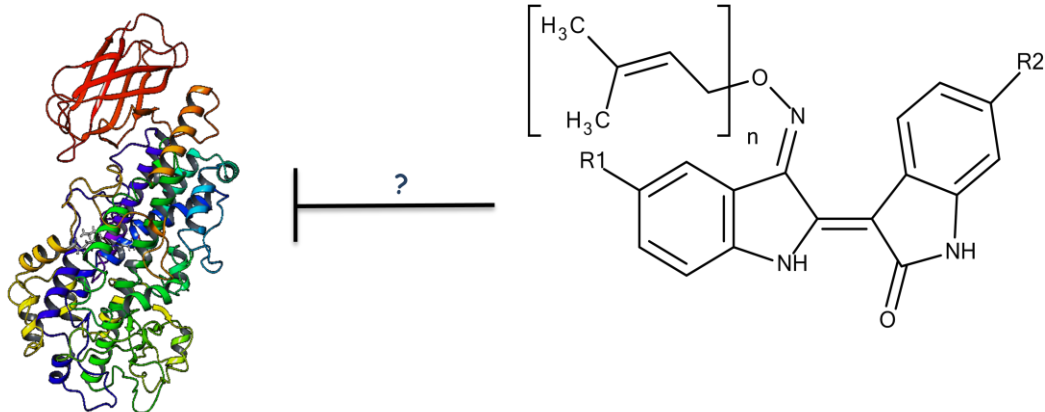




ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ & ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Καθηγητής Αλέξιος-Λέανδρος Σκαλτσούνης

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ Μ.Δ.Ε.

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ
ΙΝΤΙΡΟΥΜΠΙΝΗΣ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥΣ
ΩΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ 5-LOX**



ΛΑΖΑΡΗ ANNA

ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ: Καθηγητής Αλέξιος-Λέανδρος Σκαλτσούνης

ΑΘΗΝΑ 2014

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

- ✓ Τα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:
 - τον Καθηγητή Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη
 - την Καθηγήτρια Σοφία Μητάκου και
 - τον Επίκουρο Καθηγητή Νεκτάριο Αληγιάννη, για τις επισημάνσεις τους και το χρόνο που αφιέρωσαν για την διόρθωση του μεταπτυχιακού.
- ✓ Ιδιαίτερα τον υπεύθυνο καθηγητή μου Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη, για την επιλογή και ανάθεση του θέματος και το συνεχές ενδιαφέρον του.
- ✓ Τον Dr. Nicolas Gaboriaud-Kolar, για την επίβλεψη του μεταπτυχιακού, τη βοήθεια, την ενθάρρυνση και τη στήριξή του τόσο σε εργαστηριακό όσο και σε προσωπικό επίπεδο.
- ✓ Τη Διδάκτορα Γεωργία-Κωνσταντίνα Σταθοπούλου, για την προετοιμασία των δειγμάτων για in vitro αξιολόγησή.
- ✓ Τον Επίκουρο Καθηγητή Ευάγγελο Γκίκα, την Υποψήφια Διδάκτορα Ειρήνη Κουλούρα και τον Dr. Vincent Brièudes, για την λήψη των φασμάτων μάζας.
- ✓ Την Υποψήφια Διδάκτορα Νικητία Μέξια, για την υπομονή της και την πολύτιμη βοήθειά της κάθε φορά που τη χρειάστηκα.
- ✓ Τον κο. Παναγιώτη Γερολυμάτο για την καθοδήγησή του κατά τους πρώτους μήνες του μεταπτυχιακού.
- ✓ Τα υπόλοιπα μέλη της "ομάδας της σύνθεσης" για το ευχάριστο και χαρούμενο κλίμα στο εργαστήριο και τη συμπαράσταση και φιλική τους στήριξη.
- ✓ Την οικογένειά μου που μου έδωσε τη δυνατότητα να συνεχίσω τις σπουδές μου με το συγκεκριμένο μεταπτυχιακό.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|--|----|
| ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ | 0 |
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 7 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ: ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ | 9 |
| 1.1) Εισαγωγή..... | 9 |
| 1.2) Ιστορία της χρήσης των ιντιρουμπινών | 10 |
| 1.2.1) Οι ιντιρουμπίνες ως χρωστικές..... | 10 |
| 1.2.2) Οι ιντιρουμπίνες ως φάρμακα | 16 |
| 1.3) Ιντιρουμπίνες σε φυσικές πηγές..... | 18 |
| 1.4) Βιοσυνθετικές πορείες που καταλήγουν σε σχηματισμό ιντιρουμπινών | 22 |
| 1.4.1) Στα φυτά:..... | 22 |
| 1.4.2) Στα γαστερόποδα μαλάκια: | 23 |
| 1.4.3) Στον άνθρωπο από τα εντερικά βακτήρια:..... | 25 |
| 1.5) Φαρμακολογικές δράσεις και θεραπευτικό προφίλ ιντιρουμπινών..... | 26 |
| 1.6) Παράγοντες που καθιστούν δύσκολη την κλινική αξιοποίηση των ιντιρουμπινών.... | 29 |
| 1.7) Κινάσες και άλλα ένζυμα ως μοριακοί στόχοι των ιντιρουμπινών | 30 |
| 1.7.1) Εισαγωγή..... | 30 |
| 1.7.2) CDKs..... | 33 |
| 1.7.3) GSK-3 | 37 |
| 1.7.4) <i>STAT</i> πρωτεΐνες | 44 |
| 1.7.5) Aurora's..... | 45 |
| 1.7.6) DYRK | 47 |
| 1.7.7) CRK3 | 48 |
| 1.7.8) GP | 49 |
| 1.7.9) AhR | 49 |
| 1.8) 5-LOX: Ένας νέος μοριακός στόχος για τις ιντιρουμπίνες | 49 |
| 1.8.a) Γενικά στοιχεία για την 5-LOX..... | 49 |
| 1.8.β) Υπάρχοντα στοιχεία για την επίδραση των ιντιρουμπινών επί της 5-LOX..... | 56 |
| 1.9) Ερευνητικοί στόχοι..... | 57 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ: ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 61 |
| 2.1) Βασικές αντιδράσεις: Σύνθεση των πρόδρομων μορίων (ινδολίων και ισατινών), διμερισμός τους και σχηματισμός οξιμών..... | 61 |
| 2.1.1) Εισαγωγή..... | 61 |
| 2.1.2) Σύνθεση των απαραίτητων ισατινών..... | 62 |

| | |
|---|-----|
| 2.1.3) Σύνθεση των κατάλληλα υποκατεστημένων 3-ακετοξυϊνδολίων | 64 |
| 2.1.4) Σύνθεση ιντιρουμπινών | 65 |
| 2.1.5) Σύνθεση οξιμών | 66 |
| 2.2) Σύνθεση νέων παραγώγων της 6-βρωμοϊντιρουμπίνης και της 3' οξίμης της στην 5'-θέση..... | 66 |
| 2.3) Σύνθεση παραγώγων με συζευγμένο επιπλέον βενζολικό δακτύλιο δομής βενζο[g]ινδολίου | 69 |
| 2.4) Σύνθεση και βιολογική δράση ισοπρενικών παραγώγων της ιντιρουμπινο-3'-οξίμης..... | 70 |
| 2.5) Φασματοσκοπική Μελέτη..... | 73 |
| 2.5.α) Φάσματα της 3'-O-farnesyl-IO [25]..... | 73 |
| 2.5.β) Φάσματα των 5'-φθορο-παραγώγων | 77 |
| 2.6) Ενδεικτική παράθεση της θραυσματοποίησης ενός από τα ισοπρενικά παράγωγα ... | 78 |
| 2.7) Βιολογική δράση των αναλόγων..... | 78 |
| 2.8) Συμπεράσματα..... | 84 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ..... | 87 |
| 3.1) Γενικά (Τεχνικές-Οργανολογία)..... | 87 |
| 3.2) Βασικές αντιδράσεις: Σύνθεση των πρόδρομων μορίων (ινδολίων και ισατινών), διμερισμός τους και σχηματισμός οξιμών..... | 88 |
| 3.2.1) Σύνθεση των απαραίτητων ισατινών..... | 88 |
| 3.2.2) Σύνθεση των κατάλληλων 5-υποκατεστημένων 3-ακετοξυϊνδολίων..... | 90 |
| 3.2.3) Σύνθεση ιντιρουμπινών | 97 |
| 3.2.4) Σύνθεση οξιμών | 98 |
| 3.3) Σύνθεση παραγώγων της 6-βρωμοϊντιρουμπίνης και της 3' οξίμης της στην 5'-θέση | 100 |
| 3.3.1) Νέα παράγωγα..... | 100 |
| 3.3.2) Γνωστά 5'-υποκατεστημένα παράγωγα που μετατράπηκαν σε νέα ισοπρενικά ανάλογα ιντιρουμπίνης..... | 104 |
| 3.4) Σύνθεση παραγώγων με συζευγμένο επιπλέον βενζολικό δακτύλιο δομής βενζο[g]ινδολίου | 110 |
| 3.4.1) 6-βρωμο-βενζο[g]ιντιρουμπινη | 110 |
| 3.4.2) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-βενζο[g]ιντιρουμπινο-3'-οξίμη..... | 110 |
| 3.4.3) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-βενζο[g]ιντιρουμπινο-3'-[O-(2-βρωμοαιθυλ)]οξίμη | 111 |
| 3.5) Σύνθεση ισοπρενικών παραγώγων ιντιρουμπινο-3'-οξίμης | 112 |
| 3.5.1) (2'Z, 3'E)-ιντιρουμπινο-3'-(O-πρενυλ)οξίμη | 112 |
| 3.5.2) (2'Z, 3'E)-ιντιρουμπινο-3'-(O-γερανυλ)οξίμη | 113 |

| | |
|--|-----|
| 3.5.3) (2'Z, 3'E)-ιντιρουμπινο-3'-(Ο-φαρνεσυλ)οξίμη | 114 |
| 3.5.4) (2'Z, 3'E)-6-βρωμοϊντιρουμπινο-3'-(Ο-πρενυλ)οξίμη | 115 |
| 3.5.5) (2'Z, 3'E)-6-βρωμοϊντιρουμπινο-3'-(Ο-γερανυλ)οξίμη..... | 116 |
| 3.5.6) (2'Z, 3'E)-6-βρωμοϊντιρουμπινο-3'-(Ο-φαρνεσυλ)οξίμη..... | 117 |
| 3.5.7) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-5'-μεθοξυϊντιρουμπινο-3'-(Ο-πρενυλ)οξίμη | 118 |
| 3.5.8) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-5'-μεθοξυϊντιρουμπινο-3'-(Ο-γερανυλ)οξίμη | 119 |
| 3.5.9) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-5'-μεθυλοϊντιρουμπινο-3'-(Ο-πρενυλ)οξίμη..... | 119 |
| 3.5.10) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-5'-μεθυλοϊντιρουμπινο-3'-(Ο-γερανυλ)οξίμη | 120 |
| 3.5.11) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-5'-κυανοϊντιρουμπινο-3'-(Ο-πρενυλ)οξίμη | 121 |
| 3.5.12) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-5'-κυανοϊντιρουμπινο-3'-(Ο-γερανυλ)οξίμη | 122 |
| 3.5.13) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-5'-νιτροϊντιρουμπινο-3'-(Ο-πρενυλ)οξίμη | 123 |
| 3.5.14) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-5'-νιτροϊντιρουμπινο-3'-(Ο-γερανυλ)οξίμη..... | 123 |
| 3.5.15) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-5'-φορμυλοϊντιρουμπινο-3'-(Ο-πρενυλ)οξίμη | 124 |
| 3.5.16) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-5'-φορμυλοϊντιρουμπινο-3'-(Ο-γερανυλ)οξίμη | 125 |
| 3.5.17) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-5'-φθοριοϊντιρουμπινο-3'-(Ο-πρενυλ)οξίμη | 126 |
| 3.5.18) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-5'-φθοριοϊντιρουμπινο-3'-(Ο-γερανυλ)οξίμη | 127 |
| 3.5.19) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-5'-βρωμοϊντιρουμπινο-3'-(Ο-πρενυλ)οξίμη..... | 128 |
| 3.5.20) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-5'-βρωμοϊντιρουμπινο-3'-(Ο-γερανυλ)οξίμη | 128 |
| 3.5.21) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-βενζο[g]ιντιρουμπινο-3'-[Ο-(πρενυλ)]οξίμη | 129 |
| 3.5.22) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-βενζο[g]ιντιρουμπινο-3'-[Ο-(γερανυλ)]οξίμη | 130 |
| 3.5.23) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-βενζο[g]ιντιρουμπινο-3'-[Ο-(φαρνεσυλ)]οξίμη | 131 |
| ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΕΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ | 133 |
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ | 135 |
| SUMMARY | 137 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 139 |

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη νέων παραγώγων ιντιρουμπίνης και η διερεύνηση της φαρμακολογικής τους δράσης ως αναστολείς της 5-λιποξυγενάσης, που αποτελεί ένζυμο-κλειδί για την πρόκληση φλεγμονής.

Δεδομένου ότι οι κινάσες ως μοριακός στόχος των ιντιρουμπινών έχουν μελετηθεί εκτενώς τα τελευταία χρόνια και λαμβάνοντας υπόψιν την σημασία των φλεγμονωδών διαδικασιών στην εμφάνιση ποικίλων ασθενειών που πλήττουν ολοένα και μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού, μετατοπίσαμε το ενδιαφέρον μας σε ένα ένζυμο που δεν ανήκει στους παραδοσιακούς μοριακούς στόχους των ιντιρουμπινών, την 5-λιποξυγενάση.

Συνθέσαμε 30 νέα παράγωγα ιντιρουμπίνης τα οποία φαρμακολογικά μπορούν να διαιρεθούν σε δύο κατηγορίες: 1ον) παράγωγα ιντιρουμπίνης με σκοπό τη στόχευση της θέσης πρόσδεσης του ATP που διαθέτει η 5-LOX και 2ον) παράγωγα ιντιρουμπίνης με σκοπό τη στόχευση της καταλυτικής περιοχής οξειδωσης του αραχιδονικού της 5-LOX. Από άποψης δομής τα παράγωγα που συνθέσαμε αποτελούν: 1ον) παράγωγα της 6BIO με 5'-υποκατάσταση 2ον) παράγωγα βενζο[g]ινδολίου και 3ον) ισοπρενικά παράγωγα ιντιρουμπίνης.

Το πρώτο κεφάλαιο αποτελεί το γενικό μέρος και περιλαμβάνει μία ανασκόπηση της προέλευσης των ιντιγκοειδών, της ιστορίας των χρήσεών τους, της βιοσύνθεσής τους, των φαρμακολογικών τους δράσεων, του μηχανισμού δράσης και των προβλημάτων που προκύπτουν κατά την κλινική τους εφαρμογή.

