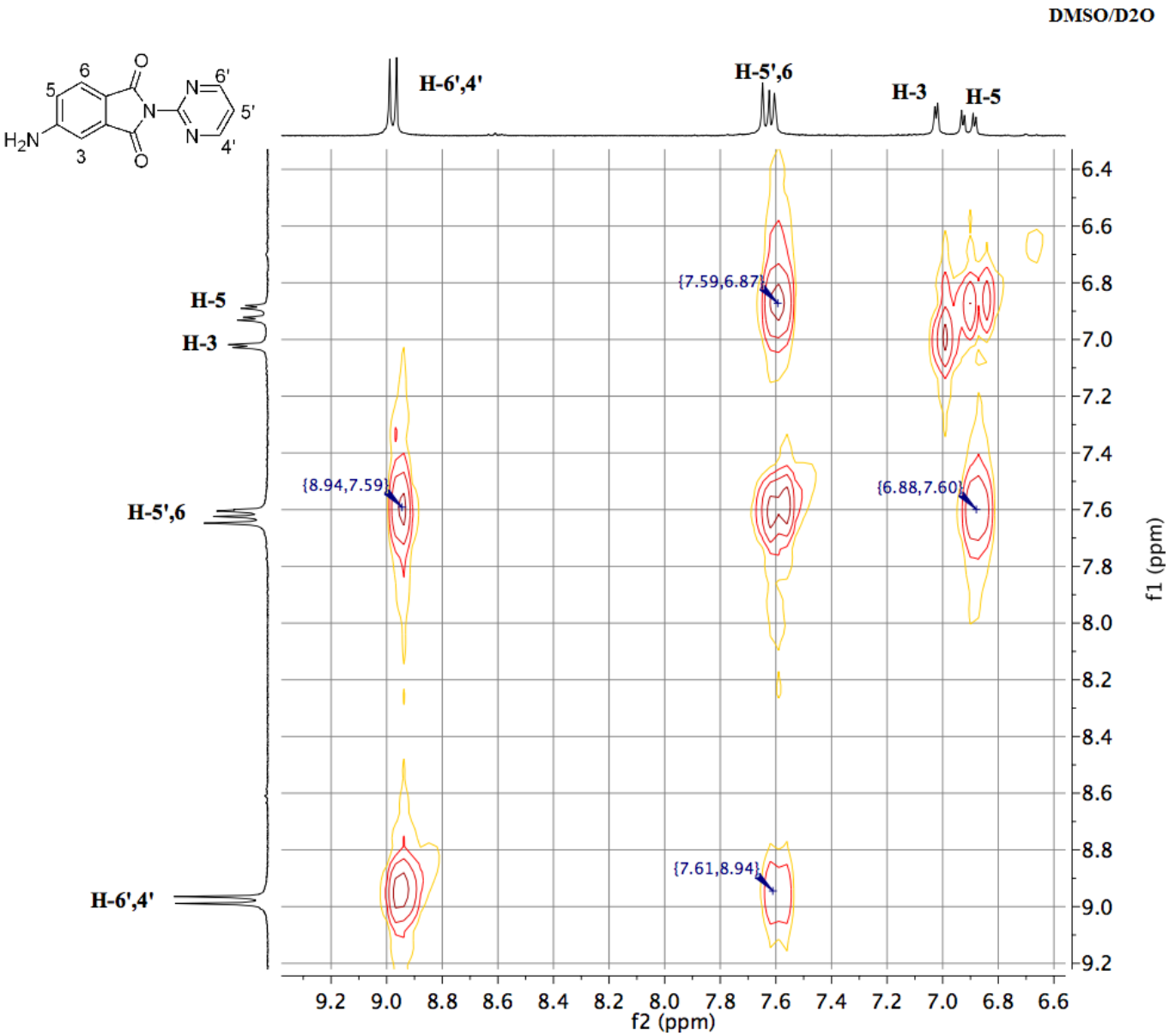
5. ΦΑΣΜΑΤΑ

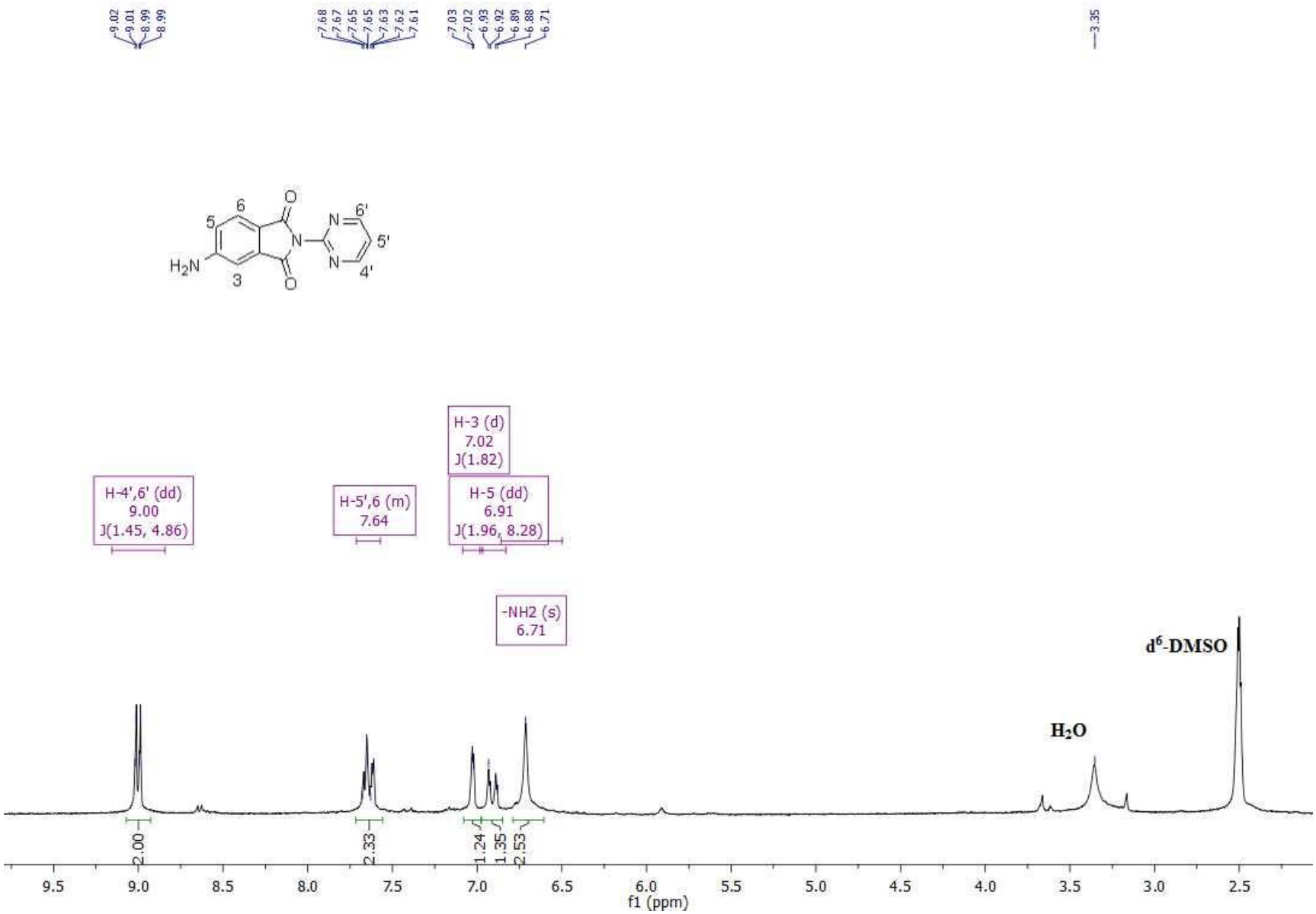

8.85
8.84
8.84
8.83
8.80
8.79
8.76
8.75
8.28
8.28
8.24
8.24
7.26
6
5
3
O
O
O
O_2N
H-3 (dd)
8.84
J(0.64, 1.92)
H-5 (dd)
8.77
J(1.95, 8.23)
H-6 (dd)
8.26
J(0.63, 8.23)
0.92
1.03
1.00
$CDCL_3$
9.2
