



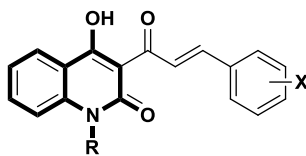
Εθνικό και Καποδιστριακό
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΣΥΝΘΕΤΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Νέα υβριδικά βιοδραστικά κινολινικά ανάλογα χαλκονών
με αντιπαρασιτική δράση

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ



Μαρίνα Ι.Ρουσσάκη

Χημικός Μηχανικός

ΑΘΗΝΑ 2011



Εθνικό και Καποδιστριακό

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΣΥΝΘΕΤΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Νέα υβριδικά βιοδραστικά κινολινικά ανάλογα χαλκωνών
με αντιπαρασιτική δράση**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Μαρίνα Ι.Ρουσσάκη

Επιβλέπων εργασίας : *Ανδρέας Τσοτίνης* *Καθηγητής ΕΚΠΑ*

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Γεώργιος Φώσκολος

Καθηγητής ΕΚΠΑ

Τμήμα Φαρμακευτικής

Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας

Ανδρέας Τσοτίνης

Καθηγητής ΕΚΠΑ

Τμήμα Φαρμακευτικής

Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας

Παναγιώτης Μαράκος

Καθηγητής ΕΚΠΑ

Τμήμα Φαρμακευτικής

Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας

Πρόλογος

Η ερευνητική αυτή εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών 'Συνθετική Φαρμακευτική Χημεία' του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά τη χρονική περίοδο 2010 – 2011.

Εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη της Δρ. Αναστασίας Δέτση, Λέκτορας Ε.Μ.Π. και του Καθηγητή Ε.Κ.Π.Α. Ανδρέα Τσοτίνη. Τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, ήταν ο κ. Φώσκολος Γεώργιος, Καθηγητής ΕΚΠΑ, ο κ. Τσοτίνης Ανδρέας, Καθηγητής ΕΚΠΑ και ο κ. Μαράκος Παναγιώτης, Καθηγητής ΕΚΠΑ.

Θέλω να ευχαριστήσω θερμώς όλα τα μέλη της τριμελούς επιτροπής για τις εύστοχες παρατηρήσεις και το ενδιαφέρον τους.

Για την πραγματοποίηση και ολοκλήρωση αυτής της ερευνητικής εργασίας θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στην Δρ. Αναστασία Δέτση, η οποία μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με το ερευνητικό αντικείμενο της σύνθεσης βιοδραστικών μορίων, και της οποίας η ουσιαστική και συνεχής υποστήριξη και οι υποδείξεις, αποτέλεσαν σημαντικό επιστημονικό υπόβαθρο στην προετοιμασία και την περάτωση αυτής της εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Ανδρέα Τσοτίνη, για τις συνεχείς συμβουλές και υποδείξεις του, για την επιτυχή πραγματοποίηση της εργασίας και την ορθή ανάλυση και εξήγηση των αποτελεσμάτων που μου παρείχε απλόχερα, σε όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

Ευχαριστώ τη Δρ. Θεοδώρα Καλογεροπούλου, Διευθύντρια Ερευνών στο Ινστιτούτο Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, η οποία, ως αντιπρόεδρος του COST Action CM0801 'New drugs for neglected diseases', συνέβαλε στην ανάπτυξη της συνεργασίας με τα ερευνητικά εργαστήρια του εξωτερικού στα οποία πραγματοποιήθηκαν τα βιολογικά πειράματα της παρούσας εργασίας.

Επιπλέον, να ευχαριστήσω τους Δρ. Μ. Ζερβού και Δρ. Π. Ζουμπουλάκη, Ερευνητές στο Ινστιτούτο Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, για τη συμβολή τους στη φασματοσκοπική μελέτη των ενώσεων που παρουσιάζονται σε αυτή την εργασία.

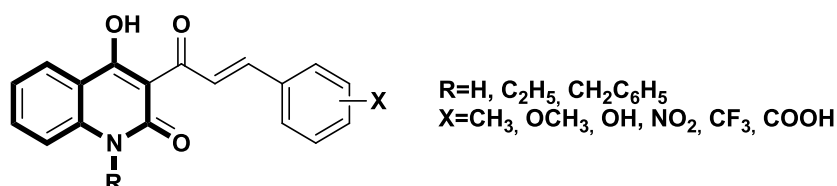
Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους συναδέλφους και φίλους, τους υποψήφιους Διδάκτορες Ιωάννα Δεληγκιόζη και Δημήτρη Ματιάδη, καθώς και τους Δρ.Κυριάκο Προυσή, μεταδιδακτορικό Ερευνητή στο Ινστιτούτο Οργανικής & Φαρμακευτικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, την προπτυχιακή φοιτήτρια Χρύσα Κονταρέλη και τη Ζαμπία Κατσανεβάκη ΕΕΔΙΠ (II) του εργαστηρίου Οργανικής Χημείας του ΕΜΠ, για την σημαντική βοήθεια και υποστήριξη, κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της μεταπτυχιακής αυτής εργασίας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την συμπαράσταση και τη βοήθεια που μου προσέφεραν για την πραγματοποίηση των στόχων μου.

Στην μνήμη της Μητέρας μου

Περίληψη

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία έχει ως αντικείμενο τη σύνθεση νέων βιοδραστικών ετεροκυκλικών, α,β -ακόρεστων καρβονυλικών ενώσεων, με ταυτόχρονη μελέτη και αξιολόγηση της αντιπαρασιτικής τους δράσης. Η ενδιαφέρουσα βιολογική δράση τόσο των 3-υποκατεστημένων-4-υδροξυ-2-κινολινονών όσο και των χαλκονών, ως προς τις αντιοξειδωτικές, αντιπαρασιτικές, αντικαρκινικές και αντιϊκές ιδιότητες τους συνδυάστηκε σε μία υβριδική σκελετική διάταξη 4-υδροξυ-2-κινολινόνης-χαλκόνης.



Συγκεκριμένα, η συνθετική πορεία των νέων παραγώγων, αρχικά περιλαμβάνει την παρασκευή της 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2-κινολινόνης, η οποία βασίζεται σε αντίδραση C-ακυλίωσης του ακετοξικού αιθυλεστέρα από την 2-μεθυλο-3,1-βενζοξαζιν-4-όνη. Η κύκλωση των ενδιάμεσων προϊόντων C-ακυλίωσης σε αλκαλικό περιβάλλον υπό ήπιες συνθήκες, οδήγησε με αρκετά ικανοποιητικές αποδόσεις στην επιθυμητή 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2-κινολινόνη.

Η σύνθεση των νέων κινολινονο-χαλκονών πραγματοποιήθηκε μέσω αλδολικής συμπύκνωσης της 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2-κινολινόνης με διάφορες αρωματικές αλδεΐδες παρουσία καταλυτικής ποσότητας πιπεριδίνης. Παρασκευάστηκαν συνολικά 12 νέες ενώσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν ομάδες δότες ή δέκτες ηλεκτρονίων σε διάφορες θέσεις του δακτυλίου B ή σύστημα εκτεταμένης συζυγίας.

Προκειμένου, εν συνεχεία, να μελετηθούν εκτενέστερα οι σχέσεις δομής-δράσης, πραγματοποιήθηκαν τροποποιήσεις σε δύο από τα σημαντικότερα δομικά χαρακτηριστικά των μορίων: αρχικά στο N – H του ετεροκυκλικού δακτυλίου της κινολινόνης και κατόπιν στο α,β -ακόρεστο καρβονυλικό σύστημα της χαλκόνης.

Η μεθοδολογία η οποία αναπτύχθηκε για την υποκατάσταση του αμιδικού αζώτου με ομάδες δότες ηλεκτρονίων (αιθυλο και βενζυλο – ομάδες), πραγματοποιήθηκε μέσω αναγωγικής αμίνωσης του μεθυλεστέρα του ανθρανιλικού οξέος με την κατάλληλη αλδεΐδη, ακυλίωση της δευτεροταγούς αμίνης και κυκλοποίησή της σε βασικό περιβάλλον. Οι τελικές αλκυλιωμένες χαλκόνες συντέθηκαν μέσω της μικτής αλδολικής συμπύκνωσης παρουσία πιπεριδίνης ως καταλύτη, σύμφωνα με την αρχική μέθοδο.

Η πρώτη προσέγγιση στη χημική τροποποίηση του α,β -ακόρεστου καρβονυλικού συστήματος των χαλκονών πραγματοποιήθηκε μέσω θέρμανσης της αντίστοιχης χαλκόνης με παράγωγα υδραζίνης σε οξικό οξύ, σχηματίζοντας τα νέα ετεροκυκλικά πυραζολινικά ανάλογα. Ακολούθως, διερευνήθηκε η εκλεκτική αναγωγή με αντίδραση καταλυτικής μεταφοράς υδρογόνου, χρησιμοποιώντας την κατάλληλη οργανική ένωση ως δότη υδρογόνου και καταλύτη Pd/C, με στόχο τη σύνθεση νέων διϋδροχαλκονών.

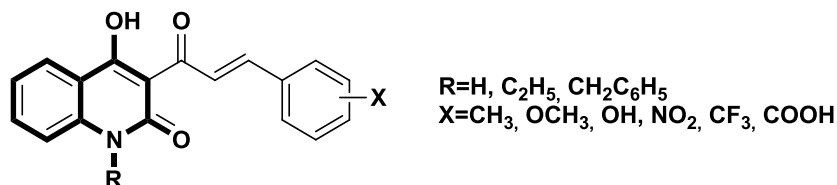
Τα νέα αυτά παράγωγα στη συνέχεια, ελέχθησαν ως προς την αντιπαρασιτική τους δράση έναντι της Σπλαχνικής Λεισμανίασης (Visceral Leishmaniasis) και της Αφρικανικής Τρυπανοσωμίας (Human African Trypanosomiasis – HAT), παρουσιάζοντας αξιολογικά

αποτελέσματα και ενθαρρύνοντάς μας για περαιτέρω μελέτη της σχέσης δομής – βιολογικής δράσης.

Η ταυτοποίηση της δομής των νέων αυτών ενώσεων πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπικές μεθόδους (Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού NMR μίας και δύο διαστάσεων και Φασματοσκοπία Μάζας ESI – MS και HRMS).

Abstract

In this work, novel bioactive, heterocyclic, α,β -unsaturated carbonyl compounds were designed and synthesized and their anti – parasitic activity evaluated. The powerful and diverse biological properties of quinolinones and chalcones, in the field of the antioxidant, anti – parasitic, anticancer and antiviral activities, were combined to a novel hybrid skeleton of Quinolinyl – Chalcone.



Among the methods employed in the synthesis of quinolinone analogues, the C- acylation reaction of ethyl acetoacetate, by 2-methyl-3,1-benzoxazin-4-one and further cyclization of the C-acylated intermediates under basic conditions, led to the formation of the starting material 3-acetyl 4-hydroxyquinolin-2(1H)-one.

The new series of quinolinyl chalcones were prepared via a crossed aldol coupling reaction between 3-acetyl-4-hydroxy-quinolinone and various aromatic aldehydes using piperidine as a basic catalyst. Twelve novel compounds were synthesized in total, bearing either a variety of electron – donating or electron – withdrawing substituents or a conjugated system.

Moreover, as we were interested in investigating further the structure – activity relationship of the new series of quinolinyl chalcones, we decided to proceed to the modification of the two more important structural characteristics of these molecules, i.e. the amide hydrogen of the heterocyclic ring of the quinolinone and the α,β -unsaturated system of the chalcone.

The methodology which was developed for the substitution of amidic hydrogen with electron donating groups, such as ethyl or benzyl, was realized via reductive amination of methyl anthranilate by the appropriate substituted aldehyde, acylation of the secondary amine and further cyclization under basic conditions. The newly synthesized quinolinyl chalcones were prepared via a crossed aldol coupling reaction, according to the initial method.

The first approach in the chemical modification of the α,β -unsaturated carbonyl system of chalcones was realised by heating the corresponding quinolinyl chalcone with hydrazine derivatives in the presence of acetic acid, as a solvent, to give the novel heterocyclic pyrazoline analogues. Furthermore, hydrogenation of the quinolinyl chalcones, using an appropriate organic compound as a hydrogen donor, catalyzed by Pd/C, led to the synthesis of novel dihydrochalcones.

In the present study, the newly synthesized compounds were evaluated for their *in vitro* antiparasitic activity against *Visceral leishmaniasis* and Human African Trypanosomiasis (HAT). The compounds present efficient inhibitory activity, encouraging us for further investigation of the structure activity relationship.

The structure of all of the synthesized quinolinyl-chalcone analogues was elucidated using spectroscopic techniques (1H and ^{13}C -NMR, ESI/MS, HRMS).

Σκοπός

Πληθώρα αλκαλοειδών και φυσικών προϊόντων, τα οποία περιέχουν καρβονυλικές, ετεροκυκλικές ενώσεις, έχουν αποτελέσει αντικείμενο της ερευνητικής δραστηριότητας πολλών επιστημονικών ομάδων, καθώς οι ετεροκυκλικές ενώσεις κατέχουν μια προεξέχουσα θέση στη φαρμακευτική έρευνα εδώ και δεκαετίες. Στα πλαίσια της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας, το συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον για την εύρεση νέων οργανικών μορίων με βιολογικές εφαρμογές, μας οδήγησε στο σχεδιασμό και στη σύνθεση νέων υβριδικών μορίων αναλόγων των κινολινονών και των χαλκονών με σκοπό την ύπαρξη ενώσεων με φαρμακολογικό κυρίως ενδιαφέρον.

Η σύνθεση υβριδικών μορίων που συνδυάζουν, σε ένα μόριο, δύο ή περισσότερες φαρμακοφόρες δομικές μονάδες αποτελεί μια κοινώς αποδεκτή προσέγγιση στη φαρμακευτική χημεία. Ο βασικός ετεροκυκλικός δακτύλιος των κινολινών, οι οποίες ανήκουν σε μία τάξη ετεροκυκλικών παραγώγων με μεγάλο εύρος βιολογικών και φαρμακευτικών ιδιοτήτων, αλλά και το α,β -ακόρεστο καρβονυλικό σύστημα των χαλκονών, που αποτελούν τους προδρόμους στη βιοσύνθεση των φλαβονοειδών, αποτελούν σημαντικές και χρήσιμες δομές για το σχεδιασμό και την ανάπτυξη νέων υβριδικών φαρμάκων.

Για το λόγο αυτό, στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκε η αντίδραση της 3-ακετυλο-4 υδροξυ-2-κινολινόνης με κατάλληλες αρωματικές αλδεΐδες προς σχηματισμό των αντίστοιχων υβριδικών κινολινονο – χαλκονών. Ακολούθως, η αξιολόγηση των νέων μορίων η οποία πραγματοποιήθηκε ως προς τις βιολογικές και φαρμακολογικές τους ιδιότητες, μας οδήγησε σε χρήσιμα συμπεράσματα για τη σχέση δομής – βιολογικής δράσης των νέων παραγώγων παρέχοντας έτσι σημαντικές πληροφορίες για το σχεδιασμό παραγώγων με ακόμα πιο βελτιωμένη φαρμακολογική δράση.

Πίνακας Περιεχομένων

Κεφάλαιο 1°

Παρασιτικές Ασθένειες και Φαρμακευτική Προσέγγιση

1.1	Πρωτοζωικές νόσοι	1
1.2	Αντιπαρασιτικά Φάρμακα	2
1.3	Λεισμανίαση	4
	1.3.1 Δερματική Λεισμανίαση (Cutaneous Leishmaniasis CL)	6
	1.3.2 Καλα – Αζάρ – Σπλαχνική Λεισμανίαση (Visceral Leishmaniasis VL)	7
	1.3.3 Χημειοθεραπεία της Λεισμανίασης	9
1.4	Τρυπανοσωμίαση	13
	1.4.1 Αμερικάνικη Τρυπανοσωμίαση - Ασθένεια Τσάγκας (Chagas disease)	14
	1.4.2 Αφρικανική Τρυπανοσωμίαση - Ασθένεια του Ύπνου	15
	1.4.3 Χημειοθεραπεία της Αφρικανικής Τρυπανοσωμίας	17

Κεφάλαιο 2°

Φυσικά Προϊόντα με Αντιπαρασιτική Δράση: Χαλκόνες και Κινολινόνες

2.1	Φυσικά Προϊόντα	20
2.2	Φλαβονοειδή (Flavonoids)	20
2.3	Χαλκόνες (1,3-διφαινυλο-2-προπεν-1-όνες)	22
	2.3.1 Βιολογική δράση φυσικών και συνθετικών χαλκονών	23
	2.3.2 Κυριότερες μέθοδοι σύνθεσης χαλκονών	25
2.4	Κινολινόνες	27
	2.4.1 Βιολογική δράση φυσικών και συνθετικών κινολινονών	27
	2.4.2 Κυριότερες μέθοδοι σύνθεσης κινολινονών	29
2.5	Κινολινικά ανάλογα χαλκονών : δομή και βιολογική δράση	31

Κεφάλαιο 3°

Σχεδιασμός, σύνθεση και ταυτοποίηση των νέων ενώσεων

3.1	Σχεδιασμός των νέων παραγώγων	34
3.2	Βελτιστοποίηση συνθηκών αντίδρασης αλδολικής συμπύκνωσης	36
3.3	Σύνθεση και χαρακτηρισμός των νέων μορίων	37
	3.3.1 Σύνθεση 3-υποκατεστημένων-4-υδροξυ-2-κινολινονών	37
	3.3.2 Σύνθεση υβριδικών μορίων κινολινονο-χαλκονών	39
3.4	Δομικές τροποποιήσεις	40
	3.4.1 Αλκυλιωμένες κινολινονο-χαλκόνες	40
	3.4.2 Πυραζολινικά ανάλογα	41
	3.4.3 Διϋδρο-χαλκόνες	43
3.5	Φασματοσκοπική Μελέτη	45
3.6	Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού Μίας Διάστασης	45
3.7	Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού Δύο Διαστάσεων	49
	3.7.1 Στρατηγική ταυτοποίησης της 4-υδροξυ-3-[3-(4-καρβοξυλφαινυλο)-1-οξο-2-προπεν-1-υλο]- 2(1H)-κινολινόνης	13

Κεφάλαιο 4°

Αποτελέσματα και Συζήτηση

4.1	Βιοδοκιμασίες	55
4.2	Αντιπαρασιτική Δράση έναντι της Σπλαχνικής Λεισμανίασης	55
4.3	Αντιπαρασιτική Δράση έναντι της Αφρικανικής Τρυπανοσωμίας	59

4.4	Συμπεράσματα	62
	Κεφάλαιο 5^ο	
	Πειραματικό Μέρος	
5.1	Συνθετική Πορεία των νέων ενώσεων	65
5.2	Μέθοδοι βιοδοκιμασιών	78
	5.2.1 Αντιπαρασιτική Δράση έναντι της Σπλαχνικής Λεισμανίασης	78
	5.2.1.1 Υλικά και μέθοδοι	78
	5.2.1.2 Μελέτη τοξικότητας κινολινονο-χαλκονών THP1 σε διαφοροποιημένα μακροφάγα	79
	5.2.1.3 Αναστολή ανάπτυξης	79
	5.2.2 Αντιπαρασιτική Δράση έναντι της Αφρικανικής Τρυπανοσωμίας	80
	5.2.2.1 Υλικά και μέθοδοι	80
	5.2.2.2 Μελέτη τοξικότητας κινολινονο-χαλκονών THP1 σε διαφοροποιημένα μακροφάγα	80
	Βιβλιογραφία	81

Κεφάλαιο 1^ο

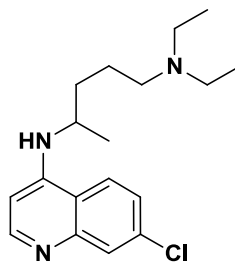
Παρασιτικές Ασθένειες και Φαρμακευτική Προσέγγιση

1.1 Πρωτοζωικές νόσοι

Ο σχεδιασμός νέων φαρμάκων τις τελευταίες δεκαετίες έχει σημειώσει μια αξιόλογη ανάπτυξη στον τομέα της φαρμακευτικής χημείας. Η έρευνα όμως για τη θεραπεία πολλών πρωτοζωικών ασθενειών που ενδημούν κυρίως στις φτωχότερες οικονομικά χώρες δεν είναι εξίσου αναπτυγμένη. Η πλειοψηφία των παρασιτικών ασθενειών κυριαρχούν στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές πλήττοντας δυσανάλογα τους φτωχούς και περιθωριοποιημένους πληθυσμούς της Αφρικής, της Ασίας, της κεντρικής και της νότιας Αμερικής. Ο υποσιτισμός, η έλλειψη υγιεινολογικής περίθαλψης καθώς και συνθηκών υγιεινής, σε συνδυασμό με διάφορους κοινωνικο – οικονομικούς παράγοντες ευθύνονται για την επιδείνωση της δημόσιας υγείας των πλέον ευαίσθητων πληθυσμών του πλανήτη.

Ο στόχος επομένως για την εξασφάλιση της υγείας αποτελεί μείζονα πρόκληση στον τομέα της ανάπτυξης νέων θεραπειών σε διεθνές επίπεδο. Τα υπάρχοντα όμως φαρμακευτικά σκευάσματα για την αντιμετώπιση αυτών των ασθενειών είναι είτε ασύμφορα οικονομικά, είτε ιδιαίτερα τοξικά, είτε αναποτελεσματικά. Αναγνωρίζοντας αυτά τα μειονεκτήματα, θεωρείται αναγκαία η προσπάθεια να επικεντρωθεί το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας στη βελτίωση της ποιότητας ζωής και της υγείας των ανθρώπων που πάσχουν από παραμελημένες μολυσματικές ασθένειες, μέσω εναλλακτικών μοντέλων ανάπτυξης φαρμάκων για τη θεραπεία νοσημάτων που θεωρούνται πλέον παρελθόν στη δυτική ιατρική.

Αναμφισβήτητα, ένας μεγάλος αριθμός παρασιτικών ασθενειών, πολλές από τις οποίες θα μπορούσαν να προληφθούν ή να αντιμετωπιστούν αποτελεσματικά, εκφράζεται με υψηλά ποσοστά νοσηρότητας και θνησιμότητας παγκοσμίως εδώ και δεκαετίες. Μια από τις σημαντικότερες πρωτοζωικές νόσους θεωρείται η ελονοσία (μαλάρια) καθώς πλήττει πληθυσμούς σε περισσότερες από εκατό χώρες μολύνοντας 300 – 500 εκατομμύρια άτομα ετησίως^{1,2}. Η πλειοψηφία των λοιμώξεων αυτών συναντάται στην υποσαχάρια Αφρική και η μη αποτελεσματική αντιμετώπιση της νόσου προκαλεί επιπλοκές στο κεντρικό νευρικό σύστημα (εγκεφαλική ελονοσία) οδηγώντας κάθε χρόνο στο θάνατο περισσότερους από ένα εκατομμύριο ασθενείς. Η νόσος προκαλείται από το πρωτόζωο του γένους *Plasmodium* ενώ μεταδίδεται από τα θηλυκά κουνούπια του είδους *Anopheles*. Θεραπευτικά η ελονοσία, μέχρι σήμερα, αντιμετωπίζεται με τη χορήγηση χλωροκίνης (chloroquine), ένα ανάλογο της 4-αμινοκινολίνης (4-aminoquinoline), με μειωμένη πλέον αποτελεσματικότητα λόγω ανάπτυξης ανθεκτικών στελεχών (Σχήμα 1).



Σχήμα 1. Χλωροκίνη

Η τοξοπλάσμωση είναι μια ακόμα σημαντική παρασιτική ασθένεια η οποία προκαλείται από το πρωτόζωο του γένους *Toxoplasma gondii* το οποίο εντοπίζεται ενδοκυτταρικά³. Η μετάδοση της ασθένειας στον άνθρωπο γίνεται μέσω οικόσιτων ζώων ενώ η θεραπευτική αγωγή της πραγματοποιείται συνήθως με συνδυασμούς φαρμάκων, χωρίς όμως να επιτυγχάνονται πάντα τα επιθυμητά αποτελέσματα.

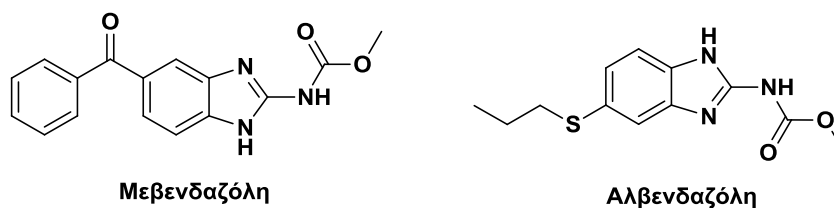
Άλλες πρωτοζωικές νόσοι είναι η αμοιβάδωση, η λαμβλίαση, η τριχομονάδωση και η σχιστοσωμίαση, με την τρυπανοσωμίαση και τη λεϊσμανίαση να κατέχουν τις πρώτες θέσεις στις παρασιτικές ασθένειες που απειλούν άμεσα τις αναπτυσσόμενες χώρες.

1.2 Αντιπαρασιτικά Φάρμακα

Οι πρωτοζωικές ασθένειες είναι σχεδόν άγνωστες στον ανεπτυγμένο κόσμο, με αποτέλεσμα οι προσπάθειες εύρεσης κατάλληλων θεραπειών να φαίνονται ασήμαντες κυρίως λόγω της έλλειψης ενδιαφέροντος της διεθνούς κοινότητας για αυτές τις ξεχασμένες ασθένειες. Οι υπάρχουσες θεραπευτικές μέθοδοι που ακολουθούνται στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, αντιμετωπίζουν αποτελεσματικά ένα μικρό μόνο ποσοστό των λοιμώξεων, εξαιτίας της τοξικότητάς τους ή της ανάπτυξης ανθεκτικότητας.

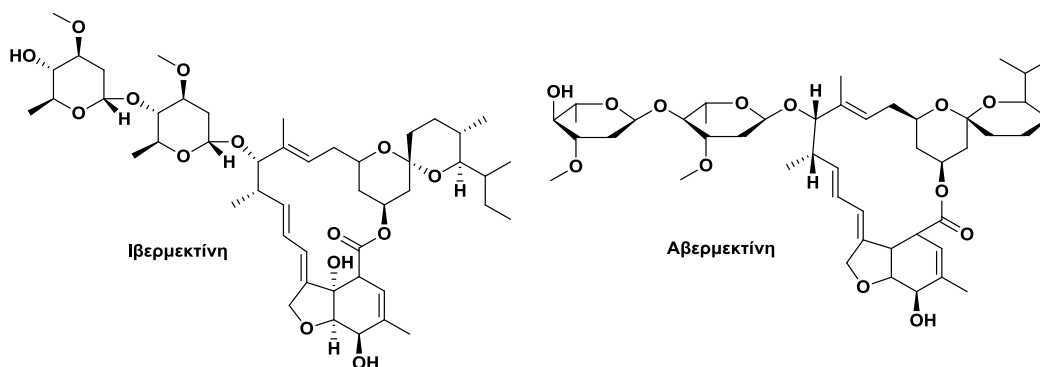
Σήμερα, τα αντιπαρασιτικά φάρμακα έχουν κατηγοριοποιηθεί με βάση τα είδη των παρασίτων στα οποία δρουν⁴.

I. Τα ανθελμινθικά φάρμακα (anthelmintic) δρουν έναντι σκωληκόμορφων ασπόνδυλων παρασιτικών ζώων (roundworms, flatworms), με κυριότερους εκπροσώπους τους τις βενζιμιδαζόλες (benzimidazoles) και τις μακροκυκλικές λακτόνες (macrocyclic lactones). Η μεβενδαζόλη (mebendazole) και η αλβενδαζόλη (albendazole) χρησιμοποιούνται ως θεραπεία πρώτης εκλογής στην κατηγορία των βενζιμιδαζολών, με κύριο μηχανισμό δράσης την αναστολή του πολυμερισμού της τουμπουλίνης των μικροσωληνίσκων του κυτταρικού σκελετού του παρασίτου (Σχήμα 2).



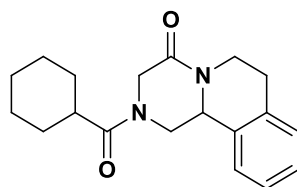
Σχήμα 2. Βενζιμιδαζόλες

Η ιβερμεκτίνη (ivermectin) είναι συνθετικό ανάλογο της αβερμεκτίνης (avermectin), μια φυσική μακροκυκλική λακτόνη απομονωμένη από το βακτήριο *Streptomyces avermitilis*. Η δράση της στοχεύει στην απορύθμιση των διαύλων ιόντων χλωρίου των κυτταρικών μεμβρανών του σκώληκα, παρεμποδίζοντας τελικά τη φυσιολογική νευρομυϊκή λειτουργία του (Σχήμα 3).



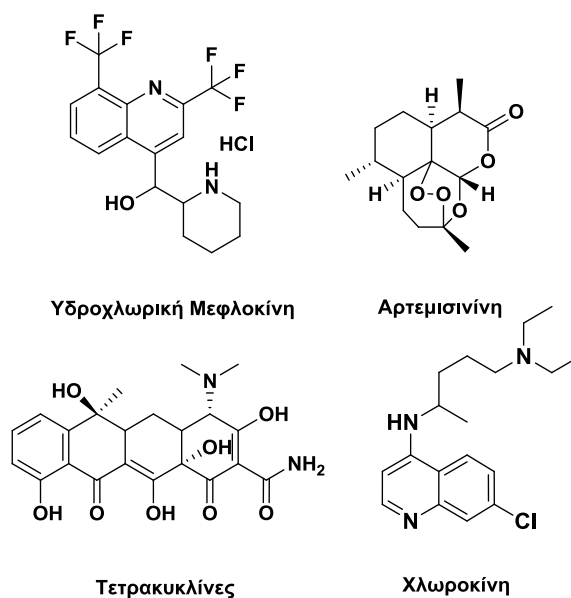
Σχήμα 3. Μακροκυκλικές Λακτόνες

Η πραζικουαντέλη (praziquantel) είναι ένα επιπλέον ανθελμινθικό φάρμακο ενάντια της σχιστοσωμίας, με χαμηλή κυτταροτοξικότητα και με ευρύ φάσμα δράσης καλύπτοντας τα περισσότερα είδη σχιστοσωμάτων (Σχήμα 4).



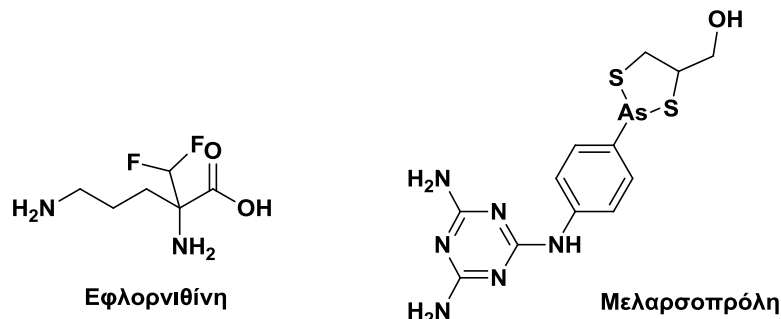
Σχήμα 4. Πραζικουαντέλη

II. Τα ανθελονοσιακά φάρμακα (antimalarials) δρουν εναντίων τεσσάρων ειδών του παρασίτου *Plasmodium* για την αποτελεσματική θεραπεία της μαλάριας. Η χλωροκίνη (chloroquine), η υδροχλωρική μεφλοκίνη (mefloquine) η οποία ενδείκνυται σε περιπτώσεις ανθεκτικών στελεχών στη χλωροκίνη, η αρτεμισινίνη (artemisinin) και οι τετρακυκλίνες (tetracycline) είναι τα ευρέως χρησιμοποιούμενα φάρμακα για την αντιμετώπιση της ασθένειας (Σχήμα 5).



Σχήμα 5. Ανθελονοσιακά φάρμακα

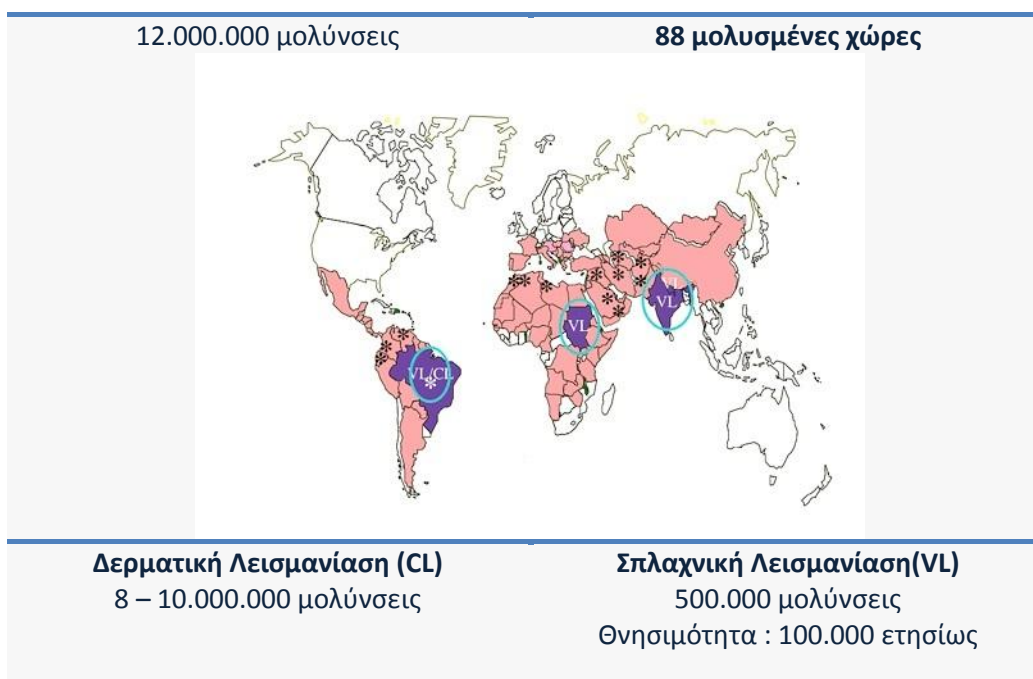
III. Μια επιπλέον κατηγορία φαρμάκων είναι αυτά τα οποία δρουν ενάντια της τρυπανοσωμίας, της λεισμανίασης, της πνευμονοκύστωσης και άλλων παρασιτικών ασθενειών. Οι κυριότεροι εκπρόσωποι αυτής της κατηγορίας είναι η πενταμιδίνη (pentamidine), η σουραμίνη (suramin), η μελασοπρόλη (melarsoprol), η αμφοτερικίνη (amphotericin), η εφλορνιθίνη (eflornithine) και η αμινοσιδίνη (aminosidine) (Σχήμα 6).



Σχήμα 6. Αντιπρωτοζωικά φάρμακα

1.3 Λεισμανίαση

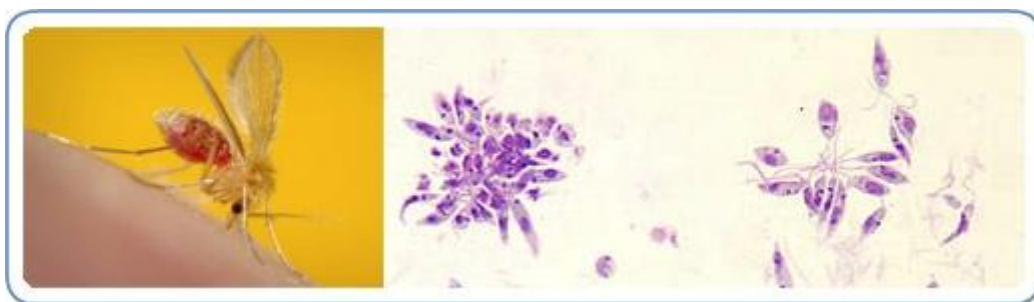
Η λεισμανίαση είναι μια από τις σημαντικότερες πρωτοζωικές ασθένειες με υψηλή θνησιμότητα και ευρεία γεωγραφική κατανομή σε συνολικά 88 χώρες εκ των οποίων οι 16 ανήκουν στον αναπτυσσόμενο κόσμο. Η ασθένεια θεωρείται ενδημική κυρίως στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές του κόσμου (Μεξικό, Μέση Ανατολή, Αφρική), ενώ παράλληλα είναι η μοναδική τροπική ασθένεια με ενδημικό χαρακτήρα επί σειρά ετών και στη νότια Ευρώπη⁵. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), από το 1998 έως το 2005 έχουν αναφερθεί στην Ελλάδα 291 κρούσματα σπλαχνικής και 20 κρούσματα δερματικής λεισμανίασης, ενώ εκτιμάται ότι περίπου 350 εκατομμύρια άνθρωποι στον κόσμο, ζουν καθημερινά υπό το ρίσκο μιας πιθανής μόλυνσης από λεισμανίαση με έναν ετήσιο απολογισμό περίπου 2 εκατομμυρίων νέων μολύνσεων⁶⁻⁹ (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Η Λεισμανίαση Παγκοσμίως

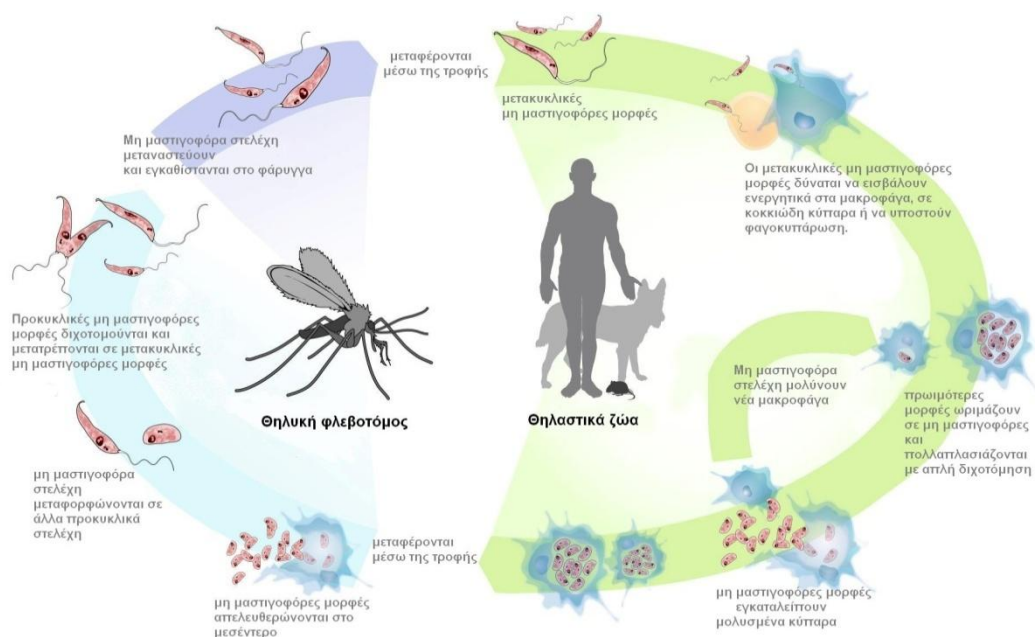
Η ευρύτερη γεωγραφική κατανομή της ασθένειας τη σημερινή εποχή συγκριτικά με το παρελθόν απασχολεί σε σημαντικό βαθμό το παγκόσμιο επιστημονικό ενδιαφέρον, καθώς δικαιολογημένα η λεισμανίαση θεωρείται ως ένα αυξανόμενο πρόβλημα υγείας και μια σημαντική απειλή για πολλές περιοχές. Περιστατικά καταγράφονται πλέον και σε περιοχές που δεν ήταν προηγουμένως ενδημικές, όπως ο δυτικός Νείλος και το νότιο Σουδάν. Η αναμφισβήτητη αύξηση του αριθμού των μολύνσεων αποδίδεται κυρίως στη διαρκή αύξηση των μεμονωμένων παραγόντων επικινδυνότητας. Οι ανθρώπινες παρεμβάσεις στο περιβάλλον και οι κλιματολογικές αλλαγές, οι μαζικές πληθυσμιακές μετακινήσεις, η αποψίλωση, η αστικοποίηση και ο υποσιτισμός οδηγούν σε σημαντική επέκταση της μόλυνσης από τις φλεβοτόμους¹⁰⁻¹³.

Η λεισμανίαση, ως μια σημαντική μεταδοτική ασθένεια προκαλείται από το πρωτόζωο του γένους *Λεισμάνια* (*Leishmania*). Το παράσιτο αυτό προσβάλλει τα περισσότερα θηλαστικά (τρωκτικά, κύνες, μαρσιποφόρα, πρωτεύοντα) συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου και μεταδίδεται από το δήγμα συγκεκριμένων ειδών της φλεβοτόμου (σκνίπας) που ζει κυρίως σε ελώδεις και δασικές περιοχές, σε υποτροπικά και τροπικά κλίματα (Εικόνα 2). Σπανίως, η λεισμανίαση μεταδίδεται από μια έγκυο γυναίκα κάθετα στο έμβρυο, ενώ μπορεί να μολυνθεί μεταγγιζόμενος ασθενής από νοσούντα αιμοδότη.



Εικόνα 2. α) Φλεβοτόμος, β) Πρωτόζωο του γένους *Λεισμάνια*

Ο κύκλος ζωής των παρασίτων της *Leishmania* περιλαμβάνει δύο στάδια και απαιτεί την ύπαρξη δύο ξενιστών στους οποίους μεταφέρεται μέσω δύο διαφορετικών εξελικτικών μορφών. Στο πρώτο εξωκυτταρικό στάδιο στον ασπόνδυλο ξενιστή (φλεβοτόμος), το παράσιτο βρίσκεται υπό τη μαστιγοφόρο μορφή (promastigotes) ενώ στο δεύτερο ενδοκυτταρικό στάδιο στον σπονδυλωτό ξενιστή (θηλαστικό) βρίσκεται υπό τη μη μαστιγοφόρο μορφή (amastigotes)¹⁴. Ο βιολογικός τους κύκλος ξεκινάει όταν από το δήγμα μιας μολυσμένης θηλυκής φλεβοτόμου μεταφερθεί η εξωκυτταρική μαστιγοφόρα μορφή του παρασίτου στο θηλαστικό. Αμέσως μετά τη μόλυνση, το παράσιτο μέσω της διαδικασίας της φαγοκυττάρωσης από τα μακροφάγα του σπονδυλωτού ξενιστή, μετατρέπεται στη μη μαστιγοφόρα, ενδοκυτταρική μορφή του, όπου μπορεί πλέον να πολλαπλασιαστεί μέσω της φυσιολογικής κυτταρικής διαίρεσης των μακροφάγων του ξενιστή και να συνεχιστεί η μόλυνση (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Ο κύκλος ζωής του παρασίτου της *Leishmania*

Περισσότερα από είκοσι διαφορετικά είδη του γένους *Leishmania* είναι γνωστά ως παθογόνα παράσιτα για τους ανθρώπους και όλα μεταδίδονται από τις φλεβοτόμους του είδους *Lutzomyia* στην Αμερική και του είδους *Phlebotomus* στον υπόλοιπο κόσμο (Ευρώπη, Ασία, Αφρική)^{15,16}. Το παράσιτο της λεισμανίασης εμπλέκεται σε διαφορετικές παθολογίες ανάλογα με το είδος του και την ανοσολογική απάντηση του ξενιστή, ταξινομώντας έτσι τη λεισμανίαση σε τρεις κλινικές μορφές.

Κύριοι τύποι λεισμανίασης:

- **Η δερματική (cutaneous) λεισμανίαση**
- **Η σπλαγχνική (visceral) λεισμανίαση**
- **Η βλεννογοδερματική (mucocutaneous) λεισμανίαση** η οποία προκαλεί αλλοιώσεις του δέρματος, που στη συνέχεια επεκτείνονται βαθύτερα, προκαλώντας μεγάλης έκτασης καταστροφή του ιστού γύρω από το στόμα και τη μύτη, παρόμοια με της λέπρας. Η πλειοψηφία των περιπτώσεων της λεισμανίασης των βλεννογόνων απαντάται σε χώρες όπως στη Βραζιλία, στη Βολιβία και στο Περού.