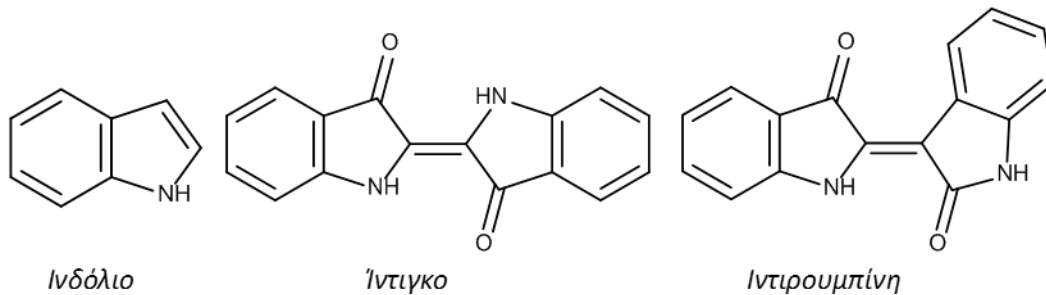
Στο δεύτερο κεφάλαιο παρουσιάζονται αναλυτικά οι κατηγορίες των μορίων που συντέθηκαν, ο τρόπος σύνθεσης και η *in vitro* αξιολόγηση της βιολογικής τους δράσης και τα συμπεράσματα.

Στο τελευταίο κεφάλαιο, αναφέρονται αναλυτικά οι ακριβείς πειραματικές συνθήκες για κάθε παράγωγο ξεχωριστά, οι τεχνικές των συνθέσεων και τα φασματοσκοπικά δεδομένα κάθε ένωσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ: ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

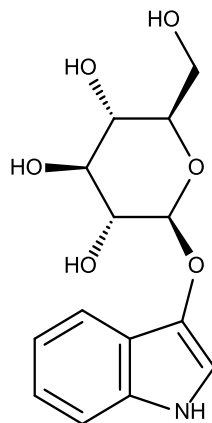
1.1) Εισαγωγή

Οι ιντιρουμπίνες (IUPAC: 1H,1'H[2',3]δισινδολυλιδENO-2,3'-διόνες) είναι δισ-ινδόλια, και παράγονται από ποικίλες φυσικές πηγές.¹ Είναι ενώσεις ισομερείς του ίντιγκο (2,2'-Bis(2,3-dihydro-3-oxoindolyliden)) που απαρτίζονται από τα δύο μονομερή αυτού (ινδόλια) συνδεδεμένα σε διαφορετική θέση με αποτέλεσμα την τροποποίηση του χρωμοφόρου τμήματός. Έτσι οι ιντιρουμπίνες εμφανίζουν ερυθροϊώδες χρώμα ενώ το ίντιγκο, απορροφώντας στα 600-675 nm, μπλε.²



Εικόνα 1: Η ιντιρουμπίνη αποτελεί μόριο ισομερές του ίντιγκο και αμφότερα είναι διμερή του ινδολίου.

Η ιντιρουμπίνη ανακαλύφθηκε το 1855 από τον Edward Schunck ως ένα από τα παραπροϊόντα της μετατροπής της ινδικάνης σε ίντιγκο.³



Εικόνα 2: Ινδικάνη: Άχρωμο πρόδρομο των ιντιγκοειδών που παράγεται φυσιολογικά από φυτά του γένους *Indigofera*.

Η χημική σύνθεση ιντιρουμπίνης πραγματοποιήθηκε το 1881 και βασίστηκε στην συμπύκνωση της ισατίνης και του ινδοξυλίου, ενώ το 1969 η

συνθετική πορεία τροποποιήθηκε μέσω της αντικατάστασης του ινδοξυλίου με το περισσότερο σταθερό 3-ακετοξυ-ινδόλιο.⁴

Το 1961 ο Randraud προσδιόρισε την κρυσταλλική δομή της ιντιρουμπίνης: μια σχεδόν επίπεδη δομή αποτελούμενη από δύο ινδολικά συστήματα συνδεδεμένα με ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου. Οι ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις σταθεροποιούν την trans διαμόρφωση της ιντιρουμπίνης. Διαμοριακοί δεσμοί υδρογόνου μεταξύ του λακταμικού υδρογόνου ενός μορίου ιντιρουμπίνης και του λακταμικού οξυγόνου μιας άλλης ιντιρουμπίνης, καθώς επίσης και π-π-αλληλεπιδράσεις, ευθύνονται για την χαμηλή υδατοδιαλυτότητα και το υψηλό σημείο τήξης των παραγώγων ιντιρουμπίνης.⁵

1.2) Ιστορία της χρήσης των ιντιρουμπινών

1.2.1) Οι ιντιρουμπίνες ως χρωστικές

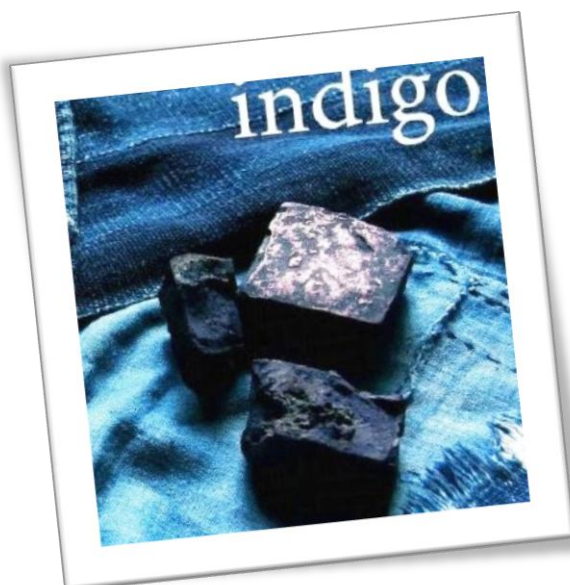
Οι αρχαίοι σε όλη την υφήλιο, συμπεριλαμβανομένων των Φοινίκων, των Κινέζων και των Περουβιανών, εκμεταλλευόμενοι τις εκκρίσεις διαφόρων θαλάσσιων μαλακίων, ανακάλυψαν χρωστικές διαδικασίες.⁶

Το Tyrian Purple ή Πορφύρα της Τύρου ή "Βασιλική πορφύρα" (Royal purple) ή απλά Πορφύρα είναι μια από τις παλαιότερες γνωστές οργανικές χρωστικές που συναντώνται σε αντικείμενα τέχνης και πολιτιστικής κληρονομιάς. Χημικές μελέτες ταυτοποίησαν την πορφύρα σε τοιχογραφίες του 17ου αιώνα π.Χ. στην νότια Ελλάδα. Από ιστορικές πηγές φαίνεται ότι η πορφύρα χρησιμοποιήθηκε εκτενώς στην Αχαιμεδονική αυτοκρατορία (559-330 π.Χ., Περσία). Μετά την κατάκτηση της Περσίας από τον Μέγα Αλέξανδρο (331 π.Χ.), η πολύτιμη βαφή έγινε ευρέως γνωστή στο βορειότερο τμήμα της Ελλάδας και συγκεκριμένα στην περιοχή της Μακεδονίας όπως φαίνεται από αρχαιολογικούς θησαυρούς που βρέθηκαν σε βασιλικούς τάφους του 4ου π.Χ. αιώνα στη Βεργίνα. Η χρήση της βαφής αναφέρεται και σε Ρωμαϊκές και Βυζαντινές πηγές. Στην Ευρώπη η μαζική χρήση της βαφής σταματά οριστικά το 15ο αιώνα μ.Χ..⁷

Ενώ άνθρωποι από ολόκληρη την υφήλιο ανακάλυψαν διαδικασίες χρώσης βασιζόμενες σε εκκρίσεις μαλακίων, οι Φοινίκες της πρώτης χιλιετίας π.Χ. είναι ο λαός που η ιστορία και οι μύθοι συσχετίζουν περισσότερο με την βαφή.⁸ Το Tyrian purple περιέχει 6,6'-διβρωμοϊντινγκοτίνη (DBI), η οποία ταυτοποιήθηκε χημικώς στο εσωτερικό

"Χαναανικών" βάζων. Τα σκεύη αυτά χρησιμοποιούνταν για την αποθήκευση και μεταφορά αγαθών σε εργοστάσια χρωστικών του 13ου π.Χ. αιώνα της Σαρέπτας, μιας παράκτιας περιοχής του Λίβανου. Αυτή είναι η αρχαιότερη ιστορική εντόπιση της βαφής οπουδήποτε στον κόσμο και την συνδέει με την πατρίδα των Φοινίκων.⁶ Οι Φοινικές εμπορεύονταν υφάσματα σε όλη τη Μεσόγειο, τα οποία είχαν βαφτεί στην πατρίδα τους το Λίβανο και προήγαγαν την βιομηχανία αυτή και μέσω ίδρυσης εργοστασίων χρωστικής στις αποικίες τους κυρίως κατά μήκος των ακτών της Τυνησίας, της Μάλτας, της Σικελίας και της Ισπανίας.⁸

Παρόλο που η ιντιρουμπίνη είναι συστατικό βαφών γνωστών από την αρχαιότητα, οι περισσότερες από τις βαφές αυτές συντέθηκαν εργαστηριακά και ταυτοποιήθηκαν μόλις πριν από έναν αιώνα περίπου. Η ιντιρουμπίνη, όπως αναφέρθηκε, είναι ισομερές του ίντιγκο το οποίο, όντας γνωστό από την αρχαιότητα, παραμένει ακόμα η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη βαφή για blue-jeans με παγκόσμια παραγωγή που προσεγγίζει τους 15000 τόνους το χρόνο. Πολλά τεχνητά ίντιγκο έχουν συντεθεί παρόλο που αρκετά παράγωγά του υπάρχουν στη φύση.⁹



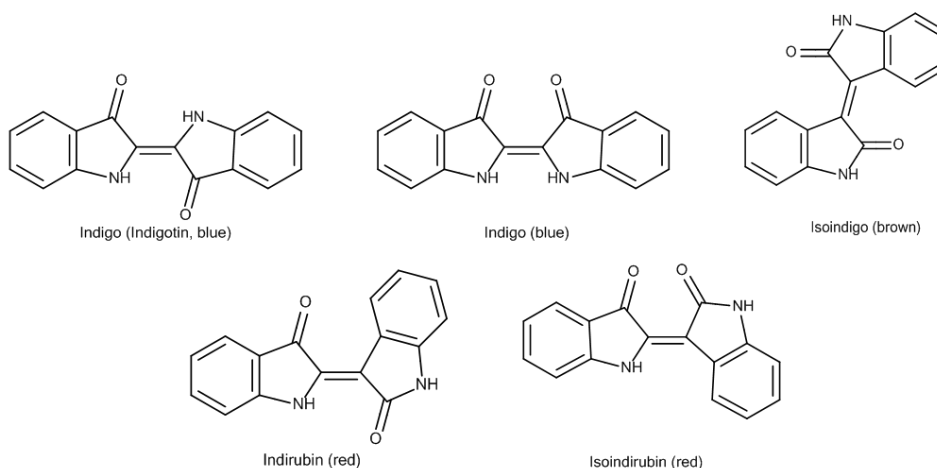
Εικόνα 3: Το ίντιγκο αποτελεί την ευρύτερα χρησιμοποιούμενη βαφή για blue-jeans.

Φυτικές βαφές: Τα ιντιγκο-παραγωγά φυτά παράγουν μια σκούρα μπλε βαφή ιντιγκοειδούς σύστασης και προέρχονται από διάφορα μέρη του κόσμου. Ανά την υφήλιο υπάρχουν διάφορες ποικιλίες φυτών που παράγουν ίντιγκο. Το *Indigofera tinctoria* που θεωρείται ότι προέρχεται από την Ασία, καλλιεργήθηκε κατά το πέρασμα των αιώνων στην Ινδία για εμπορικούς

σκοπούς. Μέχρι την εμφάνιση του ίντιγκο η κύρια πηγή μπλε χρωστικών στην Ευρώπη ήταν φυτά καλλιεργούμενα εκτενώς στην Γαλλία, την Γερμανία και την Αγγλία. Οι καλλιεργητές και οι έμποροι αυτών των φυτών θεώρησαν το ίντιγκο σημαντικό ανταγωνιστή και απειλή γι' αυτούς αφού προσφέρει βαθύτερο και πιο σταθερό χρώμα. Έτσι το ίντιγκο απαγορεύτηκε σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες λίγο μετά την εμφάνισή του στα Ευρωπαϊκά λιμάνια. Παρόλα αυτά, οι απαγορεύσεις δεν ανέκοψαν τελικά τις εισαγωγές ίντιγκο στην Ευρώπη με αποτέλεσμα να επέλθει η κατάρρευση της Γερμανικής βιομηχανίας των ευρωπαϊκών φυτών. Το ίντιγκο άρχισε να διακινείται νόμιμα στις ευρωπαϊκές χώρες και η Ινδία κατέστη ο κύριος προμηθευτής ίντιγκο της Βρετανίας. Οι Βρετανοί δυσκολεύονταν να εξασφαλίζουν επαρκείς προμήθειες και να διασφαλίζουν την ποιότητα του εισερχόμενου ίντιγκο κι έτσι ακολούθησαν το παράδειγμα της Ισπανίας και της Γαλλίας οι οποίες είχαν ήδη αρχίσει να καλλιεργούν το ίντιγκο στο νέο κόσμο. Μετά την απώλεια των αμερικανικών αποικιών όμως και την εξάντληση των γαλλικών αποθεμάτων ίντιγκο, η Βρετανία στράφηκε ξανά στην Ινδία ως προμηθευτή. Κατά τη διάρκεια όλου σχεδόν του 19ου αιώνα, το φυσικό ίντιγκο ήταν μακράν η πολυτιμότερη βαφή και η παραγωγή του κατέστη επικερδής απασχόληση για του Ινδούς. Συνθετικό ίντιγκο παρήχθη πρώτη φορά για εμπορικούς σκοπούς το 1897, όταν η γερμανική χημική εταιρεία BASF (Badische Anilin und Soda Fabrik) δημιούργησε μια βαφή βασισμένη στα ευρήματα του Γερμανού χημικού Adolf von Baeyer. Σύντομα κι άλλες ευρωπαϊκές εταιρείες άρχισαν να παράγουν το δικό τους συνθετικό ίντιγκο κι έτσι άρχισε μια μη αναστρέψιμη πτώση της αξίας του φυσικού ίντιγκο στις διεθνείς αγορές.¹⁰

Παρά το γεγονός ότι η απόχρωση του φυσικού ίντιγκο υπερτερεί αισθητικά αυτής του συνθετικού, η εμπορική παραγωγή ίντιγκο ως χρωστική από τα ίντιγκο-παραγωγά φυτά έχει εγκαταλειφθεί λόγω της επικράτησης του φθηνότερου συνθετικού. Παρόλα αυτά η τέχνη της φυσικής βαφής ίντιγκο ευδοκιμεί ακόμη μεταξύ κάποιων καλλιτεχνών και ερασιτεχνών σε χώρες της Άπω Ανατολής όπως η Κορέα και η Ιαπωνία.¹¹

Το φυσικό ίντιγκο διαθέτει πιο ιδιαίτερη και πιο ευχάριστη απόχρωση από αυτή του συνθετικού εξαιτίας των περιεχόμενων ιντιρουμπινών και της κόκκινης χροιάς τους που συμβάλει στο τελικό χρώμα. Εκτός από τις ιντιρουμπίνες, στη διαμόρφωση του τελικού χρώματος του φυσικού ίντιγκο επίσης καθοριστικό ρόλο παίζουν μόρια όπως η ισοιντιρουμπίνη, το ισοίντιγκο, η ιντιγκοτίνη, η ισοιντιγκοτίνη κ.ά.¹²



Εικόνα 4: Ιντιγκοειδή που συμβάλλουν στη διαμόρφωση του τελικού χρώματος του φυσικού ίντιγκο

Το φυσικό ίντιγκο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βαφή αφού πρώτα αναχθεί το ιντιγκοειδές που περιέχει, προς την άχρωμη, διαλυτή λευκομορφή του, με την οποία και απορροφάται στην συνέχεια από τα υφάσματα. Η επανοξειδωση μέσω έκθεσης στον αέρα αποδίδει τη χρώστική, η οποία είναι τόσο καλά προσδεδεμένη στην ύφανση που αντέχει στο πλύσιμο και στο τρίψιμο.¹³

Βαφές από μαλάκια: Το Tyrian purple προέρχεται από διάφορα είδη θαλάσσιων μαλακίων και στις κύριες χρωστικές του περιλαμβάνονται η ιντιρουμπίνη, η ιντιγκοτίνη και τα βρωμιωμένα ανάλογά τους.¹⁴



Εικόνα 5: "Κροκοσυλλέκτριες", με τη φασματοσκοπική μέθοδο οι επιστήμονες ανακάλυψαν ότι το ιώδες χρώμα που βρίσκεται σε λεπτομέρειες της τοιχογραφικής σύνθεσης είναι η πορφύρα, κάτι που αποδεικνύει το υψηλό επίπεδο τεχνογνωσίας και πολιτισμού της Σαντορίνης κατά τον 17ο αιώνα π.Χ.