9.0
8.8
8.6
8.4
8.2
8.0
7.8
7.6
7.4
7.2
7.0
6.8
6.6
6.4
6.2
6.0
5.8
5.6
5.4
f1 (ppm)
8.85
8.84
8.84
8.83
8.80
8.79
8.76
8.75
0.92
1.03
8.85
8.80
8.75
8.70
f1 (ppm)

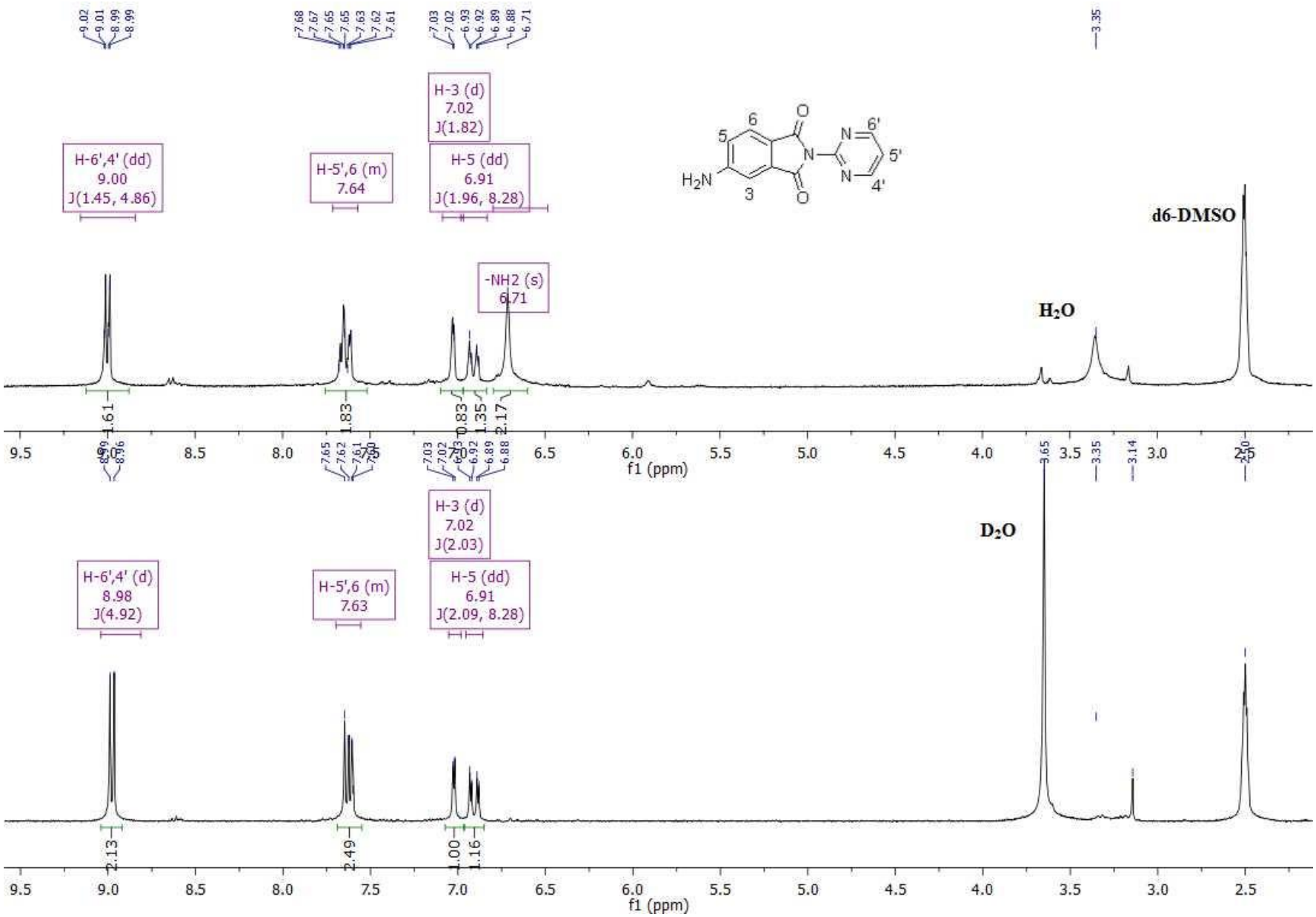

H-3
H-5
H-6
CDCl3
O2N
CDCl3
H-6
H-5
H-3
{8.77,8.26}
{8.25,8.77}
f2 (ppm)
f1 (ppm)