1.3.1 Δερματική Λεισμανίαση (Cutaneous Leishmaniasis CL)

Η δερματική λεισμανίαση είναι η πιο συνήθης μορφή της ασθένειας με περίπου 1,5 εκατομμύρια νέα κρούσματα ετησίως, προκαλώντας κυρίως επιδερμικές βλάβες οι οποίες μπορούν να είναι μία ή περισσότερες, επώδυνες ή ανώδυνες. Το 90% των περιπτώσεων εμφανίζεται σε χώρες όπως η Συρία, η Σαουδική Αραβία, το Ιράν, η Βραζιλία, το Περού και το Αφγανιστάν. Προκαλείται από δύο κυρίως είδη παρασίτων της οικογένειας *Leishmania* : το παράσιτο *Leishmania Tropica* το οποίο προκαλεί κοκκιώματα και το παράσιτο

Leishmania Braziliensis το οποίο προκαλεί έλκη κατά κανόνα στα εκτεθειμένα μέρη του σώματος, όπως στο πρόσωπο, στα χέρια και στα πόδια. Τα δερματικά αυτά έλκη ποικίλλουν σε αριθμό, πολλές φορές συμβάλλοντας σημαντικά στην δυσλειτουργικότητα του ασθενή, ενώ συχνά αυτοϊάται. Ακόμα και μετά τη θεραπεία των ελκών, τα μόνιμα σημάδια είναι εμφανή αφήνοντας ουλές και συνήθως είναι η αιτία σοβαρής κοινωνικής προκατάληψης.

Το πρώτο σημάδι της μόλυνσης είναι μια μικρή ερυθματώδης κηλίδα (erythema) ή οζίδιο που τυπικά σχηματίζει ένα ρηχό έλκος με υπερυψωμένο όχθο, το οποίο εμφανίζεται ένα έως δύο μήνες μετά τη νύξη του μολυσμένου εντόμου, στο σημείο εισόδου του παρασίτου. Το οζίδιο τις επόμενες εβδομάδες μεγαλώνει και παράλληλα εξελκείται. Γύρω από την αρχική βλάβη μπορεί να παρουσιαστούν κι άλλες μικρότερες που σχετικά γρήγορα και εύκολα αποδράμουν. Το ερύθημα στη συνέχεια αναπτύσσεται ως μια βλατίδα (papule) και έπειτα σε έναν κόνδυλο. Ο κόνδυλος μετά από μια περίοδο από δύο εβδομάδες μέχρι έξι μήνες γίνεται ένα ανοιχτό τραύμα με χαρακτηριστική κλινική εικόνα για τη δερματική λεισμανίαση¹⁷ (Εικόνα 4). Συχνά συνυπάρχει λεμφαδενική συμμετοχή τοπικά, συνηθέστερα κάτω από τη μασχάλη στην περίπτωση που οι βλάβες εντοπίζονται στο χέρι ή στο βραχίονα.



Εικόνα 4. Κλινική εικόνα Δερματικής Λεισμανίασης

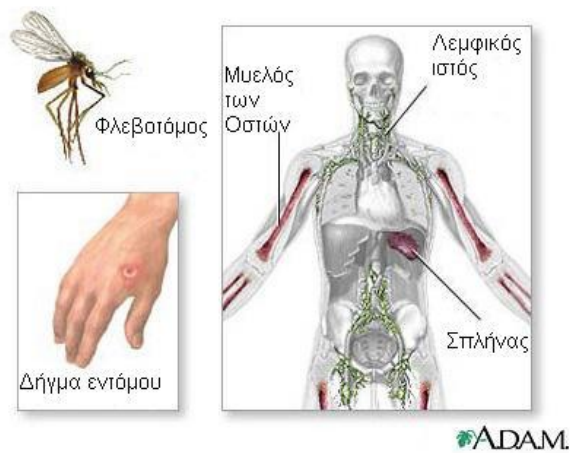
Η διάγνωση της ασθένειας μπορεί να γίνει με ορολογικές εξετάσεις, με ειδικές αιματολογικές εξετάσεις (για την ανεύρεση των αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου σε παρασκευάσματα μυελού των οστών ή αίματος), με καλλιέργεια αίματος (για την ανεύρεση των προμαστιγωτών μορφών), με άλλες μοριακές τεχνικές (για την ανεύρεση του παρασίτου στο αίμα ή σε δείγματα δερματικής βλάβης) ή με ιστοπαθολογικές εξετάσεις (βιοψία ιστού).

1.3.2 Καλα – Αζάρ – Σπλαχνική Λεισμανίαση (Visceral Leishmaniasis VL)

Η σπλαχνική λεισμανίαση, επίσης γνωστή και ως Καλα – Αζάρ (το οποίο στη νεοϊνδική διάλεκτο σημαίνει «μαύρος πυρετός»), είναι η σοβαρότερη μορφή της νόσου με 500.000 νέα κρούσματα ετησίως έχοντας σοβαρότερες συνέπειες στη δημόσια υγεία συγκριτικά με την δερματική λεισμανίαση. Προκαλείται από το παράσιτο *Leishmania Donovanii* (στην Ανατολική Αφρική και στην Ινδία) και το *Leishmania Infantum* (στην Ευρώπη, στη Λατινική Αμερική και στη Βόρεια Αφρική) και προσβάλλει όλες τις ηλικίες, αλλά με μεγαλύτερη επίπτωση τα παιδιά της προσχολικής ηλικίας. Πάνω από το 90% των περιστατικών

σπλαχνικής λειψμανιάσης καταγράφονται σε χώρες όπως το Μπαγκλαντές, η Βραζιλία, η Ινδία, το Νεπάλ και το Σουδάν¹⁸ όπου στερούνται επαρκή υγειονομική περίθαλψη και οι ασθενείς έχουν μειωμένη πρόσβαση σε φαρμακευτική περίθαλψη, ενώ εκτιμάται ότι περίπου 59.000 άνθρωποι πέθαναν από την σπλαχνική λειψμανιάση το 2001¹⁹. Στις μεσογειακές χώρες υπολογίζεται ότι περίπου 1000 άνθρωποι προσβάλλονται ετησίως, με μεγαλύτερη συχνότητα τα παιδιά, τους ανοσοκατασταλμένους και τους ανοσοανεπαρκείς^{20,21}. Ένας επιπλέον σημαντικός παράγοντας επικινδυνότητας για την εκδήλωση της σπλαχνικής λειψμανιάσης είναι ο υποσιτισμός. Στη Βραζιλία, παιδιά που υποφέρουν από υποσιτισμό έχουν εννέα φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να νοσήσουν από τη σπλαχνική λειψμανιάση²².

Αυτή η μορφή της νόσου προσβάλλει συστηματικά τον άνθρωπο. Ξεκινά με καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος δεδομένου ότι το παράσιτο προκαλεί μείωση του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Σπλαχνική λειψμανιάση

Οι ασθενείς της σπλαχνικής λειψμανιάσης παρουσιάζουν τα συμπτώματα και τα σημάδια μιας επίμονης και συστηματικής μόλυνσης, όπως παρατεταμένο πυρετό, κόπωση, αδυναμία, ανορεξία και απώλεια βάρους και καθώς η ασθένεια προχωρεί επέρχεται αναιμία, λεμφαδενοπάθεια, λευκοπενία, θρομβοκυτταροπενία και ήπατο – σπληνομεγαλία, έντονο και ιδιαίτερα χαρακτηριστικό σύμπτωμα της νόσου (Εικόνα 6). Αυτά τα συμπτώματα εμφανίζονται σταδιακά και για μια περίοδο μερικών εβδομάδων ή ακόμα και μηνών. Εάν δεν χορηγηθεί αγωγή, η σπλαχνική λειψμανιάση είναι θανατηφόρα σχεδόν στο 100 % των περιπτώσεων, μέσα σε ένα έως τέσσερις μήνες.



Εικόνα 6. Ήπατο – σπληνομεγαλία σπλαχνικής λειψμανιάσης

Συχνά, μετά από την ανάρρωση, οι ασθενείς μπορούν να αναπτύξουν μια χρόνια δερματική μορφή αποκαλούμενη ως μετα – καλα – αζάρ δερματική λεισμανίαση η οποία εμφανίζεται συνήθως μέσα σε δύο έτη μετά από την θεραπεία της σπλαχνικής λεισμανίασης²³.

Σήμερα, η αύξηση των περιπτώσεων της σπλαχνικής λεισμανίασης παγκοσμίως συνδέεται ευρέως και με την εξάπλωση του ιού HIV εξαιτίας της πανδημίας του AIDS. Στο παρελθόν έχουν καταγραφεί περιπτώσεις σπλαχνικής λεισμανίασης στις οποίες τα άτομα που νόσησαν, μέσω κάποιου πιθανού αυτοάνοσου μηχανισμού, απέκτησαν μια μορφή ανοσίας σε κάποια δεύτερη πιθανή μόλυνση από το παράσιτο. Στην περίπτωση όμως όπου το ανοσοποιητικό τους σύστημα κατασταλεί ως αποτέλεσμα κάποιας αντινεοπλασματικής θεραπείας ή άλλων λοιμώξεων όπως του HIV, η σπλαχνική λεισμανίαση επανεμφανίζεται. Στην περιοχή της Μεσογείου άτομα ακόμα και χωρίς καταγεγραμμένο ιστορικό σπλαχνικής λεισμανίασης νόσησαν από την ασθένεια ύστερα από την μόλυνσή τους από τον ιό του HIV. Η καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος λόγω του HIV είναι ένας από τους κύριους παράγοντες για την αυξανόμενη ευαισθησία στην αρχική μόλυνση της λεισμανίας ή στην επανεμφάνισή της. Ως ένας εντεινόμενος κίνδυνος θεωρείται η ταυτόχρονη μόλυνση από λεισμανίαση και HIV η οποία έχει αναφερθεί σε 35 από τις 88 χώρες στις οποίες η λεισμανίαση είναι ενδημική, ενώ υπάρχει μια αυξανόμενη ανησυχία στη Βραζιλία, στην ανατολική Αφρική και στην Ινδία, όπου και οι δύο ασθένειες κυριαρχούν^{24,25}. Επειδή και οι δύο ασθένειες πλήττουν το ανοσοποιητικό σύστημα, το σώμα έχει ακόμη λιγότερες πιθανότητες να αντισταθεί στις μολύνσεις και η θεραπεία καθίσταται ακόμη λιγότερο αποτελεσματική. Στην Αιθιοπία, το 20% των ασθενών με σπλαχνική λεισμανίαση φαίνεται ότι πάσχει επίσης από HIV. Στη νότια Ευρώπη, το 25 – 70 % των ενήλικων περιπτώσεων σπλαχνικής λεισμανίασης συνδέεται με τη μόλυνση του HIV, και το 1.5 – 9.5 % των περιπτώσεων του AIDS υποφέρουν από νεοφερμένες ή επαναενεργοποιημένες μορφές της νόσου.

1.3.3 Χημειοθεραπεία της Λεισμανίασης

Αναμφισβήτητα η λεισμανίαση είναι μια σημαντική απειλή για ολόκληρο τον κόσμο και μια από τις πιο παραμελημένες ασθένειες στις αναπτυσσόμενες χώρες.

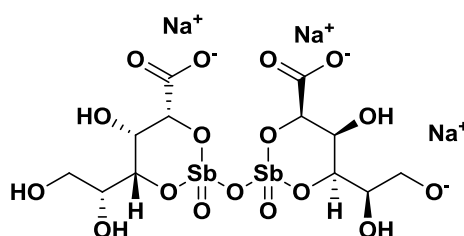
Η θεραπεία της λεισμανίασης περιλαμβάνει φαρμακευτική αγωγή, η οποία χορηγείται ενδοφλέβια ή ενδομυϊκά, η οποία όμως εμποδίζεται από την ακαταλληλότητα και τις υψηλές τιμές των υπαρχόντων φαρμάκων, καθώς και από την αργή πρόοδο στην έρευνα και στην ανάπτυξη νέων αγωγών.

i. Πεντασθενή παράγωγα του Αντιμονίου Στιβογλυκονικό Νάτριο και Αντιμονιούχος Μεγλουμίνη

Ιστορικά, η χημειοθεραπεία της λεισμανίασης έχει βασιστεί στη χρήση τοξικών βαρέων μετάλλων, όπως οι ενώσεις αντιμονίου. Η ευρέως χρησιμοποιούμενη θεραπεία για τη σπλαχνική αλλά και τη δερματική λεισμανίαση αναπτύχθηκε τη δεκαετία του 1930 με παράγωγα του πεντασθενούς αντιμονίου (pentavalent antimonials) τα οποία εμποδίζουν επιλεκτικά τα ένζυμα του παρασίτου που απαιτούνται για την οξειδωση των λιπαρών οξέων. Το στιβογλυκονικό νάτριο και η αντιμονιούχος μεγλουμίνη είναι φάρμακα πρώτης

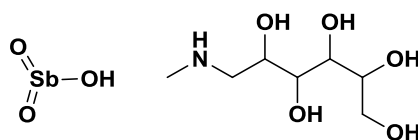
γραμμής αυτής της κατηγορίας με αξιόλογα αποτελέσματα αλλά και σοβαρές παρενέργειες²⁶.

Κύριος εκπρόσωπος αυτής της κατηγορίας φαρμάκων είναι το **Στιβογλυκονικό Νάτριο** – sodium stibogluconate SSG (Pentostam), το οποίο λαμβάνεται υπό τη μορφή ενδομυϊκής ένεσης επί τριάντα ή περισσότερες ημέρες. Το Pentostam είναι αποτελεσματικό ακόμη και σήμερα στις περισσότερες περιπτώσεις και μπορεί να αποδώσει υψηλά ποσοστά ίασης. Ωστόσο, η ανθεκτικότητα στο φάρμακο συνιστά ένα σημαντικό πρόβλημα – κυρίως στην Ινδία, όπου το 65% των ασθενών έχει αναπτύξει ανθεκτικότητα²⁷. Το Pentostam έχει άγνωστο μηχανισμό δράσης, μεταβολίζεται μερικώς, χορηγείται αποκλειστικά παρεντερικά με αποτέλεσμα την απαίτηση νοσοκομειακής περίθαλψης λόγω της μεγάλης σε διάρκεια αγωγής. Η θεραπεία είναι οδυνηρή και προκαλεί τοξικές αντιδράσεις σε κάποιους ασθενείς. Επιπλέον παρενέργειες είναι η εμφάνιση πυρετού, ο πονοκέφαλος, η αρθραλγία και η αιμολυτική αναιμία.



Στιβογλυκονικό Νάτριο

Η **Αντιμονιούχος Μεγλουμίνη** (meglumine antimoniate) (Glucantime) είναι ένα ακόμα φάρμακο αυτής της κατηγορίας και χορηγείται ενδομυϊκά. Είναι μια επίπονη και ακριβή θεραπεία που πολλές φορές μπορεί να δώσει μια λανθασμένη εντύπωση εικονικής αποτελεσματικότητας με συνέπεια η μικρής χρονικής περιόδου θεραπεία να οδηγήσει σε υποτροπή της ασθένειας με παράλληλο κίνδυνο ανάπτυξης ανθεκτικότητας.

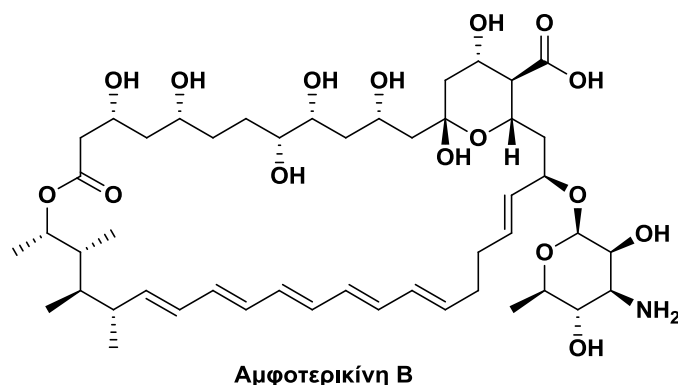


Αντιμονιούχος Μεγλουμίνη

ii. Πολυενικά Αντιμυκητιακά Φάρμακα Λιπιδική και Αντιμυκητιακή Αμφότερικίνη Β

Ο μηχανισμός δράσης των πολυενικών αντιμυκητιακών φαρμάκων είναι να δρουν ως οξέα ή βάσεις, να συνδέονται με τις στερόλες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης με τελικό αποτέλεσμα το θάνατο των μυκήτων από τη λύση αυτής.

Στις αναπτυγμένες χώρες χρησιμοποιούνται φάρμακα δεύτερης γραμμής όπως τα παράγωγα της Αμφότερικίνης Β (Aphoterigin Β), ως πολύ ισχυρά και αποτελεσματικά φάρμακα ενάντια στη λεισμάνια, κυρίως σε περιπτώσεις που ανέπτυξαν ανθεκτικότητα στην αντιμονιούχο μεγλουμίνη. Δυστυχώς η χρήση τους περιορίζεται λόγω του υψηλού κόστους τους.

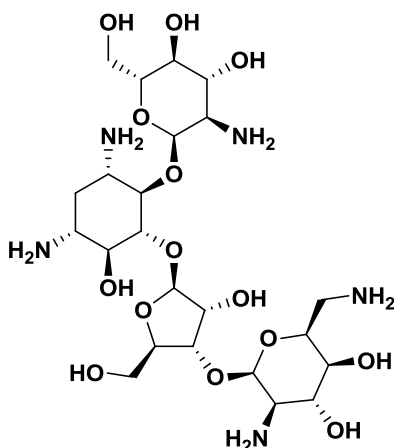


Η **Αντιμυκητιακή Αμφοτερικίνη Β** απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1953 ως ένα ισχυρό αντιμυκητιακό φάρμακο σε συστηματικές μυκητιάσεις. Χορηγείται μόνο παρεντερικά (ενδοφλεβίως) με άμεσες ανεπιθύμητες ενέργειες, που εμφανίζονται κατά ή λίγο μετά την έγχυση όπως πυρετός, ρίγη, ανορεξία, ναυτία, έμετοι, κεφαλαλγία, σπανιότερα υπόταση, ερύθημα, αρρυθμία κ.ά. Μετά την έγχυση, μπορούν να εμφανιστούν τοπικά συμπτώματα (θρομβοφλεβίτις) αλλά και νεφροτοξικότητα, νεφροσωληναριακή οξέωση, βλάβη νεφρικής συμπύκνωσης, υποκαλιαιμία και απώλεια καλίου από τους νεφρούς και άλλες ηλεκτρολυτικές διαταραχές. Η τοξικότητα αποδίδεται μερικώς σε ισχαιμία λόγω αγγειοσύσπασης. Συνδέεται με τη χοληστερόλη των κυτταρικών μεμβρανών με αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας των ιόντων K^+ προς το εξωτερικό των σωληναρίων και την απέκκριση των ιόντων K^+ , γεγονός που οδηγεί σε μεταβολική οξέωση και υποκαλιαιμία. Τέλος ευθύνεται για αιματολογικές διαταραχές όπως αναιμία, θρομβοπενία, ηωσινοφιλία και ακοκκιοκυτταραιμία.

Η Αμφοτερικίνη Β είναι επιπλέον διαθέσιμη ως σύμπλοκο θειικής χοληστερόλης (cholesteryl sulfate complex) και ως σύμπλοκο λιπιδίων για μείωση της τοξικότητας και παράταση της θεραπείας με αμφοτερικίνη. Η **Λιπιδική Αμφοτερικίνη Β** (Lipid Amphotericin B) (Ambisome) εγκρίθηκε το 1997 από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) για τη θεραπεία της λείσμανίασης. Αναπτύχθηκε αρχικά για την καταπολέμηση διαφόρων μυκητιάσεων και αποδείχτηκε ως το πιο αποτελεσματικό διαθέσιμο φάρμακο κατά της λείσμανίασης. Το ποσοστό ίασης που αποδίδει είναι πολύ υψηλό, το φάρμακο επιδρά γρήγορα (σε λίγες ημέρες) και είναι πολύ ασφαλές²⁷. Το Ambisome χρησιμοποιείται αυτή τη στιγμή για βαριά περιστατικά ή υποτροπιάζοντες ασθενείς και χορηγείται ενδοφλεβίως, γεγονός που καθιστά την αγωγή πιο δύσκολη. Εκτός αυτού, το φάρμακο είναι πολύ ακριβό - φτάνει τα 3.000 δολάρια για μία αγωγή. Η λιπιδιακή αυτή μορφή της Αμφοτερικίνης Β πλεονεκτεί σε σχέση με την κοινή Αμφοτερικίνη Β παρουσιάζοντας μειωμένη νεφροτοξικότητα, μειωμένες αντιδράσεις σχετιζόμενες με την έγχυση (πυρετός και ρίγος) με σημαντικό μειονέκτημα το αυξημένο κόστος νοσηλείας.

iii. Αμινογλυκοσιδικά αντιβιοτικά

Η Αμινοσιδίνη, Aminocyclitol (Paromomycin) είναι ένα αμινογλυκοσιδικό (aminoglycoside) αντιβιοτικό ευρέως φάσματος και έχει αποδειχθεί επίσης αποτελεσματικό κατά της λείσμανίασης²⁸. Αναστέλλει την έναρξη και την επιμήκυνση της πρωτεϊνικής σύνθεσης ενώ δείχνει να αποδίδει καλά σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα, όπως με το Στιβογλυκονικό Νάτριο.

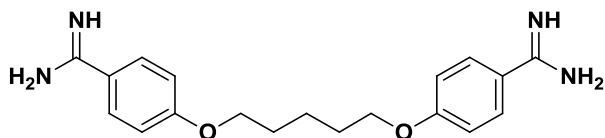


Αμινοσιδίνη

Η θεραπεία με Αμινοσιδίνη μπορεί να γίνει είτε με την εφαρμογή της δραστικής ουσίας τοπικά (αλοιφή) είτε ενέσιμα (σε συνδυασμό με το Στιβογλυκονικό Νάτριο).

iv. Πενταμιδίνη – Pentamidine

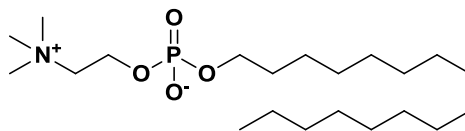
Η πενταμιδίνη χρησιμοποιείται εναλλακτικά του Στιβογλυκονικού Νατρίου κυρίως για τη θεραπεία της σπλαχνικής λεισμανίασης με άγνωστο μηχανισμό δράσης. Χορηγείται ενδοφλεβίως και αποβάλλεται αργά από τα ούρα. Δεν διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (blood brain barrier) και έχει διάφορους πιθανούς μηχανισμούς δράσης.



Πενταμιδίνη

v. Αλκυλοφωσφοχολίνες

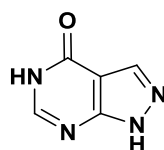
Οι Αλκυλοφωσφοχολίνες (alkylphosphocholines) είναι μια κατηγορία φαρμάκων με δραστικότητα έναντι μερικών παρασίτων όπως στην περίπτωση της Λεισμανίας. Η Μιλτεφοσίνη (miltefosine) είναι ένα ανάλογο αλκυλοφωσφοχολίνης και ένα πολλά υποσχόμενο φάρμακο, που αναπτύχθηκε αρχικά ως αντικαρκινική αγωγή. Η χορήγησή της γίνεται από το στόμα και αποδείχθηκε αποτελεσματική εναντίον στην σπλαχνική λεισμανίαση αρχικά στην Ινδία²⁹. Με δεδομένο ότι οι περισσότερες φαρμακευτικές ουσίες χορηγούνται παρεντερικά η προοπτική χρήσης της Μιλτεφοσίνης από το στόμα είναι ιδιαίτερα ελκυστική καθώς την καθιστά εύκολη στη χρήση της παρόλο το υψηλό κόστος της. Η διάρκεια αγωγής με το φάρμακο είναι μεγάλη (28 ημέρες) και επειδή το φάρμακο αποδομείται πολύ αργά, υπάρχει μεγάλος κίνδυνος ανάπτυξης ανθεκτικότητας εάν δε χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με άλλα. Επιφέρει σημαντικές παρενέργειες στο γαστρεντερικό σύστημα όπως έμετος και διάρροια ενώ αντενδείκνυται σε περιπτώσεις κυοφορίας καθώς ευθύνεται για τερατογενέσεις.



Μιλτεφοσίνη

vi. Αλλοπουρινόλη

Η Αλλοπουρινόλη (Allopurinol) είναι μια βενζιμιδαζόλη και αναφέρεται ότι σε συνδυασμό με παράγωγα του αντιμονίου έχει ικανοποιητικά αποτελέσματα για τη θεραπεία της χρόνιας δερματικής λεϊσμανίασης³⁰.



Αλλοπουρινόλη

Συμπερασματικά, η ανάγκη εύρεσης εναλλακτικών θεραπειών είναι επιτακτική δεδομένου ότι τα προβλήματα με τις υπάρχουσες θεραπευτικές αγωγές για τη λεϊσμανίαση είναι σημαντικά. Οι υφιστάμενες θεραπείες είναι αρκετά τοξικές για τον ανθρώπινο οργανισμό, δαπανηρές ενώ παράλληλα λόγω της παρεντερικής κυρίως χορήγησης τους και τις επαναλαμβανόμενες εγχύσεις, απαιτούν εξειλιγμένες εργαστηριακές μονάδες και εκπαιδευμένους ειδικούς. Πρέπει επομένως να αναπτυχθούν εναλλακτικές θεραπείες οι οποίες να είναι και αποτελεσματικές και εύχρηστες κάτω από δύσκολες συνθήκες. Πρόσθετες αγωγές με χρήση συνδυασμού φαρμάκων, θα μπορούσαν να μειώσουν τη διάρκεια της αγωγής και τις πιθανότητες ανάπτυξης ανθεκτικότητας.

Επιπλέον ο έλεγχος της λεϊσμανίασης παραμένει ένα άλυτο θέμα το οποίο δυσκολεύει τη θεραπεία της ασθένειας. Δεδομένου ότι δεν υπάρχει κανένα διαθέσιμο εμβόλιο εναντίον της ασθένειας, τα μέτρα ελέγχου εξαρτώνται από την εκάστοτε προσωπική προστασία από τις φλεβοτόμους. Η λεϊσμανίαση έχει ταξινομηθεί στην πρώτη κατηγορία των ανεξέλεγκτων ασθενειών από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας και για το λόγο αυτό η έγκυρη ανάπτυξη ενός αποδοτικού εμβολίου θα μπορούσε να υπερνικήσει τα υπάρχοντα προβλήματα. Είναι γεγονός ότι η κλινική έρευνα και ανάπτυξη νέων φαρμάκων για τη λεϊσμανίαση υποχρηματοδοτείται και είναι οδυνηρά αργή. Ο αυξανόμενος όμως αριθμός των περιπτώσεων με συν – μόλυνση HIV/VL, ιδιαίτερα στην Αιθιοπία, αντιπροσωπεύει μια άλλη σημαντική πρόκληση για την ανάπτυξη νέων ασφαλών και προσιτών θεραπειών.

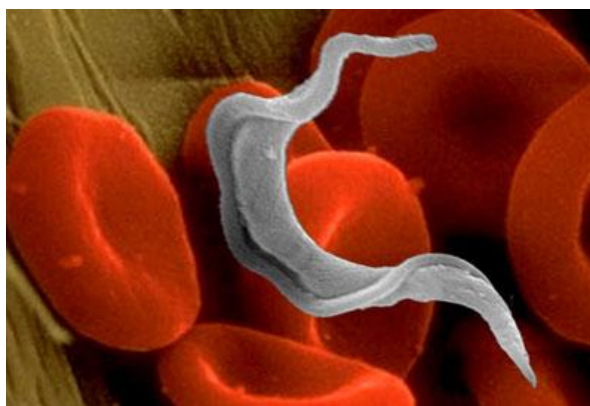
1.4 Τρυπανοσωμίαση

Η Τρυπανοσωμίαση είναι μια σοβαρή παρασιτική ασθένεια μεταδιδόμενη από έντομα που προκαλείται από το πρωτόζωο του γένους *Τρυπανόσωμα*. Υπάρχουν δύο μορφές της ασθένειας : η νόσος Τσάγκακ (Chagas disease) ή αλλιώς Αμερικάνικη Τρυπανοσωμίαση η οποία προκαλείται από το *Trypanosoma cruzi* και η Αφρικανική Τρυπανοσωμίαση ή αλλιώς ασθένεια του ύπνου που προκαλείται από το *Trypanosoma brucei gambiense* ή το *Trypanosoma brucei rhodesiense*.

1.4.1 Αμερικάνικη Τρυπανοσωμίαση - Ασθένεια Τσάγκας (Chagas disease)

Η Αμερικανική Τρυπανοσωμίαση ή ασθένεια Τσάγκας είναι μια μορφή τρυπανοσωμίας που οφείλεται στον παθογόνο παράγοντα της μαστιγοφόρου μορφής του *Trypanosoma cruzi* (Εικόνα 7). Η νόσος συναντάται κυρίως στην Νότια Αμερική και σύμφωνα με επίσημα στοιχεία εκτιμάται ότι περίπου 18 εκατομμύρια άνθρωποι είναι φορείς της ασθένειας, περίπου 100 εκατομμύρια άνθρωποι κινδυνεύουν να μολυνθούν σε συνολικά 21 χώρες της κεντρικής και νότιας αμερικανικής ηπείρου ενώ τελικά είναι υπεύθυνη για περίπου 21.000 θανάτους ετησίως κυρίως στη Λατινική Αμερική³¹.

Η ασθένεια Τσάγκας μεταδίδεται στους ανθρώπους μέσω των περιττωμάτων μολυσμένων εντόμων που εναποτίθενται στο ανθρώπινο δέρμα και τα οποία στη συνέχεια μπορεί να εισέλθουν στην πληγή που έχει δημιουργηθεί από το δήγμα, στα μάτια ή στο στόμα.

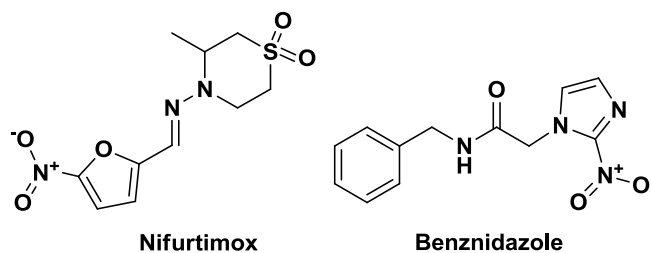


Εικόνα 7. *Trypanosoma cruzi*

Ο ανθρώπινος οργανισμός μπορεί να είναι φορέας του παρασίτου για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς να νοσήσει ακόμα και για δεκαετίες, χωρίς να γνωρίζει καν ότι έχει μολυνθεί. Η πρώτη φάση της ασθένειας είναι οξεία ενώ συνήθως το 1/3 των μολύνσεων την εκδηλώνουν σε διάστημα 10 με 20 χρόνια μετά τη μόλυνση. Η οξεία φάση διαρκεί περίπου δύο μήνες με συμπτώματα όπως πυρετός, διόγκωση των λεμφαδένων, του ήπατος και της σπλήνας.

Η θεραπεία της χρόνιας μορφής της νόσου είναι πολύ δύσκολη λόγω του ότι τα περισσότερα συμπτώματα δεν είναι πάντοτε εμφανή και συνήθως είναι μη αναστρέψιμα. Σταδιακά η κατάσταση των ασθενών χειροτερεύει και μπορεί να βρουν αιφνίδιο θάνατο από καρδιακή ανακοπή.

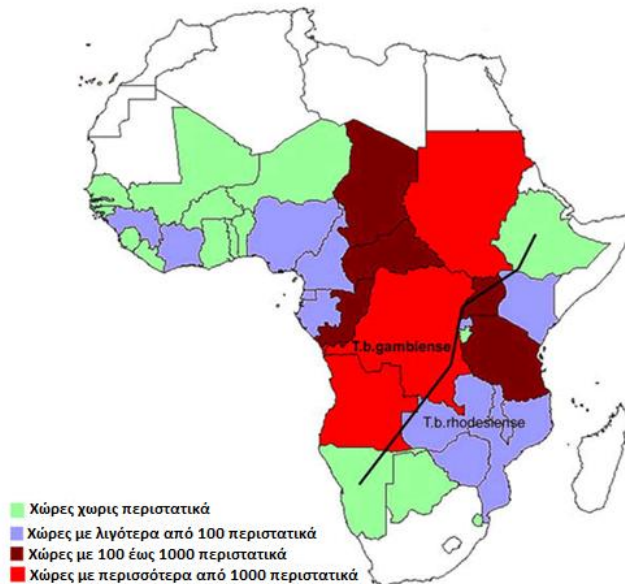
Σήμερα υπάρχουν μόνο δύο φάρμακα που χορηγούνται για τη θεραπεία της νόσου του Τσάγκας, το Nifurtimox και το Benznidazole^{32,33}.



Τα δυο αυτά φάρμακα έχουν μικρή αποτελεσματικότητα στη χρόνια μορφή της ασθένειας και δεν θεωρούνται ιδανικά καθώς μπορεί να δημιουργήσουν ανθεκτικότητα, έχουν πολλές παρενέργειες, σημαντικές διακυμάνσεις στην αποτελεσματικότητα εξαιτίας φυσικά ανθεκτικών στελεχών του τρυπανοσώματος *Cruzi*, ενώ η μεγάλης διάρκειας αγωγή (30 έως 60 ημέρες) απαιτεί εξειδικευμένη ιατρική επίβλεψη. Επιπλέον το υψηλό κόστος της θεραπείας την καθιστά ανέφικτη στην πλειοψηφία των χωρών που πλήττονται από τη νόσο με μοναδική ελπίδα τελικά να βοηθηθούν οι ασθενείς από την υπάρχουσα θεραπεία εξαιτίας της πιθανότητας να μην αναπτύξουν τη χρόνια μορφή της ασθένειας.

1.4.2 Αφρικανική Τρυπανοσωμίαση - Ασθένεια του Ύπνου (Human African Trypanosomiasis - HAT)

Η ασθένεια του Ύπνου είναι μια παρασιτική ασθένεια η οποία απειλεί περισσότερους από 60 εκατομμύρια ανθρώπους σε συνολικά 36 χώρες στην υποσαχάρια Αφρική. Σήμερα, η μετάδοση της ασθένειας πραγματοποιείται με εντατικούς ρυθμούς στην Ανγκόλα, στη Κεντροαφρικανική Δημοκρατία, στη λαϊκή Δημοκρατία του Κονγκό, στο Σουδάν, στην Ακτή Ελεφαντοστού, στη Γουινέα, στην Ουγκάντα, στο Μαλάουι, στην Τανζανία (Εικόνα 8). Οι περισσότεροι από τους πληγέντες πληθυσμούς ζουν σε απομονωμένες περιοχές με περιορισμένη πρόσβαση στις υγειονομικές υπηρεσίες, με αποτέλεσμα να παρακωλύεται η έγκυρη διάγνωση και επομένως η αποτελεσματική θεραπεία της νόσου³⁴.



Εικόνα 8. Η Ασθένεια του Ύπνου στην Αφρικανική ήπειρο

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), 300.000 κατ' εκτίμηση καινούργια περιστατικά καταγράφονται ετησίως στην Αφρική, με λιγότερες από 30.000 περιπτώσεις έγκαιρης διάγνωσης και αποτελεσματικής θεραπείας. Είναι γεγονός ότι η ασθένεια ελέγχθηκε ικανοποιητικά στη δεκαετία του 1960 αλλά επανέκαμψε με διαστάσεις επιδημίας στις απομονωμένες και ελώδεις περιοχές της υποσαχάριας Αφρικής εξαιτίας των

πολυετών συγκρούσεων, των μετακινήσεων πληθυσμών και της έλλειψης ανθρώπινων και οικονομικών πόρων.

Τα παράσιτα που προκαλούν την Αφρικανική Τρυπανοσωμίαση είναι πρωτόζωα που ανήκουν στο γένος *Trypanosoma brucei* (Εικόνα 9). Μεταδίδονται στους ανθρώπους από το δήγμα μόνο ορισμένων ειδών της μύγας *Tsetse* (γένος *Glossina*) η οποία απαντάται κυρίως στην υποσαχάρια Αφρική καθώς αναπαράγεται σε ζεστά και υγρά κλίματα. Ο άνθρωπος μπορεί να μολυνθεί και με έμμεσο τρόπο καθώς το παράσιτο μπορεί να διασχίσει τον πλακούντα και να μολυνθεί έτσι το έμβρυο από μια νοσούσα μητέρα. Η ασθένεια πλήττει κυρίως τους φτωχούς πληθυσμούς που ζουν στις απομακρυσμένες περιοχές της Αφρικανικής ηπείρου, όπου οι μύγες τσε τσε έρχονται σε επαφή με ανθρώπους, οικόσιτα και άγρια ζώα, λειτουργώντας ως φορείς του παράσιτου³⁵.



Εικόνα 9. *Trypanosoma brucei*

Αν και το παράσιτο που προκαλεί την Αφρικανική Τρυπανοσωμίαση προσδιορίστηκε περίπου το 1901, η ασθένεια του ύπνου θεωρείται ότι πρωτοεμφανίστηκε στην αφρικανική ήπειρο αιώνες πριν.

Μορφές της Αφρικανικής Τρυπανοσωμίαςης

Η Αφρικανική Τρυπανοσωμίαση συναντάται σε δύο βασικές μορφές, ανάλογα με το είδος του παρασίτου που την προκαλεί:

- Το ***Trypanosoma brucei gambiense*** εντοπίζεται κυρίως στην κεντρική και δυτική Αφρική. Αυτό το είδος τρυπανοσώματος ευθύνεται για πάνω από το 95% των περιπτώσεων της ασθένειας του ύπνου και προκαλεί χρόνια μόλυνση. Ένα άτομο μπορεί να μολυνθεί χωρίς να φέρει σημαντικά σημάδια ή συμπτώματα της ασθένειας για μια περίοδο μηνών ή ακόμα και χρόνων. Όταν όμως τα συμπτώματα εμφανιστούν, ο ασθενής βρίσκεται ήδη σε ένα προχωρημένο στάδιο της νόσου όπου το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) έχει ήδη επηρεαστεί.
- Το ***Trypanosoma brucei rhodesiense*** εντοπίζεται στην ανατολική και νότια Αφρική και ευθύνεται για περίπου το 5% των περιπτώσεων προκαλώντας μια οξεία

μόλυνση. Τα πρώτα σημάδια και τα συμπτώματα παρατηρούνται μερικές μήνες ή εβδομάδες μετά από τη μόλυνση, ενώ η ασθένεια εξελίσσεται γρήγορα προσβάλλοντας το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ).

Η Αφρικανική Τρυπανοσωμίαση είναι μια παρασιτική ασθένεια η οποία εκδηλώνεται σε δύο στάδια³⁶. Στο πρώτο στάδιο της εκδήλωσης της ασθένειας, γνωστό και ως αιμολυμφατικό (haemolympathic) στάδιο, η νόσος είναι δύσκολο να διαγνωστεί, αλλά σχετικά εύκολο να αντιμετωπιστεί. Το παράσιτο πολλαπλασιάζεται στους υποδόριους ιστούς, στο αίμα και στη λύμφη, με κυριότερα συμπτώματα τον πυρετό, τις κεφαλαλγίες και τον κνησμό. Ωστόσο, εάν δε δοθεί αγωγή, η δεύτερη φάση της νόσου, νευρολογική φάση, εξελίσσεται όταν το παράσιτο διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (ΑΕΦ) μολύνοντας το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ). Αυτό μπορεί να διαρκέσει από μερικούς μήνες μέχρι χρόνια μετά από την αρχική μόλυνση από το *T. b. gambiense* ή εντός μίας εβδομάδας για *T.b. rhodesiense*. Σε αυτό το σημείο ο ασθενής αναπτύσσει τα νευρολογικά και ψυχιατρικά συμπτώματα όπως σύγχυση, λήθαργο, αλλαγές στη συμπεριφορά και σπασμούς. Οφείλοντας το όνομά της σε ένα από τα πιο εντυπωσιακά της συμπτώματα, η Ασθένεια του Ύπνου χαρακτηρίζεται από αδυναμία ύπνου κατά τη διάρκεια της νύχτας, ενώ το άτομο καταβάλλεται από υπνηλία την ημέρα. Χωρίς αγωγή, η ασθένεια οδηγεί απαρέργκλιτα σε κώμα και τελικά, στο θάνατο.

Επομένως η διάγνωση της νόσου πρέπει να γίνει όσο το δυνατό νωρίτερα και πριν από τη νευρολογική φάση προκειμένου να αποφευχθούν οι περίπλοκες, δύσκολες και επικίνδυνες διαδικασίες της θεραπείας. Η διάγνωση της Ασθένειας του Ύπνου βασίζεται στον εντοπισμό των παρασίτων στο αίμα ή στους λεμφαδένες του ατόμου. Εάν η αρχική διάγνωση είναι θετική, ακολουθεί οσφυϊκή παρακέντηση στο δεύτερο στάδιό της. Αυτή η διαδικασία εφαρμόζεται επειδή τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση του δεύτερου σταδίου είναι τοξικά και μπορεί να έχουν θανάσιμες παρενέργειες, οπότε θα πρέπει να χορηγηθούν μόνο σε ανθρώπους που πραγματικά τα χρειάζονται. Οι τρέχουσες διαγνωστικές μέθοδοι είναι επιθετικές και δύσχρηστες σε φτωχές χώρες, καθώς για να έχει κανείς ακριβή αποτελέσματα απαιτείται εξειδικευμένο προσωπικό.

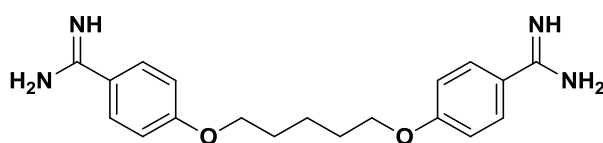
1.4.3 Χημειοθεραπεία της Αφρικανικής Τρυπανοσωμίαςης

Η ασθένεια του Ύπνου είναι γνωστή εξαιτίας της δυσκολίας αντιμετώπισής της. Οι διαθέσιμες θεραπείες της νόσου σήμερα, είναι λίγες και περιορισμένες λόγω της τοξικότητας, της πολυπλοκότητας της θεραπευτικής αγωγής και της αναποτελεσματικότητας σε διάφορες περιοχές. Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται σήμερα για τη θεραπεία της είναι παλιά, τοξικά και δύσχρηστα.

Ο τύπος της θεραπείας εξαρτάται από το στάδιο της ασθένειας. Όσο νωρίτερα διαγνωστεί η ασθένεια, τόσο αποτελεσματικότερη είναι η προοπτική μιας θεραπείας. Η αποτελεσματικότητα μιας θεραπείας σε ασθενείς που εκδήλωσαν το νευρολογικό στάδιο της νόσου, εξαρτάται από το φάρμακο που θα μπορεί να διασχίσει το αιματοεγκεφαλικό φραγμό για να φθάσει στο παράσιτο. Τέτοια φάρμακα όμως είναι τοξικά και περίπλοκα για να διαχειριστούν.

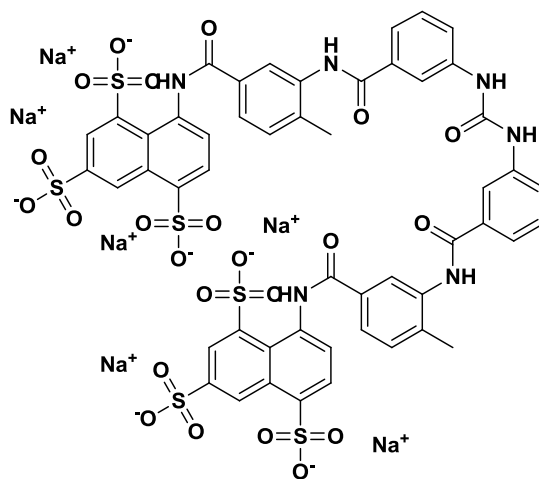
Αιμολυμφατικό Στάδιο

Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται στο αρχικό στάδιο της ασθένειας όπου το παράσιτο βρίσκεται ακόμα στο αίμα, είναι χαμηλότερης τοξικότητας και ευκολότερα να διαχειριστούν³⁷⁻³⁹. Για τη θεραπεία της νόσου σε αυτό το στάδιο χορηγούνται συνήθως δύο φάρμακα τα οποία αναπτύχθηκαν πριν από περισσότερο από μισό αιώνα. Η Πενταμιδίνη (Pentamidine), είναι μια διαμίνη η οποία πρωτοεμφανίστηκε το 1940, και χρησιμοποιείται εναντίον του *Trypanosoma brucei gambiense*. Δεν διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό με πιθανό μηχανισμό δράσης είτε την αναστολή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και τη βιοσύνθεση του DNA, του RNA, των πρωτεϊνών και των φωσφολιπιδίων, είτε την παρεμπόδιση της ενσωμάτωσης των νουκλεοτιδίων στο DNA και στο RNA.



Πενταμιδίνη

Η Σουραμίνη (Suramin), είναι μια σουλφονιλιωμένη ναφθυλαμίνη η οποία συντέθηκε αρχικά ως προϊόν της βιομηχανίας χρωστικών ουσιών το 1916³⁷⁻³⁹. Από τη δεκαετία του 1920 χρησιμοποιείται εναντίον του *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Δεν διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, έχει άγνωστο μηχανισμό δράσης με πιθανή επίδραση στις πρωτεΐνες του παρασίτου. Έχει σοβαρές παρενέργειες και μια θεραπευτική αγωγή με σουραμίνη απαιτεί περίπου πέντε εβδομάδες για να ολοκληρωθεί.