Πολύ πριν ακόμα ο Νέρων εκδόσει διάταγμα τον 1ο αιώνα μ.Χ. με το οποίο ο αυτοκράτορας είχε το αποκλειστικό δικαίωμα να φοράει ενδύματα βαμμένα με πορφύρα, ήταν παγιωμένη η σχέση της βαφής με τους βασιλείς και τους ιερωμένους. Το κοινωνικοπολιτικό και θρησκευτικό κύρος της πορφύρας προέκυπτε από την οικονομική της αξία. Σε ορισμένες περιόδους η βαφή, άξιζε όσο 10-20 φορές το βάρος της σε χρυσό, κάτι το οποίο μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι τα πρόδρομα του DBI μόρια που μετατρέπονται στην χρωστική μετά από έκθεση στον αέρα και το φως, συναντώνται στην φύση μόνον στις υποβραγχιακές εκκρίσεις συγκεκριμένων θαλασσιών μαλακίων και στο ότι απαιτούνται περισσότερα από 10.000 μαλάκια για την παραγωγή 1 g βαφής.⁶

Σε αντίθεση με το ίντιγκο που θεωρούνταν "η βαφή των φτωχών", το Tyrian purple αποτελούσε ένδειξη κύρους και ανώτερης κοινωνικής κατάστασης. Ρωμαίοι και Βυζαντινοί αυτοκράτορες το χρησιμοποιούσαν για να βάψουν τα επίσημα ενδήματά τους, ενώ το μπλε "Tekhelet", ποικιλία του Tyrian purple, αποτελούσε βαφή των ενδυμάτων των αρχιερέων. Η αρχαιότερη χρήση αυτής της ερυθροιώδους βαφής των μαλακίων, χρονολογείται στην ύστερη Εποχή του Χαλκού όπως αποδεικνύεται από την ανάλυση τοιχογραφιών στο Ακρωτήρι, τη Θήρα και την Ελλάδα. Η βαφή είχε υψηλό κόστος και παραλαμβάνονταν στη Μεσόγειο από τα μαλάκια *Hexaplex trunculus* και *Bolinus brandaris* (*Muricidae*). Στις ακτές του Βόρειου Ατλαντικού, η βαφή παραγόταν από το *Nucella lapillus* (dog whelk), ενώ στις ακτές της Λατινικής Αμερικής προς τον Ειρηνικό ωκεανό χρησιμοποιούνταν άλλα είδη όπως το *Plicorhyncha ransai*. Αντίθετα με το ίντιγκο, τα κύρια συστατικά της βαφής των μαλακίων είναι βρωμιωμένα ιντιγκοειδή. Το ιώδες χρώμα του Tyrian purple οφείλεται τόσο στην παρουσία παραγώγων ιντιρουμπίνης που προσδίδουν την ερυθρή χροιά, όσο και στο γεγονός ότι τα βρωμιωμένα ιντιγκοειδή στην στερεή τους κατάσταση είναι στην πραγματικότητα ιώδη αντί μπλε. Η ποικιλία των περιεχόμενων ιντιγκοειδών και κατά συνέπεια η χρωματική ποικιλία, καθώς επίσης και η περιορισμένη ποσότητα διαθέσιμων μαλακίων, ήταν οι κύριοι λόγοι για τους οποίους το Tyrian purple έχαιρε μεγαλύτερης εκτίμησης από ότι το ίντιγκο.¹⁵

Το Tyrian purple λαμβάνεται σε μεγάλη αφθονία κυρίως από δύο είδη μαλακίων, τα *Murex brandaris* και *Hexaplex trunculus* και ήταν σημαντικό εμπορεύσιμο προϊόν στην Κρήτη (5ος αιώνας π.Χ.), στην Φοινίκη, στην Ελλάδα και αργότερα στη Ρώμη. Μάλιστα το περίφημο "Tekhelet" που περιγράφεται

στην βίβλο ήταν ένα μίγμα ιντιγκοειδών προερχόμενων κυρίως από τον *Hexaplex trunculus*.¹⁶

Ορισμένες πληροφορίες για το Royal purple παρέχονται κι από κάποιες αρχαίες ελληνικές πηγές. Ο Αριστοτέλης αναφέρει ότι η βαφή προέρχεται από ένα συγκεκριμένο όργανο διαφόρων γαστερόποδων μαλακίων, το οποίο πρέπει να απομακρυνθεί με ιδιαίτερη προσοχή από το κέλυφος. Σύμφωνα με έναν ελληνικό μύθο για την ανακάλυψη της βαφής, ένας σκύλος που ανήκε στον θεό της Τύρου Ηρακλή, δαγκώνοντας ένα μεγάλο θαλάσσιο κοχλία έβαψε το στόμα του κόκκινο και τότε αμέσως ο Ηρακλής έβαψε ένα ένδυμα με την ουσία αυτή.¹³



Εικόνα 6: "Heracles and the Discovery of the Secret of Purple" του Peter Paul Rubens (1636), Μουσείο Bonnat

Πέραν του γεγονότος ότι ένα ερυθρό εκχύλισμα μαλακίου μπορούσε να βάψει υφάσματα μεσω άμεσης επαφής, αυτός ο μύθος δεν δίνει πληροφορίες για τον τρόπο κατεργασίας του Tyrian purple. Η κατεργασία περιγράφηκε πρώτη φορά την περίοδο της Ρωμαϊκής Αυτοκρατορίας. Η λεπτομερέστερη περιγραφή εμπεριέχεται στην "Φυσική Ιστορία" του Πλίνιου του πρεσβύτερου. Παρόλο που οι αρχαίοι δεν κατείχαν την χημεία του Tyrian purple, η κατεργασία που εφήρμοζαν όπως περιγράφεται από τον Πλίνιο, απείχε από την απλή εφαρμογή του εκχυλίσματος των μαλακίων στα ενδύματα.¹³

Τις τελευταίες δεκαετίες, ελάχιστες είναι οι έρευνες που αναφέρονται σε τρόπους παραγωγής πλήρως φυσικής χρωστικής χρησιμοποιώντας τους κοχλίες *murex*. Η χημική βαφή προϋποθέτει η χρωστική να καταστεί διαλυτή

πριν τη διαδικασία της βαφής ώστε να δοθεί η δυνατότητα στα μόρια της χρωστικής να διεισδύσουν στο εσωτερικό των ινών της ύφανσης. Απλή επάλειψη της χρωστικής στο ύφασμα ή σε άλλο υπόστρωμα συνιστά απλή επιφανειακή εφαρμογή κι όχι βαφή.¹⁷

1.2.2) Οι ιντιρουμπίνες ως φάρμακα

Η ιντιρουμπίνη αποτελεί το κύριο δραστικό συστατικό μιας παραδοσιακής Κινέζικης ιατρικής συνταγής γνωστής ως *Danggui Longhui Wan*, η οποία χρησιμοποιείται στη θεραπεία διάφορων ασθενειών όπως η χρόνια μυελοκυτταρική λευχαιμία.^{16,18}

Το 1967, μια ομάδα επιστημόνων (Ινστιτούτο Αιματολογίας, Κινέζικη Ακαδημία Ιατρικών Επιστημών) ανακάλυψε την αποτελεσματικότητα της παραδοσιακής αυτής συνταγής (DLW), στην θεραπεία της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (CML). Το DLW εμπεριέχει 11 παραδοσιακά Κινεζικά ιατρικά βότανα:

1. *Angelica sinensis* *Apiaceae* (Dang Gui 100g)
2. *Aloe vera* *Xanthorrhoeaceae* (Lu Hui 50g)
3. *Gentiana scabura* *Gentianaceae* (Long Dan 100g)
4. *Saussurea lappa* *Asteraceae* ή *Aucklandia lappa* (Mu Xiang 25g)
5. *Scutellaria baicalensis* *Lamiaceae* (Huang Qin 100g)
6. *Phellodendron chinensis* *Rutaceae* (Huang Bo 100g)
7. *Coptis chinensis* *Ranunculaceae* (Huang Lian 100g)
8. *Gardenia jasminoides* *Rubiaceae* (Zhi Zi 100g)
9. *Rheum palmatum* *Polygonaceae* (Da Huang 50g)
10. *Indigofera tinctoria* *Fabaceae* (Qing Dai 50g)
11. *Moschus moschiferus* *Moschidae* (She Xiang 5g).¹⁹



Εικόνα 7: Τα 11 παραδοσιακά Κινεζικά ιατρικά βότανα του DLW

Τα επόμενα 10 χρόνια, κλινικές μελέτες κατέδειξαν ότι η αφαίρεση του *M. Moschiferus* από τα χάπια, δεν επηρεάζει τη δραστικότητα του DLW και ομοίως δεν επηρεάζει η αφαίρεση του *C. Chinensis*. Αντίθετα, η απομάκρυνση των *M. Moschiferus*, *A. Vera* και *I. tinctoria* καθιστά τα χάπια αδρανή. Οι συνταγές που στερούνται τα *M. moschiferus* και *C. Chinensis*, διαιρούνται σε δύο τύπους βάσει των φαρμακολογικών χαρακτηριστικών των εναπομειναντων φαρμάκων: καθαρτικά (*A. vera*, *R. Palmarus*, *G. Scaber*, *S. Lappa*) και μη-καθαρτικά (*S. baicalensis*, *P. Chinensis*, *G. Jasminoides*, *A. sinensis*, *I. Tinctoria*). Σύμφωνα με κλινικές μελέτες τα μη-καθαρτικά χάπια έχουν σαφή αποτελεσματικότητα. Τα χάπια που περιέχουν μόνο τα *I. Tinctoria* και *A. Vera* εμφανίζουν σαφώς σημαντική θεραπευτική δράση. Πειραματικές θεραπευτικές μελέτες με μεταμοσχεύσιμους όγκους κατέδειξαν ότι το *I. Tinctoria* παρατείνει σημαντικά τη διάρκεια ζωής του Walker carcinosarcoma 256 σε επίμυες ενώ το *A. vera* όχι. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι το *I. Tinctoria* είναι το κύριο δραστικό συστατικό του DLW. Κλινικές δοκιμές φάσης 1 και 2 έδωσαν επίσης ενθαρρυντικά αποτελέσματα για την CML. Φυτοχημικές μελέτες του *I. Tinctoria* καταδεικνύουν ότι είναι

ένα μίγμα indigo blue, indigo brown, καιμπφερόλης και ανόργανων αλάτων. Μεταξύ αυτών, το indigo blue είναι το πιο άφθονο συστατικό αλλά είναι αδρανές. Η ιντιρουμπίνη, έδωσε σαφή θεραπευτικά αποτελέσματα σε ζωικούς όγκους και οι κλινικές δοκιμές επίσης είχαν θετικά αποτελέσματα στη θεραπεία της CML. Καθώς η περιεχόμενη στο *I. Tinctoria* ιντιρουμπίνη είναι ελάχιστη (0,11%), οι χημικοί του Ινστιτούτου της *Materia Medica* (Κινέζικη Ακαδημία Ιατρικών Επιστημών), την συνέθεσαν εξολοκλήρου από ίντιγκο. Η συνθετική ιντιρουμπίνη προκάλεσε αξιοσημείωτη αναστολή του πνευμονικού καρκινώματος Lewis και του καρκινοσαρκώματος Walker 256, εμφανίζοντας ελάχιστη μόνο τοξικότητα στα ζωικά μοντέλα. Σε σκύλους που χορηγήθηκε δόση συνθετικής ιντιρουμπίνης, 25 φορές μεγαλύτερη αυτής που χρησιμοποιούνταν για τη θεραπεία ανθρώπων (ανάλογα με το βάρος σώματος), για 6 συνεχόμενους μήνες, παρατηρήθηκαν διάρροια και κάποιες ηπατικές βλάβες αλλά καμία αλλαγή στην αιμοποίηση, στην ηλεκτροεγκεφαλογραφική δραστηριότητα, στην νεφρική λειτουργία και στην παραγωγή αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων. Από τον Ιούνιο του 1977 έως τον Οκτώβριο του 1979, χορηγήθηκε ιντιρουμπίνη (150-200 mg/d) σε 253 ασθενείς με ενθαρρυντικά αιματολογικά αποτελέσματα. Μια συγκριτική κλινική μελέτη ασθενών με CML έδειξε ότι η ιντιρουμπίνη και η βουσουλφάνη επέδειξαν παρόμοια δραστηριότητα. Αυτή ήταν η πρώτη απόδειξη της αντικαρκινικής δράσης ενός παράγοντα με σκελετό ίντιγκοειδούς.¹⁹

Προσφάτως αποδείχθηκε ότι η ιντιρουμπίνη και το ίντιγκο συνδέονται ισχυρά στον AhR υποδοχέα επίσης γνωστό ως "υποδοχέα διοξίνης"²⁰, του οποίου η ενεργοποίηση σχετίζεται με τις ανοσολογικές αποκρίσεις από τα T-λεμφοκύτταρα και την αναστολή φλεγμονών.²¹

1.3) Ιντιρουμπίνες σε φυσικές πηγές

• Φυτική προέλευση: Συναντώνται σε περισσότερα από 200 είδη ίντιγκο-παραγωγών φυτών και προκύπτουν μετά τον αυθόρμητο, μη-ενζυματικό διμερισμό της ισατίνης και του ινδοξυλίου, δύο άχρωμων πρόδρομων μορίων που υπάρχουν στα φυτά ελεύθερα ή συζευγμένα με σάκχαρα.¹⁶ Τα φυτά αυτά προέρχονται από διάφορα μέρη του κόσμου και αρχικά καλλιεργήθηκαν στην Ινδία μεταξύ τέταρτης και δεύτερης χιλιετίας π.Χ. Η *Indigofera tinctoria* (*Fabaceae*), είναι το είδος που πρώτο καλλιεργήθηκε στην Ινδία και εκείνο που κυρίως χρησιμοποιήθηκε κατά το πέρασμα των αιώνων για εμπορικούς

σκοπούς.¹⁰ Άλλες φυτικές πηγές ιντιρουμπίνης είναι: άλλα είδη του γένους *Indigofera* (π.χ. *Indigofera suffruticosa* (*Fabaceae*)), καθώς και τα *Isatis tinctoria* (*Brassicaceae*), *Polygonum tinctorium* (*Polygonaceae*), *Baphicacanthus cusia* (*Acanthaceae*) και το *Wrightia tinctoria*.^{12,22} Η ιντιρουμπιμη μάλιστα από την *Wrightia tinctoria* εμφάνισε αντιμυκητιασική δράση ενάντια σε δερματόφυτα και μη-δερματόφυτα.²³



Indigofera tinctoria



Indigofera suffruticosa



Isatis tinctoria



Polygonum tinctorium



Baphicacanthus cusia



Wrightia tinctoria

Εικόνα 8: Φυτικές πηγές ιντιρουμπίνης.