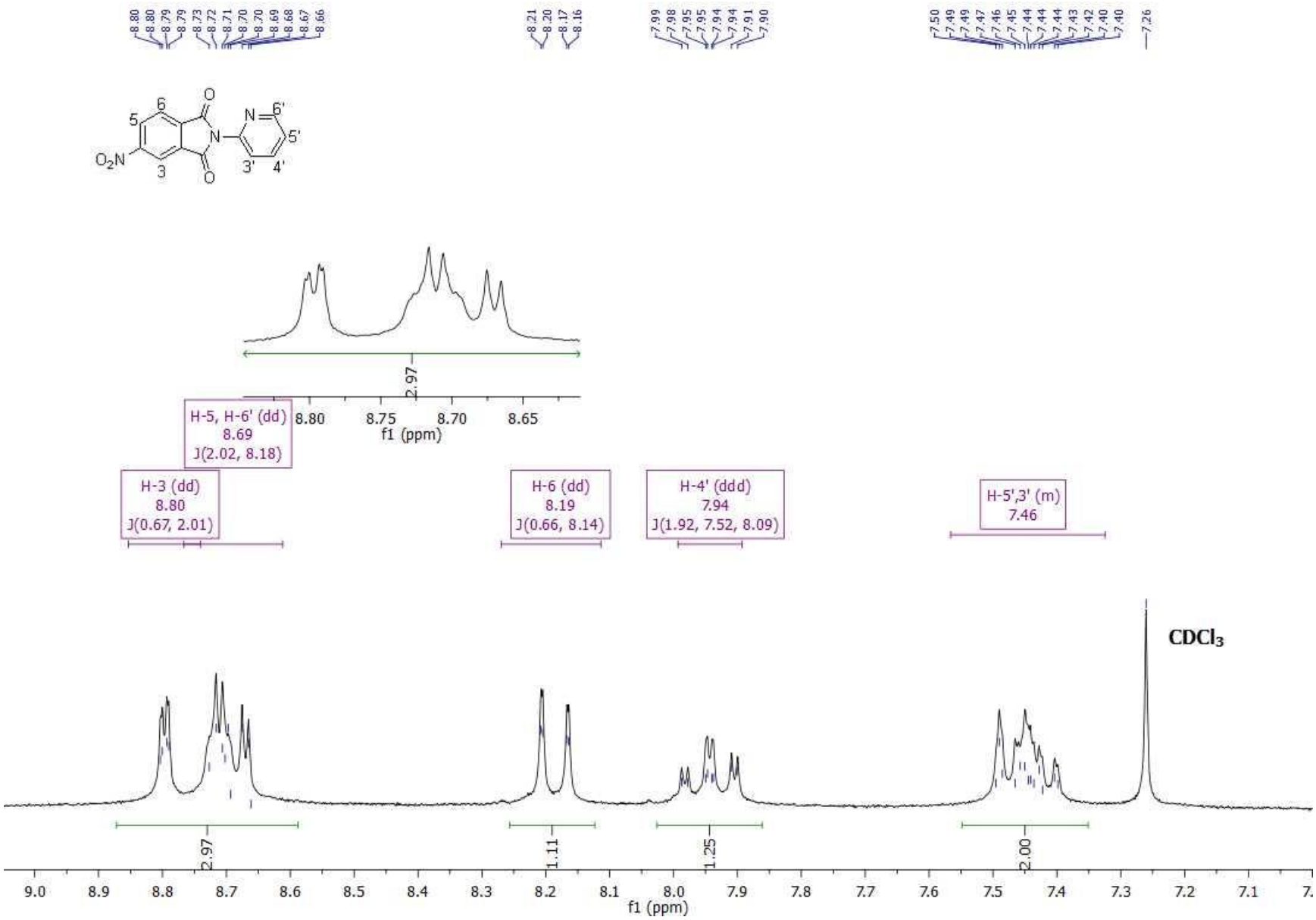

8.98
8.95
8.82
8.81
8.73
8.72
8.69
8.68
8.23
8.19
7.49
7.46
7.44
H-3 (d)
8.82
J(1.92)
H-6',4' (d)
8.96
J(4.89)
H-5 (dd)
8.70
J(1.97, 8.19)
H-6 (d)
8.21
J(8.16)
H-5' (t)
7.46
J(4.90)
CDCl3
1.78
1.01
1.15
1.00
0.98
f1 (ppm)