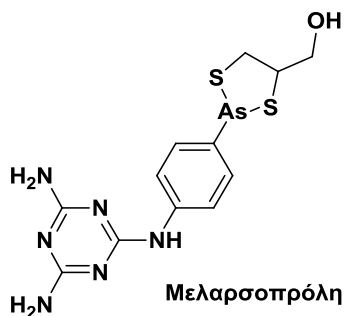


Σουραμίνη

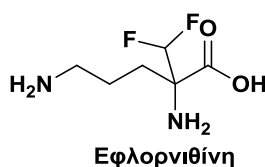
Νευρολογικό Στάδιο

Στην πλειοψηφία τους, οι άνθρωποι που έχουν μολυνθεί από τη νόσο, αναζητούν τη θεραπεία μόνο όταν η ασθένεια έχει προχωρήσει ήδη στο δεύτερο στάδιό της. Η πιο συνήθης αγωγή σε αυτήν τη φάση εναντίον και των δύο τύπων του παρασίτου είναι η Μελαρσοπρόλη (melarsoprol)³⁷⁻³⁹. Πρωτοεμφανίστηκε το 1949 και είναι παράγωγο του

αρσενικού. Είναι αρκετά τοξική (λιώνει τις πλαστικές σύριγγες), η ένεσή της προκαλεί μεγάλο πόνο και τελικά το φάρμακο έχει θανατηφόρα επίδραση στο 5% των ασθενών στους οποίους χορηγείται λόγω πρόκλησης εγκεφαλοπάθειας (encephalopathic syndrome). Επιπλέον, η μελασοπρόλη καθίσταται όλο και λιγότερο αποτελεσματική, καθώς σε κάποιες περιοχές που πλήττονται από τη νόσο, το φάρμακο αποτυγχάνει στη θεραπεία έως και στο 30% των ασθενών. Ο πιθανός μηχανισμός δράσης του φαρμάκου είναι η αναστολή του ενζύμου αναγωγή της τρυπανοθειόνης.



Μια ασφαλέστερη και πιο σύγχρονη εναλλακτική λύση από τη μελαρσοπρόλη είναι η εφλορνιθίνη (eflornithine) η οποία χρησιμοποιείται από το 1981³⁷⁻³⁹. Η δραστηριότητά της κατά της Ασθένειας του Ύπνου ανακαλύφθηκε τυχαία, καθώς πρόκειται για ένα φάρμακο που αναπτύχθηκε αρχικά για την αντιμετώπιση του καρκίνου. Η εφλορνιθίνη είναι δραστική μόνο εναντίον του παράσιτου *Trypanosoma brucei gambiense* και είναι ανάλογο της ορνιθίνης (ornithine) αναστέλλοντας το ένζυμο αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης (ornithine decarboxylase) το οποίο είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση των πολυαμινών. Παρόλου που το φάρμακο αυτό είναι πολύ λιγότερο τοξικό από τη μελαρσοπρόλη, έχει ένα πολύπλοκο σχήμα αγωγής που εμποδίζει την ευρεία χρήση του καθώς η χορήγησή του πραγματοποιείται με αργή ενστάλαξη που επαναλαμβάνεται κάθε 6 ώρες επί 14 ημέρες.



Πρόσφατα, από το 2009, το Nifurtimox, εκτός από τη χορήγησή του για την αντιμετώπιση της ασθένειας Τσάγκας, χρησιμοποιείται και για την περίθαλψη ασθενών στο δεύτερο στάδιο της Ασθένειας του Ύπνου, που δεν ανταποκρίνονταν σε άλλες αγωγές, σε συνδυασμό όμως με την εφλορνιθίνη, αλλά δυστυχώς δεν είναι αποτελεσματικό για το *Trypanosoma brucei rhodesiense*.

Αναμφισβήτητα, οι υπάρχουσες φαρμακευτικές αγωγές τόσο για την αντιμετώπιση της λεισμανίασης όσο και για την αντιμετώπιση της τρυπανοσωμίας, αφορούν φάρμακα με σημαντική κυτταροτοξικότητα και πολλές φορές ανθεκτικότητα στα παθογόνα παράσιτα. Εάν τελικά θέλουμε να περιθάλψουμε αποτελεσματικά τους ασθενείς και να ελέγξουμε αυτές τις παρασιτικές ασθένειες στο μέλλον, οι προσπάθειες πρόληψης, είναι ζωτικής σημασίας. Το μεγαλύτερο εμπόδιο στον αγώνα κατά των ασθενειών είναι η εξασφάλιση επαρκών πόρων για την έρευνα και την ανάπτυξη νέων φαρμάκων.

Κεφάλαιο 2^ο

Φυσικά Προϊόντα με Αντιπαρασιτική Δράση: Χαλκόνες και Κινολινόνες

2.1 Φυσικά Προϊόντα

Η φύση ως μια πλούσια πηγή φυσικών προϊόντων, έχει προκαλέσει το ζωηρό ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας εδώ και δεκαετίες, για το άνοιγμα νέων δρόμων στην παραγωγή φαρμάκων μέσω της έρευνας των φαρμακολογικών ιδιοτήτων των φυτών. Είναι ιστορικά αλλά και επιστημονικά επιβεβαιωμένο πως εδώ και αιώνες η ανθρωπότητα κατέφευγε στην παραδοσιακή ιατρική προκειμένου να αντιμετωπίσει προβλήματα υγείας, με ένα σημαντικό ποσοστό του παγκόσμιου πληθυσμού να εκμεταλλεύεται ακόμα και σήμερα τα οφέλη της.

Ως φυσικά προϊόντα αναφέρονται οι ενώσεις που παράγονται από φυτικούς ή ζωικούς οργανισμούς. Από άποψη δομής, καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα οργανικών ενώσεων και κατατάσσονται σε κατηγορίες με βάση ορισμένα δομικά χαρακτηριστικά τους (στεροειδή, αλκαλοειδή), τη φυσιολογική τους δράση (αντιβιοτικά, βιταμίνες, ορμόνες), την πηγή από την οποία προκύπτουν καθώς και τη βιοσυνθετική τους πορεία. Τα φυσικά προϊόντα συντίθενται από τη φύση με σκοπό να επιτελέσουν συγκεκριμένες διαδικασίες με επιλεκτικό αλλά και ιδιαίτερα αποτελεσματικό τρόπο, αποτελώντας σημαντικότερη πηγή για την εύρεση και ανάπτυξη νέων φαρμάκων.

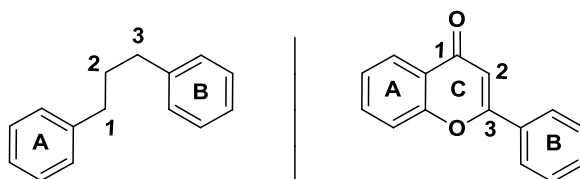
Κατά τη διάρκεια του 20^{ου} αιώνα ξεκίνησε ως πρώτο βήμα της έρευνας, η συστηματοποίηση της εμπειρικής γνώσης για τις φαρμακολογικές ιδιότητες των φυσικών ενώσεων με την εισαγωγή τεχνικών διαχωρισμού, καθαρισμού και ανάλυσης να καθιστά εφικτές αυτές τις μελέτες. Η αποτελεσματικότητα των φυτικών φαρμάκων τροφοδοτεί ακόμα και σήμερα το ενδιαφέρον των ερευνητών για τη σύνθεση νέων σκευασμάτων, πραγματοποιώντας σημαντική και εντατική έρευνα τις τελευταίες δεκαετίες στον τομέα αυτό.

Από τον συνολικό αριθμό των φυσικών προϊόντων που μελετώνται ετήσια και τα οποία επιδεικνύουν κάποια αξιοσημείωτη βιολογική δραστηριότητα, ένα ελάχιστο ποσοστό (περίπου το 5% του συνόλου του φυτικού βασιλείου) είναι αυτό που θα χρησιμοποιηθεί τελικά για φαρμακευτικούς σκοπούς. Η εξέλιξη επομένως της χημείας έχει δώσει μεγάλη ώθηση στην φαρμακολογική έρευνα, με την ανάπτυξη νέων συνθετικών μεθοδολογιών και τη βελτιστοποίηση των ήδη υπάρχουσών, καθιστώντας δυνατή τη σύνθεση ολοένα μεγαλύτερου αριθμού φαρμακευτικών προϊόντων.

2.2 Φλαβονοειδή (Flavonoids)

Τα φλαβονοειδή είναι μια κατηγορία πολυφαινολικών ενώσεων δευτερογενών φυτικών μεταβολιτών η οποία αριθμεί σήμερα περισσότερες από 9000 δομές. Ο όρος "flavone" προέρχεται από τη λατινική λέξη flavus που σημαίνει κίτρινο. Ο βασικός σκελετός των φλαβονοειδών αποτελείται από 15 άτομα άνθρακα σε μία διάταξη δύο αρωματικών δακτυλίων με έξι άτομα άνθρακα (δακτύλιοι A και B) που συνδέονται με μια γέφυρα 3

ατόμων άνθρακα ($C_6 - C_3 - C_6$). Η χημική δομή των φλαβονοειδών στηρίζεται στην ύπαρξη του φλαβανικού σκελετού, ο οποίος αποτελείται από τους δύο αρωματικούς δακτυλίους A και B με ένα ενδιάμεσο ετεροκυκλικό πυρανικό δακτύλιο (δακτύλιο C)⁴⁰. (Σχήμα 7)

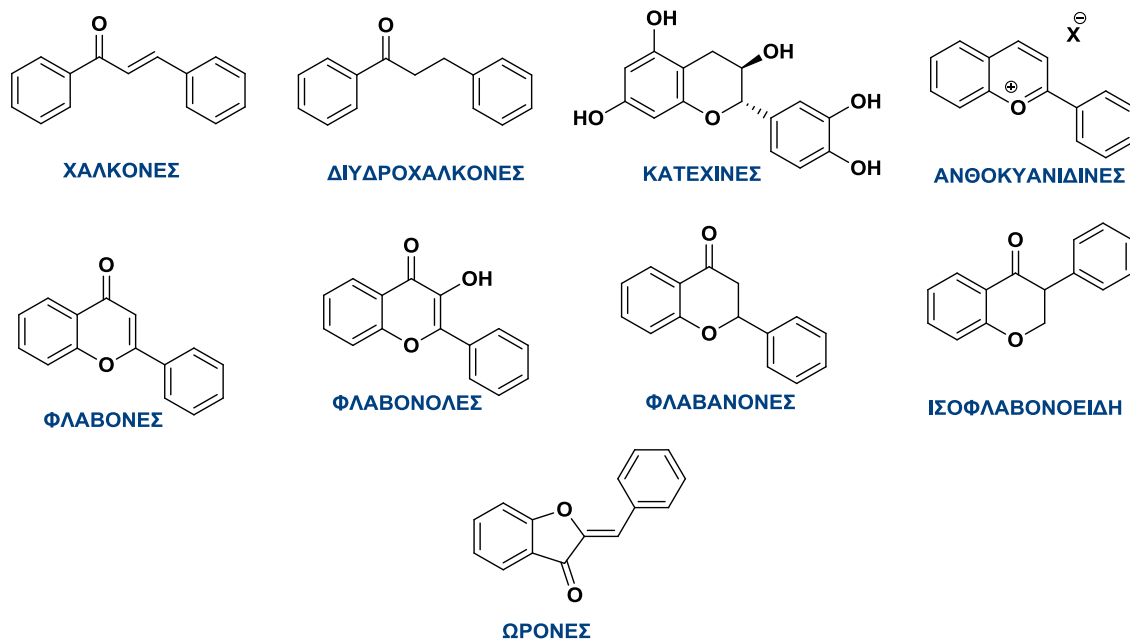


Σχήμα 7. Γενική δομή φλαβονοειδών

Τα περισσότερα φλαβονοειδή, απαντώνται υπό μορφή γλυκοζιτών και ανήκουν στις πολυφαινόλες. Περιέχονται σε πολλά φυτικά διατροφικά μέσα, ενώ πειραματικές και επιδημιολογικές μελέτες έχουν προτείνει γι'αυτά μια ποικιλία φαρμακολογικών ιδιοτήτων προσδίδοντας τους έτσι ένα προστατευτικό ρόλο για την ανθρώπινη υγεία.

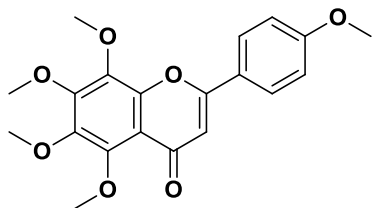
Τα φλαβονοειδή κατηγοριοποιούνται ανάλογα με το βαθμό οξείδωσης και τους υποκαταστάτες του χρωμανικού σκελετού στις ακόλουθες βασικές κατηγορίες (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Κυριότερες δομές φλαβονοειδών

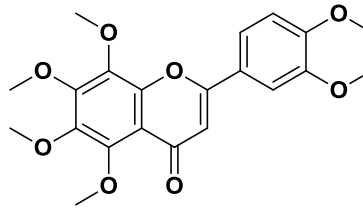


Διάφοροι ερευνητές μελετώντας τα φλαβονοειδή, έδειξαν ότι έχουν αντιφλεγμονώδη δράση, η οποία πιθανώς να οφείλεται στην αναστολή ενζυμικών συστημάτων που εμπλέκονται στο σχηματισμό και στην εξέλιξη της φλεγμονής⁴¹.

Επιπλέον, τα φλαβονοειδή που υπάρχουν στα εσπεριδοειδή, ιδίως τα πολυμεθυλιωμένα όπως η τανγκερετίνη (tangeretin) που περιέχεται στη φλούδα των κίτρων και η νοβιλετίνη (nobiletin) παρουσιάζουν έντονη ανασταλτική δράση στους καρκινικούς όγκους σε σχέση με τα υδροξυλιωμένα παράγωγα.

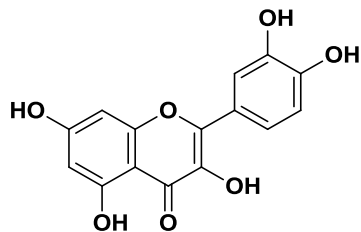


Τανγκερετίνη

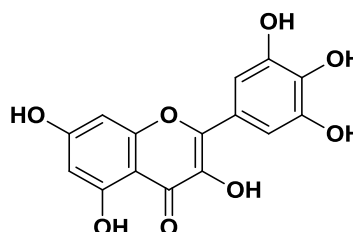


Νοβιλετίνη

Λόγω του αριθμού και της θέσης των ελευθέρων υδροξυλίων ως ισχυρότερα αντιοξειδωτικά θεωρούνται η κερκετίνη (quercetin), η μυρικετίνη (myricetin), η γκοσουπετίνη και η κερκεταγενίνη. Η κερκετίνη (ή βαλανοκετόνη), εντοπίζεται κυρίως στο κόκκινο κρασί και εμποδίζει την οξείδωση των πολυακορέστων λιπαρών οξέων προστατεύοντας παράλληλα τους χυμούς των εσπεριδοειδών από την οξείδωσή τους όπως στην περίπτωση της βιταμίνης C. Η κερκετίνη μπορεί να βοηθήσει στην πρόληψη καρδιακών παθήσεων και εγκεφαλικών επεισοδίων, διότι προστατεύει τα κύτταρα του ανθρώπινου σώματος από τις καταστροφικές συνέπειες των ελεύθερων ριζών.



Κερκετίνη

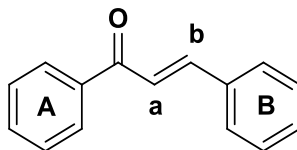


Μυρικετίνη

Η δράση οφείλεται πιθανόν στην αναστολή της σύνθεσης εικοσανοειδών. Οι επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν χαμηλό ποσοστό στεφανιαίας νόσου σε γαλλικές πόλεις, όπου οι κάτοικοι των περιοχών αυτών καταναλώνουν κόκκινο κρασί. Επίσης, τα φλαβονοειδή των εσπεριδοειδών ελαττώνουν τη συγκόλληση των αιμοπεταλίων και δρουν αντιθρομβωτικά. Ενδεικτικά, ο χυμός του λεμονιού μειώνει την χοληστερόλη και τα τριγλυκερίδια ενώ του πορτοκαλιού ανεβάζει την καλή χοληστερόλη (High – density lipoprotein – HDL).

2.3 Χαλκόνες (1,3-διφαινυλο-2-προπεν-1-όνες)

Οι χαλκόνες είναι α,β -ακόρεστες καρβονυλικές ενώσεις οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία μιας γέφυρας με τρία άτομα άνθρακα με ένα διπλό δεσμό (Σχήμα 8). Διαθέτουν συζυγιακούς διπλούς δεσμούς και ένα απεντοπισμένο π – ηλεκτρονιακό σύστημα στους δύο αρωματικούς δακτυλίους.

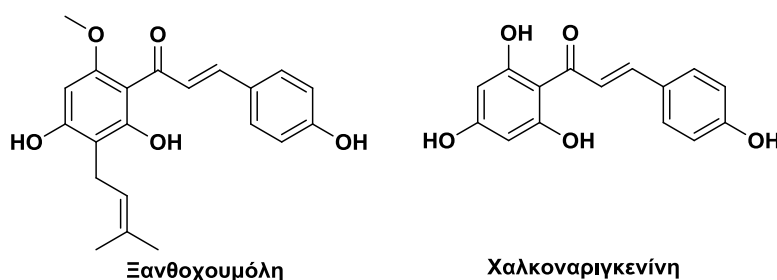


Σχήμα 8. Γενική δομή χαλκονών

Τα υδροξυλιωμένα παράγωγα της απλής χαλκόνης ως φαινολικές ενώσεις βρίσκονται σε αφθονία σε συνήθη λαχανικά (κουνουπίδια, κρεμμύδια, αντίδια) και φρούτα, (εσπεριδοειδή, κέρασια, σταφύλια, μήλα, μούρα), και σε ροφήματα από φυτά, όπως το τσάι, το κακάο και το κόκκινο κρασί κατέχοντας ένα ευρύ φάσμα βιολογικών ιδιοτήτων με σημαντικές φαρμακολογικές και ιατρικές εφαρμογές.

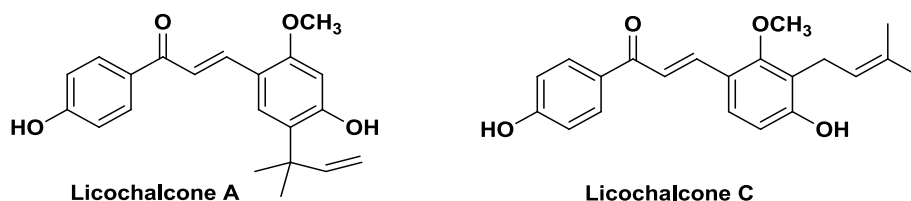
2.3.1 Βιολογική δράση φυσικών και συνθετικών χαλκόνων

Οι χαλκόνες αποτελούν τις πρόδρομες ενώσεις στη βιοσύνθεση των φλαβονοειδών με ποικίλες φαρμακολογικές ιδιότητες⁴². Η αντιοξειδωτική δράση των χαλκόνων είναι ευρείας βιολογικής σημασίας, όπως στην περίπτωση της ξανθοχουμόλης (xanthohumol), μιας πρενυλιωμένης χαλκόνης που αποτελεί συστατικό του λυκίσκου η οποία σχετίζεται με την προστασία της καρδιάς και των αιμοφόρων αγγείων και της χαλκοναρινγκενίνης, μιας πολυυδροξυλιωμένης χαλκόνης που απομονώνεται από την τομάτα⁴³⁻⁴⁵. Επιπλέον, παράγωγα χαλκόνων έχουν συντεθεί κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών προκειμένου να αναπτυχθούν νέα φάρμακα ενάντια στον καρκίνο⁴⁶⁻⁴⁹, στην ελονοσία⁵⁰⁻⁵², στην φυματίωση⁵³, στις καρδιαγγειακές παθήσεις⁵⁴, όπως επίσης και παράγωγα με αντιμικροβιακές^{55,56}, αντιαλλεργικές⁵⁷ και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες⁵⁸⁻⁶⁰ (Σχήμα 9).



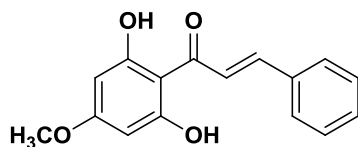
Σχήμα 9. Χαλκόνες με αντιοξειδωτική και αντικαρκινική δράση

Φυσικές αλλά και συνθετικές χαλκόνες έχουν μελετηθεί εκτενώς όσον αφορά στην αντιπαρασιτική τους δράση σε *in vivo* και *in vitro* δοκιμές⁶¹. Ενδεικτικά, οι licochalcones A και C, που απομονώνονται από τις ρίζες του φυτού γλυκύριζα, εμφανίζουν αξιόλογη αντιελισμανιακή δράση έναντι των παρασίτων *L. major* και *L. donovani*. Ιδιαίτερα η licochalcone A, η οποία έχει επίσης ανθελονοσιακή δράση καθώς είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική έναντι των ανθεκτικών στη χλωροκίνη (Dd2) αλλά και των ευαίσθητων στη χλωροκίνη (3D7) μορφών του παρασίτου *P. falciparum* είναι ένα από τα φυσικά προϊόντα που συνεχίζει να χρησιμοποιείται εκτενώς ως πρότυπη ένωση για αντιπαρασιτική έρευνα⁶²⁻⁶⁶ (Σχήμα 10).



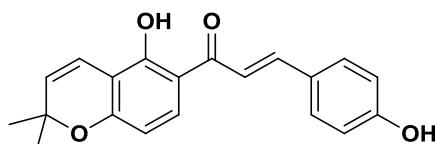
Σχήμα 10. Χαλκόνες με αντιπαρασιτική δράση

Η 2,6-διυδροξυ-4-μεθοξυ-χάλκονη είναι ένα επιπλέον συνθετικό παράγωγο με σημαντική αντιπαρασιτική δράση *in vitro* έναντι και των δύο μορφών του παρασίτου της λεισμανίασης (μαστιγοφόρου και μη μαστιγοφόρου).⁶⁷



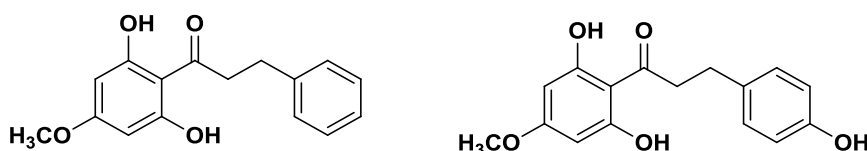
2,6-dihydroxy-4-methoxychalcone

Παράγωγα των χρωμενο – χαλκονών και των διυδροχαλκονών αναφέρονται επίσης στη βιβλιογραφία ως βιοδραστικά μόρια με αξιόλογη αντιπαρασιτική δράση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα χρωμενο – χαλκόνης αποτελεί η κροταραμοσμίνη (crotaramosmin) με σημαντική δράση έναντι του παρασίτου *L. donovani* τόσο για την εξωκυτταρική μαστιγοφόρο μορφή του παρασίτου όσο και για την ενδοκυτταρική μη μαστιγοφόρο του μορφή^{68, 69}.



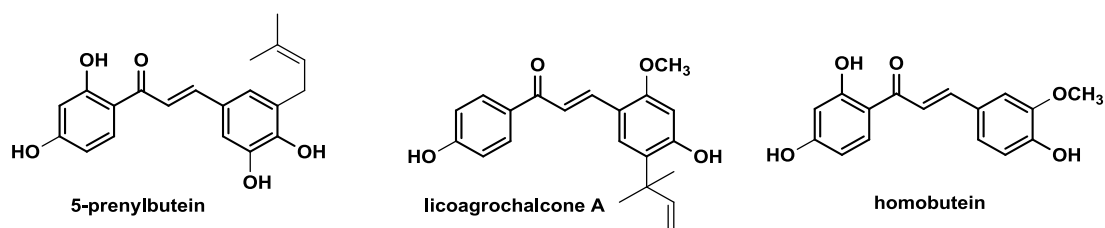
crotaramosmin

Δύο φυσικές διυδροχαλκόνες, που απομονώθηκαν από το φυτό *Piper elongatum*, όπως επίσης και συνθετικά ανάλογά τους εμφανίζουν επίσης ισχυρή αντιλεισμανιακή δράση *in vitro* έναντι της εξωκυτταρικής μορφής των προμαστιγωτών παρασίτων *L. braziliensis*⁷⁰ (Σχήμα 10).

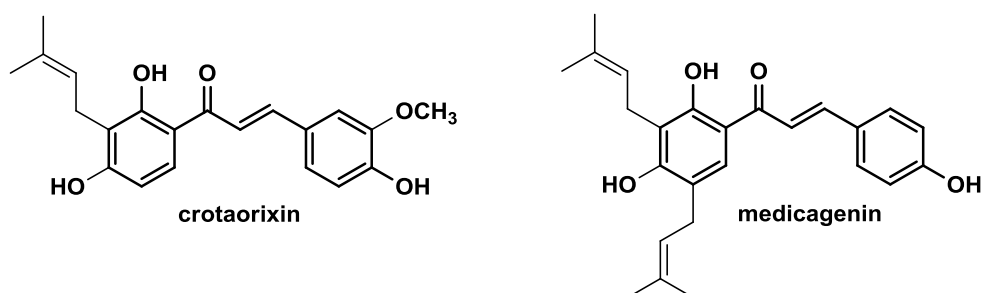


Σχήμα 10. Φυσικές διυδροχαλκόνες με αντιλεισμανιακή δράση

Ανθελονοσιακή δράση έναντι των ανθεκτικών στη χλωροκίνη (W2) και των ευαίσθητων στη χλωροκίνη (D6) μορφών του παρασίτου *P. falciparum* που ευθύνεται για το μεγαλύτερο αριθμό θανάτων από την ελονοσία, έχουν επίσης δείξει τα φυσικά προϊόντα 5-Prenylbutein, licoagochalcone A και homobutein⁷¹.

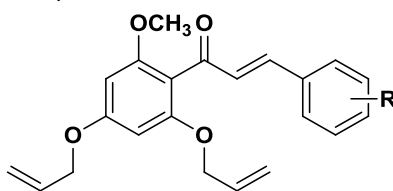


Οι πρενυλιωμένες χαλκόνες *crotaorixin* και *medicagenin*, οι οποίες απομονώθηκαν από το φυτό *Crotalaria orixensis* και από τις ρίζες του φυτού *Crotalaria medicagenia* αντίστοιχα, παρουσιάζουν 100% αναστολή του παρασίτου *P. falciparum* σε χαμηλές συγκεντρώσεις⁷².



Οι Aronte *et al.* συνέθεσαν και μελέτησαν την αντιλειτουργική δράση 43 πολύ – υποκατεστημένων χαλκονών. Τα αποτελέσματα οδήγησαν στον προσδιορισμό δύο ενώσεων με αξιόλογη δράση *in vivo* και *in vitro* έναντι της αμαστιγωτής μορφής του *L. amazonensis*⁷³.

Η ίδια ερευνητική ομάδα διερεύνησε τη δράση φυσικών και συνθετικών χαλκονών και διυδροχαλκονών έναντι του παρασίτου *Trypanosoma cruzi*. Οι 2',4'-διαλλυλοξυ-6'-μεθοξυ-χαλκόνες προσδιορίστηκαν ως ισχυροί αντιπαρασιτικοί παράγοντες, σε συγκεντρώσεις μικρότερες των 25μΜ⁷⁴ (Σχήμα 11).



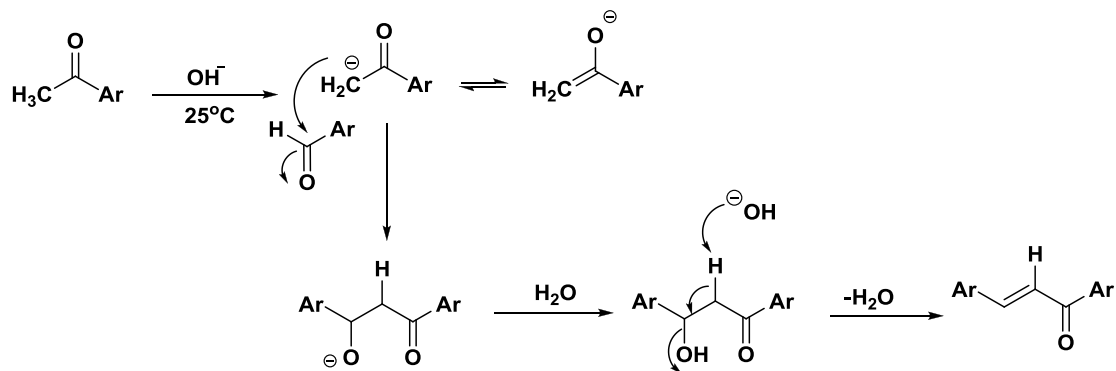
Σχήμα 11. 2',4'-διαλλυλοξυ-6'-μεθοξυ-χαλκόνες με αντιπαρασιτική δράση

2.3.2 Κυριότερες μέθοδοι σύνθεσης χαλκονών

Η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός νέων αναλόγων των χαλκονών αποτελούν ένα αναπτυσσόμενο πεδίο της φαρμακευτικής χημείας τα τελευταία χρόνια, δεδομένου κυρίως του ευρέος φάσματος της βιολογικής δραστηριότητάς τους.

Η κυριότερη μέθοδος σύνθεσης των χαλκονών γίνεται μέσω αντίδρασης μικτής αλδολικής συμπύκνωσης (Claisen – Schmidt condensation) ανάμεσα σε καρβονυλικές ενώσεις η οποία αναπτύχθηκε το 1881⁷⁵.

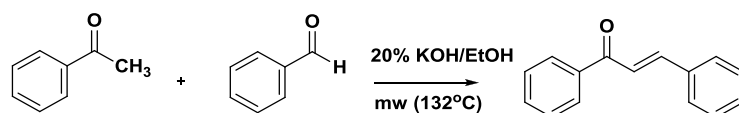
Η ύπαρξη α – υδρογόνων στις καρβονυλικές αυτές ενώσεις είναι αναγκαία, δεδομένου ότι ο ιδιαίτερα όξινος χαρακτήρας τους, επιτρέπει το σχηματισμό ενολικών μορφών είτε σε βασικό είτε σε όξινο περιβάλλον, και ακολούθως την πυρηνόφιλη προσθήκη του ενολικού ιόντος μιας αλδεΐδης ή μιας κετόνης, στην ηλεκτρονιόφιλη καρβονυλομάδα ενός άλλου μορίου. Η τελική πρωτονίωση με προσθήκη οξέος προκαλεί την απόσπαση ενός μορίου νερού με αποτέλεσμα να λαμβάνονται οι τελικές α,β-ακόρεστες χαλκόνες (Σχήμα 12).



Σχήμα 12. Αλδολική συμπύκνωση Claisen – Schmidt

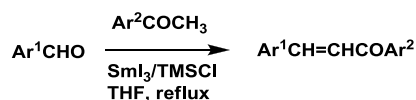
Η αλδολική συμπύκνωση, θεωρείται η πιο διαδεδομένη, κοινή μέθοδος για την σύνθεση χαλκονών σε ομογενή φάση, με συμβατική συνθετική πορεία. Απαιτεί ήπιες συνθήκες, χωρίς σχηματισμό παραπροϊόντων, ενώ η απομόνωση των τελικών προϊόντων πραγματοποιείται χωρίς επίπονους τρόπους καθαρισμού και σε υψηλές συνήθως αποδόσεις.

Παράλληλα, τα τελευταία χρόνια, νέες μη συμβατικές μέθοδοι σύνθεσης χαλκονών έχουν αναπτυχθεί χρησιμοποιώντας ακτινοβολία μικροκυμάτων (microwave irradiation) με εξίσου ικανοποιητικά αποτελέσματα (Σχήμα 13). Η χρήση των μικροκυμάτων εφαρμόζεται πλέον ευρέως στην οργανική σύνθεση και στη διαδικασία σχεδιασμού νέων φαρμάκων ως εναλλακτική λύση στις παραδοσιακές τεχνικές θέρμανσης. Η διαδικασία οδηγεί συχνά σε υψηλότερες αποδόσεις και καθαρότερα προϊόντα με σημαντικά πιο σύντομους χρόνους αντίδρασης, καθώς είναι περισσότερο αποδοτική ενεργειακά από τη συμβατική θέρμανση⁷⁶.



Σχήμα 13. Σύνθεση χαλκονών μέσω μικροκυμάτων

Η αλδολική συμπύκνωση τύπου Mukaiyama μεταξύ μη κυκλικών κετονών και βενζαλδεΐδων, παρουσία ιωδιούχου σαμαρίου και τριμεθυλοσιλυλοχλωριδίου, είναι μία ακόμη μέθοδος σύνθεσης χαλκονών⁷⁷ (Σχήμα 14).



Σχήμα 14. Mukaiyama αλδολική συμπύκνωση

Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιείται κυρίως για τη σύνθεση προϊόντων μικτής αλδολικής συμπύκνωσης, οδηγώντας στην απομόνωση μόνο των trans ισομερών. Οι αποδόσεις των παραγόμενων ενώσεων είναι ικανοποιητικές και κυμαίνονται σε ποσοστά 75-82%, σύμφωνα με τους Fan και Zhang⁷⁷. Τα προϊόντα με τις μεγαλύτερες αποδόσεις

λαμβάνονται στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται ως υποκαταστάτες ομάδες-δέκτες ηλεκτρονίων, ενώ οι μικρότερες αποδόσεις λαμβάνονται από ομάδες-δότες ηλεκτρονίων. Επιπλέον, στην ίδια έρευνα προέκυψε ότι η απουσία του SmI_3 ή του TMSCl αναστέλλει την αντίδραση.

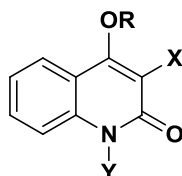
2.4 Κινολινόνες

Τα αλκαλοειδή (alkaloids), αποτελούν ιδιαίτερη κατηγορία οργανικών ενώσεων που περιέχουν άζωτο. Εντοπίζονται κυρίως σε κάποια φυτά (π.χ. στα μηκωνοειδή) και μερικές φορές και σε ζώα. Παρουσιάζουν ενδιαφέρον κυρίως λόγω των επί ετών φαρμακευτικών ιδιοτήτων τους αλλά και ως ναρκωτικά ή παραισθησιογόνα, ύστερα από χορήγησή τους σε μεγαλύτερη δόση.

Πρόκειται για αλκαλικές ουσίες των οποίων κύρια στοιχεία δομής είναι άτομα άνθρακα, υδρογόνου και αζώτου. Στην κατηγορία των αλκαλοειδών ανήκουν η νικοτίνη, η καφεΐνη, η κινίνη, η κοκαΐνη, η μορφίνη, η στρυχνίνη, κ.ά.

Τα αλκαλοειδή ταξινομούνται επιμέρους, ανάλογα με τους συντακτικούς τύπους τους και με βάση τη φύση και τον αριθμό των πυρήνων τους, (δακτύλιοι ατόμων), καθώς και με τους υποκαταστάτες που τους συνδέουν σε πυριδίνες, πυρρολιδίνες, τροπάνια, πυρρολιζιδίνες, πουρίνες, κινολίνες, ισοκινολίνες, ινδόλια, τερπενοειδή και στεροειδή.

Οι κινολινόνες είναι ετεροκυκλικές αζωτούχες ενώσεις οι οποίες απαντώνται κυρίως ως αλκαλοειδή σε μια πληθώρα φυσικών προϊόντων καθώς και συνθετικών αναλόγων κατέχοντας πολυάριθμες βιολογικές ιδιότητες (Σχήμα 15).

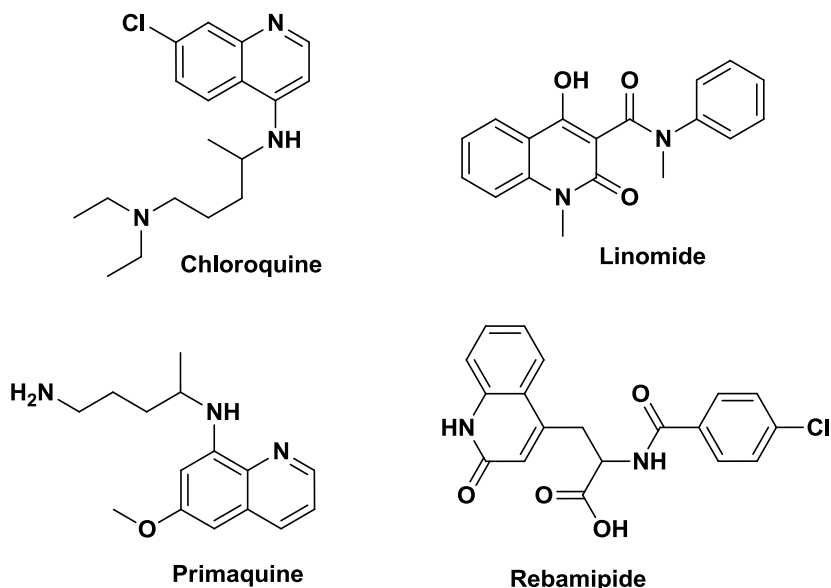


Σχήμα 15. Γενική δομή 2-κινολινονών

2.4.1 Βιολογική δράση φυσικών και συνθετικών κινολινών

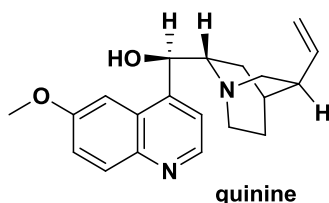
Οι ενώσεις που περιέχουν ως δομική μονάδα το ετεροκυκλικό σύστημα της 4-υποκατεστημένης-2-κινολινόνης εμφανίζουν μεγάλη ποικιλία βιολογικών και φαρμακολογικών ιδιοτήτων και αποτελούν χρήσιμα ενδιάμεσα στη σύνθεση μεγάλου αριθμού βιοδραστικών μορίων (Σχήμα 16).

Παράγωγα των κινολινών χρησιμοποιούνται ως ανθελονοσιακά φάρμακα, αντιπαρασιτικά, αντικά,⁷⁸ αντινεοπλασματικά,⁷⁹ αντιαλλεργικά⁸⁰, αντιϋπερτασικά⁸¹, αντιοξειδωτικά και αντιφλεγμονώδη^{82,83}.

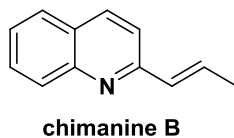


Σχήμα 16. Κινολίνες με φαρμακολογική δράση

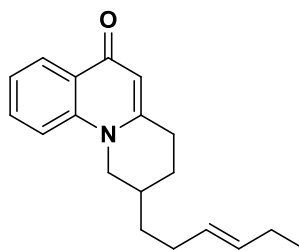
Η αντιπαρασιτική δράση των αλκαλοειδών κινολίνης είναι γνωστή εδώ και δεκαετίες. Μέχρι τα μισά του προηγούμενου αιώνα, η κινίνη (quinine), απομονωμένη από το φυτό *Cinchona succiruba* (Rubiaceae), χρησιμοποιούνταν ευρέως για τη θεραπεία της ελονοσίας, αποτελώντας ταυτόχρονα την ένωση οδηγό για τη μετέπειτα σύνθεση ανάλογων ανθελονοσιακών φαρμάκων⁸⁴.



Οι Fournet et al. απομόνωσαν από διάφορα μέρη του φυτού *Galipea longiflora* μια σειρά από αλκαλοειδή κινολίνης υποκατεστημένα στη θέση 2 του ετεροκυκλικού δακτυλίου όπως στην περίπτωση της chimanine B. Τα φυσικά αυτά προϊόντα επέδειξαν σημαντική δράση έναντι της δερματικής λειψμανίασης ενώ δεν είναι τοξικά⁸⁵.



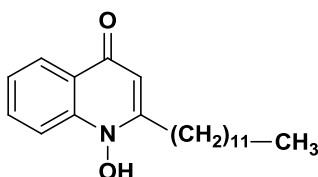
Δύο επιπλέον αλκαλοειδή κινολίνης, με συμπυκνωμένο πιπεριδινικό δακτύλιο Dictyolomide A and B, απομονωμένες από τα φυτά *Dictyoloma incanescens* (syn. *D. vandellianum*) και *D. peruviana* (Rutaceae), στη Βόρεια Αμερική (Βολιβία), παρουσίασαν αξιόλογη δράση *in vitro* έναντι της λειψμανίασης^{86,87}.



Dictyolomide A

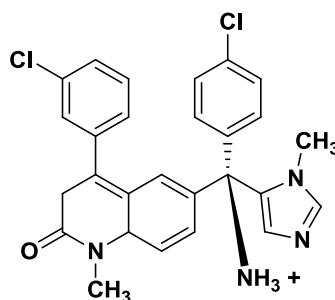
Οι κινολόνες και οι φθοροκινολόνες, συνθετικά χημειοθεραπευτικά ευρέως φάσματος, παρουσιάζουν επίσης αξιόλογη *in vitro* αντιπαρασιτική δράση έναντι των ευαίσθητων στη χλωροκίνη και των ανθεκτικών στη χλωροκίνη παρασίτων *P. falciparum* και έχουν ήδη προταθεί ως φάρμακα για την αντιμετώπιση της ελονοσίας⁸⁸.

Στην πρόσφατη βιβλιογραφία αναφέρεται η σύνθεση της 1-υδροξυ-2-δωδεκυλο-4(1H)-κινολινόνης (HDQ) και αναλόγων της, ως νέων ενώσεων με ισχυρή δράση *in vivo* και *in vitro* έναντι των παρασίτων *Toxoplasma gondii* και *Plasmodium falciparum*. Η μελέτη της σχέσης δομής – δράσης έδειξε ότι η παρουσία δωδεκυλο – ομάδας και μεθυλο – ομάδας στις θέσεις 2 και 3 του ετεροκυκλικού δακτυλίου αντίστοιχα βελτιστοποιούν τη δράση^{89,90}.



1-υδροξυ-2-δωδεκυλο-4(1H)-κινολινόνης (HDQ)

Η μη πεπτιδομιμητική κινολινόνη tipifarnib, ισχυρός αναστολέας της πρωτεϊνικής φαρνεσυλοτρανσφεράσης με αντικαρκινική δράση, εμφανίζει επίσης ισχυρή αντιπαρασιτική δράση έναντι του *Trypanosoma cruzi*, και αποτελεί πολλά υποσχόμενο μόριο – οδηγό για την ανάπτυξη φαρμάκων έναντι της ασθένειας Chagas⁹¹.



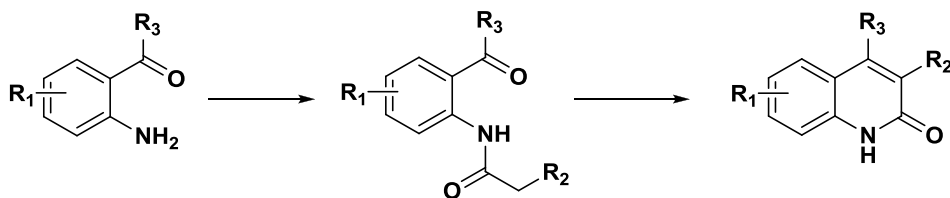
Tipifarnib

2.4.2 Κυριότερες μέθοδοι σύνθεσης 2-κινολινονών

Ο ετεροκυκλικός δακτύλιος των 2-κινολινονών αποτελεί βασική δομική μονάδα πολλών φυσικών προϊόντων και η πληθώρα των βιολογικών τους ιδιοτήτων, τις καθιστά ελκυστικούς συνθετικούς στόχους. Ως αποτέλεσμα, η ανάπτυξη ολοένα και περισσότερων

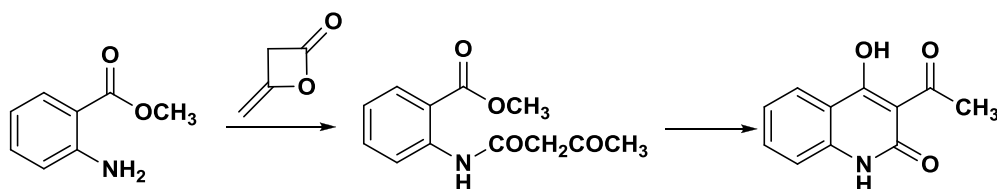
μεθόδων σύνθεσης ανάλογων ετεροκυκλικών ενώσεων αποτελεί το αντικείμενο ενασχόλησης πολλών ερευνητικών ομάδων μέχρι σήμερα.