• Ζωική προέλευση: Εκτός της φυτικής προέλευσή τους, τόσο οι ιντιρουμπίνες όσο και το ίντιγκο παράγονται κι από αρκετά θαλάσσια γαστερόποδα μαλάκια.²⁴

Γαστερόποδα των οικογενειών *Muricidae* και *Thaididae* είχαν χρησιμοποιηθεί σε διάφορα μέρη του κόσμου ως πηγή μιας ερυθροϊώδους βαφής, γνωστής σε όλη τη Μεσόγειο Θάλασσα ως "Πορφύρα της Τύρου" ("Tyrian purple" ή "Royal blue").²⁴

Στην αρχαιότητα οι εκκρίσεις των αδένων των μαλακίων ήταν η μοναδική γνωστή φυσική πηγή των βαφών από ιντιγκοειδή και απαιτούνταν μεγάλος αριθμός μαλακίων για την παραγωγή μικρών μόνο ποσοτήτων

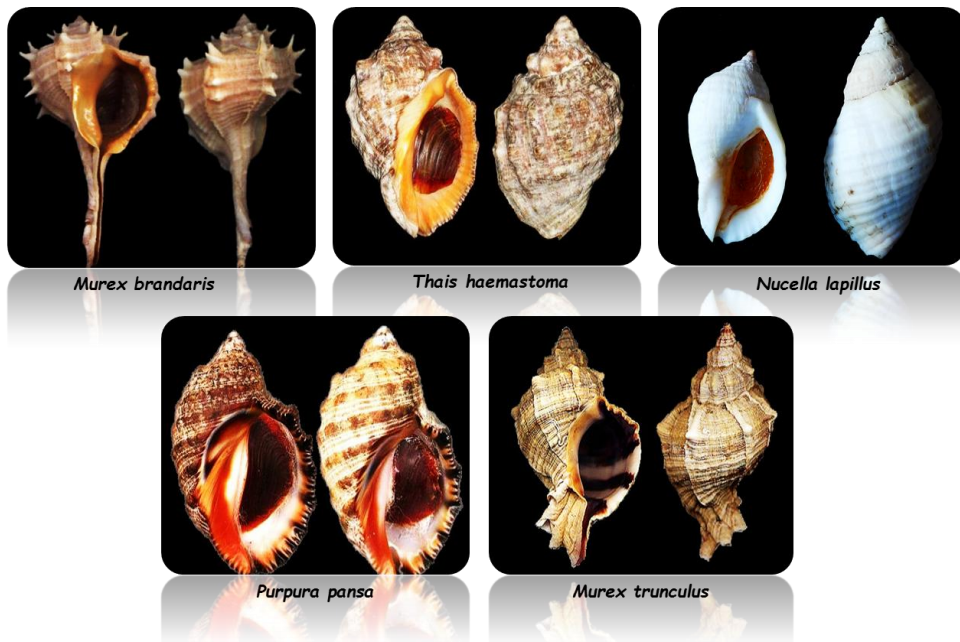
χρωστικής, γι' αυτούς τους λόγους οι βαφές αποτελούσαν προνόμιο όσων είχαν κοινωνικο-πολιτικό ή θρησκευτικό κύρος.⁸

Διάφορα είδη μαλακίων παράγουν ιντιγκοειδείς χρωστικές. Τα πιο κοινά, τα οποία συναντώνται σε παράκτιες περιοχές της Ευρωπαϊκής Ηπείρου είναι τα: *Hexarplex trunculus* (*Murex trunculus*), *Murex brandaris* (*Bolinus brandaris*), *Thais haemastoma* (*Stramonita haemastoma*) και *Nucella lapillus* (*Purpura lapillus*). Το τελευταίο υπάρχει στις ακτές του Ατλαντικού ενώ τα άλλα τρία συναντώνται στη Μεσόγειο.⁷ Τα δύο σημαντικότερα είδη στη Μεσόγειο ήταν για τους Φοίνικες τα *Murex trunculus* και *M. Brandaris*.⁸ Άλλα μαλάκια που παράγουν το Tyrian purple είναι τα: *Purpura pansa* (Μεξικό, Ειρηνικός ωκεανός), *Purpura patula* (Μεξικό, Ατλαντικός ωκεανός) και *Rapana venosa* (Ιαπωνία).¹⁶

| Mollusc species | Indigo | Indirubin | 6-Bromo indigo | 6,6'-dibromo indigo | 6,6'-dibromo indirubin |
|-------------------------|--------|-----------|----------------|---------------------|------------------------|
| <i>Murex brandaris</i> | 0 | 0 | 3 | 83 | 14 |
| <i>Thais haemastoma</i> | 0 | 0 | 3 | 91 | 6 |
| <i>Nucella lapillus</i> | 0 | 0 | 3 | 88 | 9 |
| <i>Nucella lapillus</i> | 8 | 0 | 1 | 77 | 14 |
| <i>Purpura pansa</i> | 0 | 0 | 9 | 90 | 1 |
| <i>Purpura pansa</i> | 0 | 0 | 16 | 77 | 7 |
| <i>Murex trunculus</i> | 55 | 7 | 35 | 3 | 0 |
| <i>Murex trunculus</i> | 4 | 0 | 18 | 76 | 2 |

Εικόνα 9: Η σύσταση των ιντιγκοειδών της ιώδους βαφής διαφόρων μαλακίων²⁴

Το κύριο έγχρωμο συστατικό του Tyrian Purple όπως έχει προαναφερθεί είναι η 6,6'-διβρωμοϊντιγκοτίνη (DBI), αλλά συμβάλουν και άλλα ιντιγκοειδή συστατικά το είδος των οποίων διαφοροποιείται ανάλογα με τον ακριβή τύπο του μαλακίου.⁷



Εικόνα 10: Γαστερόποδα των οικογενειών Muricidae και Thaididae.

Οι εκκρίσεις του *M. trunculus* περιλαμβάνουν τρεις κύριες χρωστικές: την 6,6'-διβρωμοϊντιγκοτίνη (DBI), την ιντιγκοτίνη και την 6-βρωμοϊντιγκοτίνη (MBI). Η ιντιρουμπίνη καταλαμβάνει ένα σχετικά μικρό ποσοστό στην τελική βαφή. Όταν οι εκκρίσεις κατεργάζονται εξ ολοκλήρου στο φως, δεν παρατηρούνται σημαντικές φυλετικές διαφοροποιήσεις στους χρωματισμούς της τελικής βαφής. Όταν η κατεργασία γίνεται στο σκοτάδι όμως, οι εκκρίσεις αρσενικών αδένων είναι πιο ιώδεις σε σχέση με των ψευδοερμαφρόδιτων θηλυκών, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι αρσενικοί αδένες περιέχουν λιγότερα μη-υποκατεστημένα πρόδρομα ινδοξυλίου, τα οποία συζεύγνυνται οξειδωτικώς παρουσία αέρα και σχηματίζουν ίντιγκο και MBI. Η έκθεση στο φως φάνηκε να είναι κρίσιμη για το σχηματισμό του πρασινωπού ενδιάμεσου 2,2'-δισυποκατεστημένου 6,6'-διβρωμο-2,2'-διϊνδοξυλίου, κι όχι μόνον για την διάσπαση αυτού σε DBI. Ο *M. brandaris* παράγει μόνο DBI και το πρόδρομό της το 6-βρωμο-2-μεθυλθειοϊνδοξυλίο (tyrindoxyl).⁸

• Βακτηριακή προέλευση: Τέλος οι ιντιρουμπίνες παράγονται κι από βακτηριακά στελέχη όπως η *E.coli*²⁵ και άλλα βακτήρια της εντερικής χλωρίδας με αποτέλεσμα να ανιχνεύονται στα ούρα ασθενών και υγιών ανθρώπων.²⁰ Σε ασθένειες που συνδέονται κυρίως με προβλήματα νεφρών, την αιμοκάθαρση και μολύνσεις του ουροποιητικού, η παραγωγή ιντιγκοειδών

και η παρουσία τους στα ούρα αυξάνεται (λόγω μετανάστευσης των εντερικών βακτηρίων στον ουροκαθετήρα) και το γεγονός αυτό προκαλεί τον έντονο χρωματισμό των ουροσυλλεκτών ατόμων υπό καθετηριασμό (Purple Urine Bag Syndrome: PUBS, blue diaper syndrome).^{22,26}



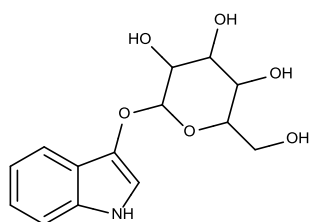
Εικόνα 11: Ουροσυλλέκτης ασθενούς με PUBS.

Επίσης έχουν απομονωθεί από το έδαφος βακτήρια (αερόβιοι Gram-θετικοί κόκκοι) που αναπτύσσονται χρησιμοποιώντας ως μοναδική πηγή άνθρακα και αζώτου το ινδόλιο.²⁷

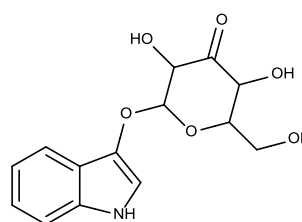
1.4) Βιοσυνθετικές πορείες που καταλήγουν σε σχηματισμό ιντιρουμπινών

1.4.1) Στα φυτά:

Στα ιντιγγο-παραγωγά φυτά το ινδόλιο, προϊόν του καταβολισμού του φωσφορικού εστέρα του 3-υποκατεστημένου ινδολίου με γλυκερόλη, οξειδώνεται προς ινδοξύλιο και αποθηκεύεται στα νεαρά φύλλα με τη μορφή της ινδικάνης και της ισατάνης Β που αποτελούν τα πρόδρομα μόρια για τη σύνθεση του ίντιγγο.



Indican



Isatan B

Εικόνα 12: Μορφές αποθήκευσης του ινδολίου στα φύλλα των φυτών

Τα πρόδρομα αυτά μόρια σπάνε από υδρολάσες όταν τα γέρικά φύλλα εκτεθούν στον αέρα και καταστραφούν. Το ινδοξύλιο που απελευθερώνεται οξειδώνεται αυθόρμητα από το οξυγόνο της ατμόσφαιρας αποδίδοντας

ίντιγκο. Σε πλούσιο σε οξυγόνο περιβάλλον, μέρος του ινδοξυλίου αντί να μετατραπεί σε ίντιγκο, μετατρέπεται σε ισατίνη μέσω μιας παράπλευρης αντίδρασης. Η ακόλουθη συμπύκνωση του ινδοξυλίου με την ισατίνη είναι αυτή που αποδίδει την ιντιρουμπίνη.¹²

1.4.2) Στα γαστερόποδα μαλάκια:

Στο Ισραηλινό τμήμα της Μεσογείου θάλασσας υπάρχουν πάνω από 700 είδη μαλακίων εκ των οποίων 16 είναι είδη της οικογένειας Muricidae. Μόνο 3 μέλη της οικογένειας αυτής, έχουν συσχετιστεί με τις ιώδεις χρωστικές, το *Hexarplex trunculus* (Linnaeus, 1758), επίσης γνωστό με τα ονόματα *Murex trunculus*, *Phyllonotus trunculus*, *Trunculariopsis trunculus*, ή απλώς 'trunculus', το *Bolinus brandaris* (Linnaeus, 1758), επίσης γνωστό ως *Murex brandaris* ή 'brandaris' και το *Stramonita haemastoma* (Linnaeus, 1766), επίσης γνωστό ως *Thais haemastoma*, *Purpura haemastoma* ή 'haemastoma'.¹⁷

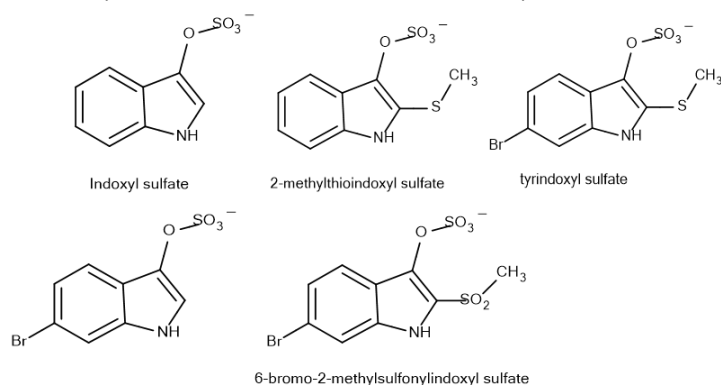
Ο υποβραγχιακός αδένας τέτοιων γαστερόποδων περιέχει άχρωμες πρόδρομες ενώσεις (διαφορετικές από τις πρόδρομες ενώσεις των φυτών που είναι ισατάνες και ινδικάνες) όπως το θειϊκό άλας του ινδοξυλίου, το μερκαπτανικό του παράγωγο και τα βρωμοπαράγωγά τους, οι οποίες μετά από διαβροχή, απελευθερώνουν διάφορα ινδοξύλια.¹⁶