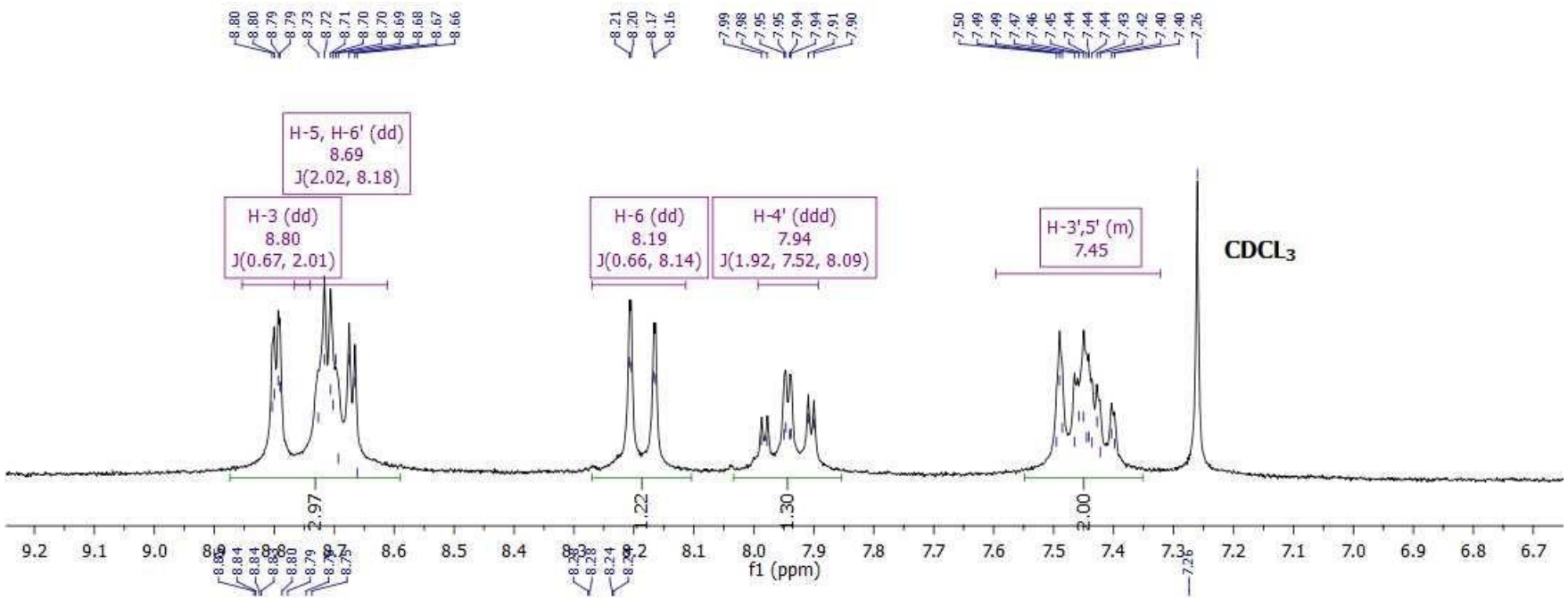

H-3 (d)
8.82
J(1.90)
H-6',4' (d)
8.96
J(4.87)
H-5 (dd)
8.70
J(1.94, 8.16)
H-6 (d)
8.21
J(8.17)
H-5' (t)
7.46
J(4.90)
CDCl3
f1 (ppm)
H-5 (dd)
8.77
J(1.95, 8.23)
H-3 (dd)
8.84
J(0.64, 1.92)
H-6 (dd)
8.26
J(0.63, 8.23)
CDCl3
f1 (ppm)

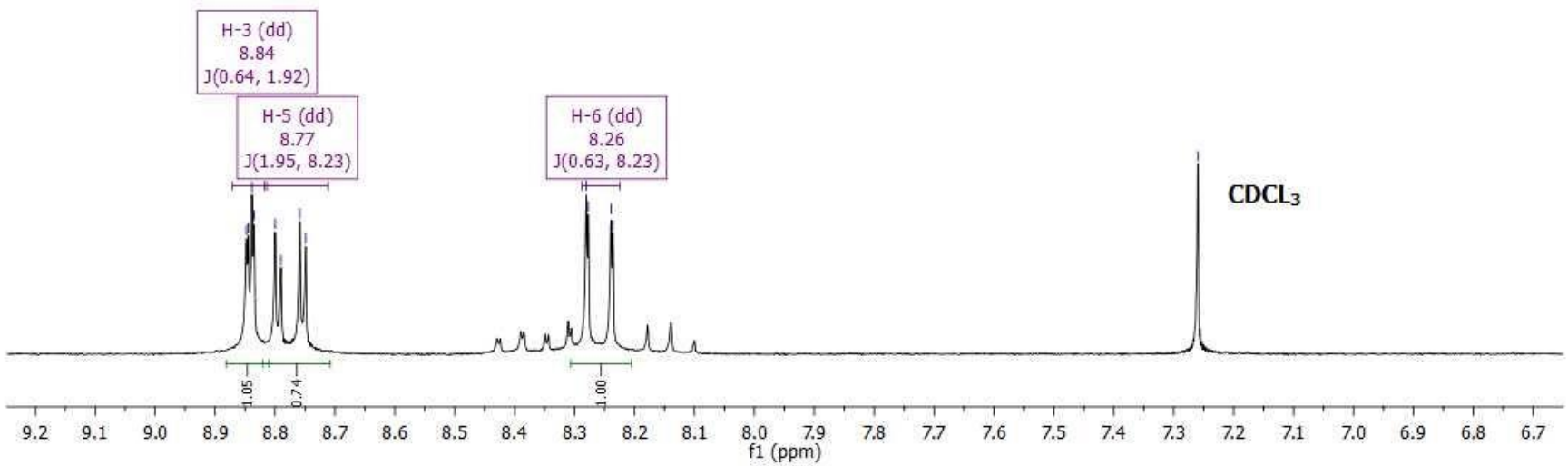

DMSO/D2O
H-6',4'
H-5',6
H-3
H-5
H-5
H-3
H-5',6
H-6',4'
{7.59,6.87}
{8.94,7.59}
{6.88,7.60}
{7.61,8.94}
f2 (ppm)
f1 (ppm)