Στη βιβλιογραφία ως γενική μέθοδος σύνθεσης 4-υποκατεστημένων κινολινονών αναφέρεται συνήθως η ακυλίωση κατάλληλα υποκατεστημένων αμινοκετόνων προς σχηματισμό του τελικού παραγώγου ύστερα από κύκλωση του ενδιάμεσου προϊόντος⁹² (Σχήμα 17).



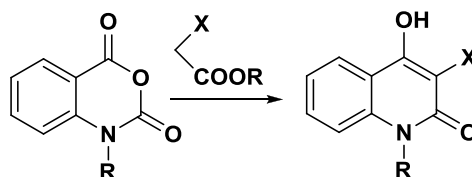
Σχήμα 17. Σύνθεση 4-υποκατεστημένων κινολινονών

Το 1954 με τη μέθοδο Lacey αναπτύχθηκε η αντίδραση του μεθυλεστέρα του ανθρανιλικού οξέος με δικετένιο και κύκλωση του ενδιάμεσου N – ακετοακετυλο παραγώγου προς την 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2-κινόλινονη⁹³ (Σχήμα 18). Η ευελιξία της μεθόδου Lacey την καθιστά δυνατή να χρησιμοποιηθεί και για τη σύνθεση ανάλογων 3-υποκατεστημένων-4 υδροξυ-κινόλινονών-2 με ποικίλους υποκαταστάτες αρκεί να μπορούν να παρασκευαστούν τα αντίστοιχα N – ακετοακέτυλο παράγωγα, με αποτέλεσμα πολλές ερευνητικές ομάδες με συνεχείς τροποποιήσεις και προσθήκες να έχουν αναπτύξει νέες βελτιωμένες μεθόδους σύνθεσης κινολινονών^{94,95}.



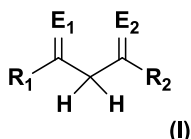
Σχήμα 18. Μέθοδος Lacey

Μία επιπλέον βασική μέθοδος σύνθεσης 4-υδροξυ-3-υποκατεστημένων-2-κινόλινονών η οποία συνεχίζει να αναπτύσσεται τις τελευταίες δεκαετίες, αφορά κυρίως αντιδράσεις C-ακυλίωσης ενεργών μεθυλενίων και περαιτέρω κύκλωση του ενδιάμεσου προϊόντος C-ακυλίωσης. Το 1976 αναφέρθηκε από την ερευνητική ομάδα του Coppola⁹⁶⁻⁹⁹ μια μέθοδος η οποία περιγράφει την ακυλίωση ενώσεων ενεργού μεθυλενίου από ισατοϊκό ανυδρίτη με τελικό προϊόν τις N-αλκυλο-4-υδροξυ-2-κινόλινόνες (Σχήμα 19).



Σχήμα 19. Μέθοδος Coppola

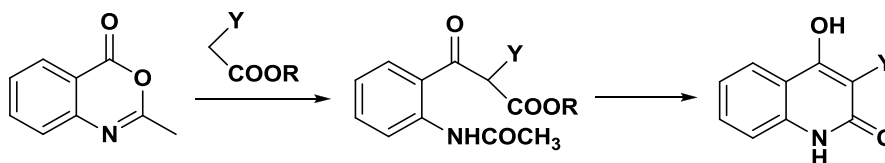
Οι ενώσεις ενεργού μεθυλενίου είναι της μορφής **(I)** (Σχήμα 20), όπου E₁ και E₂ είναι ομάδες δέκτες ηλεκτρονίων με αποτέλεσμα η μέθοδος να μπορεί να εφαρμοστεί σε ένα μεγάλο αριθμό ενώσεων ενεργού μεθυλενίου, με σκοπό τη σύνθεση αντίστοιχων κινολινονών.



Σχήμα 20. Ένωση ενεργού μεθυλενίου

Πληθώρα ερευνητικών ομάδων ανέπτυξαν στη συνέχεια, περαιτέρω μεθόδους βασισμένες στις αντιδράσεις C-ακυλίωσης ενώσεων ενεργού μεθυλενίου, με σκοπό τη σύνθεση νέων ανάλογων 3-υποκατεστημένων-4-υδροξυ-2-κινολινονών, εισάγοντας διάφορους υποκατάστατες στη θέση 3 της 4-υδροξυ-2-κινολινόνης¹⁰⁰⁻¹⁰³.

Στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, μια ανάλογη μέθοδο με αυτή των Corroia *et al.* σχεδιάστηκε και εφαρμόστηκε με σκοπό τη σύνθεση 3-υποκατεστημένων-4-υδροξυ-2-κινολινονών. Η σύνθεση των εν λόγω μορίων, επιτεύχθηκε με αντίδραση C-ακυλίωσης χρησιμοποιώντας τη 2-μεθυλο-4-Η-3,1-βενζοξαζιν-4-όνη ως ακυλιωτικό μέσο. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η κύκλωση των C-ακυλο-παραγώγων προς τις τελικές 3-υποκατεστημένες-4-υδροξυ-2-κινολινόνες (Σχήμα 21)¹⁰⁴.

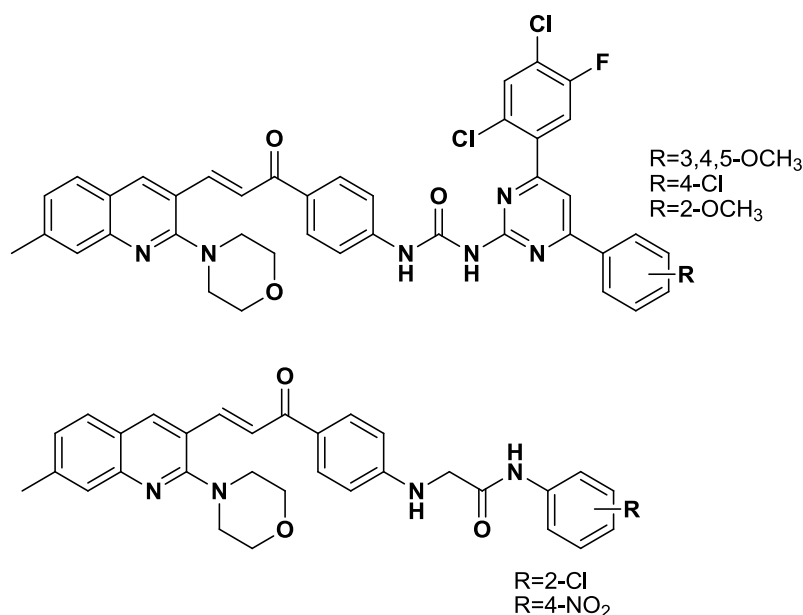


Σχήμα 21. Συνθετική πορεία 3-υποκατεστημένων-4-υδροξυ-2-κινολινονών

2.5 Κινολινικά ανάλογα χαλκόνων: δομή και βιολογική δράση

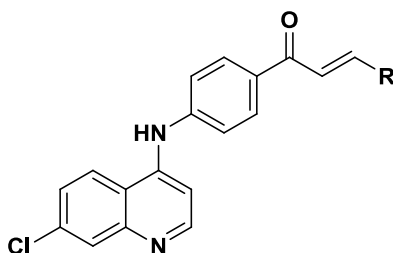
Η σύνθεση και η μελέτη της βιολογικής δραστηριότητας ανάλογων χαλκόνων που περιέχουν τον ετεροκυκλικό δακτύλιο της κινολίνης έχει αποτελέσει αντικείμενο ενδιαφέροντος σχετικά πρόσφατα και για το λόγο αυτό η σχετική βιβλιογραφία είναι περιορισμένη.

Πρόσφατα, η ερευνητική ομάδα των Chikhalia *et al.*, συνέθεσε μια νέα σειρά κινολινικών ανάλογων χαλκόνων (Σχήμα 22) αξιολογώντας τη για την αντιμικροβιακή τους δράση *in vitro* έναντι 4 ειδών βακτηρίων, θετικών ή αρνητικών κατά Gram¹⁰⁵. Τη βέλτιστη δράση έναντι των βακτηρίων *Staphylococcus aureus* και *Bacillus subtilis* παρουσίασε το παράγωγο με R=3,4,5-OCH₃, έναντι του βακτηρίου *Bacillus subtilis* τα παράγωγα με R=4-Cl και με R=2-OCH₃, έναντι του βακτηρίου *Escherichia coli* το παράγωγο με R=2-Cl και έναντι του βακτηρίου *Salmonella typhosa* το παράγωγο με R=4-NO₂.

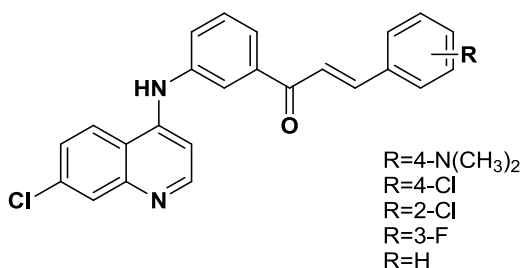


Σχήμα 22. Κινολινονο-χαλκόνες με αντιμικροβιακή δράση

Νέα κινολινικά ανάλογα χαλκονών της παρακάτω δομής σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν, παρουσιάζοντας αξιόλογη αντιμικροβιακή δράση έναντι του παθογόνου βακτηρίου της φυματίωσης *Mycobacterium tuberculosis*¹⁰⁶.



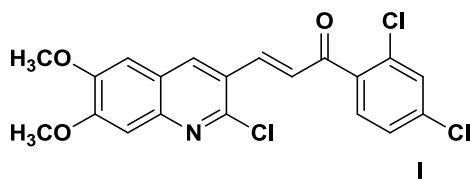
Οι Ferrer et al. παρασκεύασαν παράγωγα των 3-(7-χλωρο-4-κινολινυλαμινο) χαλκονών με ανθελονοσιακή και αντικαρκινική δράση (Σχήμα 23). Τα νέα παράγωγα δρουν αναστέλλοντας τόσο το σχηματισμό της β-αιματίνης (β-hematin), όσο και τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων του προστάτη¹⁰⁷.



Σχήμα 23. Ανάλογα των 3-(7-χλωρο-4-κινολινυλαμινο) χαλκονών

Μία νέα σειρά κινολινικών ανάλογων χαλκονών με ανθελονοσιακή δράση έναντι του παρασίτου *Plasmodium falciparum* συντέθηκε από την ερευνητική ομάδα του Dominguez et

a/. Μεταξύ των νέων παραγώγων, τη βέλτιστη δράση παρουσίασε το παράγωγο **I**, με IC₅₀ 19.0μM¹⁰⁸.



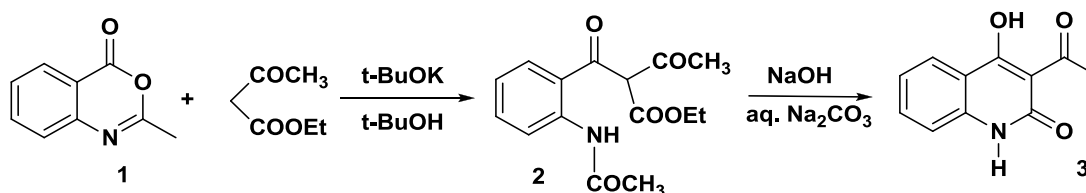
Κεφάλαιο 3^ο

Σχεδιασμός, σύνθεση και ταυτοποίηση των νέων ενώσεων

3.1 Σχεδιασμός των νέων παραγώγων

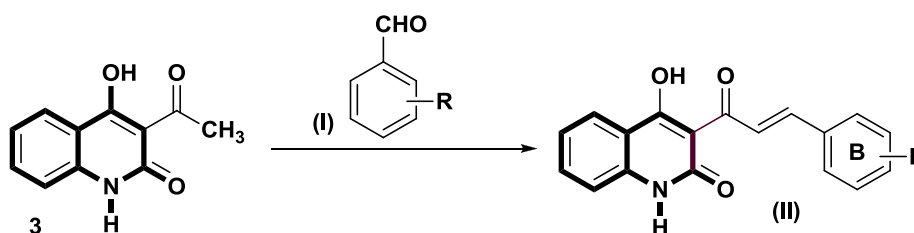
Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια σύνθεσης νέων βιοδραστικών ενώσεων ανάλογων των κινολινονών και των χαλκονών, με σκοπό το συνδυασμό των φαρμακοφόρων τους δομών σε ένα υβριδικό μόριο.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2-κινολινόνης (**3**), βασιζόμενη σε αντίδραση C-ακυλίωσης του ακετοξικού αιθυλεστέρα από τη 2-μεθυλοβενζοξαζινόνη (Σχήμα 24).



Σχήμα 24. Σύνθεση της 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2-κινολινόνης

Τα νέα κινολινικά ανάλογα χαλκονών (**II**) συντέθηκαν μέσω αλδολικής συμπύκνωσης της 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2-κινολινόνης με αρωματικές αλδεΐδες (**I**) (Σχήμα 25).



Σχήμα 25. Σύνθεση των νέων κινολινονο – χαλκονών

Η επιλογή των αρωματικών αλδεϋδών πραγματοποιήθηκε με σκοπό τη σύνθεση παραγώγων με ποικιλία υποκαταστατών σε διάφορες θέσεις του δακτυλίου B, προκειμένου να μελετηθεί η σχέση δομής – δράσης των νέων μορίων. Επιπλέον, επιλέχθηκαν και αλδεΐδες με σύστημα εκτεταμένης συζυγίας, με αποτέλεσμα τελικά, να ταξινομηθούν τα νέα μόρια σε τέσσερις σειρές παραγώγων:

i. Σειρά A

Η σειρά A, αποτελείται συνολικά από επτά νέα παράγωγα, τα οποία διαθέτουν σε θέσεις *ορθο*, *μετα* και *παρα* του αρωματικού δακτυλίου της βενζαλδεΐδης έναν ή περισσότερους υποκαταστάτες με +R φαινόμενο (CH₃, OCH₃, C(CH₃)₃, OH).

ii. Σειρά Β

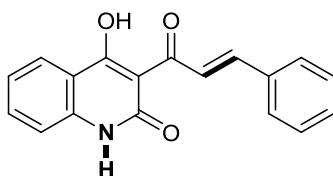
Η σειρά Β, αποτελείται συνολικά από τρία νέα παράγωγα, τα οποία διαθέτουν σε θέσεις *ορθο*, *μετα* και *παρα* του αρωματικού δακτυλίου της βενζαλδεύδης, υποκαταστάτες με -R φαινόμενο (NO₂, CF₃, COOH).

iii. Σειρά Γ

Η σειρά Γ, αποτελείται από δύο νέα παράγωγα, τα οποία διαθέτουν σύστημα εκτεταμένης συζυγίας.

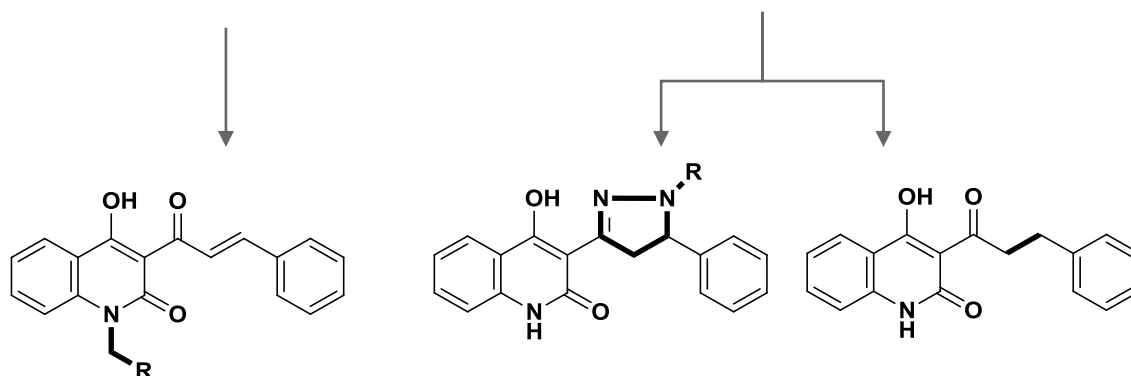
iv. Σειρά Δ

Προκειμένου να μελετηθεί εκτενέστερα η σχέση της δομής με τη βιολογική δράση, πραγματοποιήθηκαν τροποποιήσεις σε δύο από τα σημαντικότερα δομικά χαρακτηριστικά των μορίων τα οποία αναμένεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στη βιολογική τους δράση: α) στην ομάδα N – H του ετεροκυκλικού δακτυλίου της κινολινόνης και β) στο α,β-ακόρεστο καρβονυλικό σύστημα της χαλκόνης.



i. υποκατάσταση στο άζωτο με ομάδες δότες ηλεκτρονίων

ii. σύνθεση ετεροκυκλικών παραγώγων με πενταμελή δακτύλιο
iii. εκλεκτική αναγωγή του διπλού δεσμού



Με αυτό το σκεπτικό, προέκυψαν η σειρά Δ₁, με δύο αλκυλιωμένες κινολινόνες και τέσσερις αλκυλιωμένες κινολινονο – χαλκόνες, η σειρά Δ₂, η οποία αποτελείται από τέσσερις διϋδροχαλκόνες και η σειρά Δ₃ με συνολικά τρία πυραζολινικά ανάλογα.

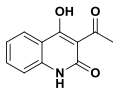
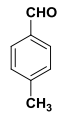
Η παρουσία ενός αλκυλο – υποκαταστάτη στο αμιδικό άζωτο διαφοροποιεί τη φυσικοχημική συμπεριφορά του μορίου καθιστώντας τα αλκυλιωμένα ανάλογα πολύ περισσότερο διαλυτά σε κοινούς οργανικούς διαλύτες. Επίσης, τα μη υποκατεστημένα στο άζωτο παράγωγα μπορούν να συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου ενώ τα αντίστοιχα αλκυλιωμένα δεν έχουν αυτή τη δυνατότητα. Η διαλυτότητα, και κατ' επέκταση η λιποφιλικότητα, όπως επίσης και η δυνατότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου αποτελούν δύο από τις σημαντικότερες παραμέτρους που επηρεάζουν τη βιολογική δράση.

Το α,β -ακόρεστο καρβονυλικό σύστημα των χαλκονών δρα ως δέκτης σε αντιδράσεις Michael με αποτέλεσμα οι χαλκόνες να αντιδρούν εκλεκτικά με ασθενώς πυρηνόφιλες ομάδες όπως οι σουλφυδρυλομάδες που περιέχονται στα ενεργά κέντρα ενζύμων. Επομένως, η τροποποίηση του συστήματος αυτού αναμένεται να οδηγήσει σε χρήσιμα συμπεράσματα σχετικά με το μηχανισμό δράσης τους. Πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικές προσεγγίσεις: α) σύνθεση ετεροκυκλικών παραγώγων με πενταμελή δακτύλιο και β) εκλεκτική αναγωγή του διπλού δεσμού.

3.2 Βελτιστοποίηση συνθηκών αντίδρασης αλδολικής συμπύκνωσης

Προκειμένου να μελετηθούν οι βέλτιστες συνθήκες της αντίδρασης της αλδολικής συμπύκνωσης για την παρασκευή των νέων κινολινονο χαλκονών, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με πρώτες ύλες την 3-ακετυλο-4-υδροξυ-κινολιν-2-όνη (**3**) και την π – τολουαλδεΐδη σε διάφορες συνθήκες βασικού περιβάλλοντος και διαλύτη. Ως βάση χρησιμοποιήθηκε είτε το καυστικό κάλιο (KOH) σε περίσσεια, είτε η πιπεριδίνη σε στοιχειομετρική ή καταλυτική ποσότητα, σε διαλύτη αιθανόλη (EtOH) ή πυριδίνη (Πίνακας 2).

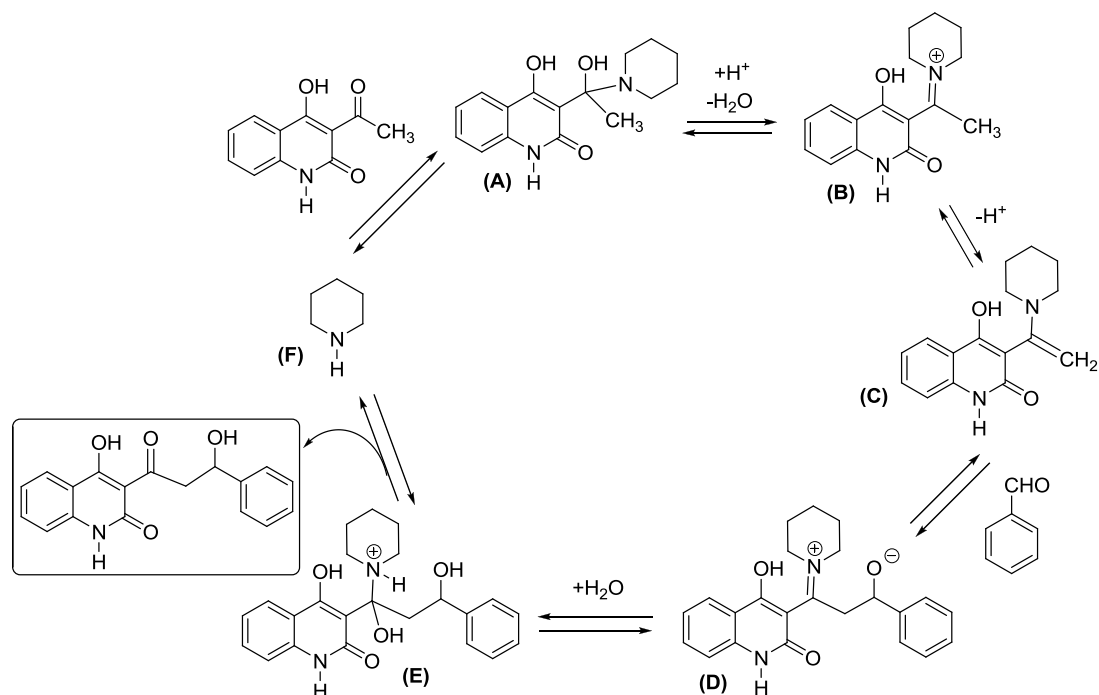
Πίνακας 2. Μελέτη συνθηκών αλδολικής συμπύκνωσης

		Βάση	Διαλύτης	Απόδοση (%)
1eq	1eq	KOH (5eq)	EtOH	19
1eq	1eq	Πιπεριδίνη (1.2eq)	EtOH	15
1eq	1eq	Πιπεριδίνη(1.2eq)	Πυριδίνη	<10
1eq	1eq	Πιπεριδίνη (καταλυτικά)	EtOH	56

Από τη διερεύνηση αυτή προέκυψε ότι οι καλύτερες αποδόσεις λαμβάνονται κατά την αντίδραση της κινολινόνης με την αλδεΐδη σε διαλύτη αιθανόλη, παρουσία καταλυτικής ποσότητας πιπεριδίνης, σε θερμοκρασία βρασμού της αιθανόλης (78°C).

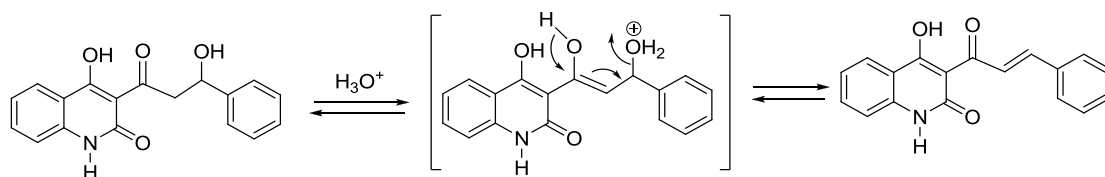
Ο μηχανισμός της καταλυόμενης από αμίνες αλδολικής συμπύκνωσης προσομοιάζει με τις αντίστοιχες αλδολικές αντιδράσεις που καταλύονται από τα ένζυμα αλδολάσες τύπου I. Ο καταλυτικός κύκλος (Σχήμα 26) περιλαμβάνει τον ενδιάμεσο σχηματισμό καρβινολαμίνης (A), ιόντος ιμινίου (B) και εναμίνης (C). Στη συνέχεια, πραγματοποιείται πυρηνόφιλη προσθήκη στην αλδεΐδη οπότε σχηματίζεται ο νέος δεσμός C – C (D). Προσθήκη H₂O προς

το σχηματισμό μιας νέας καρβινολαμίνης (E) και διάσπασή της προς το προϊόν αλδολικής συμπύκνωσης και απελευθέρωση της αμίνης (F) ολοκληρώνουν τον καταλυτικό κύκλο.¹⁰⁹



Σχήμα 26. Μηχανισμός καταλυόμενης από πιπεριδίνη αλδολικής συμπύκνωσης

Το προϊόν αλδολικής συμπύκνωσης δεν απομονώθηκε σε καμία από τις αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν σε αυτήν την εργασία. Η όξινη κατεργασία του μίγματος της αντίδρασης οδηγεί στην αφυδάτωση του προϊόντος και στο σχηματισμό της επιθυμητής χαλκόνης (Σχήμα 27).



Σχήμα 27. Μηχανισμός αφυδάτωσης του προϊόντος αλδολικής συμπύκνωσης

3.3 Σύνθεση και χαρακτηρισμός των νέων μορίων

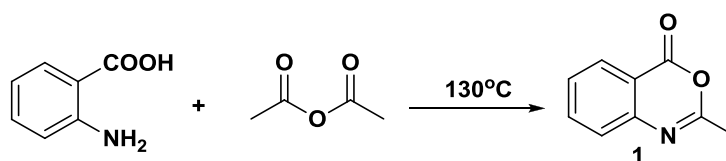
3.3.1 Σύνθεση 3-υποκατεστημένων-4-υδροξυ-2-κινολινονών

Η μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται για τη σύνθεση μιας κατάλληλα 3-υποκατεστημένης-4-υδροξυ-2-κινολινόνης, βασίζεται σε αντιδράσεις C-ακυλίωσης ενώσεων ενεργού μεθυλενίου με επιλογή των κατάλληλων ακυλιωτικών μέσων ώστε να

επιτευχθεί η σύνθεση του επιθυμητού κάθε φορά ετεροκυκλικού καρβονυλικού παραγώγου¹⁰⁴.

Σύνθεση της 2-μεθυλο-4H-3,1-βενζοξαζιν-4-όνης, (1)

Για τη σύνθεση της αρχικής ένωσης, 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2-(1H)-κινολινόνης (3), χρησιμοποιήθηκε ως ακυλιωτικό μέσο η 2-μεθυλο-4H-3,1-βενζοξαζιν-4-όνη (1), η οποία παρασκευάζεται με θέρμανση του ανθρανλικού οξέος με οξικό ανυδρίτη (Σχήμα 28).

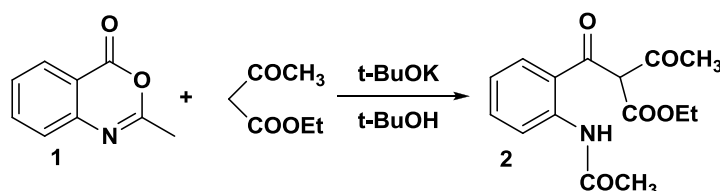


Σχήμα 28. Σύνθεση της 2-μεθυλο-4H-3,1-βενζοξαζιν-4-όνης

Μοναδικό μειονέκτημα είναι το γεγονός ότι η 2-μεθυλο-4H-3,1-βενζοξαζιν-4-όνη (1) δεν είναι ιδιαίτερα σταθερή με αποτέλεσμα να πρέπει να χρησιμοποιηθεί σε χρονικό διάστημα μίας ή δύο ημερών μετά την παρασκευή της και να φυλάσσεται σε ξηραντήρα. Εκτεθειμένη στην ατμόσφαιρα μετατρέπεται προς *N*-ακέτυλο ανθρανλικό οξύ.

Σύνθεση του *N*-ακετυλανθρανυλο-ακετοξικού αιθυλεστέρα, (2)

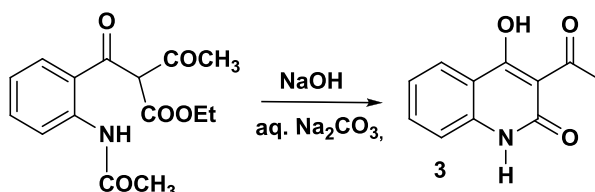
Με αντίδραση C-ακυλίωσης του ακετοξικού αιθυλεστέρα με ακυλιωτικό μέσο τη 2-μεθυλο-4H-3,1-βενζοξαζιν-4-όνη (1) σε βασικό περιβάλλον (διάλυμα *tert*-βουτοξυκαλίου σε διαλύτη *tert*-βουτυλική αλκοόλη) και ανάδευση 1.5 – 2 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος απομονώνεται το αντίστοιχο προϊόν C-ακυλίωσης, το οποίο λαμβάνεται σε καθαρή στερεή μορφή και υψηλή αποδόση (70 – 90%) (Σχήμα 29).



Σχήμα 29. Αντίδραση C-ακυλίωσης ενώσεων ενεργού μεθυλενίου

Σύνθεση της 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2-(1H)-κινολινόνης, (3)

Με αντίδραση κύκλωσης του προϊόντος C-ακυλίωσης (2) σε αλκαλικό περιβάλλον ($\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaOH}$), με ανάδευση 2 ωρών σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, λαμβάνεται σε καθαρή στερεή μορφή και υψηλή αποδόση (80 – 90%) η 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2-(1H)-κινολινόνη, (3) (Σχήμα 30).

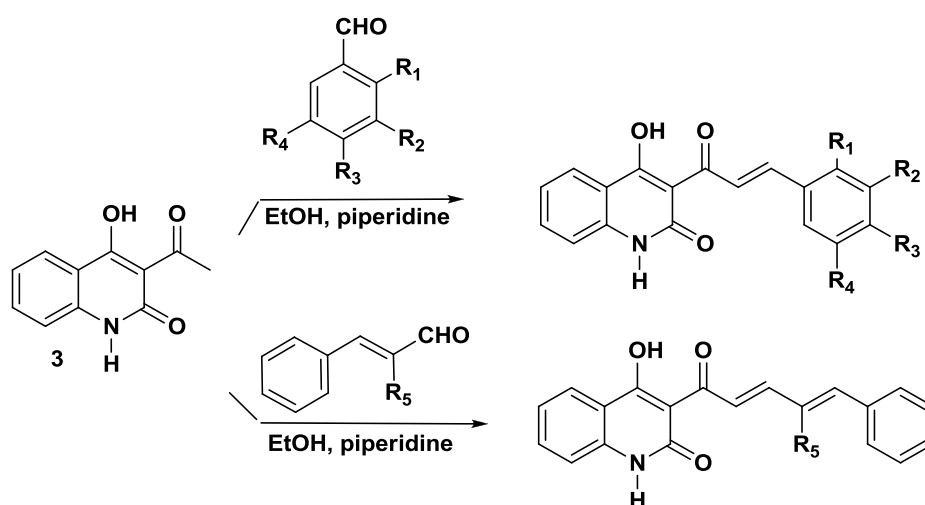


Σχήμα 30. Σύνθεση της 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2-(1H)-κινολινόνης

Συμπερασματικά, η συνθετική πορεία της 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2-(1H)-κινολινόνης (**3**), μέσω αντιδράσεων C-ακυλίωσης και κυκλοποιήσεως πραγματοποιήθηκε σε ήπιες συνθήκες, με αρκετά ικανοποιητικές αποδόσεις επιτρέποντας επιπλέον την απομόνωση των ενδιάμεσων παραγώγων.

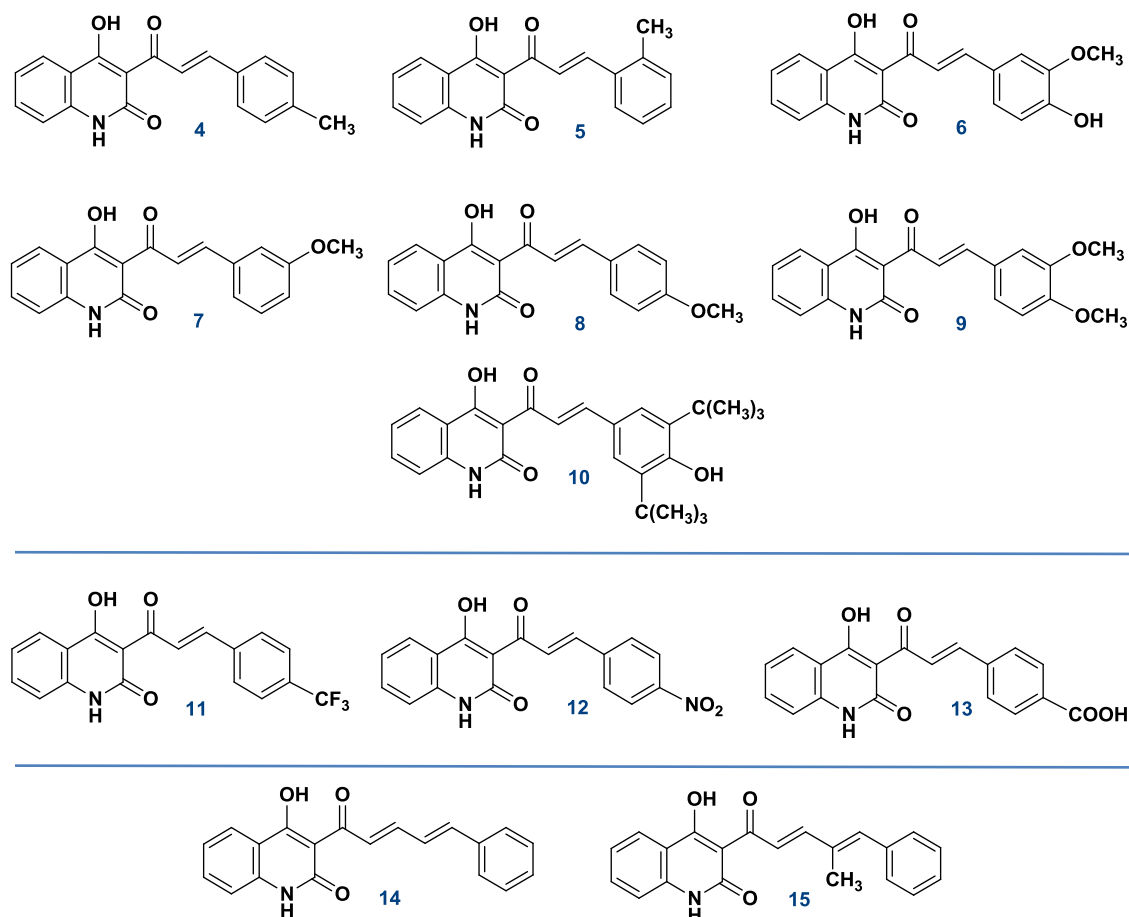
3.3.2 Σύνθεση υβριδικών μορίων κινολινο-χαλκονών

Η σύνθεση των νέων κινολινο-χαλκονών πραγματοποιήθηκε μέσω αλδολικής συμπύκνωσης της 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2-(1H)-κινολινόνης (**3**) με διάφορες αρωματικές αλδεΐδες, παρουσία καταλυτικής ποσότητας πιπεριδίνης με θέρμανση στους 78°C (Σχήμα 31).



Σχήμα 31. Σύνθεση κινολινο – χαλκονών

Παρασκευάστηκαν συνολικά δέκα νέες ενώσεις (ενώσεις 4-7, 9,11-15) και δύο γνωστές στη βιβλιογραφία (ενώσεις 8¹¹⁸ και 10¹¹⁹), οι οποίες περιέχουν ομάδες με +R φαινόμενο (CH₃, OCH₃, C(CH₃)₃, OH) ή -R φαινόμενο (NO₂, CF₃, COOH) σε διάφορες θέσεις του δακτυλίου Β ή σύστημα εκτεταμένης συζυγίας (Σχήμα 32).

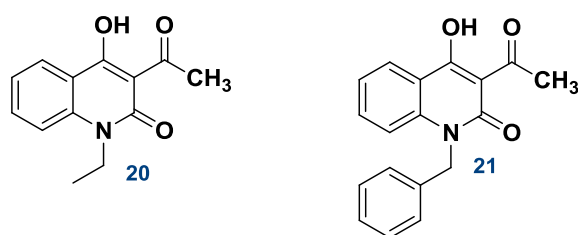


Σχήμα 32. Υβριδικά ανάλογα κινολίνου – χαλκονών

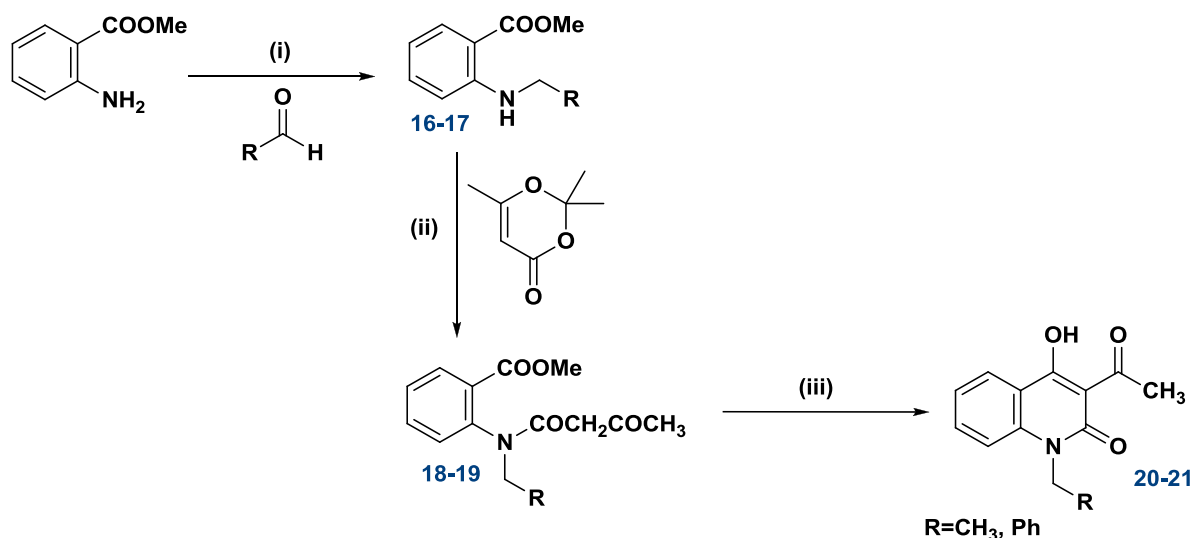
3.4 Δομικές τροποποιήσεις

3.4.1 Αλκυλιωμένες κινολινονο-χαλκόνες

Αρχικά, παρασκευάστηκαν οι 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2-κινολινόνες **20** και **21** (Σχήμα 33) υποκατεστημένες στο άζωτο με ομάδες δότες ηλεκτρονίων (αιθυλο και βενζυλο – ομάδες) με σκοπό τη μελέτη της επίδρασής τους στην αντιπαρασιτική δράση των κινολινονο-χαλκονών. Η σύνθεση αυτή πραγματοποιήθηκε μέσω αναγωγικής αλκυλίωσης του μεθυλεστέρα του ανθρανιλικού οξέος με την κατάλληλη αλδεΐδη, ακυλίωση της δευτεροταγούς αμίνης και κύκλωση σε βασικό περιβάλλον¹¹⁰ (Σχήμα 34).

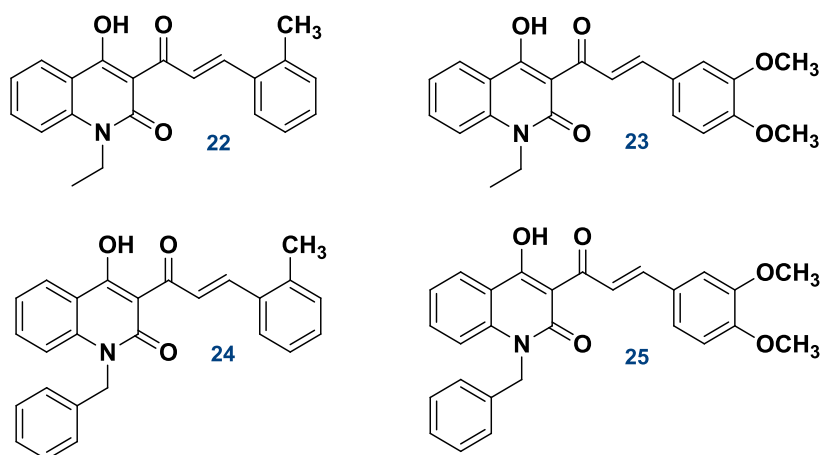


Σχήμα 33. Αλκυλιωμένες κινολινόνες



Σχήμα 34. (i) CH₃COOH, H-B(OAc)₃Na, DCM, (ii) 2,2,6-τριμεθυλο-1,3-διοξαν-4-όνη, τολουόλιο, reflux, (iii) EtOH, EtONa

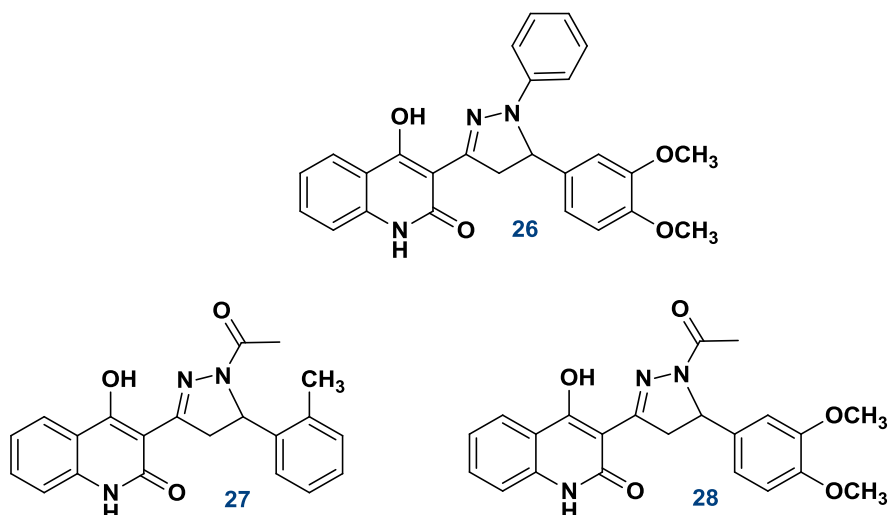
Οι τελικές χαλκόνες **22-25** (Σχήμα 35) συντέθηκαν μέσω της μικτής αλδολικής συμπύκνωσης παρουσία πιπεριδίνης ως καταλύτη, σύμφωνα με τη γνωστή μέθοδο (Σχήμα 31).



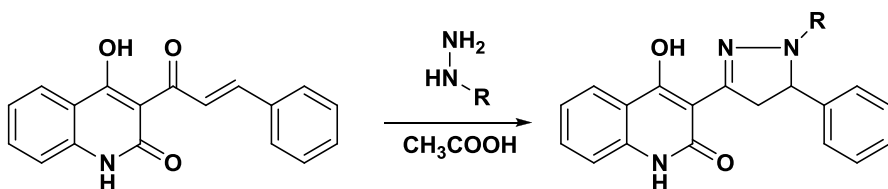
Σχήμα 35. Αλκυλιωμένες κινολινονο-χαλκόνες

3.4.2 Πυραζολινικά ανάλογα

Η πρώτη προσέγγιση στη χημική τροποποίηση του α,β-ακόρεστου καρβονυλικού συστήματος των χαλκόνων περιλαμβάνει την αντίδραση με παράγωγα υδραζίνης, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό ετεροκυκλικών πυραζολινικών αναλόγων. Τα πυραζολινικά ανάλογα **26-28** (Σχήμα 36) παρασκευάστηκαν με θέρμανση της αντίστοιχης χαλκόνης με φαινυλυδραζίνη σε διαλύτη οξικό οξύ¹¹¹ (Σχήμα 37).