Τα πρόδρομα της χρωστικής των μαλακίων έχουν ταυτοποιηθεί ως θειϊκοί εστέρες ινδοξυλίου, 6-βρωμοϊνδοξυλίου και παραγώγων τους, υποκατεστημένοι στη θέση 2 με μεθυλοθειο-ομάδες ή μεθυλοσουλφονυλο-ομάδες. Η υδρόλυση αυτών των εστέρων προς τα αντίστοιχα ινδοξύλιά τους καταλύεται από ένα ένζυμο την πουργουράση. Τα πρόδρομα που δεν φέρουν υποκατάσταση στη θέση 2, σχηματίζουν ιντιγκοειδή άμεσα μέσω οξειδωτικής σύζευξης στον αέρα. Όταν υπάρχει υποκατάσταση στη θέση 2, πρώτα σχηματίζονται 2,2'-δισυποκατεστημένα 2,2'-δισινδοξύλια που έχουν πράσινο χρώμα. Μετά μια φωτοχημική αντίδραση λαμβάνει χώρα και μετατρέπεται το ενδιάμεσο στην ιντιγκοειδή έγχρωμη ένωση.⁸

Η ιώδης βαφή που παράγεται από τον κοχλία *Hexarplex trunculus* έχει βρεθεί ότι περιέχει όχι μόνο την περίφημη χρωστική DBI (6,6'-dibromoindigo), η οποία αποτελεί και το κύριο συστατικό τόσο των αρχαίων όσο και των σύγχρονων χρώσεων, αλλά και μια πληθώρα ισομερών

βρωμιωμένων και μη βρωμιωμένων ιντιγκοειδών, ιντιρουμπινοειδών και σχετικών μορίων, όπως διαπιστώθηκε μέσω HPLC ανάλυσης.¹⁷

Ήδη από το 1685, ο Cole είχε παρατηρήσει ότι ένα άχρωμο ρευστό από τους υποβραχιακούς αδένες θαλάσσιων μαλακίων των ακτών της Βρετανίας, μετατρέπεται σε κόκκινη χρωστική μετά από έκθεση στο φως. Το 1909 ο Friedlander προσδιόρισε την 6,6'-διβρωμοιντιγκοτίνη (DBI) ως τη χρωστική ενός από τα μεσογειακά είδη μαλακίων, του *Murex brandaris*. Οι δομές των πρόδρομων μορίων και η απομόνωσή τους, διερευνήθηκαν για πρώτη φορά αποτελεσματικά από τους Bouchilloux και Roche το 1955 και αργότερα από τους Baker και Sutherland το 1968 και τους Fouquet και Bielig το 1971. Έτσι στα μαλάκια τα πρόδρομα μόρια βρέθηκαν ότι είναι θειϊκοί εστέρες του ινδοξυλίου, του 6-βρωμοϊνδοξυλίου και των παραγώγων τους υποκατεστημένων στην θέση 2 με μεθυλθειο- ή μεθυλοσουλφονυλο-ομάδες. Η υδρόλυση αυτών των θειοεστέρων από το ένζυμο πουργουράση μελετήθηκε από τους Dubois (1909) και Erspramer (1947). Οι Baker και Sutherland το 1968 έδειξαν ότι η πρασινωπή ένωση που σχηματίζεται με οξειδωτικές διαδικασίες από τα 2-υποκατεστημένα ινδοξύλια, μετατρέπεται σε βαφή μέσω ενός φωτοχημικού μηχανισμού. Τα μη-υποκατεστημένα στη θέση 2 ινδοξύλια, φάνηκε να σχηματίζουν ιντιγκοειδή κατευθείαν μέσω οξειδωτικής σύζευξης εκτιθέμενα στον αέρα. Ενώ τα εκκρίματα του *Murex trunculus* περιέχουν τόσο ινδοξύλια όσο και 6-βρωμοϊνδοξύλια υποκατεστημένα και μη στην θέση 2, τα εκχυλίσματα των *Murex brandaris* και *Purpura haemastoma* περιέχουν μόνο 2-υποκατεστημένα 6-βρωμοϊνδοξύλια. Κατά συνέπεια, το *Murex trunculus* αποδίδει τόσο ιντιγκοτίνη όσο και 6,6'-διβρωμοιντιγκοτίνη, ενώ τα *Purpura haemastoma* και *Murex brandaris* παράγουν αποκλειστικά 6,6'-διβρωμοιντιγκοτίνη.¹³



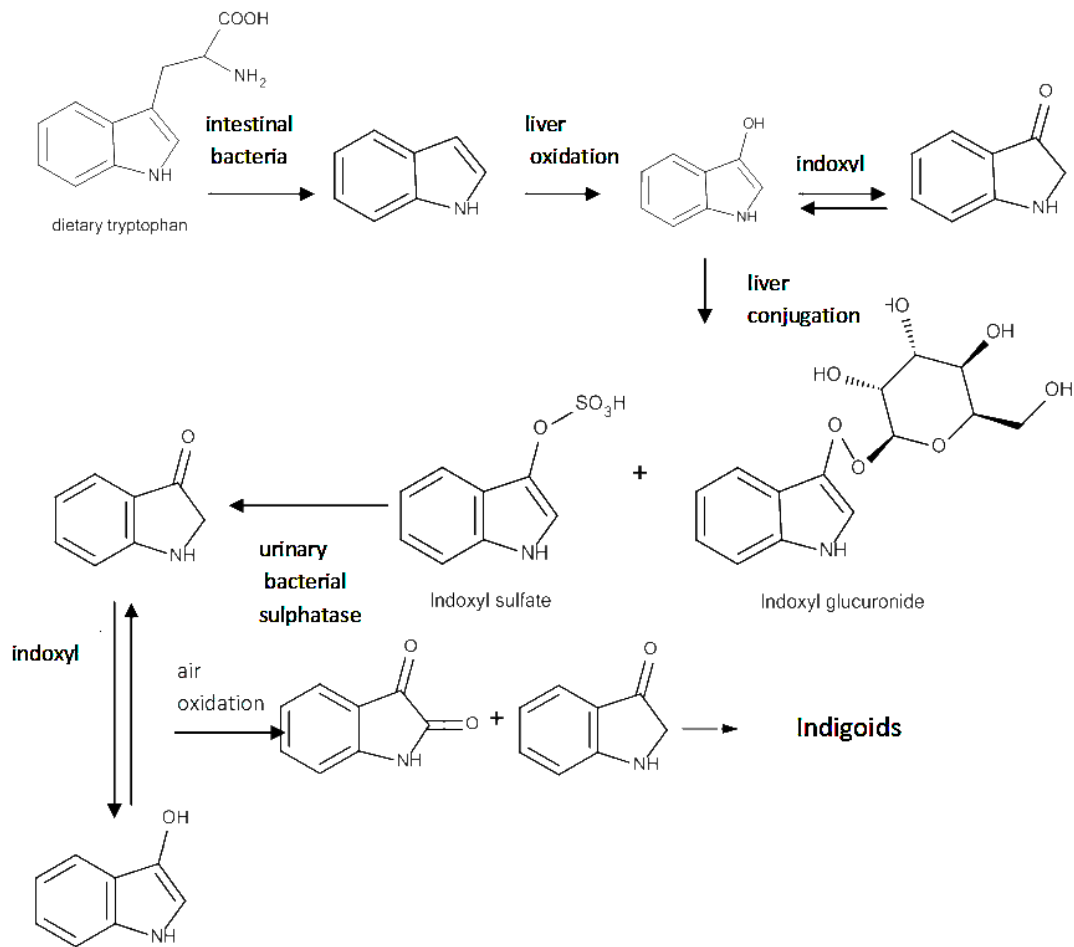
Εικόνα 13: Πρόδρομες του ινδοξυλίου ενώσεις στον υποβραχιακό αδένα γαστερόποδων μαλακίων.

Όταν εκτεθούν στο φως και στο οξυγόνο, τα ινδόλια διμερίζονται προς ένα μίγμα ίντιγκο και ιντιρουμπίνης με κύριο προϊόν το 6,6'-διβρωμοϊντιγκο.¹⁶

Τα άχρωμα βρωμιωμένα και μη-βρωμιωμένα θειικά ινδοξύλια που αποτελούν πρόδρομες ουσίες των έγχρωμων συστατικών, καθώς επίσης και το αναγκαίο ένζυμο πουρπουράση, περιέχονται όλα στον υποβραγχιακό αδένα του ζωντανού μαλακίου. Το ένζυμο έρχεται σε επαφή με αυτά τα πρόδρομα μόρια και τα υδρολύει μόνο μετά από διάτρηση του αδένα ή όταν το μαλάκιο πεθαίνει. Μετά την υδρόλυσή τους τα πρόδρομα έχουν την δυνατότητα να υποστούν μια σειρά φωτοχημικών και οξειδωτικών αντιδράσεων που καταλήγουν στο σχηματισμό της τελικής χρωστικής.¹⁷

1.4.3) Στον άνθρωπο από τα εντερικά βακτήρια:

Το ινδόλιο, προϊόν του καταβολισμού της τρυπτοφάνης από τα εντερικά βακτήρια, απορροφάται από το σώμα σε σημαντικές ποσότητες, οξειδώνεται προς ινδοξύλιο και απεκρίνεται στα ούρα. Οι χρωστικές ίντιγκο και ιντιρουμπίνη έχουν ταυτοποιηθεί ως προϊόντα του μεταβολισμού του ινδολίου από το ανθρώπινο κυτόχρωμα P450.²⁸



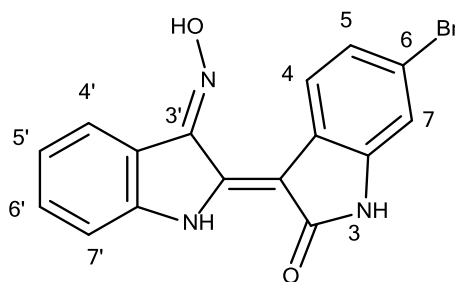
Σχήμα 1: Παραγωγή ιντιγκοειδών στον άνθρωπο από τον καταβολισμό της τρυπτοφάνης

1.5) Φαρμακολογικές δράσεις και Θεραπευτικό προφίλ ιντιρουμπινών

• Στη μυελογενή λευχαιμία: Η ιντιρουμπίνη, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, είναι ο κύριος δραστικός αντικαρκινικός παράγοντας του παραδοσιακής Κινεζικής συνταγής που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (CML). Τα παράγωγα ιντιρουμπίνης αναστέλλουν τα ένζυμα: CDK1/cyclin B, CDK2/cyclin A, CDK2/cyclin E, GSK-3β και CDK5/p25, οδηγώντας σε αναστολή της ανάπτυξης των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων. Παράγωγα ιντιρουμπίνης αναστέλλουν επίσης την φωσφορυλίωση της STAT5 στην οξεία μυελογενή λευχαιμία και μπλοκάρουν το σηματοδοτικό μονοπάτι της STAT3 σε κύτταρα επιθηλιακών όγκων όπως στήθους και προστάτη.²⁹ Αναφέρεται τέλος ότι η ιντιρουμπίνη αναστέλλει τη σύνθεση DNA και πρωτεϊνών σε διάφορες κυτταρικές σειρές. Παρόλα αυτά ο μηχανισμός δράσης της ιντιρουμπίνης παραμένει στην πραγματικότητα άγνωστος.³⁰

• Σε νευροεκφυλιστικές παθήσεις: Έχουν απομονωθεί και συντεθεί 6-υποκατεστημένα παράγωγα ιντιρουμπινών με δράση εκλεκτικών αναστολέων της πρωτεϊνικής κινάσης GSK-3 (κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου), η οποία συμμετέχει και υπερεκφράζεται σε παθολογικές βιοχημικές οδούς που χαρακτηρίζουν νευροεκφυλιστικές παθήσεις.^{16,31}

• Σε παθήσεις της καρδιάς: Μία πολλά υποσχόμενη εφαρμογή των ιντιρουμπινών είναι και σε παθήσεις της καρδιάς, όπως η ισχαιμία, λόγω της ιδιότητας των μορίων αυτών να αναστέλλουν πρωτεϊνικές κινάσες (π.χ. κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες: CDKs, GSK-3) που ενεργοποιούνται ή απενεργοποιούνται κατά την εκδήλωση των καρδιοπαθειών. Πρόσφατες μελέτες σε πειραματόζωα (κουνέλια) δείχνουν ότι η 3'-οξιμη της 6-βρω μοϊντιρουμπίνης (6ΒΙΟ) αυξάνει την αντοχή στην ισχαιμία και προάγει την ανάνηψη της καρδιάς μετά από ισχαιμικό επεισόδιο.³²



Εικόνα 14: 6ΒΙΟ (6-bromo-indirubin-3'-oxime)

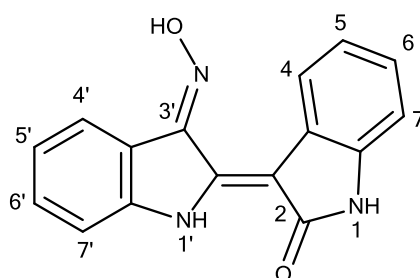
• Στον διαβήτη: Οι ιντιρουμπίνες μπορούν να βρουν εφαρμογή στο διαβήτη τύπου ΙΙ. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η ιντιρουμπίνη και τα παράγωγα ιντιρουμπίνης είναι ισχυροί αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GP). Οι αναστολείς της φωσφορυλάσης αυτής αποτελούν πιθανή θεραπευτική στρατηγική για την βελτίωση του γλυκαιμικού ελέγχου στον σακχαρώση διαβήτη τύπου 2 και σύμφωνα με διάφορες μελέτες αυτές οι ενώσεις είναι αποτελεσματικές στη μείωση της γλυκόζης του αίματος και στην αναστολή της ηπατικής γλυκογονόλυσης *in vivo*.³³

Ακόμη, αναστολείς της GSK-3 μικρού μοριακού βάρους, όπως η 6ΒΙΟ, μπορούν να προάγουν τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των β-κυττάρων του παγκρέατος, ακόμη και σε διαβητικούς ασθενείς, ενώ παράλληλα μπορούν να ανακουφίσουν από τα τοξικά συμπτώματα που οφείλονται στην υπερσυγκέντρωση γλυκόζης και λιπαρών οξέων.³⁴

• Στην αντιμετώπιση ιών: Αρκετοί φαρμακολογικοί αναστολείς εκλεκτικοί για τις CDKs (cyclin-dependent kinases), βρέθηκε πρόσφατα ότι

καταστέλλουν την αντιγραφή ιών *in vitro*. Η αντιγραφή του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού (CMV), του ιού του απλού έρπητα (HSV) και του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV-1), καταστέλλεται από αναστολείς των CDKs. ³⁵ Η 3'-οξίμη της ιντιρουμπίνης (ΙΟ) έχει επιδείξει αντιϊκές ιδιότητες έναντι του HIV-1, ³⁶ και έναντι του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού (CMV). ³⁷