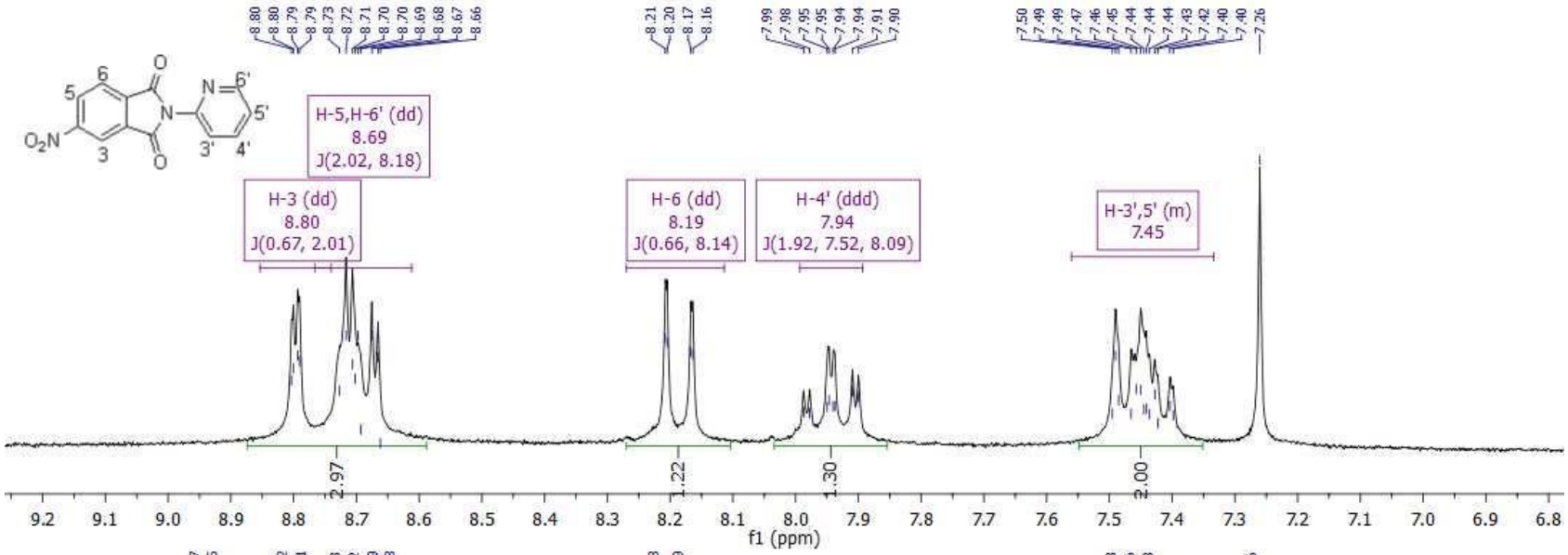

9.02
9.01
8.99
8.99
7.68
7.67
7.65
7.65
7.63
7.62
7.61
7.03
7.02
6.93
6.92
6.89
6.88
6.71
3.35
H-4',6' (dd)
9.00
J(1.45, 4.86)
H-5',6 (m)
7.64
H-3 (d)
7.02
J(1.82)
H-5 (dd)
6.91
J(1.96, 8.28)
-NH2 (s)
6.71
d6-DMSO
H2O
2.00
2.33
1.24
1.35
2.53
9.5
9.0
8.5
8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
f1 (ppm)

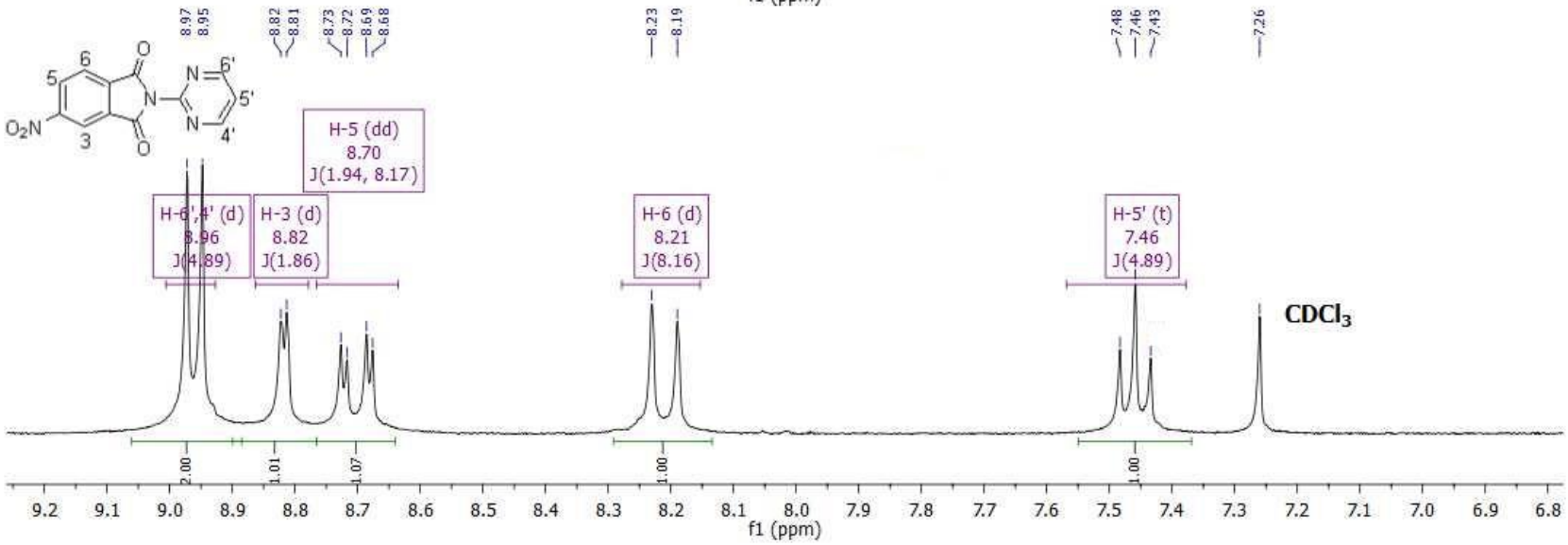

H-6',4' (dd)
9.00
J(1.45, 4.86)
H-5',6 (m)
7.64
H-3 (d)
7.02
J(1.82)
H-5 (dd)
6.91
J(1.96, 8.28)
-NH2 (s)
6.71
d6-DMSO
H2O
H-6',4' (d)
8.98
J(4.92)
H-5',6 (m)
7.63
H-3 (d)
7.02
J(2.03)
H-5 (dd)
6.91
J(2.09, 8.28)
D2O
f1 (ppm)