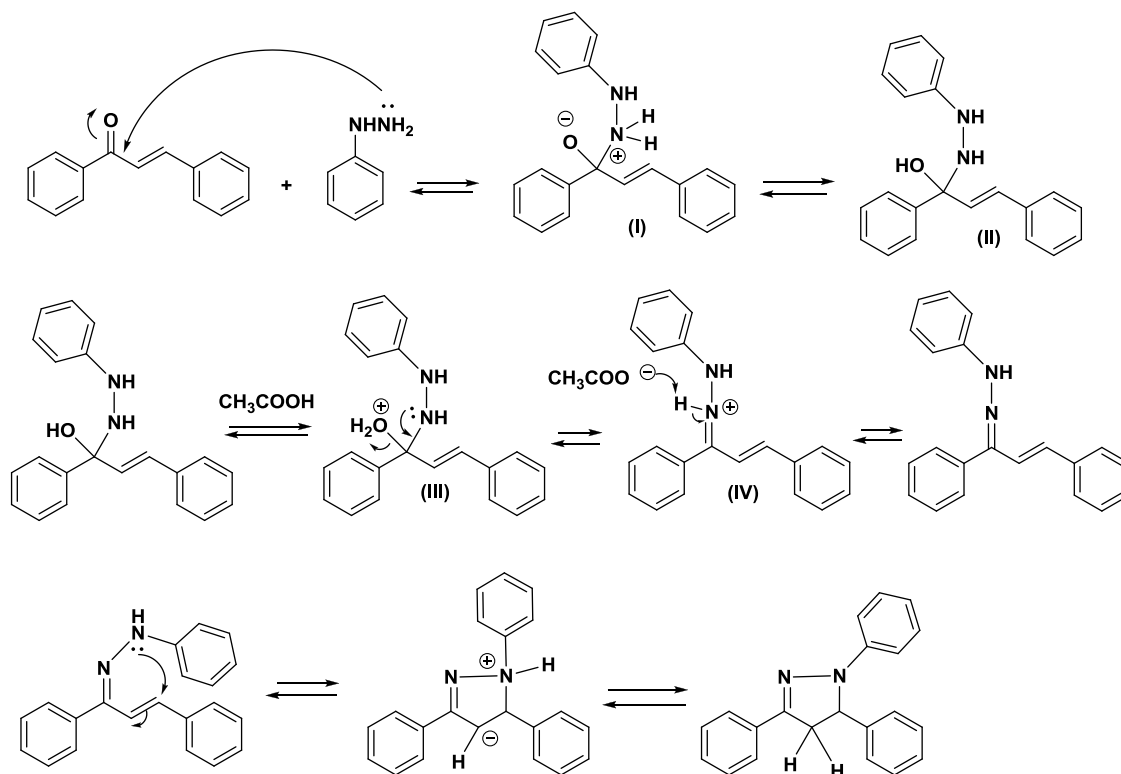
Σχήμα 36. Πυραζολινικά ανάλογα κινολινονο – χαλκόνων



Σχήμα 37. Αντίδραση σχηματισμού πυραζολινικών παραγώγων

Η τελική κύκλωση των ενδιάμεσων μορίων προς το σχηματισμό των τελικών προϊόντων, πραγματοποιείται λόγω των δύο ηλεκτρονιόφιλων κέντρων στο α,β -ακόρεστο καρβονυλικό σύστημα της χαλκόνης.

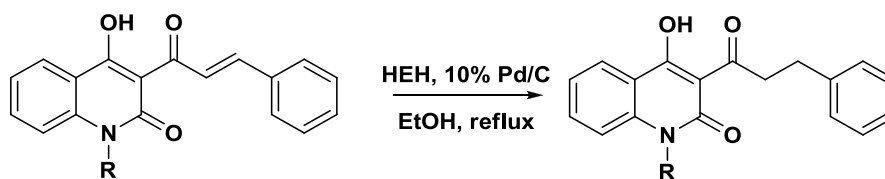
Αρχικά, το ζεύγος ηλεκτρονίων της αμινομάδας της φαινυλυδραζίνης προσβάλλει τον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα του καρβονυλίου της χαλκόνης οπότε σχηματίζεται το τετραεδρικό ενδιάμεσο (I) το οποίο με μεταφορά πρωτονίου, παρέχει το ουδέτερο ενδιάμεσο (II). Πρωτονίωση του υδροξυλίου του (II) από το οξικό οξύ μετατρέπει το OH σε καλή αποχωρούσα ομάδα (H_2O). Το μη δεσμικό ζεύγος ηλεκτρονίων του αζώτου δημιουργεί ένα νέο διπλό δεσμό ($\text{C}=\text{N}$) και παράλληλα αποσπάται ένα μόριο H_2O (ενδιάμεσο (III)). Στη συνέχεια, πραγματοποιείται απόσπαση του όξινου υδρογόνου με επίδραση του οξικού ανιόντος και δημιουργία του ουδέτερου ενδιάμεσου (IV). Το ασύζευκτο ζεύγος ηλεκτρονίων της δεύτερης αμινομάδας προσβάλλει το δεύτερο ηλεκτρονιόφιλο κέντρο του α,β -ακόρεστου καρβονυλικού συστήματος και σχηματίζει απλό δεσμό ($\text{C}-\text{N}$) κλείνοντας έναν ετεροκυκλικό πενταμελή δακτύλιο. Η τελική πυραζολίνη προκύπτει με μεταφορά πρωτονίου από το άζωτο στον άνθρακα (Σχήμα 38).



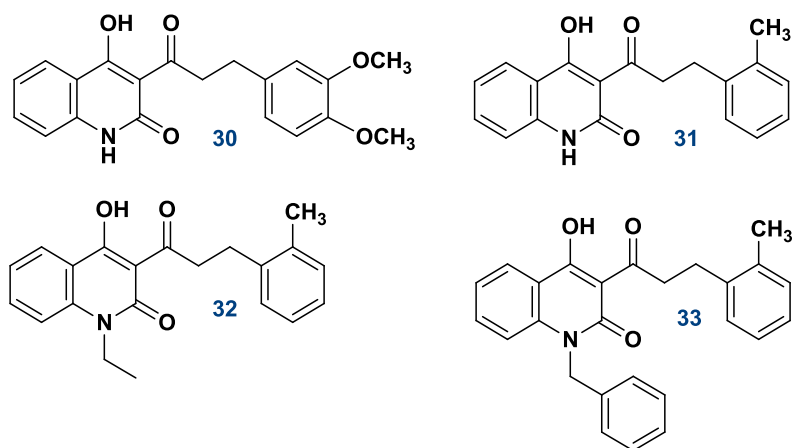
Σχήμα 38. Μηχανισμός σχηματισμού πυραζολίνης

3.4.3 Διϋδρο-χαλκόνες

Η δεύτερη προσέγγιση, αφορά στην εκλεκτική αναγωγή του α,β ακόρεστου καρβονυλικού συστήματος, με αντίδραση καταλυτικής μεταφοράς υδρογόνου, χρησιμοποιώντας την κατάλληλη οργανική ένωση, ως δότη υδρογόνου και καταλύτη Pd/C (Σχήμα 39). Με τη μέθοδο αυτή παρασκευάστηκαν τα υδρογονωμένα παράγωγα των χαλκονών, οι διϋδρο-χαλκόνες **30-33** (Σχήμα 40).

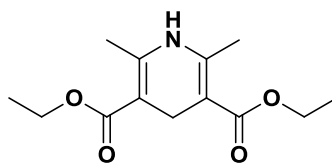


Σχήμα 39. Εκλεκτική αναγωγή χαλκονών



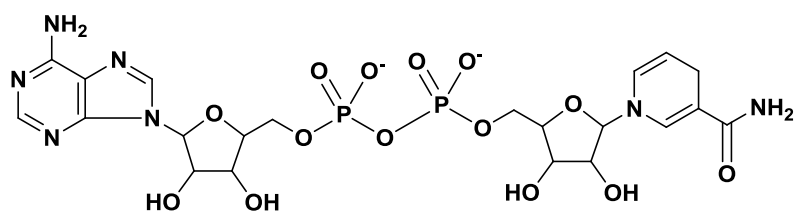
Σχήμα 40. Παράγωγα διϋδρο-χαλκονών

Η οργανική ένωση η οποία χρησιμοποιήθηκε ως δότης υδρογόνου, είναι ο εστέρας του Hantzsch (HEH, **29**). Η επιλογή του εστέρα του Hantzsch (Hantzsch 2,6-διμεθυλο-1,4-διϋδροπυριδινό-3,5-δικαρβοξυλικός διαιθυλεστέρας, HEH) πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της εύκολης συνθετικής του πορείας και της εκλεκτικής ικανότητάς του να ανάγει α,β-ακόρεστα καρβονυλικά συστήματα βιομιμητικά.



Hantzsch ester

Στα βιολογικά συστήματα ο σχηματισμός στερεογονικών κέντρων C-H πραγματοποιείται με εξειδικευμένα ένζυμα που ονομάζονται οξειδοαναγωγάσες. Τα ένζυμα αυτά αποτελούνται από συμπράγοντες που αναλαμβάνουν το ζωτικό ρόλο του 'φυσικού αναγωγικού αντιδραστήριου'. Τα νουκλεοτίδια που περιέχουν διϋδροπυριδίνη, δηλαδή το NADH και το NADPH, είναι οι πιο σημαντικοί συμπράγοντες που χρησιμοποιούνται κατά τις εναντιοεκλεκτικές βιοχημικές αντιδράσεις υδρογόνωσης.



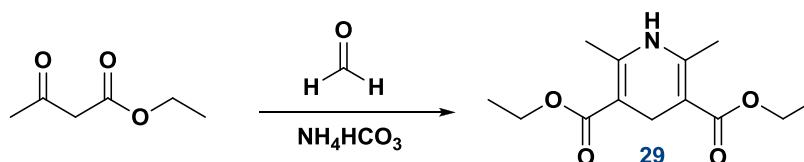
Ανηγμένο νικοτιναμίδο αδενίνο δινουκλεοτίδιο (NADH)

Από χημικής άποψης, μόρια όπως το NADH ενσωματώνουν δύο δομικά χαρακτηριστικά που λειτουργούν συγχρόνως καθιστώντας δυνατή την εκλεκτική μεταφορά του υδριδίου σε ηλεκτρονιόφιλα χημικά είδη. Το τμήμα του νουκλεοτιδίου έχει το ρόλο της μοριακής αναγνώρισης ενώ το τμήμα της διϋδροπυριδίνης (που βρίσκεται δίπλα σε ηλεκτρονιόφιλο) έχει τη δυνατότητα να μεταφέρει ιόντα υδριδίου σε καρβονύλια ή αμίνες^{112,113}.

Οι φυσικές διαδικασίες λαμβάνουν χώρα διαδοχικά, χωρίς να είναι αναγκαίος κανενός είδους ενδιάμεσος διαχωρισμός όπως συνήθως συμβαίνει στο χημικό εργαστήριο. Η υιοθέτηση επομένως βιομημητικών προσεγγίσεων για την ολοκλήρωση μιας σύνθεσης στο εργαστηριακό περιβάλλον αποσκοπεί σε μεγάλο βαθμό στην αξιοποίηση της παραπάνω δυνατότητας.

Ο ΗΕΗ χρησιμοποιείται ως ασφαλές, εύκολο στο χειρισμό, φθηνό και περιβαλλοντικά ακίνδυνο αντιδραστήριο για την αναγωγή οργανικών ενώσεων. Ειδικά στην περίπτωση των α,β -ακόρεστων καρβονυλικών ενώσεων, η εκλεκτική αναγωγή του διπλού δεσμού με τη χρήση του ΗΕΗ και καταλύτη Pd/C ή και οργανοκαταλυτικά έχει εκτενώς μελετηθεί και παρέχει τις επιθυμητές κορεσμένες καρβονυλικές ενώσεις κατ' αποκλειστικότητα^{114,115}.

Η σύνθεση του εστέρα του Hantzsch περιλαμβάνει την αντίδραση συμπύκνωσης της φορμαλδεΐδης με τον ακετοξικό αιθυλεστέρα, παρουσία όξινου ανθρακικού αμμωνίου¹¹⁶ (Σχήμα 41).



Σχήμα 41. Σύνθεση του εστέρα του Hantzsch

3.5 Φασματοσκοπική Μελέτη

Η ταυτοποίηση της δομής των νέων ενώσεων πραγματοποιήθηκε με Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) μίας και δύο διαστάσεων και Φασματοσκοπία Μάζας (ESI – MS και HRMS).

3.6 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού Μίας Διάστασης

Φασματοσκοπική μελέτη κινολινονο-χαλκονών

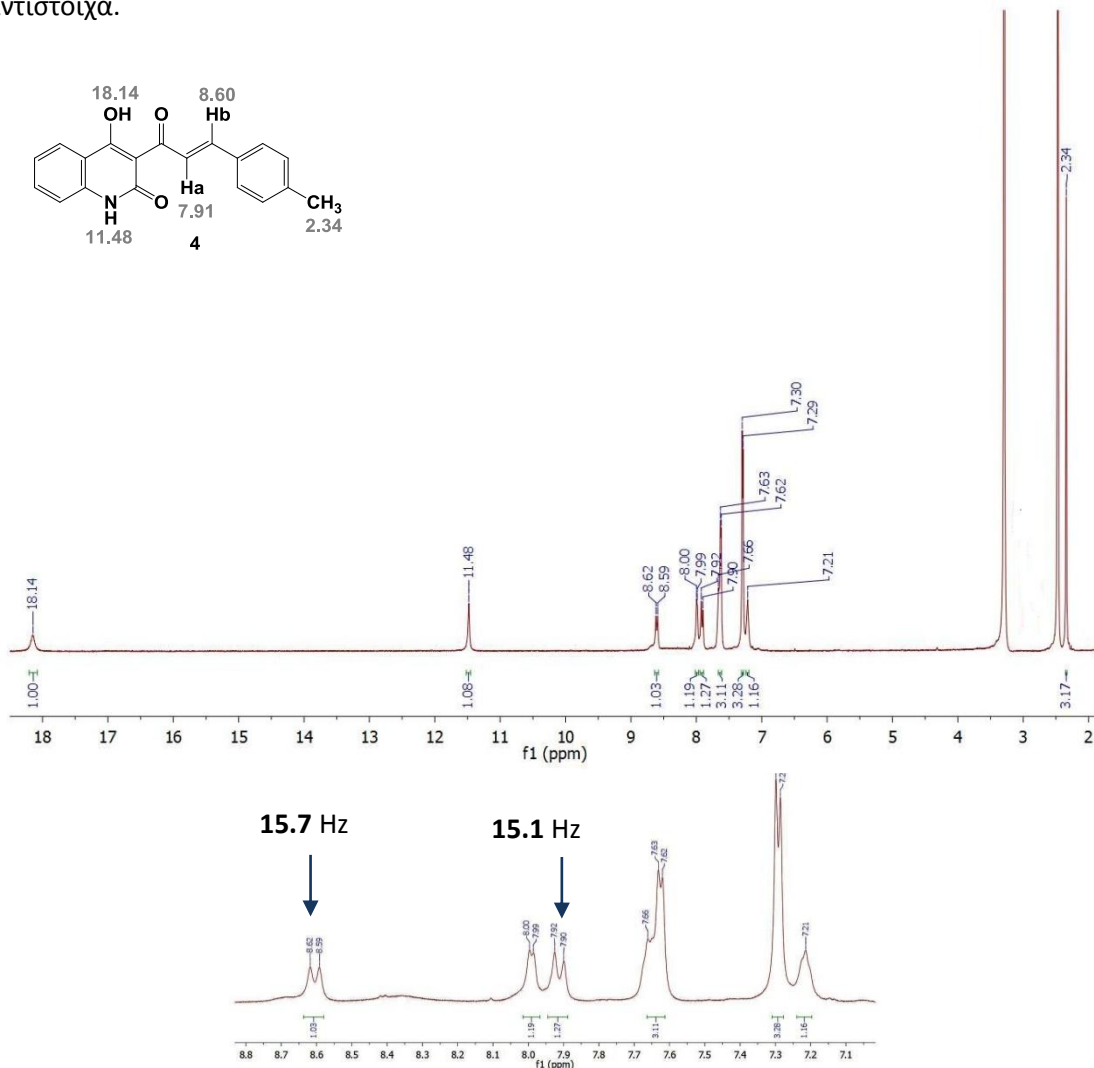
Αρχικά, μελετήθηκαν τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου των κινολινονο-χαλκονών **4-15** σε διαλύτη δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο ($\text{DMSO} - d_6$). Η μειωμένη διαλυτότητα των μορίων σε κοινούς διαλύτες, δυσχεραίνει τη λήψη των φασμάτων ακόμα και σε συνθήκες αυξημένης θερμοκρασίας (60°C), με αποτέλεσμα τον περιορισμό στη λήψη των φασμάτων ^{13}C NMR. Τα φάσματα των αλκυλιωμένων χαλκονών **22-25** ελήφθησαν σε δευτεριωμένο διαλύτη χλωροφόρμιο (CDCl_3).

Οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις των νέων χαλκονών που εμφανίζονται σε όλα τα φάσματα ^1H NMR είναι:

- Η απορρόφηση του πρωτονίου του υδροξυλίου η οποία εμφανίζεται σε χαμηλά μαγνητικά πεδία (17-18ppm) λόγω της ισχυρής ενδομοριακής αλληλεπίδρασης με δεσμό υδρογόνου με το καρβονυλικό οξυγόνο του μορίου.

- ii. Η απορρόφηση των βινυλικών πρωτονίων στην περιοχή 6.5-8ppm, με τη μορφή δύο διπλών κορυφών. Η σταθερά σύζευξης J κυμαίνεται από 12-18 Hz, γεγονός που αποδεικνύει την E γεωμετρία των μορίων.

Ενδεικτικά, στο παρακάτω φάσμα (Εικόνα 10) για το μόριο **4**, φαίνεται τόσο ο συντονισμός του πρωτονίου του υδροξυλίου στα 18.14 ppm, όσο και οι κορυφές των βινυλικών πρωτονίων στα 8.60 και 7.91 ppm, με σταθερές σύζευξης 15.7 Hz και 15.1 Hz αντίστοιχα.



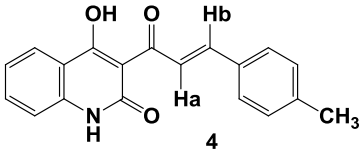
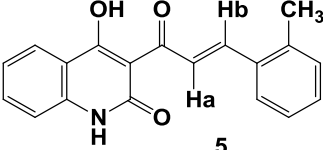
Εικόνα 10. Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, DMSO-d_6) της κινολινο-χαλκόνης **4**

Αξίζει να σημειωθεί, ότι στα φάσματα ^1H όλων των κινολινο-χαλκονών που μελετήθηκαν, η διπλή κορυφή του βινυλικού πρωτονίου H_b εμφανίζεται πάντα σε χαμηλότερο πεδίο από τη διπλή κορυφή του H_a . Το φαινόμενο αυτό, πιθανώς οφείλεται στην πόλωση του διπλού δεσμού από το καρβονύλιο με αποτέλεσμα την ελάττωση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας στη θέση β και αντίστοιχα αύξησή της στη θέση α .¹¹⁷

Μια επιπλέον ενδιαφέρουσα παρατήρηση αφορά στη διαφοροποίηση των σημάτων των βινυλικών πρωτονίων στα φάσματα ^1H NMR των χαλκονών που περιέχουν υποκαταστάτη στη θέση 2 του δακτυλίου B σε σχέση με αυτά των αντίστοιχων χαλκονών που περιέχουν τον ίδιο υποκαταστάτη στη θέση 4 του δακτυλίου B.

Στην περίπτωση των ισομερών κινολινο-χαλκονών **4** και **5**, όπου ο υποκαταστάτης της μέθυλο ομάδας βρίσκεται στη θέση 4 (παρα-θέση) και στη θέση 2 (ορθο-θέση) αντίστοιχα του δακτυλίου Β, τα βινυλικά πρωτόνια εμφανίζονται σε χαμηλότερο πεδίο (υψηλότερη συχνότητα) για το παράγωγο **5** (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Διαφοροποίηση χημικών μετατοπίσεων των βινυλικών πρωτονίων

			$\Delta\delta$ (ppm)
Ha (ppm)	7.85	7.91	0.06
Hb (ppm)	8.62	8.63	0.01

Το φαινόμενο αυτό εμφανίζεται στις περιπτώσεις ορθο-υποκατεστημένων βενζολικών παραγώγων και ονομάζεται 'ορθο-φαινόμενο'.

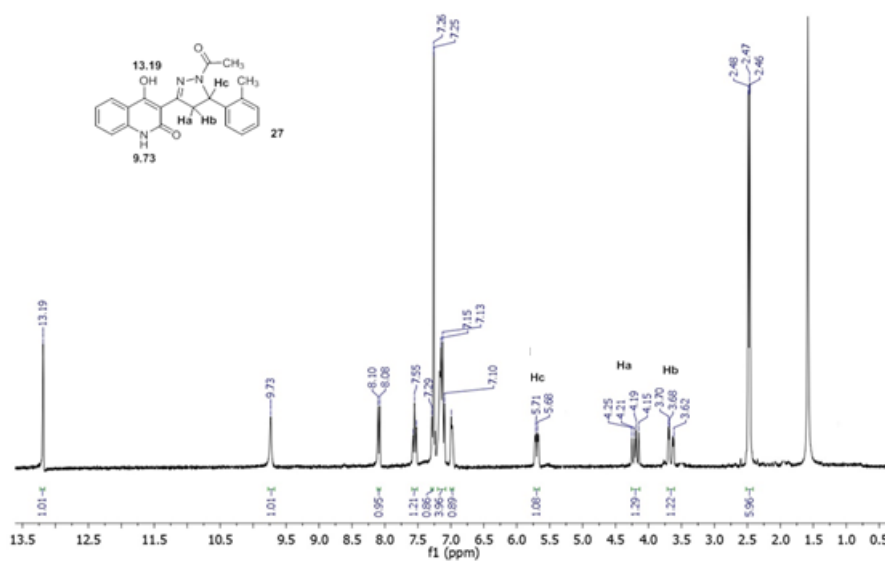
Τα ορθο-υποκατεστημένα βενζόλια είναι πιο πολύπλοκα συστήματα από τα αντίστοιχα μετα- και παρα-υποκατεστημένα. Η εγγύτητα των υποκαταστατών μπορεί να προκαλέσει μεταβολές στις γωνίες, τα μήκη δεσμών και στην επίπεδη δομή του δακτυλίου. Η έκταση της επίδρασης του 'ορθο-φαινομένου' εξαρτάται από τις ιδιότητες του υποκαταστάτη. Το 'ορθο-φαινόμενο' επηρεάζει με τους εξής τρόπους¹¹⁸:

- ηλεκτρονικά φαινόμενα, τα οποία εμφανίζονται επιπρόσθετα των συνήθων ηλεκτρονικών φαινομένων του υποκαταστάτη και διακρίνονται σε εντοπισμένα και σε φαινόμενα συντονισμού.
- στερεοχημικά φαινόμενα, τα οποία είναι συνάρτηση του όγκου και του μεγέθους του υποκαταστάτη
- ενδομοριακοί δεσμοί, οι οποίοι περιλαμβάνουν τους δεσμούς υδρογόνου, τις αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου και μεταφοράς φορτίου

Φασματοσκοπική μελέτη πυραζολινονών

Τα φάσματα των πυραζολινονών **26** – **28** ελήφθησαν σε δευτεριωμένο διαλύτη χλωροφόρμιο (CDCl_3). Η τελική δομή των νέων πυραζολινικών αναλόγων, προσδιορίζεται από τις τρεις χαρακτηριστικές διπλές διπλών κορυφές των πρωτονίων H_a , H_b και H_c , στην περιοχή 3.6 – 5.7 ppm, οι οποίες ολοκληρώνονται για 1H η κάθε μία, καθώς και από την απουσία των χαρακτηριστικών διπλών κορυφών των βινυλικών πρωτονίων στην αρωματική περιοχή του φάσματος (Εικόνα 11). Η παρουσία των τριών αυτών κορυφών, οφείλεται στο ότι ο μεθυλενικός άνθρακας του πυραζολινικού δακτυλίου, βρίσκεται δίπλα σε ασύμμετρο κέντρο, με αποτέλεσμα τα πρωτόνια H_a και H_b να είναι διαστερεοτοπικά και συνεπώς χημικά μη ισοδύναμα.

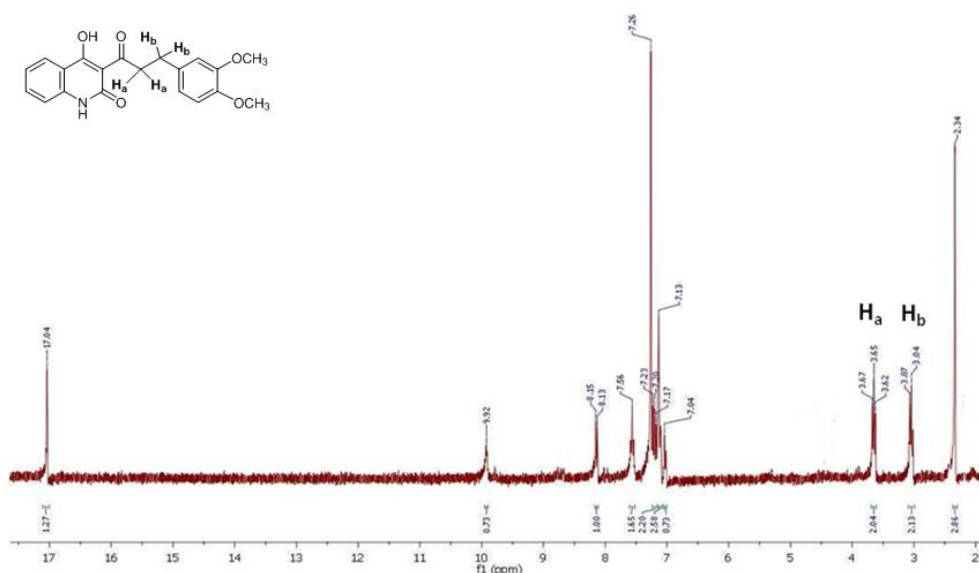
Επιπλέον, η απορρόφηση του πρωτονίου του υδροξυλίου, εμφανίζεται σε υψηλότερα μαγνητικά πεδία (13 ppm) σε σύγκριση με την αντίστοιχη απορρόφηση των κινολινο-χαλκονών (17-18ppm), εξαιτίας της απουσίας του δεσμού υδρογόνου με το καρβονυλικό οξυγόνο των μορίων των χαλκονών, με αποτέλεσμα την αύξηση της ηλεκτρονικής πυκνότητας γύρω από το πρωτόνιο και τον συντονισμό του σε χαμηλότερες συχνότητες.



Εικόνα 11. Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) της πυραζολίνης **27**

Φασματοσκοπική μελέτη διϋδρο-χαλκονών

Τα φάσματα των των διϋδροκινολινο-χαλκονών **30** – **33** ελήφθησαν σε δευτεριωμένο διαλύτη χλωροφόρμιο (CDCl_3). Οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις των νέων αναλόγων που προσδιορίζουν τη τελική δομή τους, είναι οι δύο τριπλές κορυφές στην περιοχή των 3.04-3.64 ppm, που ολοκληρώνονται για 2H η κάθε μία και οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια H_a και H_b , χωρίς πλέον να παρατηρούνται οι δυο χαρακτηριστικές διπλές κορυφές των βινυλικών πρωτονίων στην αρωματική περιοχή του φάσματος (Εικόνα 12).



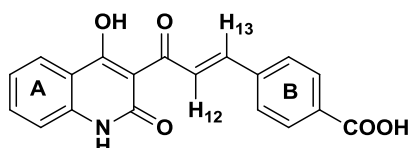
Εικόνα 12. Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) της διϋδροκινολινο-χαλκονής **30**

3.7 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού Δύο Διαστάσεων

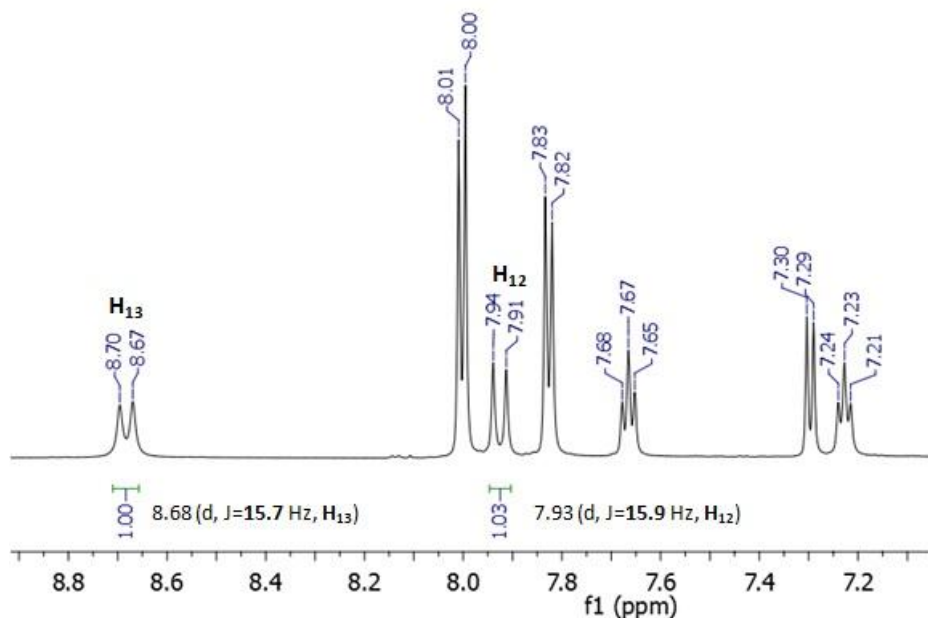
Από τα συνολικά μόρια που συντέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν με NMR 1D, επιλέχθηκε το παράγωγο **13** (Σχήμα 42), για την πλήρη ταυτοποίησή του με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού δύο διαστάσεων ομοπυρηνικού (COSY, NOESY) και ετεροπυρηνικού συσχετισμού (HSQC, HMBC).

3.7.1 Στρατηγική ταυτοποίησης της 4-υδροξυ-3-[3-(4-καρβοξυλφαινυλο)-1-οξο-2-προπεν-1-υλο]-2(1H)-κινολινόνης

Αρχικά, από τις χαρακτηριστικές απορροφήσεις στην αρωματική περιοχή του φάσματος μίας διάστασης ^1H , ταυτοποιήθηκαν τα βινυλικά πρωτόνια του μορίου (Εικόνα 13). Οι δύο διπλές κορυφές που συντονίζονται στα 8.68 και 7.93 ppm αντίστοιχα, ολοκληρώνονται για 1H η κάθε μία, με σταθερές σύζευξης 15.7 Hz και 15.9 Hz. Εξαιτίας της πόλωσης του διπλού δεσμού από το καρβονύλιο του μορίου όπως προαναφέρθηκε, η διπλή κορυφή του βινυλικού πρωτονίου H-13 συντονίζεται στα 8.67 ppm (χαμηλότερο πεδίο), ενώ του H-12 στα 7.93 ppm.



Σχήμα 42. Χημική δομή του παραγώγου **13**



Εικόνα 13. Τμήμα φάσματος πρωτονίου ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) της κινολινονο – χαλκόνης **13**

Φάσματα ομοπυρηνικού συσχετισμού δύο διαστάσεων

Nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY)

Από το ομοπυρηνικό φάσμα δύο διαστάσεων NOESY για το παράγωγο **13**, συσχετίζονται οι αλληλεπιδράσεις των πρωτονίων μέσω του χώρου. Σήμα NOESY αναμένεται μεταξύ του H – 13 και των H – 15/H – 20. Πράγματι, η διπλή κορυφή στα 8.68 ppm που ολοκληρώνεται για 2H, δίνει σήμα NOESY με το H – 13 και ανήκει στα μαγνητικώς ισοδύναμα H – 15/H – 20 (Εικόνα 14).

Correlation spectroscopy (COSY)

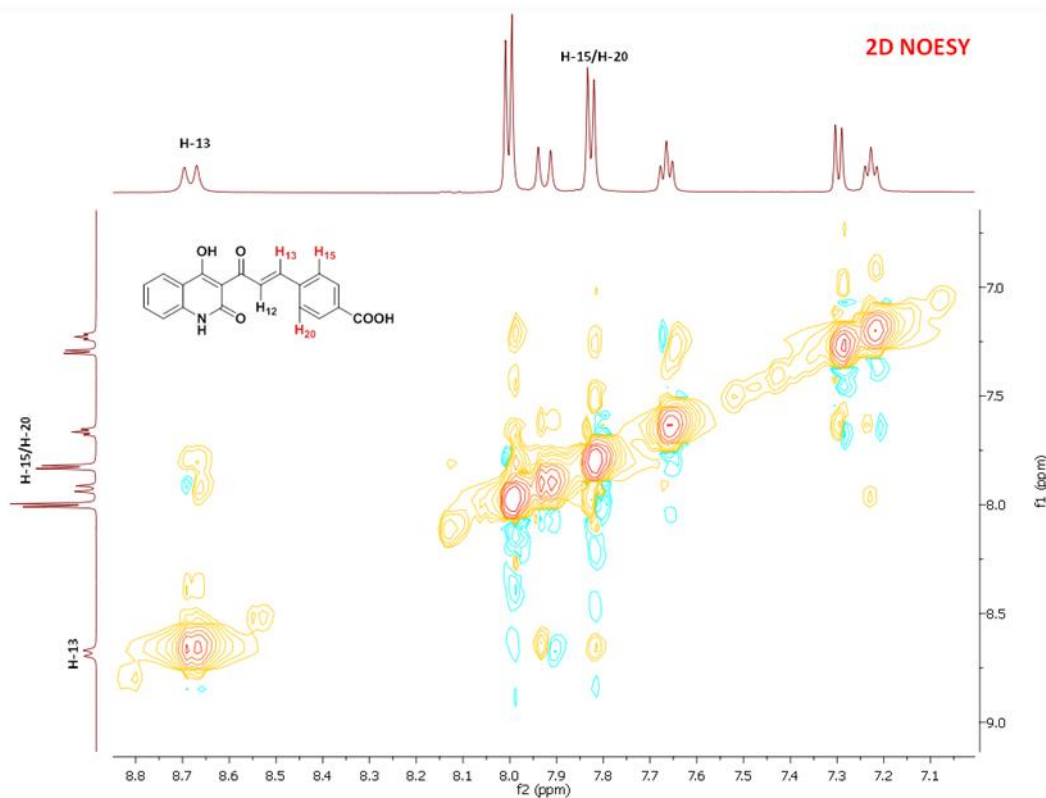
Από το φάσμα δύο διαστάσεων COSY για το παράγωγο **13**, αντήσαμε πληροφορίες για το γειτονικό περιβάλλον μέσω δεσμών του παρακολουθούμενου πυρήνα, δηλαδή ποιοι ομοειδείς πυρήνες παρουσιάζουν μεταξύ τους σύζευξη spin-spin μέσω ομοιοπολικών δεσμών. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν οι συζεύξεις των πρωτονίων H – 1, H – 2, H – 5, H – 6, H – 12, H – 13, H – 15/H – 20 και H – 16/H – 19 (Εικόνα 15).

Η ταυτοποίηση των πρωτονίων του δακτυλίου A, ξεκίνησε με τη βοήθεια του προγράμματος πρόβλεψης του λογισμικού M – Nona και με βάση τη πολλαπλότητα των κορυφών. Η διπλή κορυφή στα 7.3 ppm της οποίας η ολοκλήρωση είναι για 1H, αποδίδεται στο H – 5.

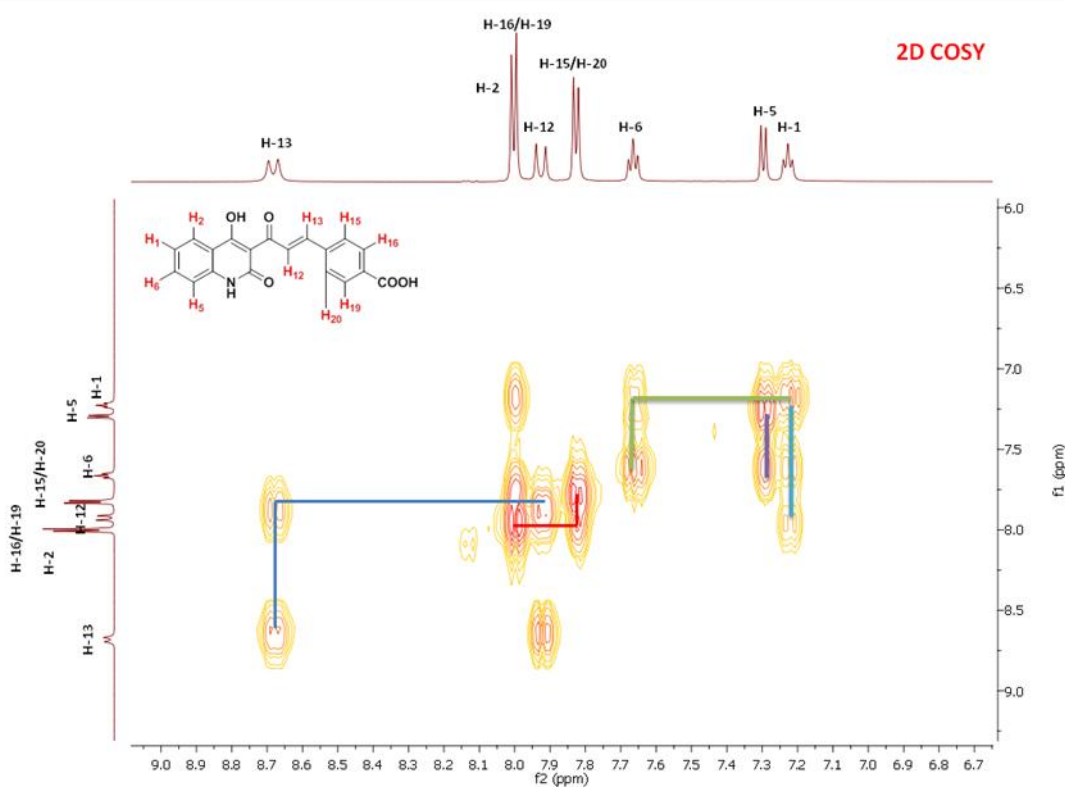
Σήμα COSY του H – 5, με την τριπλή κορυφή στα 7.67 ppm αποδίδει την τελευταία στο H – 6. Με την ίδια λογική των σημάτων COSY, ταυτοποιούνται τα H – 1 και H – 2 στα 7.23 και 8.00 ppm αντίστοιχα.

Από το φάσμα 2D COSY παρατηρήθηκε επίσης συσχέτιση μέσω δεσμού του H – 15/H – 20 με τη διπλή κορυφή στα 8.0 ppm, η οποία ταυτοποιείται για τα H – 16/H – 19. Επειδή όμως η ολοκλήρωση της κορυφής αυτής είναι 3, υπολείπεται άλλο ένα πρωτόνιο.

Οι απορρόφησεις του ενολικού, του αμιδικού και του καρβοξυλικού υδρογόνου δεν δίνουν 2D σήματα, εξαιτίας του διαμοριακού δεσμού υδρογόνου με το δευτεριωμένο διαλύτη DMSO – d₆.



Εικόνα 14. Φάσμα 2D NOESY της κινολινονο – χαλκόνης 13



Εικόνα 15. Φάσμα 2D COSY της κινολινονο – χαλκόνης 13

Φάσματα ετεροπυρηνικού συσχετισμού δύο διαστάσεων

Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)

Από το ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC αποδόθηκαν οι ετεροπυρηνικές συζεύξεις μεταξύ των πρωτονίων και των ανθράκων με τους οποίους υπάρχει μεταξύ τους απευθείας σύνδεση (Εικόνα 16).

Η κορυφή στα 7.23 ppm που αποδίδεται στο H-1 δίνει σήμα HSQC με τη κορυφή στα 122.7 ppm οπότε η τελευταία αποδίδεται στο C1. Ομοίως μέσω του πειράματος HSQC ταυτοποιούνται και οι C2, C5, C6, C12, C13, C15/C20, C16/C19 στα 125.6, 116.3, 135.6, 127.2, 143.0, 128.9 και 130.3 ppm αντίστοιχα.

Heteronuclear Multiple Bond Coherence (HMBC)

Η ταυτοποίηση των τεταρτοταγών ανθράκων του μορίου, έγινε μέσω του πειράματος 2D HMBC όπου παρατηρείται ετεροπυρηνικός συσχετισμός άνθρακα με τα υδρογόνα των γειτονικών ανθράκων (Εικόνα 17).

Η κορυφή στα 114.4 ppm αποτιμάται για τον C3 επειδή δίνει σήμα HMBC με τις κορυφές στα 7.23 και 7.3 ppm που αποδίδονται στα πρωτόνια H – 1 και H – 5. Ομοίως η κορυφή στα 141.1 ppm αποτιμάται για τον C4 επειδή δίνει σήμα HMBC με τις κορυφές στα 8.00 και 7.67 ppm που αποδίδονται στα πρωτόνια H – 2 και H – 6.

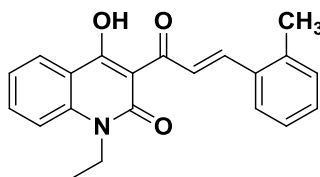
Η απορρόφηση του C11 αναμένεται σε χαμηλό μαγνητικό πεδίο, άρα υψηλότερα στην κλίμακα ppm, και όντως η κορυφή στα 193.3 ppm εξαιτίας του σήματος HMBC με το H – 13 αποτιμάται για τον C11.

Στα 139.2 ppm αποδίδεται ο C14, εξαιτίας των σημάτων HMBC που δίνει με τις κορυφές 8.67 και 8.00 ppm οι οποίες αποδίδονται στα H – 12 και H – 16/H – 19.

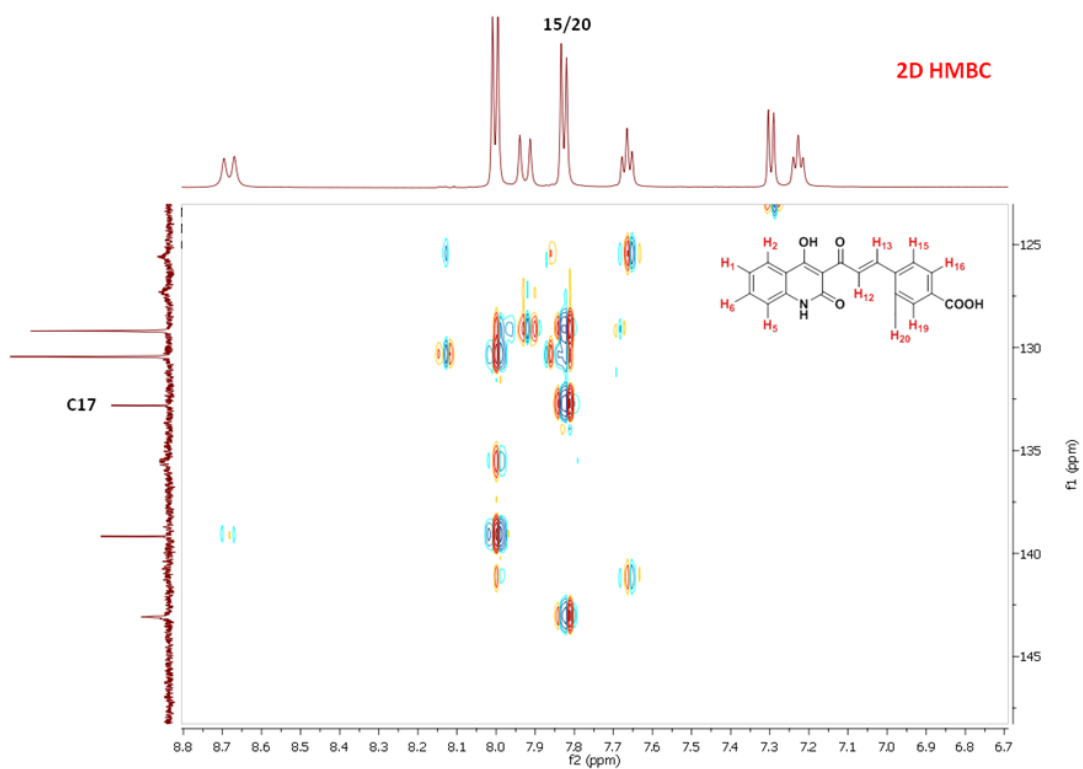
Σήμα HMBC με τα H – 16/H – 19 δίνει ο καρβοξυλικός άνθρακας C18 και αποδίδεται στα 167.1 ppm. Ομοίως ταυτοποιείται και ο C17 στα 132.7 ppm λόγω σήματος HMBC με τα H – 15/H – 20.

Σήμα HMBC δίνεται με τις κορυφές στα 8.00 και 7.23 ppm που έχουν αποδοθεί στα H – 1 και H – 2, με την κορυφή στα 177.6 ppm όπου και ταυτοποιείται για τον C7. Ο C9 απορροφά στην ίδια χημική μετατόπιση με τον C18, δηλαδή στα 167.1 ppm και αυτό εξακριβώνεται λόγω του ισχυρού σήματος HMBC που δίνει με το H – 2.