Επίσης και διάφοροι άλλοι ιοί απαιτούν για την αντιγραφή τους CDKs που είναι ευαίσθητες σε φαρμακολογικούς αναστολείς. Ορισμένοι από τους αναστολείς CDKs με αντιϊκή δράση *in vitro* που δοκιμάστηκαν σε ζωικά μοντέλα και σε ανθρώπους σε κλινικές δοκιμές ως αντικαρκινικοί παράγοντες εμφάνισαν μικρή τοξικότητα *in vivo*. Για ασθένειες που προκαλούνται από ιούς και των οποίων το παθολογικό υπόβαθρο σχετίζεται με τις CDKs, όπως οι όγκοι που επάγονται από ιούς, οι αναστολείς των κινασών αυτών θα κατέστρελλαν τόσο τον αιτιολογικό παράγοντα όσο και τον παθογόνο μηχανισμό. Οι αναστολείς των CDKs όπως φαίνεται αποτελούν μια προσέγγιση για την ανάπτυξη αντιϊκών παραγόντων συγκροτώντας μάλιστα μια νέα ομάδα πιθανών αντιϊκών φαρμάκων καθώς στοχεύουν τις κυτταρικές πρωτεΐνες για να καταστέλλουν την αντιγραφή των ιών, γεγονός που θα τους καθιστούσε δραστικούς έναντι ανθεκτικών στα συμβατικά αντιϊκά ιών. ³⁵



Εικόνα 15: ΙΟ (*indirubin-3'-oxime*)

- Στην αντιμετώπιση παρασίτων: Παράγωγα ιντιρουμπινών όπως η 6-BIO και η 5-Me-6-BIO είναι ισχυροί αναστολείς ανάπτυξης του προμαστιγωτού *Leishmania donovani*. Αναστέλλουν το ένζυμο του παρασίτου LdGSK-3s, γεγονός το οποίο μπορεί να αξιοποιηθεί για την ανάπτυξη εκλεκτικών βασισμένων-στις-ιντιρουμπίνες αντιπαρασιτικών. ³⁸

- Σε φλεγμονώδεις καταστάσεις: Ιντιρουμπίνες, όπως η 3'-οξίμη της ιντιρουμπίνης (ΙΟ), φάνηκε ότι είναι ικανές να ρυθμίζουν τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις των μακροφάγων. Συγκεκριμένα η ΙΟ καταστέλλει την παραγωγή του οξειδίου του αζώτου (NO) και της προσταγλανδίνης E2, την έκφραση της συνθάσης του NO (NOS) και της κυκλοξυγενάσης 2 (COX-2) και αναστέλλει

την απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτοκινών όπως οι ιντερλευκίνες (IL)-1β και IL-6. Έτσι οι ιντιρουμπίνες είναι πιθανόν να αποτελέσουν χρήσιμους παράγοντες στη θεραπεία διάφορων φλεγμονωδών ασθενειών μέσω της αναστολής της παραγωγής φλεγμονωδών μεσολαβητών.³⁹

1.6) Παράγοντες που καθιστούν δύσκολη την κλινική αξιοποίηση των ιντιρουμπινών

Είναι γνωστό ότι οι μη-κατάλληλες φυσικοχημικές και φαρμακοκινητικές ιδιότητες ενός φαρμακευτικά δραστικού μορίου μπορούν να οδηγήσουν στην απόρριψή του κατά τη διαδικασία ανάπτυξης του φαρμάκων. Το μεγαλύτερο μειονέκτημα όλων των ιντιρουμπινών είναι η ιδιαίτερα χαμηλή διαλυτότητά τους στα υδατικά διαλύματα κάτι που καθιστά δύσκολες τις *in vivo* μελέτες με επαρκείς δόσεις.⁵

Η πολύ χαμηλή υδατοδιαλυτότητα των ιντιρουμπινών οδηγεί σε φτωχή απορρόφηση και μειωμένη δραστικότητα σε επίπεδο κυττάρων. Επιπλέον, οι άχρωμες ενώσεις προτιμώνται γενικά έναντι των έγχρωμων για θεραπευτική χορήγηση. Έχουν ήδη συντεθεί κάποια παράγωγα ιντιρουμπίνης με στόχο να ξεπεραστούν κάποια από τα προβλήματα αυτά και να δημιουργηθούν νέες ενώσεις με αυξημένη ισχύ για τα ένζυμα-στόχους και ταυτόχρονα βελτιωμένη υδατοδιαλυτότητα.⁴⁰

Παράμετροι όπως η διαλυτότητα ή η μεμβρανική διαπερατότητα δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη της εντερικής απορρόφησης. Σε μελέτες διαπερατότητας πρακτικά αδιάλυτων φαρμάκων χρησιμοποιούνται ενισχυτές διαλυτότητας όπως τα επιφανειοδραστικά. Το επιφανειοδραστικό ενσωματώνει το φάρμακο εντός μικυλλίων κι έτσι αυξάνει τη φαινομενική διαλυτότητα του μορίου. Από την άλλη πλευρά, με την προσέγγιση αυτή το ελεύθερο κλάσμα του φαρμάκου που απομένει διαθέσιμο για διαπεράσει τις μεμβράνες μειώνεται σημαντικά (θεωρείται ότι μόνο το ελεύθερο φάρμακο είναι ικανό να διαπεράσει την εντερική μεμβράνη). Για τα BCS φάρμακα τάξης 2 (Biopharmaceutics Classification System, Class II - high permeability, low solubility) η ενσωμάτωση του φαρμάκου εντός μικυλλίων ελαττώνει το ποσό του ελεύθερου φαρμάκου στο διάλυμα και κατά συνέπεια μειώνεται η εντερική διαπερατότητα.⁵

Όταν το ελεύθερο κλάσμα του φαρμάκου είναι πολύ μικρό (<0.1) και η πλειονότητα των μορίων του φαρμάκου είναι στη μικυλλιακή φάση, "η άμεση

κατανομή του φαρμάκου από το μικύλλιο στη μεμβράνη" μπορεί να συμβάλλει στη διαπερατότητα. Η μικυλλιακή ενσωμάτωση του φαρμάκου διευκολύνει τη μεταφορά του φαρμάκου στην επιφάνεια της μεμβράνης καθώς η εντερική μη αναδευόμενη στιβάδα ύδατος (UWL, unstirred water layer) που επηρεάζει αρνητικά τη μεταφορά των λιπόφιλων φαρμάκων "βραχυκυκλώνεται". Το κύριο περιοριστικό στάδιο του ρυθμού εντερικής διαπερατότητας φαίνεται ότι είναι η διαλυτότητα και όχι η μεμβρανική διαπερατότητα.⁵

Η ιντιρουμπίνη και τα παράγωγά της εμφανίζουν ιδιαίτερα χαμηλή διαλυτότητα στα βιολογικά υγρά και φτωχή βιοδιαθεσιμότητα. Προκειμένου να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα, εισάγονται υποκαταστάτες στους αρωματικούς δακτυλίους ή τροποποιείται η χαρακτηριστική περιοχή του 3'-καρβονυλίου με διάφορα πυρηνόφιλα ώστε να παραμορφωθεί η επιπεδότητα του μορίου, που είναι υπεύθυνη για την πολύ στενή αλληλεπίδραση μεταξύ των κρυστάλλων των μορίων και κατά συνέπεια για την φτωχή διαλυτότητα στα βιολογικά υγρά. Η μετατροπή του 3'-καρβονυλίου σε οξίμη προσφέρει περαιτέρω δυνατότητες για τροποποιήσεις μέσω εισαγωγής ογκωδών υδρόφιλων ομάδων που προσδίδουν αυξημένη υδατοδιαλυτότητα ή επίπεδων λιπόφιλων ομάδων που οδηγούν σε βελτιωμένη κυτταροτοξικότητα σε κυτταροκαλλιέργειες. Για παράδειγμα, η indirubin-5-sulfonic acid, εμφάνισε πολύ ισχυρή δράση επί κινασών *in vitro* αλλά περιορισμένη δράση επί του κυτταρικού πολλαπλασιασμού πιθανόν εξαιτίας περιορισμένης πρόσληψης από τα κύτταρα.⁴¹

Άλλος τρόπος αντιμετώπισης της μειωμένης υδατοδιαλυτότητας είναι η εύρεση φορέων του μορίου που θα επιτρέπουν την απελευθέρωσή του στους ιστούς-στόχους. Έχουν γίνει κάποιες προσπάθειες με το σκοπό αυτό, όσον αφορά στον εγκλεισμό των ιντιρουμπινών σε κατάλληλους φορείς ή στην παρασκευή εναιωρημάτων τους, κατάλληλων για φαρμακευτική χορήγηση. Παρόλα αυτά το πρόβλημα της εύρεσης παραγώγων ιντιρουμπινών με βελτιωμένη βιοδιαθεσιμότητα εξακολουθεί να υφίσταται.

1.7) Κινάσες και άλλα ένζυμα ως μοριακοί στόχοι των ιντιρουμπινών

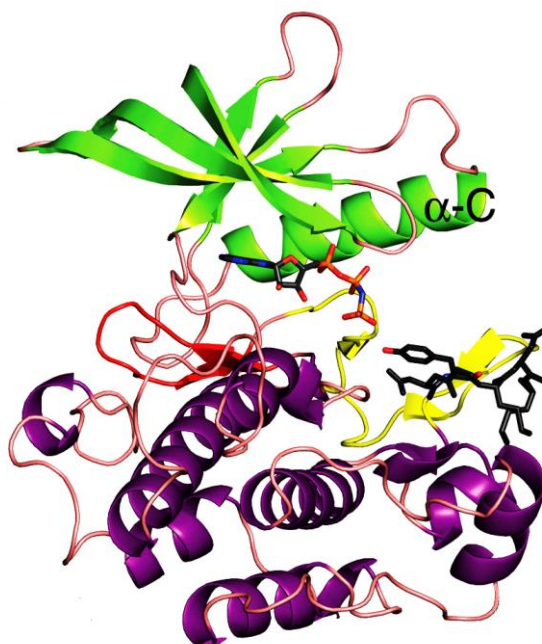
1.7.1) Εισαγωγή

Η πρωτεϊνική φωσφορυλίωση είναι ο πιο κοινός μετα-μεταφραστικός μηχανισμός που χρησιμοποιούν τα κύτταρα για τη ρύθμιση ενζύμων και δομικών πρωτεϊνών και ελέγχεται από περίπου 520 κινάσες και περίπου 80

πρωτεϊνικές φωσφατάσες. Πολλές ασθένειες σχετίζονται με ανωμαλίες στην πρωτεϊνική φωσφορυλίωση και γι' αυτό οι φαρμακολογικοί αναστολείς κινασών και φωσφατασών εμφανίζουν μεγάλο ενδιαφέρον ως πιθανά νέα φάρμακα.⁴²

Η οικογένεια των κινασών αποτελεί πεδίο πολλά υποσχόμενο στο οποίο επικεντρώνεται η έρευνα χημειοθεραπευτικών φαρμάκων. Έχει αποδειχθεί ότι διάφορες κινάσες απορρυθμίζονται στα καρκινικά κύτταρα, σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες και σε φλεγμονές. Η αναστολή των δυσλειτουργικών κινασών τυροσίνης ή σερίνης-θρεονίνης, θεωρείται αξιόπιστη προσέγγιση για τη θεραπεία πολλών ασθενειών. Διάφορα φάρμακα που αναστέλλουν ισχυρώς τέτοιες τυροσινικές κινάσες, έχουν προχωρήσει σε κλινικές δοκιμές και δύο ενώσεις (*imatinib-Gleevec* και *gefitinib-Iressa*) είναι ήδη σε κλινική χρήση ως χημειοθεραπευτικά φάρμακα.⁴³

Ο υψηλός βαθμός ομοιότητας της περιοχής πρόσδεσης του ATP μεταξύ των διαφορετικών κινασών, είναι ένας από τους λόγους που πολλοί αναστολείς εμφανίζουν περιορισμένη εκλεκτικότητα.⁴⁴

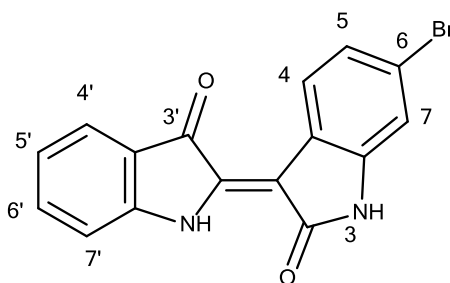


Εικόνα 16: Δομή της καταλυτικής περιοχής των πρωτεϊνικών κινασών. Ο αμινοτελικός λοβός εμφανίζεται με πράσινο, ο καρβοξυτελικός λοβός με μωβ, ο βρόγχος/θηλιά ενεργοποίησης με κίτρινο, και η περιοχή πρόσδεσης του ATP φαίνεται με κόκκινο. Το πεπτιδικό υπόστρωμα προσδεμένο στο βρόγχο ενεργοποίησης φαίνεται με μαύρο και το ATP με μπλε και πορτοκαλί.

Η εκλεκτικότητα είναι ένα από τα σημαντικά στοιχεία ενός αναστολέα κινασών στην περίπτωση που αυτός χρησιμοποιείται ως εργαλείο για τη

μελέτη βιοχημικών διαδικασιών αλλά και όταν χρησιμοποιείται ως θεραπευτικός παράγοντας, παρόλα αυτά τα φάρμακα που στοχεύουν πολλαπλά ένζυμα έχουν πλεονεκτήματα ιδίως σε παθήσεις στις οποίες εμπλέκονται πολλαπλά σηματοδοτικά μονοπάτια. Ο μοριακός σκελετός της ιντιρουμπίνης αποτελεί ιδανική βάση για την ανάπτυξη ισχυρών αναστολέων κινασών.⁴⁵ Σήμερα, μεγάλο ποσοστό των προγραμμάτων ανακάλυψης φαρμάκων στη φαρμακευτική βιομηχανία σχετίζονται με την εξεύρεση εκλεκτικών αναστολέων κινασών.⁴⁶

Όσον αφορά την στόχευση κινασών είναι γνωστό ότι η μετατροπή της 3'-καρβονυλομάδας της 6-βρωμοϊντιρουμπίνης σε οξίμη αυξάνει κατά πολύ τόσο την ανασταλτική ισχύ όσο και την κυτταροτοξικότητα.



Εικόνα 17: 6-βρωμοϊντιρουμπίνη

Επίσης μετά τη συγκρυσταλλογράφηση της 6BIO με την GSK-3β, έγινε εμφανές ότι υπάρχει δυνατότητα εισαγωγής υποκαταστατών στην 3' θέση για παράγωγα που προορίζονται για αναστολή κινασών αφού η 3'-θέση προσανατολίζεται στο εξωτερικό μέρος της θέσης πρόσδεσης (στο χώρο που καταλαμβάνεται κανονικά από την ομάδα της ριβόσης του ATP) και δεν είναι αυτή που δημιουργεί τους απαραίτητους δεσμούς υδρογόνου με το ένζυμο. Η υποκατάσταση της οξίμης με υδρόφιλες ομάδες αυξάνει αποδεδειγμένα την υδατοδιαλυτότητα. Αντίθετα, υποκατάσταση στις θέσεις 1, 2 και 1' αντενδείκνυται, αφού οι αναστολείς συνδέονται στην θέση πρόσδεσης του ATP μέσω δεσμών υδρογόνου, που δημιουργούνται στις θέσεις αυτές.