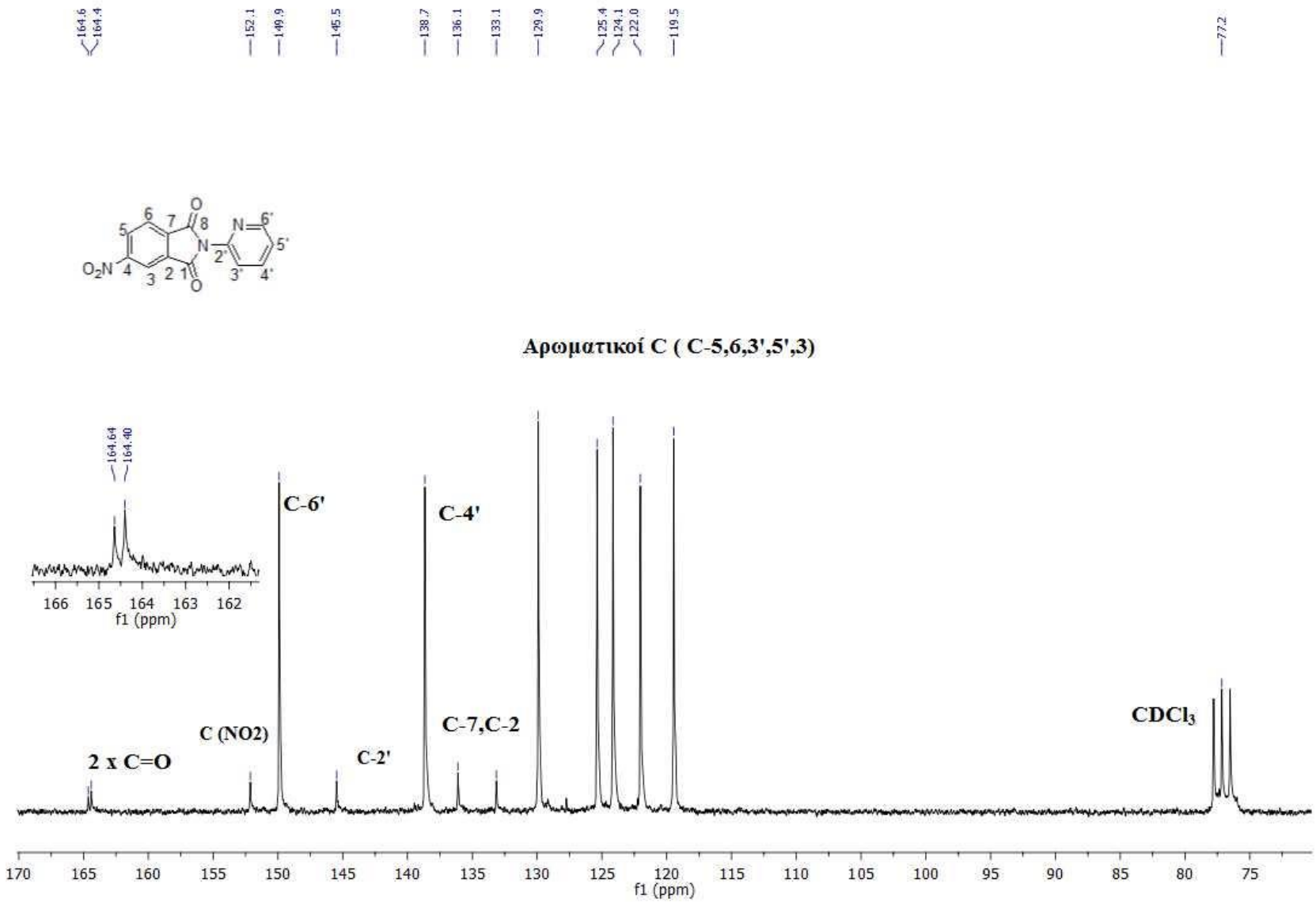

8.80 8.80 8.79 8.79 8.73 8.72 8.71 8.70 8.70 8.69 8.68 8.67 8.66
8.21 8.20 8.17 8.16
7.99 7.98 7.95 7.95 7.94 7.94 7.91 7.90
7.50 7.49 7.49 7.47 7.46 7.45 7.44 7.44 7.44 7.43 7.42 7.40 7.40
7.26
O
N
6'
5'
6
5
N
O
O_2N
3
3'
4'
2.97
8.80
8.75
8.70
8.65
f1 (ppm)
H-5, H-6' (dd)
8.69
J(2.02, 8.18)
H-3 (dd)
8.80
J(0.67, 2.01)
H-6 (dd)
8.19
J(0.66, 8.14)
H-4' (ddd)
7.94
J(1.92, 7.52, 8.09)
H-5',3' (m)
7.46
$CDCl_3$
2.97
1.11
1.25
2.00
9.0 8.9 8.8 8.7 8.6 8.5 8.4 8.3 8.2 8.1 8.0 7.9 7.8 7.7 7.6 7.5 7.4 7.3 7.2 7.1
f1 (ppm)


H-5, H-6' (dd)
8.69
J(2.02, 8.18)
H-3 (dd)
8.80
J(0.67, 2.01)
H-6 (dd)
8.19
J(0.66, 8.14)
H-4' (ddd)
7.94
J(1.92, 7.52, 8.09)
H-3',5' (m)
7.45
CDCL3
2.97
1.22
1.30
2.00
f1 (ppm)