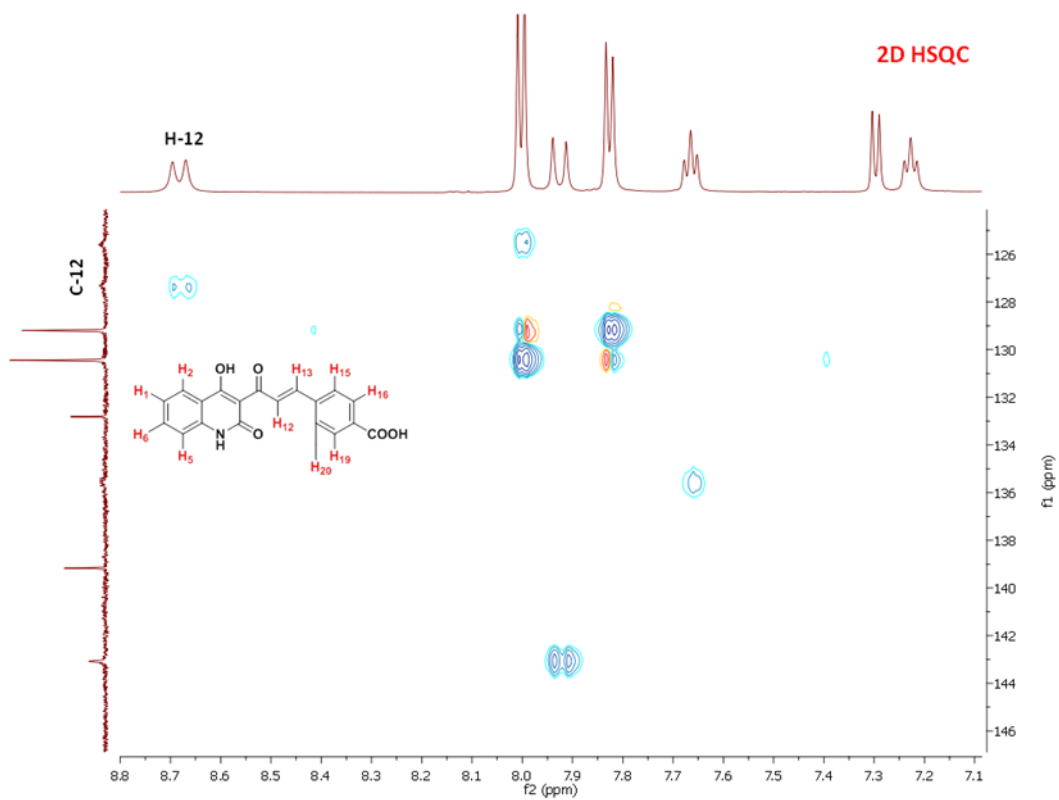
Η ταυτοποίηση του C10 έγινε με τη παράλληλη φασματοσκοπική μελέτη άλλου μορίου παρόμοιας δομής (Σχήμα 43), σε δευτεριωμένο διαλύτη χλωροφορμίου (CDCl₃) λόγω καλύτερης διαλυτότητας. Ως αποτέλεσμα, υποβοηθήθηκε η σταθεροποίηση του ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου του πρωτονίου του υδροξυλίου με το καρβονύλιο, έτσι ώστε να παρατηρηθεί η απορρόφηση του εν λόγω πρωτονίου στα 17.88 ppm. Σήμα HMBC του πρωτονίου του υδροξυλίου με την κορυφή στα 110.59 ppm αποδίδει την τελευταία στον άνθρακα C10.



Σχήμα 43. Χημική δομή παραγώγου 22



Εικόνα 16. Φάσμα 2D HSQC της κινολινονο – χαλκόνης 13



Εικόνα 17. Φάσμα 2D HMBC της κινολινονο-χαλκόνης 13

Συγκεντρωτικά, η αποτίμηση των κορυφών ^1H και ^{13}C του μορίου **13** παρουσιάζεται στον παρακάτω Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Απορροφήσεις ^1H και ^{13}C NMR του μορίου **13**

Άτομα	Πρόβλεψη Απορροφήσεων ^1H (ppm)	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)
1	7.32	7.23 t(7.5Hz)	122.7
2	7.67	8.0 d(8.2 Hz)	125.6
3	-	-	114.4
4	-	-	141.1
5	7.46	7.3 d(8.2 Hz)	116.3
6	7.50	7.67 t(7.5 Hz)	135.6
7	-	-	177.6
NH(8)	-		
9	-	-	167.1
10	-	-	
11	-	-	193.3
13	8.06	7.93 d(15.9 Hz)	143
12	7.30	8.67 d(15.9 Hz)	127.2
14	-	-	139.2
15/20	7.75	7.83 d(8.2 Hz)	128.9
16/19	8.00	8.00 d(8.2 Hz)	130.3
17	-	-	132.7
18	-	-	167.1

Κεφάλαιο 4^ο

Αποτελέσματα και Συζήτηση

4.1 Βιοδοκιμασίες

Στην εργασία αυτή σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν νέα παράγωγα με σκοπό να συνδυαστούν σε ένα υβριδικό μόριο τα δομικά χαρακτηριστικά της κινολιόνης και της χαλκόνης. Τα παράγωγα αυτά ελέχθησαν για πιθανή αντιπαρασιτική δράση έναντι της Σπλαχνικής Λεισμανίασης (Visceral Leishmaniasis) και της Αφρικανικής Τρυπανοσωμίας (Human African Trypanosomiasis - HAT).

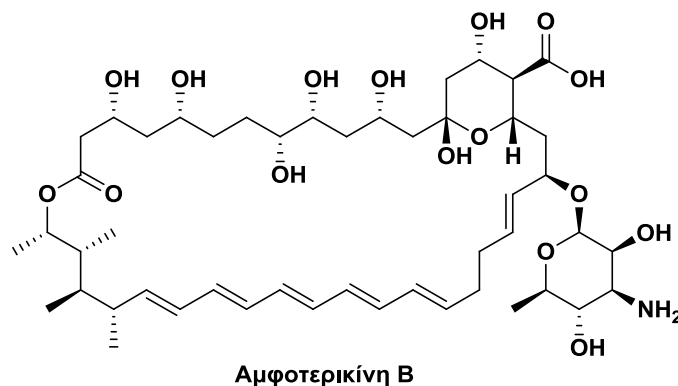
Όλα τα φαρμακολογικά και βιολογικά αποτελέσματα εκφράστηκαν με τη βοήθεια του δείκτη IC_{50} (μM) (Inhibition Concentration) ο οποίος εκφράζει τη συγκέντρωση των κινολινών-χαλκονών η οποία απαιτείται για να επιτευχθεί 50% αναστολή της δράσης του εκάστοτε παρασίτου, και καθορίστηκε με γραμμική ανάλυση μεταβολής (linear regression analysis).

4.2 Αντιπαρασιτική Δράση έναντι της Σπλαχνικής Λεισμανίασης

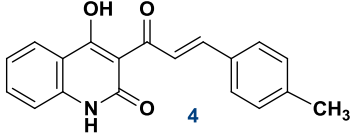
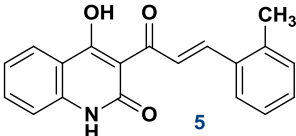
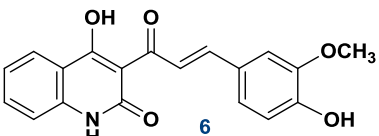
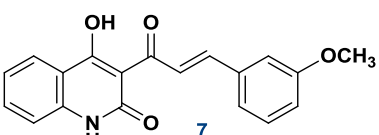
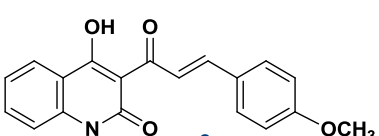
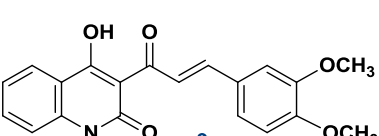
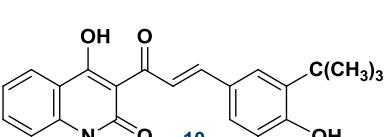
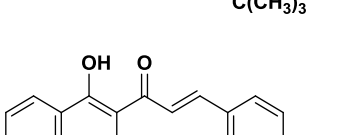
Τα βιολογικά πειράματα για την εκτίμηση της πιθανής φαρμακευτικής δράσης των νέων παραγώγων, πραγματοποιήθηκαν με *in vitro* μεθόδους στο Ινστιτούτο Μοριακής - Κυτταρικής Βιολογίας και στο Τμήμα Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου του Πόρτο, στην Πορτογαλία (Instituto de Biologia Molecular e Celular and Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto) από τη Δρ Sofia Costa Lima και την καθηγήτρια Anabela Cordeiro da Silva. Η συνεργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος COST Action CM0801 "New drugs for neglected diseases".

Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της αντιπαρασιτικής δράσης έναντι της ενδοκυτταρικής μορφής του παρασίτου *L.infantum* και της κυτταροτοξικότητας των συνολικά 14 κινολινο-χαλκονών (**4-15**, **22**, **23**) και των δύο κινολινονών (**3**, **18**) που εξετάστηκαν, παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

Η ένωση αναφοράς για τη μελέτη της αντιπαρασιτικής δράσης έναντι της σπλαχνικής λεισμανίασης είναι η Αμφοτερικίνη Β με $IC_{50} = 2 \mu M$.

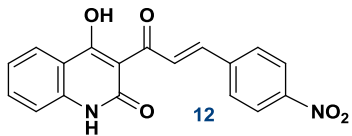
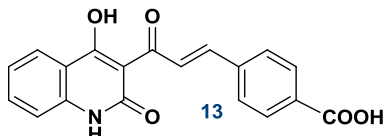
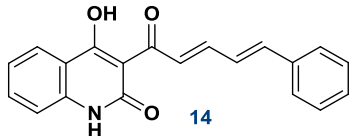
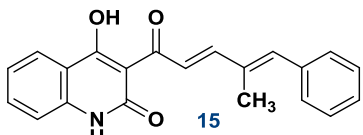
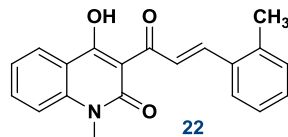
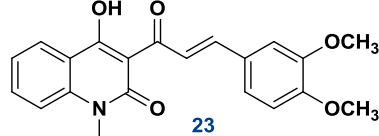
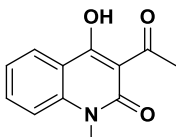
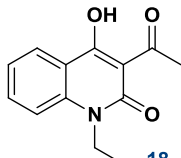


Πίνακας 5. Αντιπαρασιτική Δράση έναντι του παρασίτου *Leishmania infantum*

Ένωση	Αναστολή της ανάπτυξης της ενδοκυτταρικής μορφής του παρασίτου <i>L.infantum</i> IC ₅₀ (μΜ)	Τοξικότητα έναντι των κυττάρων THP1* IC ₅₀ (μΜ)
	2.08 ± 0.64	>50
	>50	>30
	11.45 ± 1.74	≈20
	28.35 ± 3.51	>30
	12.68 ± 2.97	>50
	7.52 ± 2.64	>30
	1.27 ± 0.09	≈10
	3.13 ± 0.95	>50

*Αξιολόγηση ύστερα από 48 ώρες επώασης

Πίνακας 5 (συνέχεια). Αντιπαρασιτική Δράση έναντι του παρασίτου *Leishmania infantum*

Ένωση	Αναστολή της ανάπτυξης της ενδοκυτταρικής μορφής του παρασίτου <i>L.infantum</i> IC ₅₀ (μM)	Τοξικότητα έναντι των κυττάρων THP1* IC ₅₀ (μM)
	26.84 ± 4.61	>50
	18.36 ± 6.16	>50
	>50	>50
	20.02 ± 6.63	>50
	24.78 ± 3.87	>50
	>50	>50
	2.98 ± 0.84	>50
	25.34 ± 4.72	>50

*Αξιολόγηση ύστερα από 48 ώρες επώασης

Όσον αφορά στην κυτταροτοξικότητα, από τον Πίνακα 4 φαίνεται ότι η πλειοψηφία των υπό εξέταση ενώσεων δεν παρουσιάζουν κυτταροτοξική δράση έναντι των κυττάρων THP1, με εξαίρεση τις ενώσεις **6** και **10**. Επίσης πρέπει να σημειωθεί ότι οι τιμές της

κυτταροτοξικότητας δεν ήταν δυνατό να προσδιοριστούν επακριβώς λόγω της μειωμένης διαλυτότητας των μορίων.

Μεταξύ των κινολινονο – χαλκονών **4-15**, **22** και **23** που αξιολογήθηκαν έναντι της αμαστιγωτής μορφής του παρασίτου *Leishmania infantum*, τη βέλτιστη δράση συνοδευόμενη από χαμηλή κυτταροτοξικότητα παρουσίασαν τα παράγωγα **4** ($IC_{50} = 2.08 \pm 0.64 \mu M$) και **11** ($IC_{50} = 3.13 \pm 0.95 \mu M$), που περιέχουν μεθυλο- και τριφθορομεθυλο-ομάδα σε θέση παρα- του δακτυλίου B, αντίστοιχα. Ειδικά η χαλκόνη **4** εμφανίζει δράση συγκρίσιμη με αυτή της αμφοτερικίνης ($IC_{50} = 2 \mu M$).

Η θέση του υποκαταστάτη στο δακτύλιο B φαίνεται πως επηρεάζει τη δράση, καθώς το παράγωγο **5**, στο οποίο η μέθυλο ομάδα βρίσκεται σε όρθο θέση, δεν εμφανίζει αξιόλογη δράση ($IC_{50} > 50 \mu M$).

Από τη Σειρά A των νέων μορίων που διαθέτουν ομάδες-δότες ηλεκτρονίων, τα παράγωγα **6 – 9** διαθέτουν ως κοινό δομικό χαρακτηριστικό την παρουσία μίας ή περισσότερων μεθοξυ-ομάδων στο δακτύλιο B παρουσιάζουν σαφείς διαφορές όσον αφορά στην αντιπαρασιτική τους δράση. Συγκεκριμένα, η χαλκόνη **7**, που περιέχει μεθοξυ-ομάδα σε θέση μετα- του δακτυλίου B δεν παρουσιάζει αξιόλογη αντιπαρασιτική δράση ($IC_{50} = 28.35 \pm 3.51 \mu M$). Η αλλαγή της θέσης της μεθοξυ-ομάδας σε θέση παρα- (χαλκόνη **8**) βελτιώνει τη δράση ($IC_{50} = 12.68 \pm 2.97 \mu M$) ενώ παράλληλα ελαττώνει την κυτταροτοξικότητα. Επίσης, η προσθήκη μιας επιπλέον μεθοξυ ομάδας στο δακτύλιο B (χαλκόνη **9**) έχει ως αποτέλεσμα την περαιτέρω βελτίωση της αντιπαρασιτικής δράσης ($IC_{50} = 7.52 \pm 2.64 \mu M$) σε σχέση με τη χαλκόνη **8**. Τέλος, η προσθήκη μιας ομάδας υδροξυλίου με την ταυτόχρονη διατήρηση της μεθοξυ-ομάδας στη θέση μετα- του δακτυλίου B οδηγεί στη χαλκόνη **6**, η οποία εμφανίζει παρόμοια δράση με τη χαλκόνη **8** αλλά σχετικά αυξημένη κυτταροτοξικότητα ($IC_{50} = 11.45 \pm 1.74 \mu M$). Από τα παραπάνω φαίνεται ότι ο αριθμός και η θέση των μεθοξυ-ομάδων παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιπαρασιτική δράση των μορίων που μελετήθηκαν.

Το παράγωγο **10** υποκατεστημένο στις θέσεις 3 και 5 με tert-βουτυλο-ομάδες και στη θέση 4 με υδροξυ-ομάδα παρουσίασε την καλύτερη αναστολή του παρασίτου από το σύνολο των νέων χαλκονών ($IC_{50} = 1.27 \pm 0.09 \mu M$), εμφανίζοντας όμως μια σημαντικά αυξημένη κυτταροτοξική δράση ($IC_{50} \approx 10 \mu M$) και για το λόγο αυτό δε συμπεριλαμβάνεται στα πιθανά μόρια-οδηγούς για περαιτέρω ανάπτυξη. Τα αποτελέσματα της μελέτης της κυτταροτοξικής δράσης των μορίων **6** και **10** δείχνουν ότι η παρουσία ομάδας υδροξυλίου στο δακτύλιο B αυξάνει την κυτταροτοξικότητα.

Από τη Σειρά B των νέων μορίων, που περιέχουν ομάδες-δέκτες ηλεκτρονίων, μόνο το παράγωγο **11** με υποκαταστάτη μια CF_3 ομάδα στην πάρα θέση του δακτυλίου B, εμφάνισε την καλύτερη δράση ($IC_{50} = 3.13 \pm 0.95 \mu M$) χωρίς να είναι κυτταροτοξικό ($IC_{50} > 50 \mu M$). Στην περίπτωση των ενώσεων της Σειράς B φαίνεται ότι η φύση του υποκαταστάτη-δέκτη ηλεκτρονίων (CF_3 , NO_2 και $COOH$) παίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση αξιόλογης αντιπαρασιτικής δράσης.

Το σύστημα εκτεταμένης συζυγίας των παραγώγων **14** και **15** της Σειράς Γ, δεν έδειξε να δραματίζει κάποιο ρόλο στην αντιπαρασιτική δράση των μορίων, καθώς τα τελευταία δεν εμφάνισαν σημαντική αναστολή του παρασίτου.

Οι αλκυλιωμένες χαλκόνες **22** και **23** της Σειράς Δ δεν παρουσίασαν αξιόλογη δράση με την παρούσα μέθοδο. Η σύγκριση της δράσης της μη αλκυλιωμένης χαλκόνης **9** ($IC_{50} = 7.52 \pm 2.64 \mu M$) με την αντίστοιχη τροποποιημένη χαλκόνη **23** ($IC_{50} > 50 \mu M$) που περιέχει αιθυλο-

ομάδα στο αμιδικό άζωτο, δείχνει ότι η αλκυλίωση οδηγεί σε πλήρη απώλεια της δράσης του παραγώγου. Αντίθετα, στην περίπτωση των χαλκονών **5** ($IC_{50} > 50 \mu M$) και **22** ($IC_{50} = 24.78 \pm 3.87 \mu M$) η αλκυλίωση του αμιδικού αζώτου φαίνεται να βελτιώνει σχετικά την αντιλεϊσμανιακή δράση.

Συμπερασματικά, η ομάδα N – H του ετεροκυκλικού δακτυλίου της κινολινόνης είναι απαραίτητη προϋπόθεση ώστε να καθιστά τα εν λόγω μόρια ικανά να δρουν ως αντιπαρασιτικά, πιθανόν γιατί το αμιδικό υδρογόνο συμμετέχει στο μηχανισμό αναστολής της δράσης των παρασίτων. Αυτό ενισχύεται και από την αξιολόγηση της αντιλεϊσμανιακής δράσης των δύο κινολινονών **3** και **18**, καθώς η 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2-κινολινόνη **3** με ελεύθερο το αμιδικό άζωτο παρουσίασε αξιόλογη δράση ($IC_{50} = 2.98 \pm 0.84 \mu M$) ενώ η αντίστοιχη 3-ακετυλο-1-αιθυλ-4-υδροξυ-2-κινολινόνη **18** εμφανίζει σημαντικά μειωμένη δράση ($IC_{50} = 25.34 \pm 4.72 \mu M$).

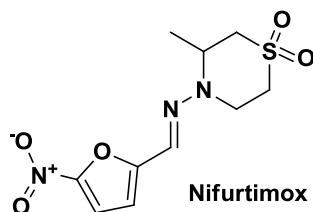
Τα μόρια που μελετήθηκαν δεν αναστέλλουν την ανάπτυξη της προμαστιγωτής μορφής του *Leishmania infantum*, σε συγκεντρώσεις έως $100 \mu M$.

4.3 Αντιπαρασιτική Δράση έναντι της Αφρικανικής Τρυπανοσωμίας

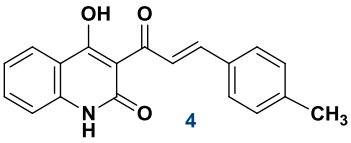
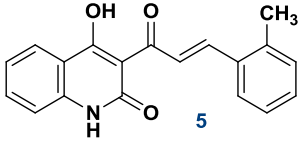
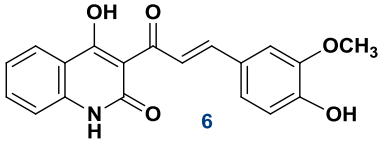
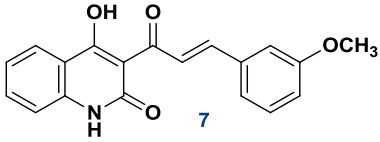
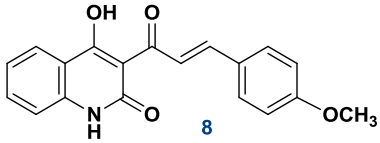
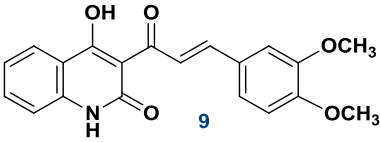
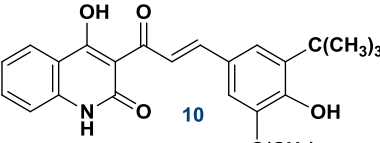
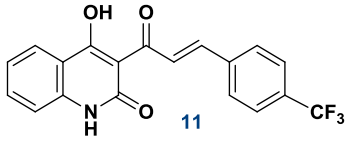
Τα βιολογικά πειράματα για την εκτίμηση της πιθανής φαρμακευτικής δράσης των νέων παραγώγων έναντι του παρασίτου που προκαλεί την ασθένεια του Ύπνου, πραγματοποιήθηκαν με *in vitro* μεθόδους στη σχολή Βιολογικών και Χημικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Queen Mary του Λονδίνου (School of Biological and Chemical Sciences, Queen Mary University of London) από τη Dr Belinda Hall και τον καθηγητή Shane Wilkinson.

Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της αντιπαρασιτικής δράσης και της κυτταροτοξικότητας των συνολικά 14 κινολινονο – χαλκόνων (**4-15**, **22**, **23**) και των 2 κινολινονών (**3**, **18**) που εξετάστηκαν, παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.

Στη συγκεκριμένη βιοδοκιμασία χρησιμοποιήθηκε ως ένωση αναφοράς το Nifurtimox με $IC_{50} = 2.89 \pm 0.33 (\mu M)$. Η ένωση αυτή πρόσφατα ξεκίνησε να χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της Αφρικανικής Τρυπανοσωμίας (βλ. Κεφάλαιο 1, Παρ.1.4.3).

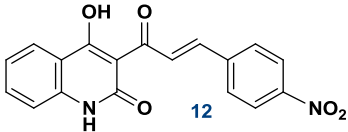
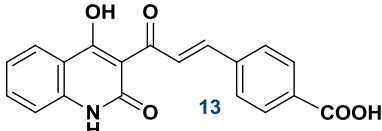
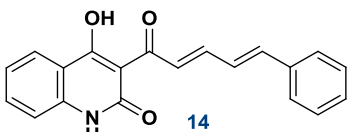
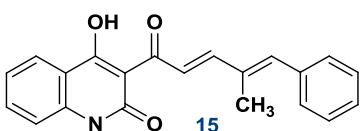
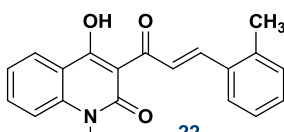
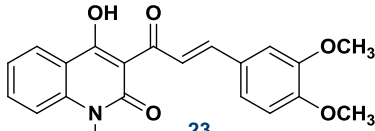
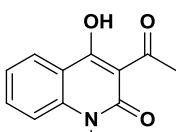
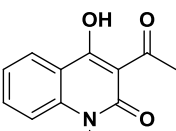


Πίνακας 6. Αντιπαρασιτική Δράση έναντι του παρασίτου *Trypanosoma Brucei*

Ένωση	Αναστολή ανάπτυξης <i>T.brucei</i> στη ροή αίματος IC ₅₀ (μΜ)	Τοξικότητα έναντι των κυττάρων THP1 IC ₅₀ (μΜ)
	>10	>50 ^a
	2.6 ± 0.1	>30 ^b
	4.9 ± 0.1	≈20 ^b
	6.5 ± 0.1	>30 ^b
	>10	>50 ^a
	4.9 ± 0.2	>30 ^b
	3.3 ± 0.1	≈10 ^b
	>10	>50 ^a

^a Αξιολόγηση ύστερα από 48 ώρες επώασης^b Αξιολόγηση ύστερα από 72 ώρες επώασης

Πίνακας 6 (συνέχεια). Αντιπαρασιτική Δράση έναντι του παρασίτου *Trypanosoma Brucei*

Ένωση	Αναστολή ανάπτυξης <i>T.brucei</i> στη ροή αίματος IC ₅₀ (μM)	Τοξικότητα έναντι των κυττάρων THP1* IC ₅₀ (μM)
	>10	>50 ^a
	>10	>50 ^a
	>10	>50 ^a
	>10	>50 ^a
	>10	>50 ^b
	>10	>50 ^b
	>10	>50 ^b
	>10	>50 ^b

^a Αξιολόγηση ύστερα από 48 ώρες επώασης^b Αξιολόγηση ύστερα από 72 ώρες επώασης

Μια συνολική εκτίμηση της αντιπαρασιτικής δράσης των κινολινονο – χαλκονών **4-15**, έναντι του παρασίτου *Trypanosoma brucei*, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ύπαρξη ομάδων δοτών ηλεκτρονίων στον δακτύλιο Β, ευνοεί τη δράση των μορίων. Συγκεκριμένα, η χαλκόνη **5**, που διαθέτει μεθυλο-ομάδα σε θέση ορθο- του δακτυλίου Β εμφανίζει τη βέλτιστη δράση ($IC_{50} 2.6 \pm 0.1$) από όλες τις ενώσεις που εξετάστηκαν. Το παράγωγο **4** με τη μέθυλο ομάδα σε πάρα θέση του δακτυλίου Β, είχε ελαττωμένη δράση ($IC_{50} >10 \mu M$) συγκριτικά με την ισομερή χαλκόνη **5** ($IC_{50} = 2.6 \pm 0.1 \mu M$).

Η θέση και ο αριθμός των μεθοξυ-ομάδων στο δακτύλιο Β επηρεάζει την αντιτρυπανοσωμιακή δράση των κινολινονο-χαλκονών: η ένωση **8** με τη μεθοξυ-ομάδα σε παρα- θέση δεν παρουσιάζει αξιόλογη δράση ($IC_{50} >10 \mu M$) ενώ η ισομερής χαλκόνη **7** έχει σχετικά βελτιωμένη δράση ($IC_{50} = 6.5 \pm 0.1 \mu M$). Η παρουσία δύο μεθοξυ-ομάδων οδηγεί στη χαλκόνη **9** με σημαντικά βελτιωμένη δράση ($IC_{50} = 4.9 \pm 0.2 \mu M$) ενώ η χαλκόνη **6** με μια μεθοξυ-ομάδα και μια υδροξυ-ομάδα εμφανίζει παρόμοια δράση με τη χαλκόνη **9** αλλά είναι περισσότερο κυτταροτοξική.

Όπως και στην περίπτωση της μελέτης της αντιλεϊσμανιακής δράσης, η χαλκόνη **10** που περιέχει δύο tert-βουτυλο-ομάδες και μια υδροξυ-ομάδα εμφανίζει αξιόλογη αντιτρυπανοσωμιακή δράση ($IC_{50} = 3.3 \pm 0.1 \mu M$), είναι όμως κυτταροτοξική.

Από τη Σειρά Β των νέων μορίων, κανένα παράγωγο με ομάδα δέκτη ηλεκτρονίων δεν ήταν δραστικό έναντι του παρασίτου ($IC_{50} >10 \mu M$). Το ίδιο ισχύει και για το εκτεταμένο σύστημα συζυγίας των χαλκονών **14** και **15** της σειράς Γ.

Οι αλκυλιωμένες κινολινονο – χαλκόνες **22** και **23** της Σειράς Δ, σε σύγκριση με τις αντίστοιχες μη αλκυλιωμένες **5** και **9** δεν είχαν καμία δράση έναντι του παρασίτου ($IC_{50} >10 \mu M$). Το γεγονός αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα, ότι το αμιδικό άζωτο των νέων μορίων είναι βασικό δομικό χαρακτηριστικό καθώς αποτελεί προϋπόθεση για την εμφάνιση αντιπαρασιτικής δράσης και στην περίπτωση του παρασίτου *T. brucei*.

Οι κινολιόνες **3** και **18**, αν και δεν είναι κυτταροτοξικές, δεν είναι δραστικές έναντι του *T. brucei*.

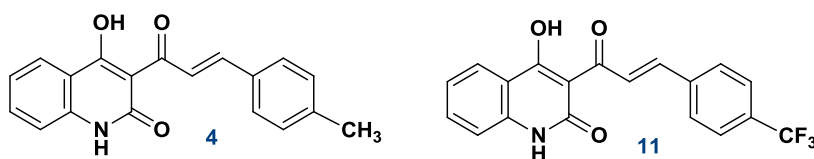
4.4 Συμπεράσματα

Η ανάπτυξη νέων μορίων με αντιπαρασιτική δράση θεωρείται σημαντικός στόχος στην προσπάθεια αντιμετώπισης ασθενειών που προκαλούνται από παράσιτα ειδικά στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές του κόσμου. Οι χαλκόνες και οι κινολιόνες κατέχουν αξιόλογες βιολογικές ιδιότητες που τις καθιστούν χρήσιμες ενώσεις στην έρευνα των φαρμάκων και για το λόγο αυτό επιλέχθηκαν ως μόρια – στόχοι για την ανάπτυξη νέων αντιπαρασιτικών παραγόντων.

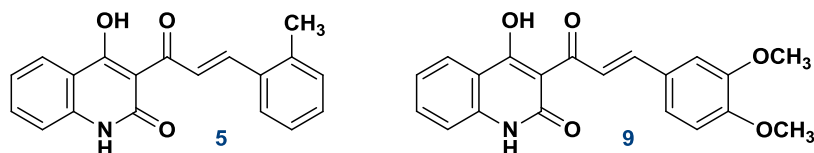
Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται η σύνθεση και η ταυτοποίηση της δομής νέων υβριδικών ενώσεων που συνδυάζουν σε ένα μόριο τα δομικά χαρακτηριστικά της κινολιόνης και της χαλκόνης. Παρασκευάστηκαν αρχικά τρεις Σειρές κινολινονο-χαλκονών, οι οποίες περιείχαν ομάδες δότες ηλεκτρονίων (Σειρά Α) ή δέκτες ηλεκτρονίων (Σειρά Β) ή σύστημα εκτεταμένης συζυγίας (Σειρά Γ). Από αυτές τις Σειρές αναλόγων προέκυψαν χρήσιμα συμπεράσματα που αφορούν στη σχέση δομής-αντιπαρασιτικής δράσης.

Συγκεκριμένα, όσον αφορά στην αντιλεϊσμανιακή δράση, βέλτιστη συμπεριφορά και χαμηλή κυτταροτοξικότητα παρουσίασαν οι χαλκόνες **4** και **11**, που περιέχουν μεθυλο- και τριφθορο-μεθυλο- ομάδα αντίστοιχα σε θέση παρα- του δακτυλίου Β. Γενικά, οι χαλκόνες

της Σειράς Α επέδειξαν καλύτερη δράση σε σχέση με αυτές των Σειρών Β και Γ, με εξαίρεση τη χαλκόνη **11**. Επίσης, η θέση και ο αριθμός των υποκαταστατών-δοτών ηλεκτρονίων φαίνεται ότι επηρεάζει τη δράση έναντι του παρασίτου *L. infantum*.



Η αξιολόγηση της δράσης των νέων μορίων έναντι του παρασίτου *T. brucei* οδηγεί σε ανάλογο συμπέρασμα όσον αφορά στις χαλκόνες της Σειράς Α. Οι δραστικότερες ενώσεις σε αυτή τη βιολογική δοκιμασία ήταν οι χαλκόνες **5** και **9**, με μεθυλο- και διμεθοξυ-υποκατάσταση στο δακτύλιο Β, αντίστοιχα. Όπως και στην περίπτωση της αντιλειτουργικής δράσης, οι χαλκόνες των Σειρών Β και Γ δεν έδειξαν αντιτρυπανοσωμιακή δράση. Αξίζει να αναφερθεί ότι η ένωση **10** εμφανίζει τη βέλτιστη αντιλειτουργική δράση και αξιολογημένη αντιτρυπανοσωμιακή δράση, είναι όμως ιδιαίτερα κυτταροτοξική.



Στη συνέχεια, προκειμένου να διερευνηθεί εκτενέστερα η σχέση δομής – βιολογικής δράσης των νέων μορίων, σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν ανάλογες ενώσεις των χαλκονών **5** και **9** που περιελάμβαναν τροποποιήσεις στα δομικά χαρακτηριστικά που αναμένεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην βιοδραστικότητα των χαλκονών: το αμιδικό άζωτο και το α,β-ακόρεστο καρβονυλικό σύστημα. Γενικά παρατηρήθηκε σημαντική ελάττωση της αντιπαρασιτικής δράσης με την εισαγωγή αιθυλο-ομάδας στο αμιδικό άζωτο και στα δύο βιολογικά πειράματα. Τα αποτελέσματα των βιολογικών δοκιμασιών για την αξιολόγηση της αντιπαρασιτικής δράσης των υπολοίπων δομικά τροποποιημένων μορίων είναι υπό εξέλιξη.

Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Η ενδιαφέρουσα αντιπαρασιτική δράση των νέων μορίων που συντέθηκαν, έναντι του τρυπανοσώματος *Brucei* και της *Leishmania*, μας παραπέμπει στο σχεδιασμό και στη σύνθεση νέων παραγώγων για μελλοντική έρευνα, με στόχο τη σύνθεση “βιβλιοθηκών” νέων κινολινο- χαλκονών, και περαιτέρω μελέτη της σχέσης δομής-βιολογικής δράσης.

Α) Μελέτη δομικών τροποποιήσεων στο δακτύλιο της κινολινόνης

Μία πρώτη προσέγγιση για μελλοντική σύνθεση νέων ανάλογων βιοδραστικών μορίων, αφορά στη μελέτη δομικών τροποποιήσεων στο δακτύλιο της κινολινόνης. Ενδεικτικά,

- i. η εισαγωγή υποκαταστατών σε διάφορες θέσεις του αρωματικού δακτυλίου Α της κινολινόνης, με ομάδες δότες ή δέκτες ηλεκτρονίων καθώς και

ii. η εισαγωγή ετεροατόμου (N) στον αρωματικό δακτύλιο είναι πιθανόν να οδηγήσει στη σύνθεση νέων βιοδραστικών μορίων με βελτιωμένη αντιπαρασιτική δράση.

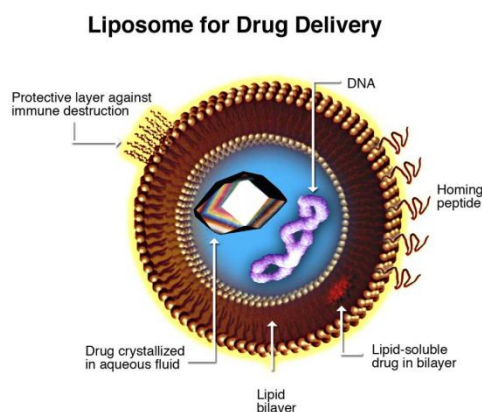
Μία δεύτερη προσέγγιση δομικής τροποποίησης του δακτυλίου της κινολινονης είναι η μελέτη του ρόλου του ενολικού υδροξυλίου που πιθανώς να διαδραματίζει στη δράση των μορίων. Η απουσία του εν λόγω υδροξυλίου ή οποιαδήποτε χημική τροποποίησή του, μπορεί να μας οδηγήσει σε χρήσιμα συμπεράσματα σχετικά με τη σχέση δομής βιολογικής δράσης των νέων παραγώγων.

B) Βελτίωση της διαλυτότητας των ενώσεων που εμφανίζουν σημαντική αντιπαρασιτική δράση

Η σημαντικά μειωμένη διαλυτότητα των νέων κινολινονο – χαλκονών σε κοινούς διαλύτες, δυσχεραίνει τόσο τη φασματοσκοπική τους μελέτη, όσο και την αξιολόγηση της βιολογικής τους δράσης, καθιστώντας έτσι σημαντική την προσπάθεια για μελλοντική έρευνα βελτίωσης της διαλυτότητάς τους.

Μια συνήθης προσέγγιση για αύξηση της διαλυτότητας φαρμακευτικών μορίων *in vivo*, αποτελεί ο εγκλεισμός των ενώσεων σε λιποσώματα. Τέτοιες σύγχρονοι μέθοδοι εγκλεισμού φαρμάκων επιτρέπουν την αύξηση της διαλυτότητας των μορίων με μικρή διαλυτότητα στο νερό, αυξάνοντας παράλληλα τη σταθερότητα των φαρμάκων και τη βιοδιαθεσιμότητα τους.

Τα λιποσώματα (Εικόνα 18), είναι μικροσκοπικά κυστίδια αποτελούμενα από μία ή περισσότερες λιπιδικές διπλοστοιβάδες και εξαιτίας του υψηλού βαθμού βιοσυμβατότητάς τους, έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς ως συστήματα φορέα φαρμάκου για ένα μεγάλο εύρος φαρμακευτικών ουσιών. Χάρη στο διφασικό τους χαρακτήρα, τα λιποσώματα μπορούν να δράσουν ως φορείς τόσο για λιπόφιλες όσο και για υδρόφιλες ουσίες, πετυχαίνοντας έτσι ελεγχόμενη αποδέσμευση των φαρμάκων και ταυτόχρονη προστασία των μορίων από χημικές μετατροπές.



Εικόνα 18. Λιποσώμα ως φορέας φαρμάκου

Ενδεικτικό παράδειγμα φαρμακευτικού παραγώγου με αντιπαρασιτική δράση, είναι η λιποσωματική Αμφοτερικίνη Β (Ambisome) (βλ. σελ 10,11) της οποίας ο εγκλεισμός με λιποσώματα τη καθιστά το πλέον χρησιμοποιούμενο αντιελμινιακό φάρμακο εδώ και δεκαετίες¹¹⁹.

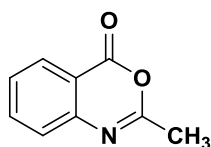
Κεφάλαιο 5^ο

Πειραματικό Μέρος

5.1 Συνθετική Πορεία των νέων ενώσεων

- Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) καταγράφηκαν με τη βοήθεια του οργάνου Varian Gemini 2000 (300Hz), Varian 300MHz και Varian 600MHz. Οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων δίνονται σε ppm ως προς το πρότυπο τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS). Η πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα ¹H NMR αναφέρεται ως απλή (s), διπλή (d), διπλή διπλών (dd), τριπλή (t), τετραπλή (q), πολλαπλή (m), broad (br). Οι σταθερές συζεύξεως (J) δίνονται σε Hz.
- Τα φάσματα μάζας υψηλής αναλύσεως (ESI-HRMS), ελήφθησαν μέσω του οργάνου Bruker micrOTOF II Mass Spectrometer του Πανεπιστημίου του Notre Dame, ΗΠΑ. Σε όλες τις περιπτώσεις οι υπό μελέτη ουσίες φέρονταν διαλυμένες στο ακετονιτρίλιο (CH₃CN).
- Τα σημεία τήξεως έχουν ληφθεί σε συσκευή Gallenkamp και δεν έχουν διορθωθεί.

2-μεθυλο-4H-3,1-βενζοξαζιν-4-όνη (1)¹⁰⁴



(1) 161.16 [C₉H₇NO₂]

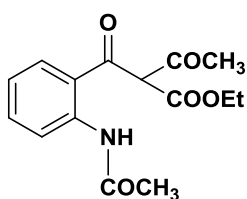
0.02 mol (2.74g) ανθρανιλικού οξέος προστίθενται σε 20 ml οξικού ανυδρίτη και το μίγμα αναδεύεται στους 130°C για περίπου μία ώρα μέχρι να διαλυθεί πλήρως το στερεό. Το διάλυμα ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια εξατμίζεται ο διαλύτης υπό κενό. Στο καστανοκίτρινο ίζημα, που σχηματίζεται, προστίθεται πετρελαϊκός αιθέρας (40°C-60°C) και το ίζημα διηθείται και

εκπλένεται στον ηθμό με πετρελαϊκό αιθέρα. Λαμβάνεται η 2-μεθυλο-4H-3,1-βενζοξαζιν-4-όνη (1) με τη μορφή υποκίτρινου στερεού. Το προϊόν χρησιμοποιείται για τις αντιδράσεις C-ακυλίωσης χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. [απόδοση : 90% (5.8g), σημείο τήξεως : 75-78 °C, σ.τ. βιβλιογραφίας: 77-78 °C]

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.44 (s, 3H), 7.44-7.52 (m, 2H), 7.77 (ddd, J_{7,8} = 9.8 Hz, J_{7,6} = 7.32 Hz, J_{7,5} = 1.5 Hz, 1H), 8.15 (dd, J_{5,6} = 7.8 Hz, J_{5,7} = 1.5 Hz, 1H)

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 160.29, 159.74, 146.50, 136.56, 128.45, 128.20, 126.41, 116.66, 21.17

α-Ακετυλο-2-(ακετυλαμινο)-β-οξο-βενζολοπροπανοϊκός αιθυλεστέρας (2)¹⁰⁴



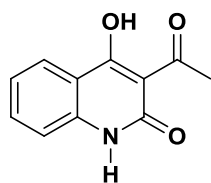
(2) 291.30 [C₁₅H₁₇NO₅]

0.012 mol (2g) 2-μεθυλο-4H-3,1-βενζοξαζιν-4-όνης (1) προστίθενται στο μίγμα βάσης ενώσεως ενεργού μεθυλενίου, το οποίο αποτελείται από 0.024 mol (2.68g) t-BuOK και 0.024 mol (3.12g) ακετοξικού αιθυλεστέρα σε 60 ml t-BuOH και το προκύπτον μίγμα αναδεύεται για 2 ώρες. Το προϊόν λαμβάνεται από το οξινομένο υδατικό διάλυμα με τη μορφή λευκού στερεού. [απόδοση : 81%, σημείο τήξεως : 98-101 °C, σ.τ. βιβλιογραφίας :

97-99 °C]

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 0.86 (t, 3H), 2.19 (s, 3H), 2.44 (s, 3H), 3.92 (q, 2H), 7.08 (pseudotriplet, 1H), 7.56 (pseudotriplet, 1H), 7.68 (dd, J_{3,5}=1.1 Hz, J_{3,4}=7.9 Hz, 1H), 8.73 (d, J_{5,6}=8.4 Hz, 1H), 11.32 (br, 1H), 16.80 (s, 1H)

3-Ακετυλο-4-υδροξυ-2(1H)-κινολινόνη (3)¹⁰⁴



(3) 203.19 [C₁₁H₉NO₃]

0.003 mol του προϊόντος C-ακυλίωσης (2) διαλύονται σε 32 ml υδατικού διαλύματος ανθρακικού νατρίου 7 % και το μίγμα προστίθεται σε 8 ml υδατικού διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (45%). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Το λευκό ίζημα διηθείται και διαλύεται σε μικρή ποσότητα νερού. Το υδατικό διάλυμα οξινίζεται με υδροχλωρικό οξύ 10%, υπό ψύξη, οπότε λαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν με τη μορφή λευκού ιζήματος το οποίο διηθείται και εκπλένεται με μικρές ποσότητες ψυχρού νερού. [απόδοση : 75%, σημείο τήξεως : 261-263 °C, σ.τ. βιβλιογραφίας: 258-259 °C]

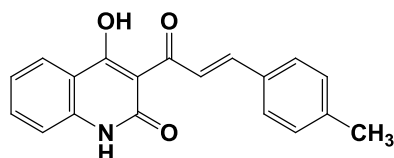
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.71 (s, 3H), 7.13 (pseudotriplet, 1H), 7.25 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.53 (pseudotriplet, 1H), 7.94 (dd, J_{5,6}=8 Hz, J_{5,7}=1.2 Hz, 1H), 11.35 (s, 1H), 17.03 (br, 1H)

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 30.47, 105.68, 113.32, 115.51, 122.00, 124.75, 134.84, 140.51, 161.07, 174.72, 205.66

Γενική μέθοδος σύνθεσης κινολινο-χαλκωνών 4-13, 22-25

Σε κατάλληλη ποσότητα απόλυτης αιθανόλης διαλύονται ισομοριακές ποσότητες της 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2(1H)-κινολινόνης (3) και της κατάλληλης βενζαλδεΐδης και προστίθεται καταλυτική ποσότητα πιπεριδίνης. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 3 ώρες στους 78°C με τη βοήθεια κάθετου ψυκτήρα. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Μετά το τέλος της αντίδρασης, το μίγμα ψύχεται σε παγόλουτρο και οξινίζεται με υδατικό διάλυμα HCl 10% w/v. Το προϊόν λαμβάνεται από το οξινισμένο υδατικό διάλυμα με τη μορφή στερεού.