Η ισχύς των ιντιρουμπινών, όπως φάνηκε από κρυσταλλογραφικές μελέτες των συμπλόκων της CDK2 με διάφορους αναστολείς, είναι αποτέλεσμα της κατάλληλης τοπολογίας του φαρμακοφόρου τμήματος του ιντιγκοειδούς σκελετού που επιτρέπει την αλληλεπίδραση με την περιοχή πρόσδεσης του ATP, μέσω τριών δεσμών υδρογόνου.⁴⁷ Το φαρμακοφόρο τμήμα αποτελείται από το λακταμικό άζωτο, το λακταμικό οξυγόνο και το ετεροκυκλικό άζωτο του μορίου μέσω των οποίων προσδένεται ο αναστολέας στο ενεργό κέντρο με αλληλεπιδράσεις τύπου αδενίνης. Η απομόνωση από

γαστερόποδα μαλάκια παραγώγων ιντιρουμπίνης που φέρουν 6-βρωμο υποκατάσταση και η εκλεκτικότητα που αυτά εμφάνισαν για την GSK-3 οδήγησε στη σχεδίαση και σύνθεση 6-υποκατεστημένων και 5,6-δισυποκατεστημένων αναλόγων. Σύμφωνα με μελέτες μοντελοποίησης φαίνεται ότι η υποκατάσταση στις θέσεις 5 και 6 βελτιώνει τη συγγένεια και την εκλεκτικότητα για την GSK-3β.^{16,31} Στην GSK-3β το βρώμιο στην θέση 6 της ιντιρουμπίνης καταλαμβάνει μια υδρόφοβη περιοχή του ενεργού κέντρου του υποδοχέα, η είσοδος στην οποία εξαρτάται από το αμινοξικό κατάλοιπο Leu132. Η 6BIO αναστέλλει την GSK-3β πιο ισχυρά από ότι τις CDK5/p25 και CDK1/cyclin B, καθώς στις CDKs το αντίστοιχο της λευκίνης132^{GSK-3β} αμινοξικό κατάλοιπο είναι μια φαινυλαλανίνη. Η στερική παρεμπόδιση που προκύπτει από τη σύγκρουση του βρωμίου με την φαινυλαλανίνη είναι η κύρια αιτία της μειωμένης συγγένειας της 6BIO και των 6-υποκατεστημένων αναλόγων για τις CDKs. Λόγω των παραπάνω γίνεται φανερό ότι οι ιντιρουμπίνες ως μόρια μας δίνουν τη δυνατότητα σχεδίασης και σύνθεσης αναλόγων που επιδεικνύουν υψηλή εκλεκτικότητα έναντι συγκεκριμένων κινασών-μοριακών στόχων. Ο σκελετός της ιντιρουμπίνης διαθέτει διάφορες θέσεις που προσφέρονται για υποκατάσταση από χημικές ομάδες που αυξάνουν την εκλεκτικότητα χωρίς να επηρεάζουν την ισχύ.⁴⁵

1.7.2) CDKs

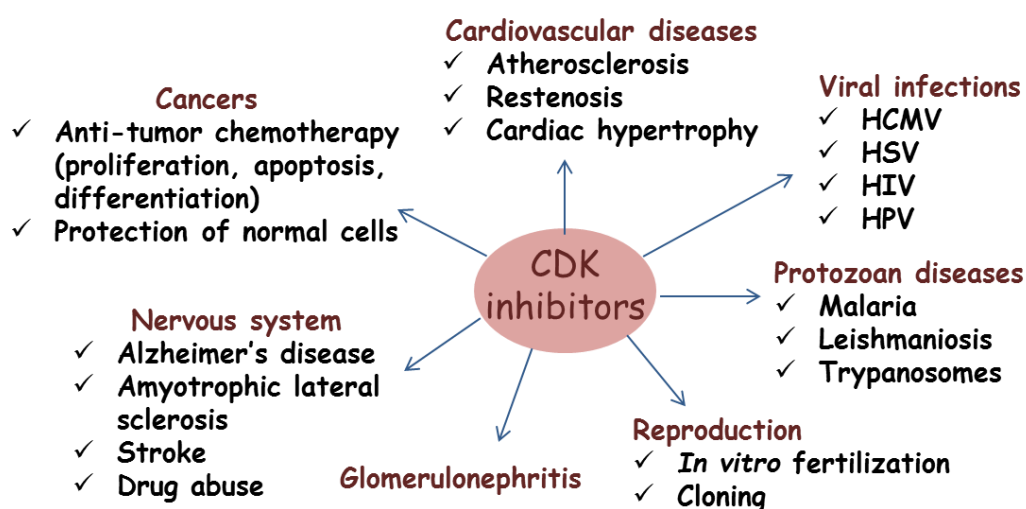
1.7.2.α) Γενικά στοιχεία για τις CDKs κινάσες

Οι CDKs είναι κινάσες σερίνης/θρεονίνης που έχουν χαρακτηριστεί κυρίως για το ρόλο τους στη διαδικασία του κυτταρικού κύκλου. Για να δράσουν οι CDKs πρέπει να συνδεθούν σε συγκεκριμένους ρυθμιστικούς παράγοντες όπως τις κυκλίνες. Μη κατάλληλη ενεργοποίηση των βιοχημικών μονοπατιών του κυτταρικού κύκλου έχει συσχετιστεί με την παθολογία εγκεφαλικού επεισοδίου και τη νόσο Alzheimer. Πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι η μη κατάλληλη ενεργοποίηση των CDKs οδηγεί στην παθολογία διαφόρων νευροεκφυλιστικών παθήσεων. Σε αντίθεση με τις υπόλοιπες CDKs, η λειτουργία της CDK5 σχετίζεται κυρίως με μεταμιτωτικούς νευρώνες και αποτελεί κινάση-κλειδί για την εκφύλιση ντοπαμινεργικών νευρώνων στην νόσο Parkinson.⁴⁸

Διάφορες CDKs ρυθμίζουν την έναρξη της σύνθεσης DNA (φάση S) κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης στα θηλαστικά και αυτές με τη σειρά τους ρυθμίζονται από αναστολείς των CDKs.⁴⁹

Στα εν ηρεμία κύτταρα στην αρχή του κυτταρικού κύκλου, καθώς το κύτταρο μπαίνει στην G1 φάση, οι CDK4 και CDK6 συμπλέκονται με κυκλίνες. Τα σύμπλοκα κυκλινών D-CDK, εισέρχονται στον κυτταρικό πυρήνα όπου πρέπει να φωσφορυλιωθούν από την CAK (CDK-activating kinase) ώστε να είναι σε θέση να φωσφορυλιώσουν πρωτεϊνικά υποστρώματα. Στα φυσιολογικά κύτταρα η CDK2 συμπλεγμένη με την κυκλίνη E, ενεργοποιείται και συμβάλλει στη μετάβαση του κυττάρου στη φάση S.⁴⁹ Η CDK1 συμπλεγμένη με την κυκλίνη B, παίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη της μίτωσης στα ανθρώπινα κύτταρα. Το σύμπλοκο CDK1/κυκλίνη B1 συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα κατά τη φάση G2 και μεταφέρεται στον πυρήνα στην αρχή της μίτωσης.³⁰

Η δομή των CDKs συμβαδίζει αρκετά με τη γενική δομή των κινασών στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Αποτελείται από το λοβό με το μικρό αμινοτελικό άκρο, στο οποίο κυριαρχούν δομές β-πτυχωτών επιφανειών και το λοβό με το μεγαλύτερο καρβοξυτελικό άκρο, στο οποίο κυριαρχεί η δομή της α-έλικας. Η θέση πρόσδεσης του ATP και της κατάλυσης βρίσκεται μεταξύ των δύο λοβών. Υπάρχουν δύο ρυθμιστικές περιοχές: η πρώτη είναι μια α-έλικα που υπάρχει και σε άλλες πρωτεϊνικές κινάσες αλλά στις CDKs έχει διαφορετική αλληλουχία και η δεύτερη είναι η θέση ενεργοποίησης της φωσφορυλίωσης.⁵⁰



Σχήμα 2: Εφαρμογές των CDK-αναστολέων

Χαρακτηριστικά αναστολέων των CDKs:

- μικρό μοριακό βάρος (<600).
- επίπεδα, υδρόφοβα, ετεροκυκλικά μόρια.
- ανταγωνίζονται το ATP για πρόσδεση στη θέση σύνδεσής του στην κινάση.
- προσδένονται στην κινάση μέσω υδρόφοβων δεσμών και δεσμών υδρογόνου.
- για την πρόσδεση στις CDKs το καρβονύλιο και η αμινομάδα του αμινοξέος *Leu83* λειτουργούν ως δέκτης υδρογόνου και ως δότης υδρογόνου αντίστοιχα, ενώ το καρβονύλιο του αμινοξέος *Glu81* λειτουργεί ως δέκτης υδρογόνου.⁵¹

Οι αναστολείς των CDKs χωρίζονται σε 3 κατηγορίες: αυτούς που δεν είναι εκλεκτικοί για καμία CDK (π.χ. φλαβοπυριδόλη, δεσχλωροφλαβοπυριδόλη, οξινδόλη), αυτούς που αναστέλλουν τις CDK1,2,5 και πιθανόν την CDK9 (π.χ. 3'-οξίμη της ιντιρουμπίνης, 5-σουλφονική ιντιρουμπίνη) και αυτούς που αναστέλλουν εκλεκτικά τις CDK4,6. Δεν έχουν ανακαλυφθεί αναστολείς εκλεκτικοί για μια συγκεκριμένη κινάση CDK, γεγονός που οφείλεται ίσως στο ότι τα αμινοξέα της περιοχής πρόσδεσης του ATP είναι πανομοιότυπα μεταξύ των CDKs.⁵¹

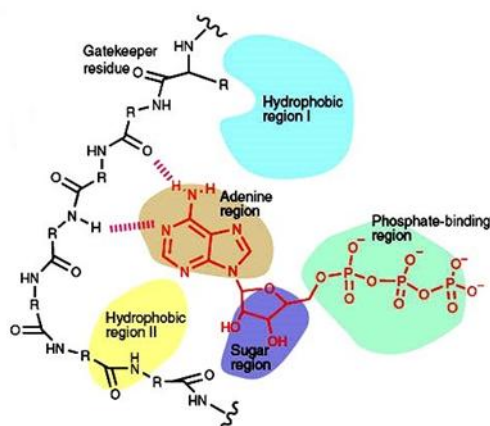
Όταν οι αναστολείς χρησιμοποιούνται ως φαρμακολογικά εργαλεία στην κυτταρική βιολογία για τον καθορισμό του ρόλου μια συγκεκριμένης κινάσης σε κάποια κυτταρική διαδικασία, η εκλεκτικότητα είναι απαραίτητη. Αντιθέτως, η απόλυτη εκλεκτικότητα δεν αποτελεί την καλύτερη προσέγγιση για τη θεραπεία περίπλοκων ασθενειών όπου απορρυθμίζονται πολλαπλά βιοχημικά μονοπάτια. Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι συνδυασμένες δράσεις αποφέρουν καλύτερα θεραπευτικά αποτελέσματα σε σύγκριση με απλές θεραπευτικές προσεγγίσεις. Αν το εύρος των κυτταρικών τους στόχων είναι γνωστό, είναι δυνατή η ανάπτυξη παραγόντων με βελτιωμένη κλινική αποτελεσματικότητα, καθώς θα υπάρχουν δεδομένα τόσο για την ομάδα των κατάλληλων μοριακών-στόχων που θα οδηγήσουν στο επιθυμητό φαρμακολογικό αποτέλεσμα, όσο και για τα ένζυμα, η αναστολή των οποίων είναι ανεπιθύμητη. Η ταυτοποίηση των "καλών" και "κακών" στόχων ίσως βοηθήσει στο να παρακάμψουμε τις τοξικές/ανεπιθύμητες ενέργειες.⁵¹

1.7.2.β) Υπάρχοντα στοιχεία για την επίδραση των ιντιρουμπινών επί των CDKs

Η ιντιρουμπίνη και τα παράγωγά της είναι εκλεκτικοί και ισχυροί αναστολείς των κινασών CDKs (cyclin-dependent kinases). Η CDK1/cyclin B

κινάση που απομονώθηκε από wokύτταρα αστερία αναστέλλεται από την ιντιρουμπίνη (IC_{50} 10 μ M). Η 3'-οξίμη της ιντιρουμπίνης (IO) εμφάνισε μεγαλύτερη ανασταλτική ισχύ (IC_{50} 0.18 μ M), ενώ η υδατοδιαλυτή indirubin-5-sulfonate ήταν ακόμα πιο ισχυρή (IC_{50} 0,055 μ M). Η 3'-οξίμη της ιντιρουμπίνης αναστέλλοντας την ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων μέσω της αναστολής των CDKs, μπλοκάρει την μετάβαση του κυττάρου μεταξύ των φάσεων G1/S και G2/M, γεγονός που οδηγεί σε επαγωγή της απόπτωσης.³⁰

Αναστολείς των CDKs, συμπεριλαμβανομένων των ιντιρουμπινών και της ροσκοβιτίνης, περιλαμβάνουν έναν επίπεδο ετεροκυκλικό πυρήνα ο οποίος καταλαμβάνει την θέση πρόσδεσης της πουρίνης στο καταλυτικό κέντρο.