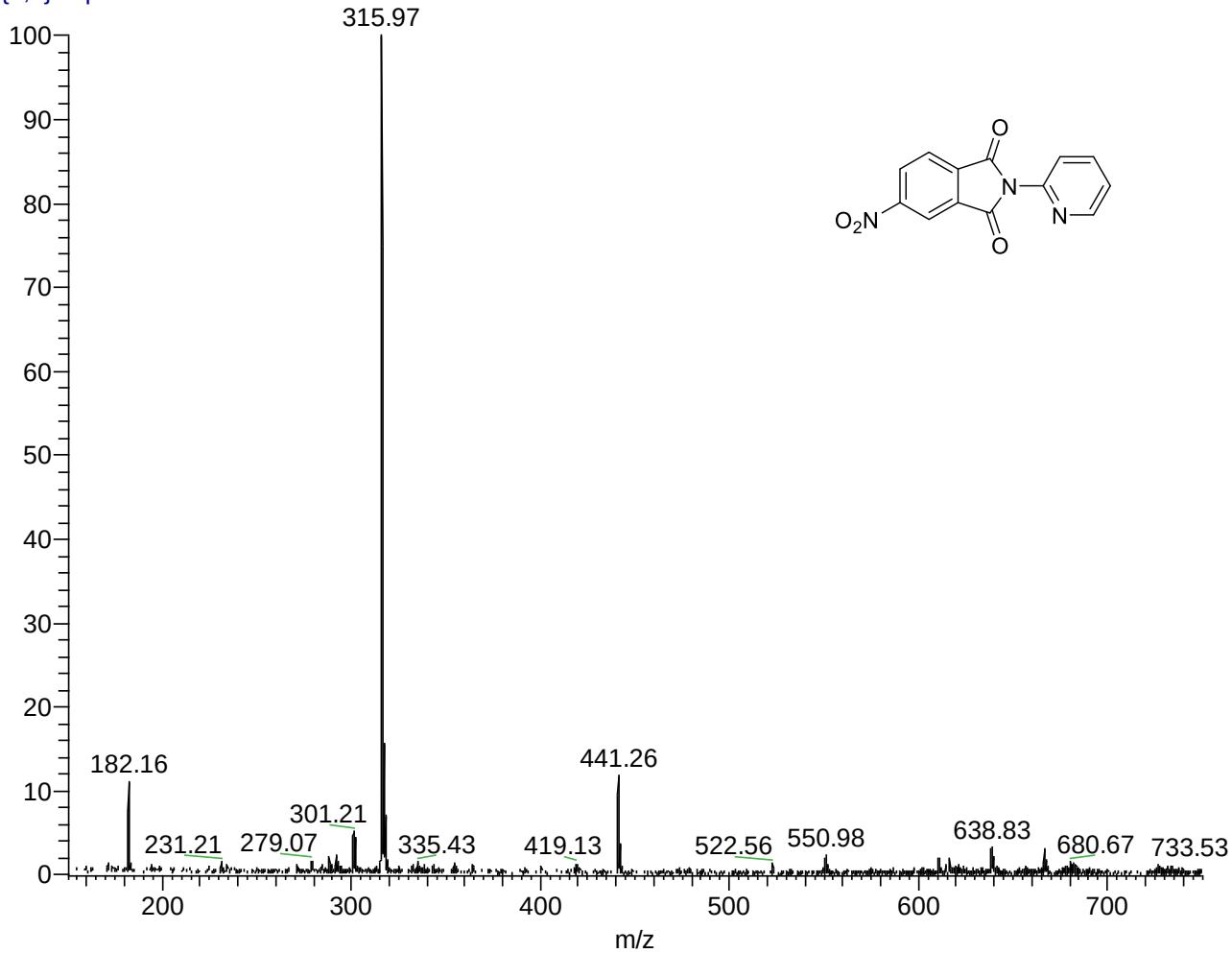

H-3 (dd)
8.84
J(0.64, 1.92)
H-5 (dd)
8.77
J(1.95, 8.23)
H-6 (dd)
8.26
J(0.63, 8.23)
CDCL3
1.05
0.74
1.00
f1 (ppm)


H-5,H-6' (dd)
8.69
J(2.02, 8.18)
H-3 (dd)
8.80
J(0.67, 2.01)
H-6 (dd)
8.19
J(0.66, 8.14)
H-4' (ddd)
7.94
J(1.92, 7.52, 8.09)
H-3',5' (m)
7.45
2.97
1.22
1.30
2.00
f1 (ppm)