4-Υδροξυ-3-[3-(4-μεθυλοφαινυλο)-1-οξο-2-προπεν-1-υλο]- 2(1H)-κινολινόνη (4)

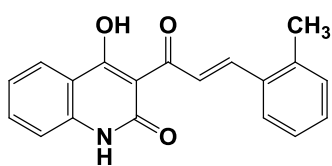


(4) 305.33 [C₁₉H₁₅NO₃]

Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο χρησιμοποιώντας 0.344 mmol (0.070 g) της 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2(1H)-κινολινόνης (3), 0.344 mmol (0.041 g) της 4-μεθυλοβενζαλδεΐδης και 3 σταγόνες πιπεριδίνης σε 2mL απόλυτης αιθανόλης. Το προϊόν λαμβάνεται από το οξινισμένο υδατικό διάλυμα με τη μορφή κίτρινου στερεού. [απόδοση : 56%, σημείο τήξεως : >300 °C]

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 2.32 (s, 3H), 7.14 (m, 3H), 7.22 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.51 (t, 3H), 7.85 (d, J = 16.1 Hz, 1H), 7.99 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.62 (d, J = 15.5 Hz, 1H), 11.21 (s, 1H).

HRMS calcd for C₁₉H₁₆NO₃: m/z: 306.1125 found: 306.1127

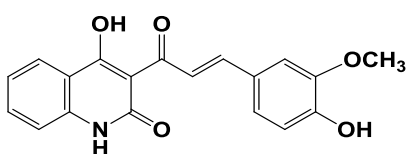
4-υδροξυ-3-[3-(2-μεθυλοφαινυλο)-1-οξο-2-προπεν-1-υλο]- 2(1H)-κινολινόνη (5)**(5)** 305.33 [C₁₉H₁₅NO₃]

Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο χρησιμοποιώντας 0.492 mmol (0.1g) της 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2(1H)-κινολινόνης (**3**), 0.492 mmol (0.06g) της 2-μεθυλοβενζαλδεΐδης και 4 σταγόνες πιπεριδίνης σε 2mL απόλυτης αιθανόλης. Το προϊόν λαμβάνεται από το οξιτισμένο υδατικό διάλυμα με τη μορφή κίτρινου στερεού.

[απόδοση : 51%, σημείο τήξεως : 277-282 °C]

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 2.37 (s, 3H), 7.22-7.41 (m, 4H), 7.53-7.755 (m, 2H), 7.68 (t, 1H), 7.91 (d, J= 16.2 Hz, 1H), 8.02 (d, J= 8.1 Hz, 1H), 8.63 (d, J= 14.7 Hz, 1H), 11.49 (s, 1H), 18.05 (s, 1H)

HRMS calcd for C₁₉H₁₆NO₃: m/z: 306.1125 found: 306.1108

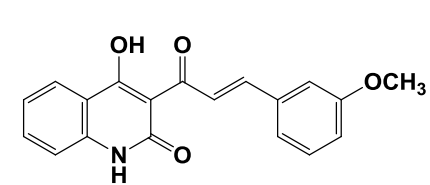
4-υδροξυ-3-[3-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο)-1-οξο-2-προπεν-1-υλο]- 2(1H)-κινολινόνη (6)**(6)** 337.33 [C₁₉H₁₅NO₅]

Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο χρησιμοποιώντας 0.492 mmol (0.1g) της 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2(1H)-κινολινόνης (**3**), 0.492 mmol (0.074g) της 4-υδροξυ-3-μεθοξυβενζαλδεΐδης και 4 σταγόνες πιπεριδίνης

σε 2mL απόλυτης αιθανόλης. Το προϊόν λαμβάνεται από το οξιτισμένο υδατικό διάλυμα με τη μορφή πορτοκαλί στερεού. [απόδοση : 57%, σημείο τήξεως : 292-293 °C]

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 3.85 (s, 3H), 6.90 (d, J= 8.1 Hz, 1H), 7.20-7.32 (m, 4H), 7.66 (pseudotriplet, 1H), 7.93 (d, J= 15.3 Hz, 1H), 8.01 (d, J= 7.2 Hz, 1H), 8.51 (d, J= 14.7 Hz, 1H), 11.41 (s, 1H)

HRMS calcd for C₁₉H₁₆NO₅: m/z: 338.1023 found: 338.1026

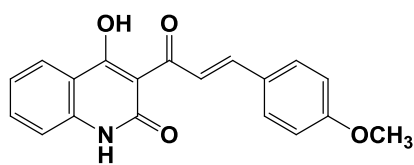
4-υδροξυ-3-[3-(3-μεθοξυφαινυλο)-1-οξο-2-προπεν-1-υλο]- 2(1H)-κινολινόνη (7)**(7)** 321.33 [C₁₉H₁₅NO₄]

Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο χρησιμοποιώντας 0.492 mmol (0.1g) της 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2(1H)-κινολινόνης (**3**), 0.492mmol (0.066g) της 3-μεθοξυβενζαλδεΐδης και 4 σταγόνες πιπεριδίνης σε 2mL απόλυτης αιθανόλης. Το προϊόν λαμβάνεται από το οξιτισμένο υδατικό διάλυμα με τη

μορφή κίτρινου στερεού. [απόδοση : 49%, σημείο τήξεως : 289-291 °C]

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 3.91 (s, 3H), 7.07-7.31 (m, 4H), 7.48 (t, 1H), 7.65-7.72 (m, 2H), 8.01 (d, J= 8.4 Hz, 1H), 8.21 (d, J= 15.9 Hz, 1H), 8.68 (d, J= 15 Hz, 1H), 11.48 (s, 1H), 18.19 (s, 1H)

HRMS calcd for C₁₉H₁₆NO₄: m/z: 322.1074 found: 322.1062

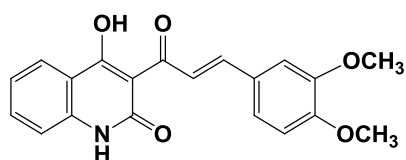
4-υδροξυ-3-[3-(4-μεθοξυφαινυλο)-1-οξο-2-προπεν-1-υλο]-2(1H)-κινολινόνη (8)^{120a,b}(8) 321.33 [C₁₉H₁₅NO₄]

Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο χρησιμοποιώντας 0.492 mmol (0.1g) της 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2(1H)-κινολινόνης (**3**), 0.492mmol (0.066g) της 4-μεθοξυβενζαλδεΐδης και 4 σταγόνες πιπεριδίνης σε 2mL απόλυτης αιθανόλης. Το προϊόν λαμβάνεται από το οξιτισμένο υδατικό διάλυμα με τη μορφή κίτρινου

στερεού. [απόδοση : 55%, σημείο τήξεως : >300 °C, σ.τ. βιβλιογραφίας: 270 °C]

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 3.85 (s, 3H), 7.05 (d, J=8.4 Hz, 2H), 7.22 (pseudotriplet, 1H), 7.31 (d, J= 7.5 Hz, 1H), 7.65-7.72 (m, 3H), 7.92 (d, J= 15.6 Hz, 1H), 8.02 (d, J= 7.2 Hz, 1H), 8.53 (d, J = 15Hz, 1H)

HRMS calcd for C₁₉H₁₆NO₄: m/z: 322.1074 found: 322.1053

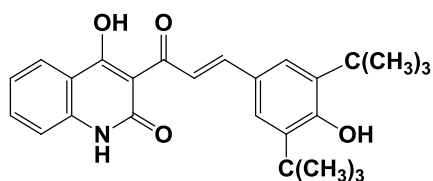
4-υδροξυ-3-[3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-1-οξο-2-προπεν-1-υλο]-2(1H)-κινολινόνη (9)(9) 351.35 [C₂₀H₁₇NO₅]

Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο χρησιμοποιώντας 0.492 mmol (0.1g) της 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2(1H)-κινολινόνης (**3**), 0.492mmol (0.081g) της 3,4-διμεθοξυβενζαλδεΐδης και 4 σταγόνες πιπεριδίνης σε 2mL απόλυτης αιθανόλης. Το προϊόν λαμβάνεται από το οξιτισμένο υδατικό διάλυμα με τη μορφή

κίτρινου στερεού. [απόδοση : 48%, σημείο τήξεως : 270-272 °C]

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 3.83 (s, 6H), 7.08 (d, J= 8.4 Hz, 1H), 7.23-7.38 (m, 4H), 7.67 (t, 1H), 7.93 (d, J= 15 Hz, 1H), 8.02 (d, 8.1 Hz, 1H), 8.54 (d, 15.9 Hz, 1H), 11.41 (s, 1H), 18.27 (s, 1H)

HRMS calcd for C₂₀H₁₈NO₅: m/z: 352.1179 found: 352.1189

3-[3-[3,5-(1)(1,1-διμεθυλαιθυλ)-4-υδροξυφαινυλ]-1-οξο-2-προπεν-1-υλο]-4-υδροξυ-2(1H)-κινολινόνη (10)¹²¹(10) 419.51 [C₂₆H₂₉NO₄]

Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο χρησιμοποιώντας 0.492 mmol (0.1g) της 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2(1H)-κινολινόνης (**3**), 0.492 mmol (0.115g) της 3,5-δι-*tert*-βουτυλ-4-υδροξυβενζαλδεΐδης και 4 σταγόνες πιπεριδίνης σε 2mL απόλυτης αιθανόλης. Το προϊόν λαμβάνεται από το οξιτισμένο υδατικό

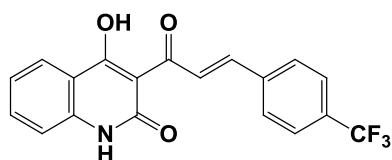
διάλυμα με τη μορφή κίτρινου στερεού. [απόδοση : 47%, σημείο τήξεως : 250-251 °C]

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.49 (s, 18H), 5.65 (s, 1H), 7.20 (d, J= 6Hz, 1H), 7.58 (pseudotriplet, 3H), 8.07 (d, J= 15.6Hz, 1H), 8.17 (d, J= 7.5Hz, 1H), 8.68 (d, J=15.9 Hz, 1H), 11.07 (s, 1H), 18.54 (s, 1H)

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 30.35, 34.49, 105.33, 115.56, 116.05, 121.54, 122.57, 125.85, 126.95, 134.75, 136.69, 140.23, 147.47, 157.17, 163.99, 178.72, 193.54

HRMS calcd for C₂₆H₃₀NO₄: m/z: 420.2169 found: 420.2162

4-υδροξυ-3-[3-(4-τριφθορομεθυλοφαινυλο)-1-οξο-2-προπεν-1-υλο]- 2(1H)-κινολινόνη (11)



(11) 359.30 [C₁₉H₁₂F₃NO₃]

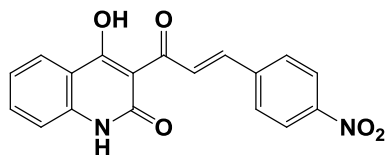
Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο χρησιμοποιώντας 0.492 mmol (0.1g) της 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2(1H)-κινολινόνης (**3**), 0.492 mmol (0.085g) της 4-τριφθορομεθυλοβενζαλδεΐδης και 4 σταγόνες πιπεριδίνης σε 2mL απόλυτης αιθανόλης. Το προϊόν λαμβάνεται από το οξιμισμένο υδατικό διάλυμα με τη

μορφή κίτρινου στερεού. [απόδοση : 46%, σημείο τήξεως : >300°C]

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 7.25 (t, 1H), 7.34 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.68 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.83 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.91 – 7.96 (m, 3H), 8.04 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.69 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 11.54 (s, 1H)

HRMS calcd for C₁₉H₁₃F₃NO₃: m/z: 360.0842 found: 360.0819

4-υδροξυ-3-[3-(4-νιτροφαινυλο)-1-οξο-2-προπεν-1-υλο]- 2(1H)-κινολινόνη (12)



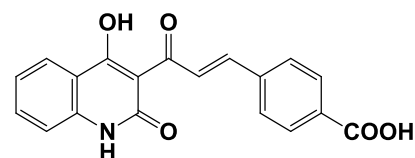
(12) 336.30 [C₁₈H₁₂N₂O₅]

Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο χρησιμοποιώντας 0.492 mmol (0.1g) της 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2(1H)-κινολινόνης (**3**), 0.492 mmol (0.074g) της 4-νιτροβενζαλδεΐδης και 4 σταγόνες πιπεριδίνης σε 2mL απόλυτης αιθανόλης. Το προϊόν λαμβάνεται από το οξιμισμένο υδατικό διάλυμα με τη μορφή κίτρινου στερεού. [απόδοση : 56%, σημείο τήξεως : 256 °C (τήξη με αποσύνθεση)]

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 7.25-7.33 (m, 2H), 7.66 (s, 2H), 7.92-7.99 (m, 3H), 8.29 (s, 2H), 8.70 (d, *J* = 15 Hz, 1H), 11.44 (s, 1H)

HRMS calcd for C₁₈H₁₃N₂O₅: m/z: 337.0819 found: 337.0828

4-υδροξυ-3-[3-(4-καρβοξυλφαινυλο)-1-οξο-2-προπεν-1-υλο]- 2(1H)-κινολινόνη (13)



(13) 335.31 [C₁₉H₁₃NO₅]

Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο χρησιμοποιώντας 0.492 mmol (0.1g) της 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2(1H)-κινολινόνης (**3**), 0.492 mmol (0.073g) της 4-καρβοξυλβενζαλδεΐδης και 4 σταγόνες πιπεριδίνης σε 2mL απόλυτης αιθανόλης. Το προϊόν λαμβάνεται από το οξιμισμένο υδατικό διάλυμα με τη μορφή

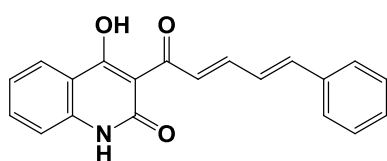
κίτρινου στερεού. [απόδοση : 52%, σημείο τήξεως : >300°C]

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ 7.23 (t, 1H), 7.30 (d, J=8.2 Hz, 1H), 7.67 (t, 1H), 7.83(d, J= 8.2 Hz, 2H), 7.93 (d, J= 15.9 Hz, 1H), 8.00 (d, J= 8.2 Hz, 3H), 8.68 (d, J= 15.7 Hz, 1H), 11.53 (s, 1H), 17.84 (s, 1H)

¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆): δ 114.4, 116.3, 122.7, 125.6, 127.19, 128.9, 130.3, 132.7, 135.6, 139.2, 141.1, 143, 167.1, 177.6, 193.3

HRMS calcd for C₁₉H₁₄NO₅: m/z: 336.0866 found: 336.0884

4-υδροξυ-3-[(2E,4E)-1-οξο-5-φαινυλο-2,4-πενταδιεν-1-υλο]-2(1H)-κινολινόνη (14)



(14) 317.34 [C₂₀H₁₅NO₃]

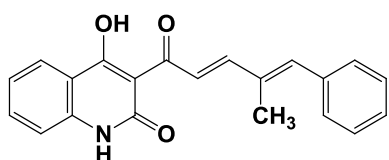
Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο χρησιμοποιώντας 0.492 mmol (0.1g) της 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2(1H)-κινολινόνης (**3**), 0.492 mmol (0.065g) της *trans*-κινναμωμικής αλδεΐδης και 4 σταγόνες πιπεριδίνης σε 2mL απόλυτης αιθανόλης. Το προϊόν λαμβάνεται από το οξιμισμένο υδατικό διάλυμα με τη

μορφή πορτοκαλί στερεού. [απόδοση : 51%, σημείο τήξεως : 296-298°C]

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 7.20-7.43 (m, 7H), 7.65-7.68 (m, 3H), 7.76 (dd, J = 15.1, 9.5 Hz, 1H), 8.01 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.21 (d, J = 15.4 Hz, 1H), 11.48 (s, 1H), 18.98 (s, 1H)

HRMS calcd for C₂₀H₁₆NO₃: m/z: 318.1125 found: 318.1150

4-υδροξυ-3-[(2E,4E)-4-μεθυλ-5-φαινυλ-5-οξο-πεντα-2,4-διεν-1-υλο]-2(1H)-κινολινόνη (15)



(15) 331.36 [C₂₁H₁₇NO₃]

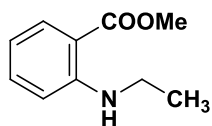
Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο χρησιμοποιώντας 0.492 mmol (0.1g) της 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2(1H)-κινολινόνης (**3**), 0.492 mmol (0.071g) της *α*-μεθυλο-*trans*-κινναμωμικής αλδεΐδης και 4 σταγόνες πιπεριδίνης σε 2mL απόλυτης αιθανόλης. Το προϊόν λαμβάνεται από το οξιμισμένο υδατικό διάλυμα με τη

μορφή κίτρινου στερεού. [απόδοση : 53%, σημείο τήξεως : 264-271°C]

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 2.14 (s, 3H), 7.21-7.5 (m, 8H), 7.66 (t, 1H), 7.78 (d, J= 15.3 Hz, 1H), 8.01 (d, J= 7.5 Hz, 1H), 8.23 (d, J= 15.3 Hz, 1H)

HRMS calcd for C₂₁H₁₈NO₃: m/z: 332.1281 found: 332.1277

2-αιθυλαμινοβενζολοκαρβοξυλικός μεθυλεστέρας (16)¹²²



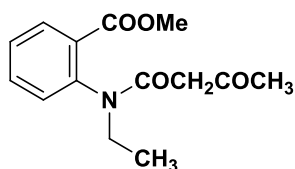
(16) 179.22 [C₁₀H₁₃NO₂]

13.23 mmol (2 g) του μεθυλεστέρα του ανθρανιλικού οξέος διαλύονται σε 40 ml διχλωρομεθάνιο και στη συνέχεια προστίθενται 13.23 mmol (0.58g) ακεταλδεΐδης και 19.84 mmol (1.19g) οξικού οξέος. Μετά από 1 ώρα αντίδρασης, προστίθεται 21.17 mmol (4.48g) τριακετοξυ βοροϋδρίδιο του νατρίου σταδιακά και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 18 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Για την

κατεργασία της αντίδρασης, προστίθενται 40 ml μεθανόλης, οπότε το διάλυμα γίνεται διαυγές και κατόπιν απομακρύνεται ο διαλύτης με εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση. Στο στερεό που προκύπτει, προστίθεται οξικός αιθυλεστέρας και υδατικό διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου, οπότε παρατηρείται έντονος αφρισμός. Η υδατική φάση στη συνέχεια εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα και η οργανική φάση εκπλένεται αρχικά με κορεσμένο υδατικό διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου και στη συνέχεια με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχο νατρίου (brine) και κατόπιν ακολουθεί ξήρανση με θειικό νάτριο και εξάτμιση του διαλύτη. Το τελικό προϊόν λαμβάνεται ύστερα από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης (PE/EtOAc 95:5). [απόδοση : 60%]

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.33 (t, 3H), 3.19 – 3.27 (m, 2H), 3.85 (s, 3H), 6.58 (t, 1H), 6.68 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.35 (t, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.91 (d, J = 8.0 Hz, 1H).

2-(N-αιθυλ-3-οξοβουτανουϊλαμινο)-βενζολοκαρβοξυλικός μεθυλεστέρας (17)

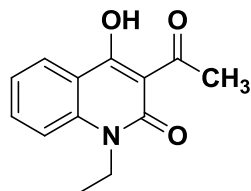


(17) 263.29 [C₁₄H₁₇NO₄]

7.92 mmol (1.41g) του 2-αιθυλαμινοβενζολοκαρβοξυλικού μεθυλεστέρα (16) διαλύονται σε 28 ml τολουολίου και στη συνέχεια προστίθεται 8.71 mmol (1.23g) 2,2,6-τριμεθυλο-1,3-διοξαν-4-όνης και το μίγμα αναδεύεται για 3 ώρες στους 112°C με τη βοήθεια κάθετου ψυκτήρα. Μετά το πέρας της αντίδρασης, ο διαλύτης συμπυκνώνεται και το ελαιώδες υπόλειμμα χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο χωρίς

περαιτέρω καθαρισμό.

3-ακετυλο-1-αιθυλ-4-υδροξυ-2(1H)-κινολινόνη (18)¹²⁵



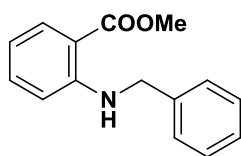
(18) 231.25 [C₁₃H₁₃NO₃]

7.86 mmol (2.07g) του 2-(N-αιθυλ-3-οξοβουτανουϊλαμινο)-βενζολοκαρβοξυλικού μεθυλεστέρα (17) διαλύονται σε 67 ml αιθανόλης και στη συνέχεια προστίθενται 31.45 mmol (2.14g) αιθοξειδίου του νατρίου. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 24 ώρες στους 78°C με τη βοήθεια κάθετου ψυκτήρα. Μετά το πέρας της αντίδρασης, ο διαλύτης εξατμίζεται υπό ελαττωμένη

πίεση και στη συνέχεια το προκύπτον στερεό οξινίζεται και διηθείται. Ακολουθούν εκπλύσεις με νερό και το προϊόν λαμβάνεται με τη μορφή υπό κίτρινου στερεού χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. [απόδοση : 53%, σημείο τήξεως : 133-135°C]

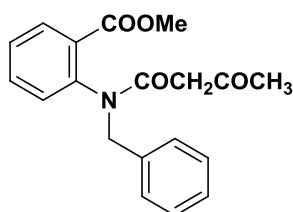
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.34 (t, 3H), 2.83 (s, 3H), 4.29 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.24-7.33 (m, 2H), 7.68 (t, 1H), 8.23 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 16.85 (s, 1H)

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 12.91, 31.66, 37.23, 106.09, 114.22, 122.00, 124.32, 126.57, 129.69, 135.01, 140.95, 174.03, 207.02

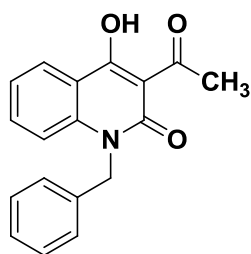
2-[(φαινυλομεθυλ)αμινο]-βενζυλοκαρβοξυλικός μεθυλεστέρας (19)¹²⁶

13.23 mmol (2 g) του μεθυλεστέρα του ανθρακικού οξέος διαλύονται σε 40 ml διχλωρομεθάνιο και στη συνέχεια προστίθενται 13.23 mmol (1.40g) βενζαλδεΐδης και 19.84 (1.19g) mmol οξικού οξέος. Μετά από 1 ώρα αντίδρασης, προστίθεται (19) 241.29 [C₁₅H₁₅NO₂] 21.17 (4.48g) mmol τριακετοξυ βοροϋδριδίου του νατρίου σταδιακά και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 18 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Για την κατεργασία της αντίδρασης, προστίθενται 40 ml μεθανόλης, οπότε το διάλυμα γίνεται διαυγές και κατόπιν απομακρύνεται ο διαλύτης με εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση. Στο στερεό που προκύπτει προστίθεται οξικός αιθυλεστέρας και υδατικό διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου οπότε παρατηρείται έντονος αφρισμός. Η υδατική φάση στη συνέχεια εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα και η οργανική φάση εκπλένεται αρχικά με κορεσμένο υδατικό διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου και στη συνέχεια με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου (brine) και κατόπιν ακολουθεί ξήρανση με θειικό νάτριο και συμπύκνωση του διαλύτη. Το τελικό προϊόν λαμβάνεται ύστερα από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης (PE/EtOAc 95:5). [απόδοση : 47%]

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 3.75 (s, 3H), 4.33 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H), 6.48-6.55 (m, 2H), 7.13–7.28 (m, 6H), 7.86 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 8.13 (s, 1H)

2-(*N*-βενζυλ-3-οξοβουτανουλαμινο)βενζυλοκαρβοξυλικός μεθυλεστέρας (20)

6.18 mmol (1.5g) του 2-[(φαινυλομεθυλ)αμινο]-βενζυλοκαρβοξυλικού μεθυλεστέρα (19) διαλύονται σε 20 ml τολουολίου και στη συνέχεια προστίθεται 6.79 mmol (1.77g) 2,2,6-τριμεθυλ-1,3-διοξαν-4-όνης και το μίγμα αναδεύεται για 5 ώρες στους 112°C με τη βοήθεια κάθετου ψυκτήρα. Μετά το πέρας της αντίδρασης, ο διαλύτης συμπυκνώνεται και το ελαιώδες υπόλειμμα χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

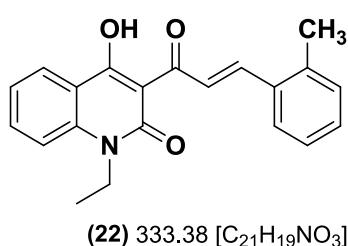
3-ακετυλο-4-υδροξυ-1-(φαινυλομεθυλο)-2(1H)-κινολινόνης (21)^{123, 124}

7.99 mmol (2.6g) του 2-(*N*-βενζυλ-3-οξοβουτανουλαμινο)βενζυλοκαρβοξυλικού μεθυλεστέρα (20) διαλύονται σε 70 ml αιθανόλης και στη συνέχεια προστίθεται 31.96 mmol (2.17g) αιθοξείδιο του νατρίου. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 24 ώρες στους 78°C με τη βοήθεια κάθετου ψυκτήρα. Μετά το πέρας της αντίδρασης, ο διαλύτης εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση και στη συνέχεια το (21) 293.32 [C₁₈H₁₅NO₃] προκύπτει στερεό οξινίζεται και διηθείται. Ακολουθούν εκπλύσεις με νερό και το προϊόν λαμβάνεται με τη μορφή σκούρου πορτοκαλί στερεού χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. [απόδοση : 53%, σημείο τήξεως : 159-164 °C]

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.87 (s, 3H), 5.50 (s, 2H), 7.34 – 7.16 (m, 7H), 7.55 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.24 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 17.04 (s, 1H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 31.76, 45.74, 106.12, 115.22, 115.84, 122.36, 126.39, 127.44, 129.01, 135.07, 136.38, 141.37, 161.95, 174.52, 207.12.

4-υδροξυ-3-[3-(2-μεθυλοφαινυλο)-1-οξο-2-προπεν-1-υλο]-1-αιθυλ-2(1H)-κινολινόνη (22)



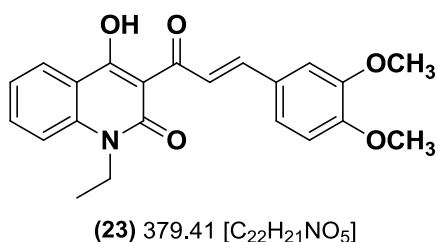
Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο χρησιμοποιώντας 0.99 mmol (0.22g) της 3-ακετυλο-1-αιθυλ-4-υδροξυ-2(1H)-κινολινόνης (**18**), 0.99 mmol (0.11g) της 2-μεθυλοβενζαλδεΐδης και 9 σταγόνες πιπεριδίνης σε 13mL απόλυτης αιθανόλης. Το προϊόν λαμβάνεται από το οξιμισμένο υδατικό διάλυμα ύστερα από κατεργασία (trituration) με μεθανόλη με τη μορφή κίτρινου στερεού.

[απόδοση : 25%, σημείο τήξεως : 146-148 °C]

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.36 (t, 3H), 2.51 (s, 3H), 4.32 (q, 2H), 7.22-7.33 (m, 6H), 7.69 (t, 1H), 7.86 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 8.28 (d, J = 15 Hz, 1H), 8.62 (d, J = 15.3 Hz, 1H), 17.89 (s, 1H)

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 12.81, 19.86, 37.18, 105.73, 114.11, 116.31, 121.88, 126.15, 126.35, 126.48, 127.33, 130.41, 130.75, 134.01, 134.86, 138.49, 140.81, 142.37, 161.36, 176.00, 194.55

4-υδροξυ-3-[3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-1-οξο-2-προπεν-1-υλο]-1-αιθυλ-2(1H)-κινολινόνη(23)

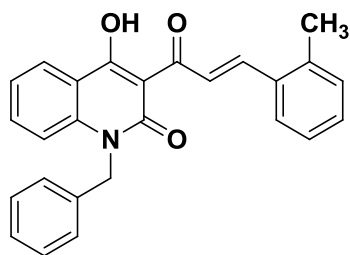


Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο χρησιμοποιώντας 0.216 mmol (0.05g) της 3-ακετυλο-1-αιθυλ-4-υδροξυ-2(1H)-κινολινόνης, (**18**), 0,216 mmol (0.035g) της 3,4-διμεθοξυβενζαλδεΐδης και 3 σταγόνες πιπεριδίνης σε 2mL απόλυτης αιθανόλης. Το προϊόν λαμβάνεται από το οξιμισμένο υδατικό διάλυμα ύστερα από κατεργασία (trituration) με

μεθανόλη με τη μορφή σκούρου-κίτρινου στερεού. [απόδοση : 37%, σημείο τήξεως : 194-197 °C]

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.37 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 3.96 (d, J = 10.2 Hz, 6H), 4.34 (dd, J = 12.9, 5.5 Hz, 2H), 6.89 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.37 – 7.22 (m, 4H), 7.69 (t, J = 8.1 Hz, 1H), 7.97 (d, J = 15.7 Hz, 1H), 8.28 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.59 (d, J = 15.7 Hz, 1H), 18.14 (s, 1H)

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 12.98, 37.27, 56.15, 56.24, 105.65, 111.12, 111.19, 114.24, 122.00, 123.12, 124.04, 126.64, 128.54, 134.89, 140.89, 145.77, 149.35, 161.62, 176.36, 194.26, 203.07, 217.38

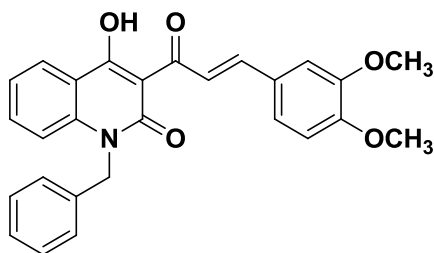
4-υδροξυ-3-[3-(2-μεθυλοφαινυλο)-1-οξο-2-προπεν-1-υλο]-1-φαινυλομεθυλο-2(1H)-κινολινόνης (24)**(24)** 395.45 [C₂₆H₂₁NO₃]

Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο χρησιμοποιώντας 0.716 mmol (0.21g) της 3-ακετυλο-4-υδροξυ-1-(φαινυλομεθυλο)-2(1H)-κινολινόνης, (**21**), 0.716 mmol (0.086g) της 2-μεθυλοβενζαλδεΐδης (*o*-tolualdehyde) και 9 σταγόνες πιπεριδίνης σε 10mL απόλυτης αιθανόλης. Το προϊόν λαμβάνεται από το οξινισμένο υδατικό διάλυμα ύστερα από κατεργασία (trituration) με μεθανόλη με τη μορφή κίτρινου στερεού. [απόδοση : 40%, σημείο τήξεως :

176-178 °C]

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.52 (s, 3H), 5.53 (2H), 7.16-7.31 (m, 10H), 7.54 (t, 1H), 7.85 (d, J= 8.1 Hz, 1H), 8.26 (s, 1H), 8.32 (d, J=15.3 Hz, 1H), 8.66 (d, J= 15.6 Hz, 1H), 18.12 (s, 1H)

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 20.03, 45.86, 105.61, 115.27, 116.52, 122.10, 126.13, 126.37, 126.44, 126.50, 127.42, 127.51, 129.02, 130.66, 130.91, 134.07, 135.07, 136.39, 138.71, 141.37, 142.83, 153.87, 162.11, 176.76, 194.69

4-υδροξυ-3-[3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-1-οξο-2-προπεν-1-υλο]-1-φαινυλομεθυλο-2(1H)-κινολινόνης (25)**(25)** 441.48 [C₂₇H₂₃NO₅]

Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο χρησιμοποιώντας 0.68 mmol (0.2g) της 3-ακετυλο-4-υδροξυ-1-(φαινυλομεθυλο)-2(1H)-κινολινόνης,, (**21**), 0.68 mmol (0.11g) της 3,4-διμεθοξυβενζαλδεΐδης και 9 σταγόνες πιπεριδίνης σε 10mL απόλυτης αιθανόλης. Το προϊόν λαμβάνεται από το οξινισμένο υδατικό διάλυμα ύστερα από κατεργασία (trituration) με μεθανόλη με τη μορφή κίτρινο-πορτοκαλί

στερεού. [απόδοση : 21%, σημείο τήξεως : 156-161 °C]

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 3.93 (d, J= 5.7 Hz, 6H), 5.52 (s, 2H), 6.87 (d, J= 8.4 Hz, 1H), 7.14-7.32 (m, 9H), 7.53 (pseudotriplet, 1H), 8.0 (d, J= 15.6 Hz, 1H), 8.26 (d, J= 8.4 Hz), 8.62 (d, J= 15.6 Hz, 1H), 18.4(s, 1H)

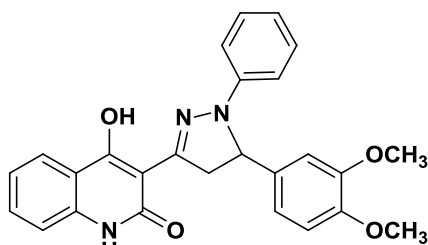
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 45.79, 56.12, 56.17, 105.34, 110.79, 111.03, 115.24, 116.71, 122.35, 122.85, 124.25, 126.32, 126.42, 127.40, 128.39, 129.03, 134.94, 136.45, 141.26, 146.11, 149.26, 151.82, 153.86, 162.16, 176.99, 194.18

Γενική μέθοδος σύνθεσης πυραζολινονών 26-28

Σε κατάλληλη ποσότητα οξικού οξέος διαλύονται σε αναλογία 1:2 ποσότητα της κινολινονο-χαλκόνης (**9**) ή (**5**) και της κατάλληλης υδραζίνης. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 4 ώρες στους 118°C με τη βοήθεια κάθετου ψυκτήρα. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Μετά το τέλος της αντίδρασης, στο μίγμα προστίθεται υδατικό διάλυμα EtOH 50% και ανάλογα με το αν

προκύψει στερεό, το προϊόν λαμβάνεται είτε κατόπιν διήθησης είτε κατόπιν εκχύλισης με διχλωρομεθάνιο (DCM). Το τελικό προϊόν παραλαμβάνεται τελικά ύστερα από κατεργασία (trituration) με MeOH με τη μορφή στερεού.

5-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-1-φαινυλο-3-(4,5-διυδρο-1H-πυραζολ-3-υλ)-4-υδροξυ-2-(1H)-κινολινόνη (26)

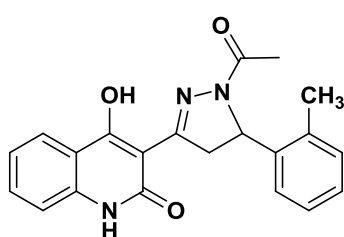


(26) 441.48 [C₂₆H₂₃N₃O₄]

Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο χρησιμοποιώντας 0.10 mmol (0.035g) της 4-υδροξυ-3-[3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-1-οξο-2-προπεν-1-υλο]-2(1H)-κινολινόνης, (9) και 0.20 mmol (0.021g) φαινυλδραζίνης σε 3 ml οξικού οξέος. Το προϊόν λαμβάνεται ύστερα από διήθηση και κατεργασία (trituration) με MeOH, με τη μορφή κίτρινου στερεού. [απόδοση : 30%, σημείο τήξεως : 269-272 °C]

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 3,67 (dd, J_{5,6}= 8.4 Hz, J_{5,7}= 19.2 Hz, 1H), 3.85 (d, J= 6.6 Hz, 6H), 4.30-4.40 (m, 1H), 5.11 (q, 1H), 6.82-6.91 (m, 4H), 6.98 (d, J= 7.8 Hz, 2H), 7.13 (d, J= 8.4 Hz, 1H), 7.20-7.26 (m, 3H), 7.5(t, 1H), 8.11 (d, J= 8.1 Hz, 1H), 10.94 (s, 1H), 13.84 (s, 1H)

5-(2-μεθυλοφαινυλο)-1-ακετυλο-3-(4,5-διυδρο-1H-πυραζολ-3-υλ)-4-υδροξυ-2-(1H)-κινολινόνη (27)



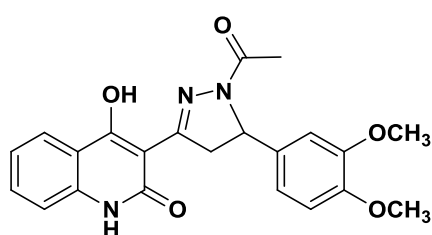
(27) 361.39 [C₂₁H₁₉N₃O₃]

Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο χρησιμοποιώντας 0.20 mmol (0.061g) της 4-υδροξυ-3-[3-(2-μεθυλοφαινυλο)-1-οξο-2-προπεν-1-υλο]-2(1H)-κινολινόνης (5) και 0.40 mmol (0.02g) ένυδρης υδραζίνης σε 4 ml οξικού οξέος. Το προϊόν λαμβάνεται ύστερα από διήθηση και κατεργασία (trituration) με MeOH, με τη μορφή ανοιχτού κίτρινου στερεού. [απόδοση : 41%, σημείο τήξεως : 296-298 °C]

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.50 – 2.44 (m, 6H), 3.73 – 3.59 (m, 1H), 3.73 – 3.59 (m, 1H), 5.71 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.99 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 7.21 – 7.08 (m, 4H), 7.28 (t, 1H), 7.56 (t, 1H), 8.10 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 9.74 (s, 1H), 13.19 (s, 1H)

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 19.61, 22.23, 45.31, 55.64, 100.88, 114.31, 115.29, 122.87, 123.95, 124.71, 126.70, 127.67, 131.05, 133.02, 134.41, 138.30, 139.49, 157.78, 162.76, 166.17

5-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-1-ακετυλο-3-(4,5-διυδρο-1H-πυραζολ-3-υλ)-4-υδροξυ-2-(1H)-κινολινόνη (28)



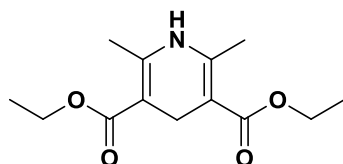
(28) 407.42 [C₂₂H₂₁N₃O₅]

Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο χρησιμοποιώντας 0.10 mmol (0.035g) της 4-υδροξυ-3-[3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-1-οξο-2-προπεν-1-υλο]-2(1H)-κινολινόνης, (9) και 0.20 mmol (0.01g) ένυδρης υδραζίνης σε 3 ml οξικού οξέος. Το προϊόν

εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο λαμβάνεται ύστερα από κατεργασία (trituration) με MeOH, με τη μορφή ανοιχτού κίτρινου στερεού [απόδοση : 35%, σημείο τήξεως : >300 °C]

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.44 (s, 3H), 3.88 (d, J = 8.5 Hz, 6H), 3.94-4.00 (m, 1H), 4.13 - 4.17 (m, 1H), 5.51 (dd, J = 11.2, 4.7 Hz, 1H), 6.74-6.86(m, 3H), 7.31 (s, 1H), 7.12 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.53-7.62 (m, 2H), 9.21 (s, 1H), 13.18 (s, 1H)

1,4-διϋδρο-2,6-διμεθυλο-3,5-πυριδινοκαρβοξυλικός δαιθυλεστέρας (εστέρας του Hantzsch) (**29**)^{115a,b}



(**29**) 253.29 [C₁₃H₁₉NO₄]

0.062 mol (8g) ακετοξικού αιθυλεστέρα διαλύονται σε 10 ml μεθανόλη και στη συνέχεια προστίθενται 0.02 mol (0.75g) φορμαλδεΐδης και 0.031 mol (2.47g) όξινου ανθρακικού αμμωνίου. Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται στους 50-60 °C μέχρι τη πλήρη διάλυση του άλατος. Στη συνέχεια, θερμαίνεται επιπλέον για 1 ώρα στους 65°C με τη βοήθεια

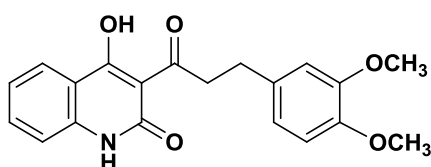
κάθετου ψυκτήρα. Μετά το τέλος της αντίδρασης, αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου, ακολουθεί διήθηση και το προϊόν παραλαμβάνεται ύστερα από διαδοχικές εκκλύσεις με μεθανόλη χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. [απόδοση : 25%, σημείο τήξεως : 184-189°C, σ.τ. βιβλιογραφίας: 183-185 °C]

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.28 (t, 6H), 2.19 (s, 6H), 3.27 (s, 2H), 4.17 (q, 4H), 5.11 (s, 1H)

Γενική μέθοδος σύνθεσης διϋδρο-χαλκονών 30-33

Σε κατάλληλη ποσότητα απόλυτης αποξυγονωμένης αιθανόλης διαλύονται σε αναλογία 1:3 ποσότητα της κατάλληλης κινολινο-χαλκόνης και του εστέρα του Hantzsch (**29**). Στη συνέχεια προστίθεται 20% w/t καταλύτη Pd/C και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 24 ώρες στους 78°C με τη βοήθεια κάθετου ψυκτήρα. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Μετά το τέλος της αντίδρασης, το μίγμα διηθείται από γη διατόμων (celite) και το διήθημα συμπυκνώνεται. Το προϊόν λαμβάνεται ύστερα από κατεργασία (trituration) με μεθανόλη με τη μορφή στερεού.

4-υδροξυ-3-[3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-1-οξο-2-προπαν-1-υλο]-2(1H)-κινολινόνη (**30**)



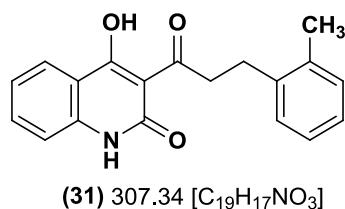
(**30**) 353.37 [C₂₀H₁₉NO₅]

Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο χρησιμοποιώντας 0.20 mmol (0.07g) της 4-υδροξυ-3-[3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-1-οξο-2-προπεν-1-υλο]-2(1H)-κινολινόνης, (**9**), 0.62 mmol (0.15g) του 1,4-διϋδρο-2,6-διμεθυλο-3,5-πυριδινοκαρβοξυλικού δαιθυλεστέρα, (**29**) και 20% w/t (0.014g) καταλύτη

Pd/C σε 5 ml αποξυγονωμένης αιθανόλης. Το προϊόν λαμβάνεται με τη μορφή ανοιχτού κίτρινου στερεού. [απόδοση : 26%]

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 3.02 (t, 2H), 3.11 (t, 2H), 3.87 (s, 6H), 6.82 (d, *J* = 11.3 Hz, 2H), 7.44 – 7.33 (m, 2H), 7.75 – 7.66 (m, 1H), 8.21 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 9.22 (s, 1H), 11.59 (s, 1H), 16.91 (s, 1H)

4-υδροξυ-3-[3-(2-μεθυλοφαινυλο)-1-οξο-2-προπαν-1-υλο]-2(1H)-κινολινόνη (31)

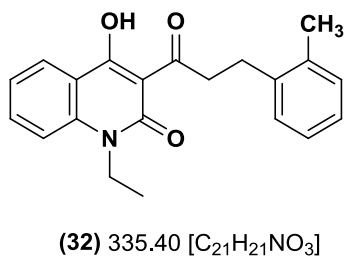


Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο χρησιμοποιώντας 0.20 mmol (0.06g) της 4-υδροξυ-3-[3-(2-μεθυλοφαινυλο)-1-οξο-2-προπεν-1-υλο]- 2(1H)-κινολινόνης, (5), 0.62 mmol (0.15g) του 1,4-διϋδρο-2,6-διμεθυλο-3,5-πυριдиноκαρβοξυλικού διαιθυλεστέρα, (29) και 20% w/t (0.012g) καταλύτη Pd/C σε 5 ml αποξυγονωμένης αιθανόλης.