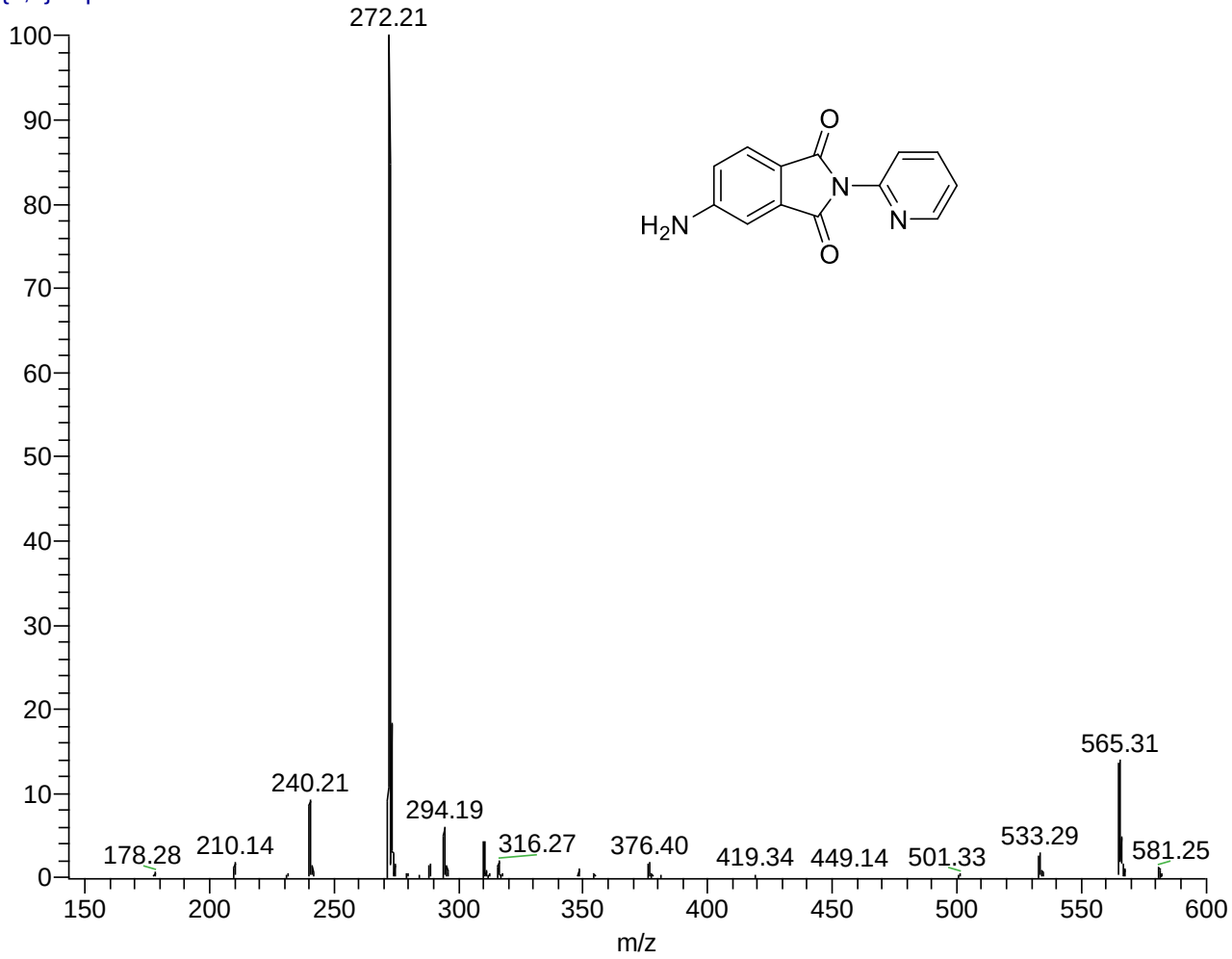
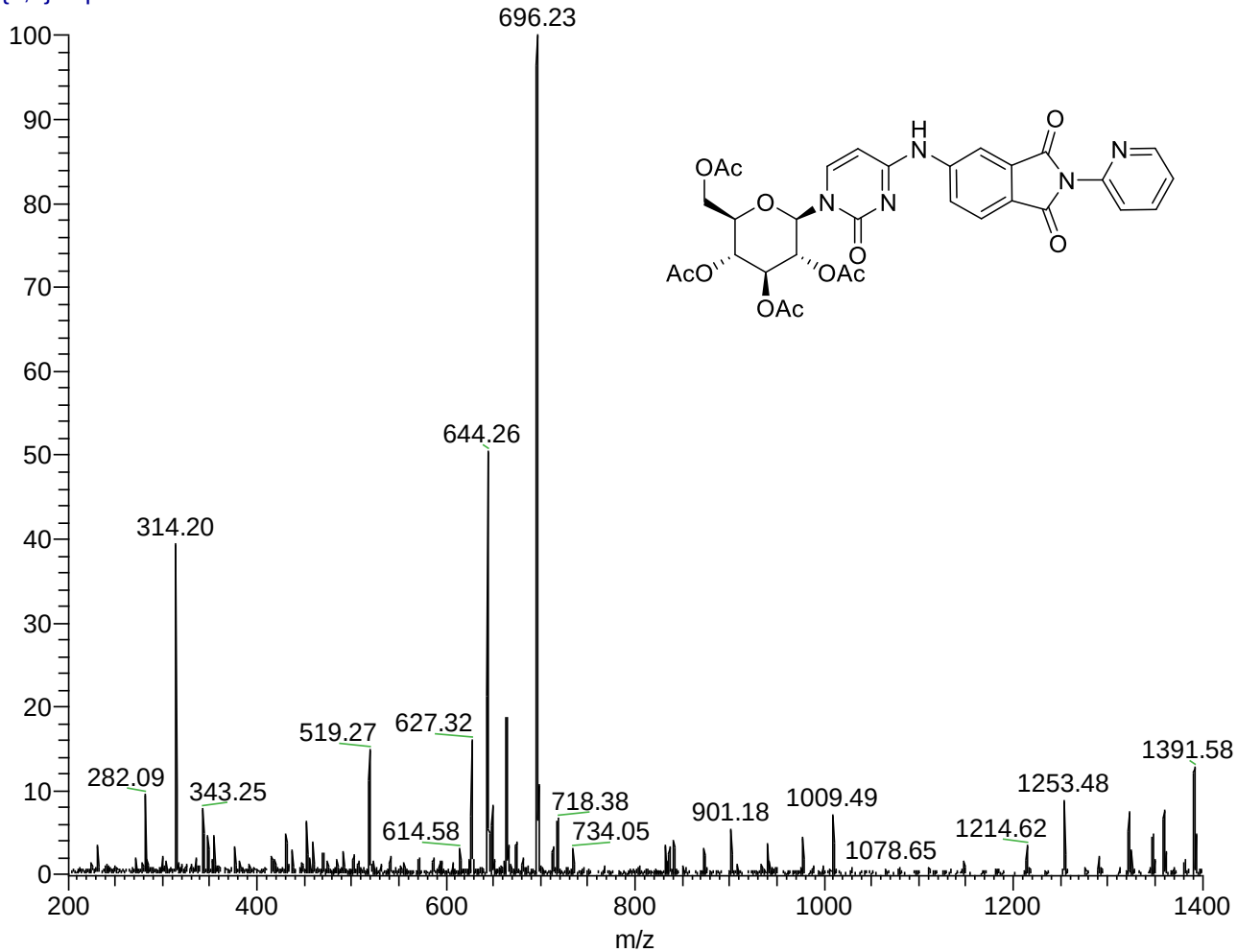

H-5 (dd)
8.70
J(1.94, 8.17)
H-6',4' (d)
8.96
J(4.89)
H-3 (d)
8.82
J(1.86)
H-6 (d)
8.21
J(8.16)
H-5' (t)
7.46
J(4.89)
CDCl3
2.00
1.01
1.07
1.00
1.00
f1 (ppm)


164.6
164.4
152.1
149.9
145.5
138.7
136.1
133.1
129.9
125.4
124.1
122.0
119.5
77.2
Αρωματικοί C (C-5,6,3',5',3)
C-6'
C-4'
C (NO2)
C-2'
C-7,C-2
2 x C=O
CDCl3
f1 (ppm)

MN24_intermediate_ESI+10 #1-16 RT: 0.00-0.51 AV: 16 NL: 1.48E5
T: {0,0} + p ESI !corona sid=10.00 det=1153.00 Full r



MN18A_ESI+25 #1-17 RT: 0.00-0.54 AV: 17 NL: 1.58E6
T: {0,0} + p ESI !corona sid=25.00 det=1153.00 Full r



MN19_ESI+10 #1-21 RT: 0.00-0.68 AV: 21 NL: 1.89E5
T: {0,0} + p ESI !corona sid=10.00 det=1153.00 Full r