Το προϊόν λαμβάνεται με τη μορφή κίτρινου στερεού. [απόδοση : 50%, σημείο τήξεως : 207-210 °C]

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.33 (s, 3H), 3.03 (t, 2H), 3.64 (t, 2H), 7.02 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.10-7.26 (m, 4H), 7.56 (pseudotriplet, 2H), 8.14 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 9.92 (s, 1H), 17.04 (s, 1H)

4-υδροξυ-3-[3-(2-μεθυλοφαινυλο)-1-οξο-2-προπαν-1-υλο]-1-αιθυλ-2(1H)-κινολινόνη (32)

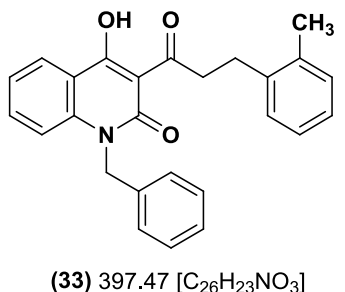


Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο χρησιμοποιώντας 0.15 mmol (0.05g) της 4-υδροξυ-3-[3-(2-μεθυλοφαινυλο)-1-οξο-2-προπεν-1-υλο]-1-αιθυλ-2(1H)-κινολινόνης (22), 0.45 mmol (0.113g) του διεθυλ 1,4-διϋδρο-2,6-διμεθυλο-3,5-πυριдиноκαρβοξυλικού διαιθυλεστέρα, (29) και 20% w/t (0.010g) καταλύτη Pd/C σε 8 ml αποξυγονωμένης αιθανόλης. Το προϊόν λαμβάνεται με τη

μορφή εκρού στερεού. [απόδοση : 36%, σημείο τήξεως : 127-129 °C]

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.33 (t, 3H), 2.37 (s, 3H), 3.03 (t, 2H), 3.62 (t, 2H), 4.29 (q, 2H), 7.12 (d, *J* = 6 Hz, 2H), 7.22-7.26 (m, 4H), 7.69 (t, 1H), 8.25 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 16.80 (s, 1H)

4-υδροξυ-3-[3-(2-μεθυλοφαινυλο)-1-οξο-2-προπαν-1-υλο]-1-φαινυλομεθυλο-2(1H)-κινολινόνης (33)



Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο χρησιμοποιώντας 0.152 mmol (0.06g) της 4-υδροξυ-3-[3-(2-μεθυλοφαινυλο)-1-οξο-2-προπεν-1-υλο]-1-φαινυλομεθυλο-2(1H)-κινολινόνης, (24), 0.455 mmol (0.115g) του 1,4-διϋδρο-2,6-διμεθυλο-3,5-πυριдиноκαρβοξυλικού διαιθυλεστέρα (29) και 20% w/t (0.012g) καταλύτη Pd/C σε 8 ml αποξυγονωμένης αιθανόλης. Το προϊόν λαμβάνεται με τη μορφή εκρού στερεού. [απόδοση : 75%, σημείο τήξεως : 144-146 °C]

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.37 (s, 3H), 3.05 (t, 2H), 3.65 (t, 2H), 5.49 (s, 2H), 7.10-7.30 (m, 11H), 7.55 (t, 1H), 8.25 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 16.97 (s, 1H)

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 19.54, 27.53, 43.45, 45.77, 115.33, 122.35, 126.16, 126.25, 126.38, 126.45, 129.02, 130.29, 135.01, 136.47, 139.44, 141.39, 153.92, 161.69, 174.44, 178.84

5.2 Μέθοδοι Βιοδοκιμασιών

5.2.1 Αντιπαρασιτική Δράση έναντι της Σπλαχνικής Λεισμανίασης

5.2.1.1 Υλικά και μέθοδοι

Η αντιπαρασιτική δράση των νέων παραγώγων έναντι της σπλαχνικής λεισμανίασης, αξιολογήθηκε με καλλιέργεια του παρασίτου *Leishmania Infantum* (MOM/MA671TMAP263) το οποίο ευθύνεται για αυτήν τη μορφή της νόσου. Τόσο η μαστιγοφόρα μορφή του παρασίτου (promastigotes), όσο και η μη μαστιγοφόρα (amastigotes), καλλιεργήθηκε in vitro κάτω από διαφορετικές πειραματικές συνθήκες κάθε φορά.

i. Υλικό ανάπτυξης των προμαστιγωτών μορφών

Στην παρούσα μέθοδο χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό υλικό καλλιέργειας ευκαρυωτικών κυττάρων το RPMI 1640 medium (Bio Whittaker, Belgium), εμπλουτισμένο με 10% (v/v) θερμικά απενεργοποιημένο εμβρυϊκό ορό βοοειδών FBS (Fetal Bovine Serum), (Bio Whittaker, Belgium). Σε αυτό προστέθηκε επίσης 2 mM L – γλουταμίνης (Bio Whittaker, Belgium), 20 mM ρυθμιστικού διαλύματος HEPES (N-2-υδροξυ-αιθυλ-πιπεραζινο-N'-2-αιθανοσουλφονικό οξύ), (Bio Whittaker, Belgium), καθώς και ποσότητα αντιβιοτικών όπως 100 U/ml πενικιλίνης και 100 µg/ml στρεπτομυκίνης (Bio Whittaker, Belgium), η χρήση των οποίων είναι απαραίτητη σε αυτά τα θρεπτικά υλικά ώστε να αποφεύγονται μολύνσεις από βακτήρια.

Η επιλογή των παρασίτων που παρουσίασαν θετική έκφραση στο γονίδιο της λουσιφεράσης (luciferase gene (LUC)), πραγματοποιήθηκε με την ενδιάμεση προσθήκη στην καλλιέργεια geneticin-sulphate (Sigma-Aldrich, USA) σε μια τελική συγκέντρωση των 5 µg/ ml. Οι προμαστιγωτές αυτές μορφές του παρασίτου επώαστηκαν στους 26°C προσθέτοντας 10⁶ παράσιτα/ml κάθε πέντε ημέρες, με καταγραφή του ρυθμού ανάπτυξης τους κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας.

ii. Υλικό ανάπτυξης των αμαστιγωτών μορφών

Η στείρα, μη μαστιγοφόρος μορφή του παρασίτου προήλθε ύστερα από καλλιέργεια της μαστιγοφόρου του μορφής σε MAA (Medium for Axenic Amastigotes). Το MAA αποτελείται από το τροποποιημένο θρεπτικό υλικό medium 199 σε συνδυασμό με το ισότονο αλατούχο διάλυμα του Hank (Gibco-Invitrogen, Spain), εμπλουτισμένο με 0.5 % ζωμό σόγιας τρύπτο-καζεΐνης (Bio-Rad, UK), 15 mM D-γλυκόζης (Panreac, Spain) και 4 mM NaHCO₃ (Sigma-Aldrich, USA). Η τιμή του pH της καλλιέργειας σταθεροποιήθηκε στο 5.8, και ύστερα από διήθηση, το αποστειρωμένο μέσο (0.2 µm) εμπλουτίστηκε επιπλέον με 0.023 mM αιμίνη βοοειδών (bovine hemin), (Fluka, USA), 5 mM L-γλουταμίνης και 25% θερμικά

απενεργοποιημένο FBS. Οι αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου επωάστηκαν στους 37°C σε ατμόσφαιρα που περιείχε 5% CO₂, προσθέτοντας 10⁵ παράσιτα/ml κάθε πέντε ημέρες.

Κυτταρικές σειρές

Τα ανθρώπινα μονοκύτταρα λευχαιμίας THP1, καλλιεργήθηκαν μονοστρωματικά στους 37°C σε υγροποιημένη ατμόσφαιρα που περιείχε 5% CO₂, με θρεπτικό υλικό το RPMI 1640 medium, εμπλουτισμένο με 10% θερμικά απενεργοποιημένο εμβρυικό ορό βοοειδών FBS, 2 mM L-γλουταμίνης, 100 U/ml πενικιλίνης και 100 μg/ml στρεπτομυκίνης. Προσθήκη επιπλέον κυττάρων γινόταν κάθε τρεις μέρες.

5.2.1.2 Μελέτη τοξικότητας κινολινονο-χαλκονών THP1 σε διαφοροποιημένα μακροφάγα

Οι κυτταροκαλλιέργειες αποτελούν ένα ανοσολογικά ανενεργό σύστημα, που περιέχει τη δυνατότητα μελέτης σε ότι αφορά την επίδραση του φαρμάκου στο κύτταρο ξενιστή έχοντας ταυτόχρονα μια ένδειξη του επιπέδου τοξικότητας του φαρμάκου κατά του κυττάρου ξενιστή.

Για τη διαφοροποίηση των μακροφάγων, τα ανθρώπινα κύτταρα THP1 επωάστηκαν σε περιβάλλον που περιείχε 5% CO₂, αποτελούμενο από 20 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma-Aldrich) για 18 ώρες στους 37°C, και παρέμειναν άλλες 24 ώρες σε καινούργιο περιβάλλον χωρίς την προσθήκη PMA με σκοπό την ωρίμανση των κυττάρων.

Κάθε κινολινονο-χαλκόνη διαλύθηκε σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 50 - 1.56 μM, και επωάστηκε για 72 ώρες στους 37°C, σε ατμόσφαιρα 5% CO₂. Η βιωσιμότητα κυττάρων αξιολογήθηκε από τη δοκιμή MTT (Mosmann, 1983).

5.2.1.3 Αναστολή ανάπτυξης

Η προμαστιγωτή μορφή του παρασίτου *Leishmania infantum*, επωάστηκε σε διαφορετικές κάθε φορά συγκεντρώσεις για μια περίοδο τριών ημερών στους 27°C, ξεκινώντας από τη συγκέντρωση των 100 μM. Τα THP1 διαφοροποιημένα μακροφάγα επιμολύνθηκαν για μια περίοδο 4 ωρών, με αναλογία αμαστιγωτα παράσιτα προς μακροφάγα 5:1. Μετά από την περίοδο επιμόλυνσης, τα κύτταρα εκπλύθηκαν με μέσο καλλιέργειας για να απομακρυνθούν τα μη ενσωματωμένα παράσιτα.

Διαλύματα των υπό εξέταση ενώσεων με συγκεντρώσεις 50 - 0.78 μM, προστέθηκαν στα κελιά εις τετραπλούν, και επωάστηκαν για 72 ώρες στους 37°C, παρουσία 5% CO₂. Μετά από την περίοδο επώασης προσδιορίστηκε η δραστηριότητα της λουσιφεράσης των ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών (Roy *et al.*, 2000).

5.2.2 Αντιπαρασιτική Δράση έναντι της Αφρικανικής Τρυπανοσωμίας

5..2.2.1 Υλικά και μέθοδοι

Η αντιπαρασιτική δράση των νέων παραγώγων έναντι της Αφρικανικής Τρυπανοσωμίας, αξιολογήθηκε με καλλιέργεια του παρασίτου *Trypanosoma brucei* το οποίο ευθύνεται για αυτή τη μορφή της νόσου.

i. Υλικό ανάπτυξης του παρασίτου

Στην παρούσα μέθοδο χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό υλικό καλλιέργειας BSF, και η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε τριβλίο 96 βοθρίων (well plates). Χρησιμοποιήθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις των υπό εξέταση ενώσεων σε μια ποσότητα παρασίτων 1×10^3 /ml. Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 37°C για 72 ώρες και στη συνέχεια προστέθηκαν 20μl Alamar Blue. Μετά από 24 ώρες ο φθορισμός επώασης (incubation fluorescence) μετρήθηκε στα $\lambda_{ex}=530$ nm και $\lambda_{em}=590$ nm.

5.2.2.2 Μελέτη τοξικότητας κινολινο-χαλκονών THP1 σε διαφοροποιημένα μακροφάγα

Χρησιμοποιήθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις των κινολινο-χαλκονών σε μια ποσότητα παρασίτων 1×10^4 /ml. Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 37°C για 6 ημέρες και στη συνέχεια προστέθηκαν 20μl Alamar Blue. Μετά από 24 ώρες ο φθορισμός επώασης (incubation fluorescence) μετρήθηκε στα $\lambda_{ex}=530$ nm και $\lambda_{em}=590$ nm. Οι ακριβείς τιμές της κυτταροτοξικότητας δεν ήταν δυνατό να μετρηθούν επακριβώς, εξαιτίας της μικρής διαλυτότητας των ουσιών σε υψηλές συγκεντρώσεις.

Βιβλιογραφία

1. Na-Bangchang K.; Karbwang J., 'Current status of malaria chemotherapy and the role of pharmacology in antimalarial drug research and development', *Fundamental & Clinical Pharmacology*, **2009**, 23, 387-409.
2. Mishra, S.K.; Satpathy, S.K.; Mohanty, S. 'Survey of malaria treatment and deaths', *Bull. World Health Organ.*, **1999**, 77, 1020.
3. Petersen E., 'Toxoplasmosis', *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, **2007**, 12, 214-223.
4. Larson Kathryn, Anti-Parasitic agents
<http://faculty.smu.edu/jbuynak/AntiParasiticAgents.ppt>, **2006**.
5. Dujardin J.C.; Campino L.; Cañavate C.; Dedet J.P.; Gradoni L.; Soteriadou K.; et al. 'Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis in Europe', *Emerg. Infect Dis.* **2008**, 14, 1013-1018.
6. WHO: Report on the Joint WHO/MZCP/HPI Workshop on the Epidemiology, Diagnosis and Control of Leishmaniasis in the Mediterranean Area, Athens, **1993**.
7. Herwaldt BL., *Leishmaniasis Lancet.* **1999**, 354, 1191-1199.
8. Desjeux P., 'Leishmaniasis: public health aspects and control', *Clin Dermatol* **1996**, 14, 417-423.
9. WHO, Control of leishmaniasis. Geneva. *World Health Organ Tech Rep Ser* **1990**, 793.
10. Desjeux P., 'The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide', *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* **2001**, 95, 239-243.
11. Dujardin J.C., 'Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring?', *Trends in Parasitology*, **2006**, 22, 4-6.
12. Harrison L.H., Naidu T.G., Drew J.S., de Alencar J.E., Pearson R.D., 'Reciprocal relationships between undernutrition and the parasitic disease visceral leishmaniasis', *Rev. Infect. Dis.* **1986**, 8, 447-453.
13. Anstead G.M., Chandrasekar B., Zhao W., Yang J., Perez L.E., Melby P.C., 'Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection', *Infect. Immun.* **2001**, 69, 4709-4718.
14. Koutis C., Special Epidemiology. Editions, Technological Educational Institute of Athens. Athens **2007**, Greece.
15. Barral A., Pedral-Sampaio D., Grimaldi Jr G., Momen H., Mc Mahon-Pratt D., Ribeiro de Jesus A., et al. 'Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease', *Am J Trop Med Hyg.* **1991**, 44, 536-546.
16. Liew F.Y., O'Donnell C.A., 'Immunology of leishmaniasis', *Adv Parasitol* **1993**, 32, 161-259.
17. Peters W., Killick-Kendrick R., eds. 'The leishmaniasis in biology and medicine', *Clinical aspects and control*, **1987**, 2.
18. World Health Organization/TDR "Leishmaniasis: Disease Information", **2004**.
19. Davies C., Kaye P., Croft S., Sundar S., "Leishmaniasis: new approaches to disease control", *British Medical Journal*, **2003**, 326, 377-382.
20. Gradoni L., Pizzuti R., Scalone A., et al. 'Recrudescence of visceral leishmaniasis unrelated to HIV infection in the Campania region of Italy', *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **1996**, 20, 234-235.

21. WHO. Leishmania/HIV co-infection. Epidemiological analysis of 692 retrospective cases. *Weekly Epidemiological Records*, **1997**, 72, 49-54.
22. Cref B.J., Jones T.C., Badar R., Sampaio D., Teixeira R., Johnson W.D.J. 'Malnutrition as a risk factor for severe visceral leishmaniasis' *J. Infect. Dis.* **1987**, 156, 1030-1033.
23. Salotra P., Singh R., 'Challenges in the diagnosis of post kala-azar dermal leishmaniasis', *Indian J Med Res.* **2006**, 123,295-310.
24. Cruz I., Nieto J., Moreno J., Cañavate C., Desjeux P., Alvar J., 'Leishmania/HIV co-infections in the second decade', *Indian J Med Res.* **2006**, 123, 357-388.
25. Koutis Ch. Special Epidemiology. Editions, Technological Educational Institute of Athens. Athens **2007**, Greece.
26. Olliaro P.L., 'Bryceson ADM: Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis', *Parasitol Today*, **1993**, 9, 323-328.
27. Guerin P., Olliaro P., Sundar S., Boelaert M., Croft S., Desjeux P., Wasunna M., Bryceson A., *The Lancet Infectious Diseases* 2, **2002**, 494-501.
28. Jha T.K., Olliaro P., Thakur C.P.N., Kanyok T.P., Singhanian B.L., Singh I.J., Singh N.K.P., Akhoury S., Jha S., 'Randomized controlled trial of aminosidine (paromomycin) v sodium stibogluconate for treating visceral leishmaniasis in North Bihar', India *British Medical Journal*, **1998**, 1200-1205.
29. Burton A., "Miltefosine - Oral Victory over Visceral Leishmaniasis", *The Lancet Infectious Diseases* 3, **2003**, 64.
30. Lee H. Y.; Ariyasinghe J. T. N.; Thirumoorthy T., 'Allopurinol hypersensitivity syndrome: a preventable severe cutaneous adverse reaction?', *Singapore Med J*, **2008**, 49(5), 384-387.
31. Pereira K.S.; Luis Schmidt F.; Guaraldo A.M.; Franco R. M. B.; L. Dias V.; Passos L.C., 'Chagas' disease as a foodborne illness', *Journal of Food Protection*, **2009**, 72, 441-446.
32. Jannin J.; Villa L., 'An overview of Chagas disease treatment', *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, **2007**, 102, 95-97.
33. Wilkinson S.R; Taylor M.C.;Horn D.; Kelly J.M.; Cheeseman I., 'A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes', *The National Academy of Sciences of the USA*, **2008**, 105, 5022-5027.
34. Barrett M.P.; Boykin D.W.; Brun R.; Tidwell R.R., 'Human African trypanosomiasis: pharmacological re-engagement with a neglected disease', *British Journal of Pharmacology*, **2007**, 152, 1155-1171.
35. Sokolova A.Y.; Wyllie S.; Patterson S.; Oza S.L.; Read K.D.; Fairlamb A.H., 'Cross-resistance to nitro drugs and implications for treatment of human African trypanosomiasis', *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, **2010**, 54, 2893-2900.
36. Kennedy P.G.E., 'Human African trypanosomiasis-neurological aspects', *J Neurol*, **2006**, 253, 411-416.
37. Docampo R.; Moreno S.N.J., 'Current chemotherapy of human African trypanosomiasis' *Parasitol Res*, **2003**, 90, S10-S13.
38. Nok A.J., 'Arsenicals (melarsoprol), pentamidine and suramin in the treatment of human African trypanosomiasis', *Parasitol Res*, **2003**, 90, 71-79.
39. Lutje V.; Seixas J.; Kennedy A., *The Cochrane Library*, **2010**, 8, 1-46.
40. Tapas A.R.; Sakarkar D.M.; Kakde R.B., *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, **2008**; 7 (3), 1089-1099.

41. Wang L.; Tu Y.C.; Lian T.W.; Hung J.T.; Yen J.H.; Wu M.J., 'Distinctive Antioxidant and Antiinflammatory Effects of Flavonols' *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 9798-9804.
42. Batovska, D.I.; Todorova, I. 'Trends in utilization of the pharmacological potential of chalcones', *Current Clinical Pharmacology* **2010**, 5(1), 1.
43. Stevens J.F.; Page J.E. 'Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health!', *Phytochemistry*, **2004**, 65, 1317-1330.
44. Detsi, A.; Majdalani, M.; Kontogiorgis, C.A.; Hadjipavlou-Litina, D.; Kefalas, P. 'Natural and synthetic 2'-hydroxy-chalcones and aurones: Synthesis, characterization and evaluation of the antioxidant and soybean lipoxygenase inhibitory activity', *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 8073.
45. Jung, J.-C.; Jang, S.; Lee, Y.; Min, Y.; Lim, E.; Jung, H.; Oh, M.; Oh, S.; Jung, M. 'Efficient Synthesis and Neuroprotective Effect of Substituted 1,3-Diphenyl-2-propen-1-ones', *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 4054.
46. Edwards, M. L.; Stemerick, D. M.; Sunkara, P. S. 'Chalcones: a new class of antimitotic agents', *J. Med. Chem.* **1990**, 33, 1948-1954.
47. Bois, F.; Beney, C.; Boumendjel, A.; Mariotte, A. M.; Conseil, G.; Di Pietro A. 'Halogenated Chalcones with High-Affinity Binding to P-Glycoprotein: Potential Modulators of Multidrug Resistance', *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 4161-4164.
48. Goniotaki M., Hatziantoniou S., Dimas K., Wagner M., Demetzos C., 'Encapsulation of naturally occurring flavonoids into liposomes: Physicochemical properties and biological activity against human cancer cell lines', *J. Pharm. Pharmacol.* **2004**, 56, 1217-1224.
49. Modzelewska A., Pettit C., Achanta G., Davidson N. E., Huang P., Khan S. R., 'Anticancer activities of novel chalcone and bis-chalcone derivatives', *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 3491-3495.
50. Liu, M.; Wilairat, P.; Go, M. L. 'Antimalarial alkoxyated and hydroxylated chalcones [corrected]: structure-activity relationship analysis' *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 4443-4452.
51. Awasthi S. K., Mishra N., Kumar B., Sharma M., Bhattacharya A., Mishra L. C., Bhasin V. K., 'Potent antimalarial activity of newly synthesized substituted chalcone analogs in vitro' *Med. Chem. Res.* **2009**, 18, 407-420.
52. Tomar V., Bhattacharjee G., Kamaluddin, S. Rajakumar, K. Srivastava, Puri S. K., 'Synthesis of new chalcone derivatives containing acridinyl moiety with potential antimalarial activity' *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 745-751.
53. Lin, Y. M.; Zhou, Y.; Flavin, M. T.; Zhou, L. M.; Nie, W.; Chen, F. C. 'Chalcones and flavonoids as anti-Tuberculosis agents' *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, 10, 2795-2802.
54. Furman, C.; Lebeau, J.; Fruchart, J. C.; Bernier, J. L.; Duriez, P.; Cotelle, N.; Teissier, 'Di-tert-butylhydroxylated flavonoids protect endothelial cells against oxidized LDL-induced cytotoxicity' *E. J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2001**, 15, 270-278.
55. Nowakowska Z., Kedzia B., Schroeder G., 'Synthesis, physicochemical properties and antimicrobial evaluation of new (E)-chalcones' *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, 43, 707-713.
56. Alvarez M. A., Debattista N. B., Pappano N. B., 'Antimicrobial activity and synergism of some substituted flavonoids' *Folia Microbiol.* **2008**, 53, 23-28.
57. Gacche N., Dhole N. A., Kamble S. G., Bandgar B. P., 'In-vitro evaluation of selected chalcones for antioxidant activity' *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2008**, 23, 28-31.

58. Hirano T., Arimitsu J., Higa S., Naka T., Ogata A., Shima Y., Fujimoto M., Yamadori T., Ohkawara T., Kuwabara Y., Kawai M., Kawase I., Tanaka T., 'Luteolin, a Flavonoid, Inhibits CD40 Ligand Expression by Activated Human Basophils' *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2006**, 140, 150–156.
59. Jin F., Jin X. Y., Jin Y. L., Sohn D. W., Kim S.-A., Sohn D. H., Kim Y. C., Kim H. S., 'Structural requirements of 2',4',6'-tris(methoxymethoxy)chalcone derivatives for anti-inflammatory activity: the importance of a 2'-hydroxy moiety' *Arch. Pharm. Res.* **2007**, 30, 1359–136.
60. Zhang X.-W., Zhao D.-H., Quan Y.-C., Sun L.-P., Yin X.-M., Guan L.-P., 'Synthesis and evaluation of antiinflammatory activity of substituted chalcone derivatives' *Med. Chem. Res.* **2010**, 19, 403–412.
61. Aponte, J.C.; Verastegui, M.; Malaga, E.; Zimic, M.; Quiliano, M.; Vaisberg, A.J.; Gilman, R.H.; Hammond, G.B, 'Synthesis, Cytotoxicity, and Anti-Trypanosomacruzi Activity of New Chalcones' *J. Med. Chem.*, **2008**, 51, 6230-6234.
62. Chen M, Christensen SB, Theander TG, Kharazami A. 'Antileishmanial activity of licochalcone A in mice infected with *Leishmania major* and in hamsters infected with *Leishmaniadonovani*' *Antimicrob Agents Chemother.*, **1994**, 38, 1339-1344.
63. Yang, E. B.; Guo, Y. J.; Zhang, K.; Chen, Y. Z.; Mack, P. 'Inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase by chalcone derivatives' *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, 1550, 144–152.
64. Chen, M.; Christensen, S. B.; Zhai, L.; Rasmussen, M. H.; Theander, T. G.; Frϕkjaer, S.; Steffansen, B.; Davidsen, J.; Kharazmi, A. 'The novel oxygenated chalcone, 2,4-dimethoxy-4'-butoxychalcone, exhibits potent activity against human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in vitro and rodent parasites *Plasmodium berghei* and *Plasmodium yoelii* in vivo' *J. Infect. Dis.* **1997**, 176, 1327–1333.
65. Chen, M.; Christensen, S. B.; Nadelmann, L.; Fich, K.; Lemmich, E.; Blom, J.; Theander, T. G.; Kharazmi, A. 'Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of *Leishmania*' *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, 37, 2550–2556.
66. Aponte J.C.; Castillo D.; Estevez Y.; Gonzalez G.; Arevalo J.; Hammond G.B.; Sauvain M. 'In vitro and in vivo anti-*Leishmania* activity of polysubstituted synthetic chalcones' *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2010**, 20, 100–103.
67. Torres-Santos E.C.; Moreira D.L.; Kaplan M.A.C.; Meirelles M.N.; Rossi-Bergmann B., 'Selective effect of 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmaniaamazonensis*' *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1999**, 43, 1234-1241.
68. Narender T.; Shweta, Gupta S.; 'A convenient and biogenetic type synthesis of few naturally occurring chromenodihydrochalcones and their in vitro antileishmanial activity' *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, 14, 3913-3916.
69. Kayser O.; Kiderlen A.F.; Felbens L.; Kalodzvaj H.; *Planta Med.*, **1998**, 65, 316.
70. Hermoso A.; Jimenez I.A.; Mamani Z. A.; Bazzocchi I. L.; Pinero J. E.; Ravelo A.G.; Valladaresa B., 'Antileishmanial activities of dihydrochalcones from *piper elongatum* and synthetic related compounds. Structuralrequirementsforactivity' *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2003**, 11, 3975–3980.

71. Yenesew A.; Duli M.; Derese S.; Midiwo J.O.; Heydenreich M.; Peter M.G.; Akala H.; Wangui J.; Liyala P.; Waters N.C.; 'Anti-plasmodial flavonoids from the stem bark of *Erythrina abyssinica*' *Phytochemistry*, **2004**, 65, 3029-3032.
72. Narender T.; Shweta; Tanvir K.; Srinivasa Rao M.; Srivastava K.; Puri S.K.; 'Prenylated chalcones isolated from *Crotalaria* genus inhibit in vitro growth of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*' *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, 15, 2453-2455.
73. Aponte J.C.; Castillo D.; Estevez Y.; Gonzalez G.; Arevalo J.; Hammonda G.B.; Sauvain M., 'In vitro and in vivo anti-Leishmania activity of polysubstituted synthetic chalcones' *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2010**, 20, 100-103.
74. Aponte J.C.; Verastegui M.; Malaga E.; Zimic M.; Quiliano M.; Vaisberg A.J.; Gilman R.H.; Hammond G.B., 'Synthesis, Cytotoxicity, and Anti-Trypanosomacruzi Activity of New Chalcones' *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 6230-6234.
75. Claisen L.; Claparbde A. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, **1881**, 14, 2460-2468.
76. Caddick, S. 'Microwave assisted organic reactions' *Tetrahedron*, **1995**, 51, 10403-10432; (b) Nuchter, M.; Muller, U.; Ondruschka, B.; Tied, A.; Lautenschlager, 'Microwave-assisted chemical reactions' *W. Chem. Eng. Technol.* **2003**, 26, 1207-1216; (c) Mavandadi, F.; Lidstrom, P. Curr. 'Microwave - assisted chemistry in drug discovery' *Top. Med.Chem.* **2004**, 4, 773-792; (d) Nuchter, M.; Ondruschka, B.; Bonrath, W.; Gum, A., 'Microwave assisted synthesis - a critical technology overview' *Green Chem.* **2004**, 6, 128-141; (e) Kappe, C. O. *Angew.*, 'Controlled microwave heating in modern organic synthesis' *Chem., Int. Ed.* **2004**, 43, 6250-6284; (f) Gronnow, M. J.; White, R. J.; Clark, J. H.; Macquarrie, D. J. *Org. Proc. Res. Dev.* **2005**, 9, 516-518.
77. Fan, X.-S.; Zhang, Y.-M., 'A Simple Access to Chalcones via Modified Mukaiyama Aldol Condensation Promoted by SmI₃/TMSCl', *Chinese Journal of Chemistry*, **2002**, 20, 198-201.
78. For a review, see: Grundon, M. F. 'Quinoline, quinazoline, and acridone alkaloids' *Nat. Prod. Rep.* **1990**, 7, 131-138; (b) Staerk, D.; Kesting, J. R.; Sairafianpour, M.; Witt, M.; Asili, J.; Emami, S. A.; Jaroszewski, J. W. 'Accelerated dereplication of crude extracts using HPLC-PDA-MS-SPE-NMR: Quinolinone alkaloids of *Haplophyllum acutifolium*' *Phytochemistry* **2009**, 70, 1055-1061; (c) Luo, X. M.; Qi, S. H.; Yin, H.; Gao, C. H.; Zhang, S. 'Alkaloids from the stem bark of *Micromelum falcatum*' *Chem. Pharm. Bull.* **2009**, 57, 600-602; (d) He, J.; Lion, U.; Sattler, I.; Gollmick, F. A.; Gabley, S.; Cai, J.; Meiners, M.; Sch€unke, H.; Schaumann, K.; Dechert, U.; Krohn, M. 'Diastereomeric quinolinone alkaloids from the marine-derived fungus *Penicillium janczewskii*' *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 1397-1399; (e) Wu, S. J.; Chen, I. 'Alkaloids from *Zanthoxylum simulans*' *S. Phytochemistry* **1993**, 34, 1659-1661; (f) Neville, C. F.; Barr, S. A.; Grundon, M.F. 'Approaches to the syntheses of dimeric quinolinone alkaloids' *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 5995-5998; (g) Campbell, W. E.; Davidowitz, B.; Jackson, G. E. 'Chemosystematic studies in the genera of the Diosmeae. Part 3. Quinolinone alkaloids from an *Agathosma* species' *Phytochemistry* **1990**, 29, 1303-1306.
79. Gurjar, M. K.; Sharma, G. V. M.; Ilangovan, A.; Narayanan, V. U.S. *Patent* 6 191 279, **2001**.
80. Thal, C.; Boye, O.; Guenard, D.; Potier, P. *WO 9002733*, **1990**.

81. Shogaki, T.; Toyoda, H.; Kakita, T.; Furukawa, M.; Nakatsugi, S.; Masai, E.; Yashima, T.; Ueda, I. *EP 577325*, **1994**.
82. Suzuki, K.; Fujiwara, S.; Machii, D.; Ochifuji, N.; Takai, H.; Oono, T.; Furuta, S.; Yamada, K. *JP 06092939*, **1994**.
83. Detsi, A.; Bouloumbasi, D.; Prousis, K.C.; Koufaki, M.; Athanasellis, G.; Melagraki, G.; Afantitis, A.; Igglessi-Markopoulou, O.; Kontogiorgis, C.; Hadjipavlou-Litina, D.J. 'Design and synthesis of novel quinolinone-3-aminoamides and their α -lipoic acid adducts as antioxidant and antiinflammatory agents' *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2450.
84. Foley, M.; Tilley, L. 'Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance' *Int. J. Parasitol.*, **1997**, *27*, 231.
85. Fournet A.; Barrios A.A.; Munoz V.; Hocquemiller R.; Cave A.; Bruneton J., '2-Substituted Quinoline Alkaloids as Potential Antileishmanial Drugs' *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1993**, 859-863.
86. Fournet, A.; Ferreira, M.E.; Rojas De Arias, A.; Torres De Ortiz, S.; Fuentes, S.; Nakayama, H.; Schinini, A.; Hocquemiller, R. 'In vivo efficacy of oral and intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*' *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1996**, *40*, 2447.
87. Lavaud, C.; Massiot, G.; Vasquez, C.; Moretti, C.; Sauvain, M.; Balderrama, L. '4-Quinolinone alkaloids from *Dictyoloma peruviana*' *Phytochemistry*, **1995**, *40*, 317.
88. Mahmoudi N.; Ciceron L.; Franetich J.F.; Farhati K.; Silvie O.; Eling W.; Sauerwein R.; Danis M.; Mazier D.; Derouin F., 'In vitro activities of 25 quinolones and fluoroquinolones against liver and blood stage *Plasmodium* spp' *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2003**, 2636-2639.
89. Bajohr L.L.; Ma L.; Platte C.; Liesenfeld O.; Tietze L.F.; Gross U.; Bohne W., 'In vitro and in vivo activities of 1-hydroxy-2-alkyl-4(1H)quinolone derivatives against *Toxoplasma gondii*' *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2010**, 517-521.
90. Saleh A.; Friesen J.; Baumeister S.; Gross U.; Bohne W., 'Growth inhibition of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum* by nanomolar concentrations of 1-hydroxy-2-dodecyl-4(1H)quinolone, a high-affinity inhibitor of alternative (type II) NADH dehydrogenases' *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2007**, 1217-1222.
91. Hucke O.; Gelb M.H.; Verlinde C.L.M.J.; Buckner F.S., 'The Protein Farnesyltransferase Inhibitor Tipifarnib as a New Lead for the Development of Drugs against Chagas Disease' *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5415-5418.
92. (a) Witkop, B.; Patrick, J. B.; Rosenblum, M. 'Mechanism of oxidation. II. Ring effects in autoxidation. A new type of Camps reaction' *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 2641; (b) Robl, J. A. 'Synthesis of 2-(4-fluorophenyl)-4-isopropyl-3-quinolinecarboxaldehyde: a new route to 2,3,4-substituted quinolines' *Synthesis* **1991**, *1*, 56; (c) Anzini, M.; Cappelli, A.; Vomero, S. 'Synthesis of 6,7-dihydro-8-(4-methyl-1-piperazinyl)[1]benzoxepino[4,5-c]quinoline as a potential 5-HT₃ receptor ligand' *Heterocycles*, **1993**, *36*, 1065; (d) Gewalt, K.; Rehwald, M.; Gruner, M. 'Hetarylsulfonium salts by cyclization' *Liebigs Ann. Chem.* **1993**, *5*, 457; (e) Varnavas, A.; Lassiani, L.; Luxich, E.; Zacchigna, M. 'Anthranoyl-anthranilic acid. A template for the development of a new class of cholecystinin receptor ligands' *Pharmazie*, **1996**, *51*, 697; (f) Watson, B. T.; Christiansen, G. E. 'Solid phase synthesis of substituted quinolin-2(1H)-one-3-carboxylic acids via an

- intramolecular Knoevenagel condensation' *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 9839; (g) Lavergne, O.;Harnett, J.; Rolland, A.; Lanco, C.; Lesueur-Ginot, L., 'BN 80927: a novel homocamptothecin with inhibitory activities on both topoisomerase I and topoisomerase II' *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 2599; (h) Hashim, S. R.;Reddy, P. T. 'A convenient method for the preparation of 3-phenoxy/thiophenoxy-2(1H)quinolinones' *Indian J. Chem., Sect B* **2001**, 40, 357.
93. Lacey R.N., 'Derivatives of acetoacetic acid. VII. α -Acetyltetramic acids' *J. Chem. Soc.*, **1954**, 850.
94. (a) Bezuglyi P.A.; Ukrainets I.V.; Treskach V.I.; Turov A.V. '4-Hydroxy-2-quinolones. 1. Efficient synthesis of 3-alkyl-4-hydroxy-2-quinolones' *Khim. Geterotsikl. Soedin.*, **1991**, 11, 1533. (b) Bezuglyi P.A.; Ukrainets I.V.; Treskach V.I.; Turov A.V. '4-Hydroxy-2-quinolones. 2. Simple synthesis of arboricine' *Khim. Geterotsikl. Soedin.*, **1992**, 4, 522.
95. Ukrainets I.V.; Bezuglyi P.A.; Treskach V.I.; Turov A.V. '4-Hydroxy-2-quinolones. 3. The synthesis and physicochemical properties of 1-R-3-carbethoxy-4-hydroxy-2-quinolones' *Khim. Geterotsikl. Soedin.*, **1992**, 5, 636.
96. Coppola G.M.; Hardtmann G.E.; Pfister O.R., 'Chemistry of 2H-3,1-benzoxazine-2,4-(1H)-dione (isatoic anhydride). 2. Reactions with thiopseudoureas and carbanions' *J. Org. Chem.*, **1976**, 41, 825.
97. Coppola G.M.; Hardtmann G.E., 'The chemistry of 2H-3,1-benzoxazine-2,4(1H)-dione (isatoic anhydride). 7. Reactions with anions of active methylene stoformquinolines' *J.Heterocycl. Chem.*, **1979**, 16, 1605.
98. Coppola G.M., '1,2,4-Triazino[4,5-a]indoles. V. Study of 1,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-1,2,4-triazino[4,5-a]indole' *J. Heterocycl. Chem.*, **1983**, 20, 1217.
99. (a) Coppola G.M.; Schuster H.F., 'Application of isatoic anhydride chemistry to the synthesis of racemic paraensine' *J. Heterocycl. Chem.*, **1984**, 21, 1409, (b) Coppola G.M., 'An efficient synthesis of arboricine' *Synth. Commun.*, **1985**, 15, 135.
100. Vulfson N.S.; Zhurin R.B., *J.Gen. Chem.*, **1959**, 29, 3635.
101. Bravo P.; Resnati G.; Viani F.; Cavicchio G., 'Selective method for 3-monoalkylation of 4-hydroxypyran-2-ones and of 4-hydroxyquinolin-2(1H)-ones or their N-methyl derivatives by ketone Mannich bases' *J.Chem. Res.*, **1986**, 374.
102. Roschger P.; Fiala W.; Stadbauer W., 'Nucleophilic substitution and ring closure reactions of 4-chloro-3-nitro-2-quinolones' *J.Heterocycl. Chem.*, **1992**, 29, 225.
103. Kappe T.; Schnell, 'Synthesis and reactions of 3-aryl derivatives of 4-hydroxy-2-quinolones and 4-hydroxycoumarin' *J.Heterocycl. Chem.*, **1996**, 33, 663.
104. Detsi A., Bardakos V., Markopoulos J. and Igglessi-Markopoulou O., 'Reactions of 2-methyl-3,1-benzoxazin-4-one with active methylene compounds: a new route to 3-substituted 4-hydroxyquinolin-2-(1H)-ones' *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 1*, **1996**, 24, 2909-2913.
105. Chikhalia K.H.; Patel M.J.; Vashi D.B.; 'Design, synthesis and evaluation of novel quinolylchalcones as antibacterial agents' *Arkivoc*, **2008**, (xiii), 189-197.
106. Sharma M.; Chaturvedi V.; Manju Y.K.; Bhatnagar S.; Srivastava K.; Puri S.K.; Prem M.S. Chauhan, 'Substituted quinoliny chalcones and quinoliny pyrimidines as a new class of anti-infective agents' *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2009**, 44, 2081–2091.

107. Ferrer R.; Lobo G.; Gamboa N.; Rodrigues J.; Abramjuk C.; Jung K.; Lein M.; Charris J.E., 'Synthesis of [(7-chloroquinolin-4-yl)amino]chalcones: potential antimalarial and anticancer agents' *Sci Pharm.*, **2009**, 77, 725–741.
108. Dominguez J.N.; Charrisa J.E.; Lobo G.; Gamboa de Dominguez N.; Moreno M.M.; Riggione F.; Sanchez E.; Olson J.; Rosenthal P.J., 'Synthesis of quinolinyl chalcones and evaluation of their antimalarial activity' *Eur. J. Med. Chem.*, **2001**, 36, 555–560.
109. Rainer Mahrwald, 'Modern Aldol Reactions', Vol. 1, **2004**, 4.2 Aminocatalysis of the Aldol Reaction, pages 163-164, ISBN: 3-527-30714-1
110. Boyle R.G.; Imogai H.J.; Cherry M.; Humphries A.J.; Navarro E.F.; Owen D.R.; Dales N.A.; Lamarche M.; Cullis C.; Gould A.E., WO 2005028474 A2, **2005**
111. Sivakumar P.M.; Ganesan S.; Veluchamy P.; Doble M., 'Novel chalcones and 1,3,5-triphenyl-2-pyrazoline derivatives as antibacterial agents' *Chem. Biol. Drug. Design*, **2010**, 76, 407–411.
112. Ouellet, S. G.; Walji, A. M.; MacMillan, D. W. C. 'Enantioselective Organocatalytic Transfer Hydrogenation Reactions using Hantzsch Esters' *Acc. Chem. Res.* **2007**, 40, 1327–1339.
113. You, S.-L. 'Recent Developments in Asymmetric Transfer Hydrogenation with Hantzsch Esters: A Biomimetic Approach' *Chem. Asian J.* **2007**, 2, 820 – 827
114. Liu, Q.; Li, J.; Shen, X.-X.; Xing, R.-G.; Yang, J.; Liu, Z.; Zhou, B. 'Hydrogenation of olefins using Hantzsch ester catalyzed by palladium on carbon', *Tetrah. Lett.* **2009**, 50, 1026–1028
115. a) Tuttle, J.B.; Ouellet, S.G.; MacMillan, D. W. C. 'Organocatalytic Transfer Hydrogenation of Cyclic Enones', *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 12662-12663, b) Wang, L.F.; Zhang, H.Y.; Kong, L.; Chen, Z.W.; Shi, J.G., 'DFT calculations indicate that 1,4-dihydropyridine is a promising lead antioxidant', *Helvetica Chimica Acta*, **2004**, 87(6), 1515-1521.
116. Lu J.; Bai Y.; Wang J.; Yang B.; Li W., *Synthetic Comm.*, **2001**, 31(17), 2625–2630.
117. Thirunarayanan, G.; Gopalakrishnan, M.; Vanangamudi, G. 'IR and NMR spectral studies of 4-bromo-1-naphthyl chalcones-assessment of substituent effects', *Spectrochimica Acta Part A*, **2007**, 67, 1106–1112.
118. Arunima and N. D. Kurur, 'Ortho effect in fluorobenzenes: cross-correlated relaxation and quantum chemical studies', *Magn. Reson. Chem.*, **2005**, 43, 132–138.
119. J.A. Moore; R.T. Proffitt, 'Ambisome: liposomal formulation, structure, mechanism of action and pre-clinical experience', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2002**, 49, 21-30.
120. a) G.V.Kalechits; V.K.Olkhovik; I.I.Kalosha; E.D.Skakovskii; A.A.Pap; A.A.Zenyuk; Y.V.Matveenko, 'Synthesis and properties of 3-cinnamoyl-4-hydroxy-2-quinolone', *Russian Journal of General Chemistry*, **2001**, 71, 8, 1257-1260, b) Sarveswari, S.; Raja, T. K., 'A rapid microwave assisted synthesis of 3-acetyl-4-hydroxyquinolin-2(1H)-one and its conversion to quinolin-3-ylisoxazolines and pyrazolines', *Indian Journal of Heterocyclic Chemistry*, **2006**, 16(2), 171-174.
121. Alekseyev, N. N.; Demidovich, A. A.; Kalechits, G. V.; Kalosha, I. L.; Tolkachev, V. A., 'Luminescent and nonlinear-optical properties of substituted cinnamoyl quinolines', *Zhurnal Prikladnoi Spektroskopii*, **1994**, 61, 234-236.

122. Selva, M.; Tundo, P.; Perosa, A., 'Reaction of Functionalized Anilines with Dimethyl Carbonate over NaY Faujasite. 3. Chemoselectivity toward Mono-N-methylation', *Journal of Organic Chemistry*, **2003**, 68(19), 7374-7378.
123. Mohamed A.; Bayaomy B., ' Synthesis and evaluation of molluscicidal and larvicidal activities of some novel enamines derived from 4-hydroxyquinolinones: Part IX', *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2005**, 13, 6133-6144.
124. Kirincich, S.J.; Xiang, J.; Green, N.; Tam, S.; Yang, Hui Y.; Shim, J.; Shen, M.W.H.; Clark, J.D.; McKew, J.C. , 'Benzhydrylquinazolinones: novel cytosolic phospholipase A2 α inhibitors with improved physicochemical properties', *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2009**, 17(13), 4383-4405.
125. Ye, Jiahai; Wu, Jun; Huang, Nianfeng; Zhang, Wenchao; Yu, Shuyan; Qin, Zhichun; Wang, Zhiyong; Shang, Yongjia, 'Study on proline-catalyzed facile synthesis of novel 3-(α,β -unsaturated carbonyl)-4-hydroxy-2(1H)-quinolinone derivatives and their fluorescent properties', *Youji Huaxue*, 2010, 30, 1548-1554.
126. Freiberg, W., 'Basicity of ketones', *Journal fuer Praktische Chemie/Chemiker-Zeitung*, **1994**, 336(7), 565-74.