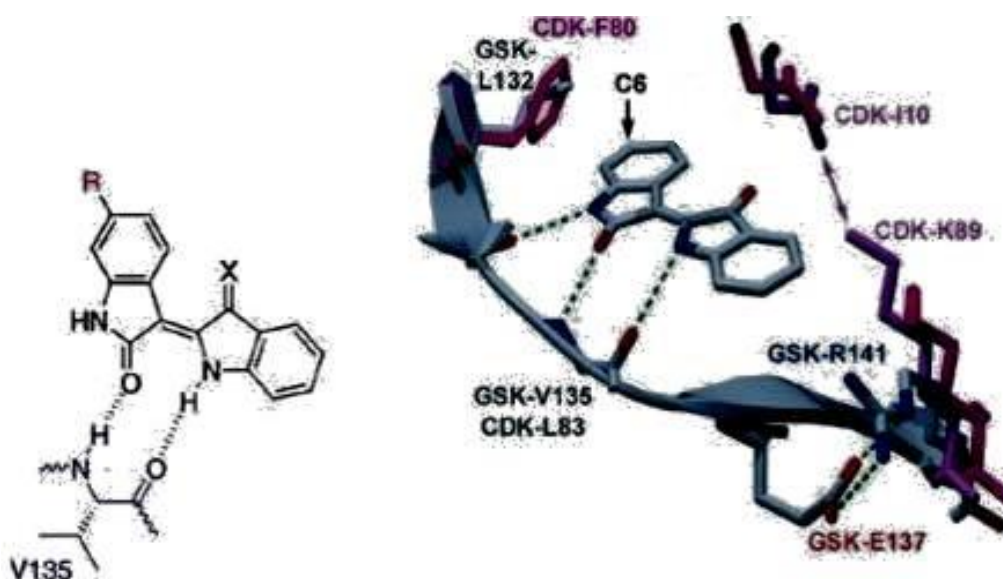
Εικόνα 18: Η σύνδεση του ATP στην θέση πρόσδεσής του στις κινάσες

Οι ιντιρουμπίνες και η ροσκοβιτίνη είναι ATP-μιμητικοί παράγοντες που αναστέλλουν τις CDKs δημιουργώντας δεσμούς υδρογόνου στην περιοχή πρόσδεσης του ATP. Οι ιντιρουμπίνες αναστέλλουν συναγωνιστικά την πρόσδεση του ATP στην καταλυτική περιοχή των CDK κινασών. Μετά από μελέτες των συμπλόκων ενζύμου-αναστολέα μέσω ακτίνων X, αποκαλύφθηκε ότι οι τρεις δεσμοί υδρογόνου που δημιουργούνται στην περιοχή πρόσδεσης του ATP, μέσω των ομάδων N-H, C=O και N-H', είναι κρίσιμοι για την πρόσδεση των ιντιρουμπινών στον πεπτιδικό σκελετό. Μοριακές τροποποιήσεις σε αυτή την περιοχή-κλειδί του μορίου καταργούν την συγγένεια και έτσι την ATP-συναγωνιστική αναστολή των CDKs. Αντιθέτως, οι 5' και 3' θέσεις προσφέρονται για μοριακές τροποποιήσεις που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε βελτίωση της ανασταλτικής ισχύος.⁵²

Η 3'-οξίμη της ιντιρουμπίνης και η 5-σουλφονική ιντιρουμπίνη προσδένονται στις CDKs ως εξής: το λακταμικό αμιδικό άζωτο του μορίου

δημιουργεί ένα δεσμό υδρογόνου με το πεπτιδικό οξυγόνο του αμινοξέος Glu81 της CDK2, η ομάδα NH του αμινοξέος Leu83 της CDK2 δημιουργεί δεσμό υδρογόνου με το λακταμικό αμιδικό οξυγόνο του μορίου και το ετεροκυκλικό άζωτο δρα ως δότης δεσμού υδρογόνου στο οξυγόνο του αμινοξέος Leu83. Όπως το ATP, τα παράγωγα ιντιρουμπίνης σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με το οξυγόνο του Glu81 και την ομάδα NH του Leu83, όμως τα παράγωγα ιντιρουμπίνης αλληλεπιδρούν επίσης και με το οξυγόνο της Leu83. Έτσι, συγκριτικά με άλλους CDK2-αναστολείς, η ιντιρουμπίνη σχηματίζει έναν επιπλέον δεσμό υδρογόνου με το σκελετό της CDK2.¹⁸

Αναστέλλοντας τις CDKs οι ιντιρουμπίνες μπλοκάρουν τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G2/M.¹⁸ Στα καρκινικά κύτταρα υπό την επίδραση ιντιρουμπινών ο κυτταρικός κύκλος σταματά στις φάσεις G1/S ή G2/M, γεγονός που οδηγεί σε αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και τελικά σε επαγωγή απόπτωσης.⁵²



Εικόνα 19: Αλληλεπίδραση ιντιγκοειδών και κινασών

1.7.3) GSK-3

Μετά την ανακάλυψη της ανασταλτικής δράσης των ιντιρουμπινών επί των CDKs, διαπιστώθηκε ότι τα μόρια αυτά είναι εξίσου ισχυροί αναστολείς της GSK-3.⁵³

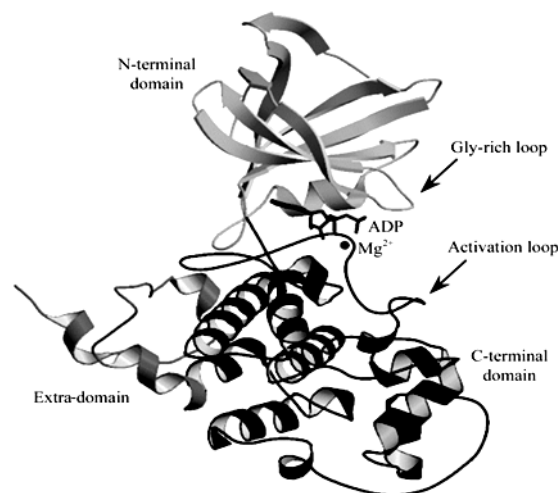
1.7.3.α) Γενικά στοιχεία για την GSK-3β κινάση

Η GSK-3 είναι ένζυμο που ρυθμίζει τη σύνθεση του γλυκογόνου (μορφή με την οποία τα ζωικά κύτταρα αποθηκεύουν γλυκόζη) κι έχει κεντρικό ρόλο σε πολλά κυτταρικά γεγονότα, συμπεριλαμβανομένων: της *Wnt* σηματοδότησης (το *Wnt* μονοπάτι παίζει ρόλο στον καρκίνο, στην εμβρυογένεση αλλά και σε άλλες φυσιολογικές διαδικασίες) και της *Hedgehog* σηματοδότησης (σηματοδοτικό μονοπάτι που παρέχει στα κύτταρα τις πληροφορίες που χρειάζονται ώστε να αναπτυχθεί το έμβρυο σωστά), της μεταγραφής, της δράσης της ινσουλίνης, της κυτταρικής διαίρεσης, της απόκρισης σε βλάβες του DNA, του κυτταρικού θανάτου, της κυτταρικής επιβίωσης, του αξονικού προσανατολισμού κατά την ανάπτυξη, της διαφοροποίησης, των νευρωνικών λειτουργιών, του κιρκάδιου ρυθμού και άλλων.⁴²

Η GSK-3 αναστέλλεται μέσω φωσφορυλίωσης από την πρωτεϊνική κινάση Β (Akt/PKB) σε απόκριση στην ινσουλίνη ή σε παράγοντες ανάπτυξης.⁵⁴

Στα κύτταρα των θηλαστικών εκφράζονται οι δύο ισομορφές της GSK-3. Η GSK-3α έχει μοριακό βάρος ~51 kDa ενώ το γονίδιο GSK-3β κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους ~47 kDa.⁵⁵

Κρυσταλλογραφική μελέτη έδειξε ότι οι GSK-3 ακολουθούν τη γενική δομή των κινασών, με ένα μικρό αμινοτελικό άκρο, το οποίο αποτελείται περισσότερο από β-πτυχωτές-επιφάνειες και ένα μεγάλο καρβοξυτελικό άκρο, το οποίο σχηματίζεται από α-έλικες. Η θέση πρόσδεσης του ATP βρίσκεται μεταξύ των δύο.⁴²



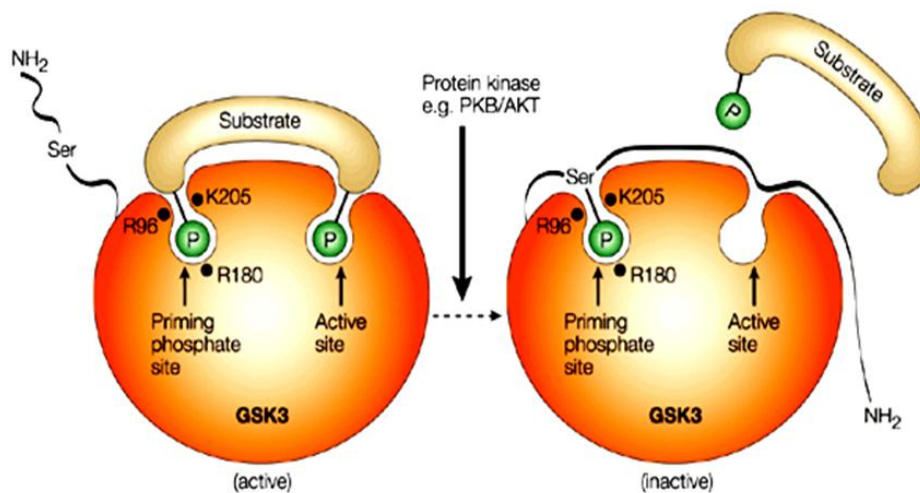
Εικόνα 20: Τριτοταγής δομή της GSK-3

Η GSK-3 ρυθμίζεται μέσω ανασταλτικής φωσφορυλίωσης σε ένα κατάλοιπο σερίνης και ενεργοποιητικής φωσφορυλίωσης σε μια τυροσίνη.⁵⁶

Οι πρωτεϊνικές κινάσες που ρυθμίζουν τη φωσφορυλίωση των GSK-3α(Ser21) και GSK-3β(Ser9) είναι σαφώς προσδιορισμένες.⁵⁷

Η φωσφορυλιωμένη/ανεσταλαμένη GSK-3 απαλλάσσει το κύτταρο από την αναστολή της σύνθεσης γλυκογόνου, ευνοώντας την ενεργό μορφή της GS (συνθάση του γλυκογόνου), γεγονός που αυξάνει τη σύνθεση γλυκογόνου και την πρωτεϊνοσύνθεση.⁵⁸

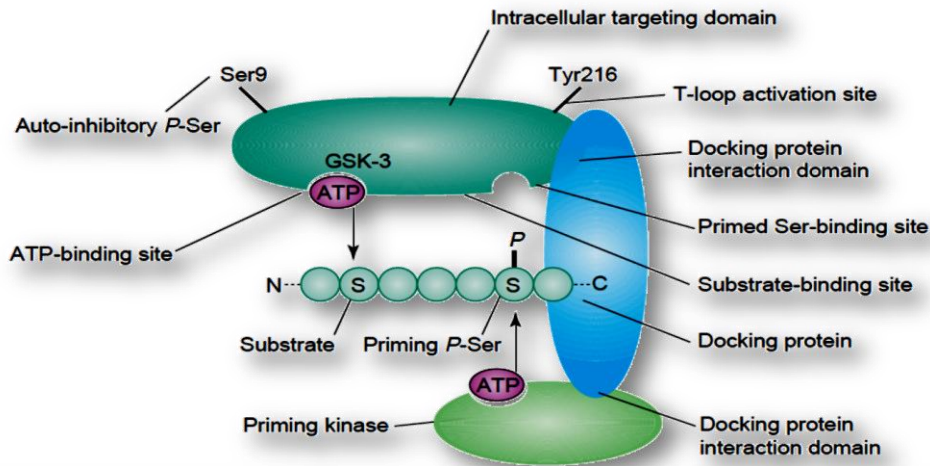
Η φωσφορυλίωση της GSK-3β (στην Ser9) προκαλεί μια ενδομοριακή αλληλεπίδραση και έτσι το αμινοτελικό άκρο του ενζύμου εκτελεί χρέη ψευδοϋποστρώματος το οποίο μπλοκάρει την περιοχή πρόσδεσης φωσφορικής ομάδας και την πρόσβαση οποιουδήποτε υποστρώματος στο καταλυτικό τμήμα.⁵⁷



Εικόνα 21: Αναστολή της GSK-3 μετά από φωσφορυλίωση της Ser9 και παρεμπόδιση της προσέγγισης οποιουδήποτε υποστρώματος. Η GSK-3 ρυθμίζεται μέσω μιας ανασταλτικής φωσφορυλίωσης σερίνης [GSK-3α(Ser21) και GSK-3β(Ser9)] μέσω της Akt και μέσω μιας ενεργοποιητικής φωσφορυλίωσης τυροσίνης [GSK-3α(Tyr279) και GSK-3β(Tyr216)].

Περισσότεροι από 30 αναστολείς της GSK-3β έχουν ταυτοποιηθεί. Επτά από αυτούς έχουν συγκρυσταλλωθεί με την GSK-3β και εντοπίζονται εντός της περιοχής πρόσδεσης του ATP.⁴²

Για να δράσει η GSK-3β απαιτείται προηγούμενη φωσφορυλίωση του υποστρώματος από μια άλλη κινάση, σε ένα κατάλοιπο σερίνης ευρισκόμενο προς το καρβοξυτελικό άκρο σε σχέση με τη θέση που φωσφορυλιώνει η GSK-3β και σε απόσταση τεσσάρων αμινοξέων από αυτήν.⁴²



Εικόνα 22: Η GSK-3 για να δράσει, απαιτεί μια κινάση (priming kinase) η οποία θα φωσφορυλιώσει το υπόστρωμα πριν την GSK-3 σε ένα κατάλοιπο σερίνης/θρεονίνης. Η πρώτη φωσφορυλίωση αυξάνει το ρυθμό δράσης της GSK-3.

Παρά την χημική ποικιλία τους, οι περισσότεροι φαρμακολογικοί αναστολείς της GSK-3 μοιράζονται κοινές ιδιότητες:

- α) έχουν μικρό μοριακό βάρος (<600)
- β) είναι κυρίως επίπεδα, υδρόφοβα ετεροκυκλικά μόρια
- γ) οι πιο πολλοί αλλά όχι όλοι, ανταγωνίζονται το ATP δρώντας στην περιοχή σύνδεσης του στην κινάση
- δ) προσδέονται στην κινάση μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και 2-3 δεσμών υδρογόνου
- ε) το καρβονύλιο και η αμινομάδα της Val135 δρουν αντίστοιχα ως δέκτης και δότης στους δεσμούς-H με αναστολείς, ενώ η Asp133 συχνά δρα ως δέκτης δεσμών-H. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις είναι παρόμοιες με αυτές των αναστολέων των CDKs, κάτι που εξηγείται από το γεγονός ότι οι δομές των GSK-3 και CDKs είναι στενά σχετιζόμενες.⁴²

Οι περισσότεροι αναστολείς κινασών είτε δρουν ανταγωνιζόμενοι το ATP στην περιοχή πρόσδεσης αυτού είτε δρουν στην περιοχή που καταλαμβάνει το μέταλλο στο ένζυμο, θέσεις που εμπλέκονται απευθείας στην καταλυτική διαδικασία.⁴²

Η GSK-3β έχει συνδεθεί με όλες τις πρώιμες ανωμαλίες που σχετίζονται με τη νόσο Alzheimer, με τη διπολική διαταραχή, ενώ επίσης ρυθμίζει την κυτταρική επιβίωση μέσω ποικίλων αποπτωτικών μηχανισμών. Το ένζυμο έχει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της πλαστικότητας των νευρώνων, στη

γονιδιακή έκφραση και ίσως είναι το ένζυμο-κλειδί σε ψυχιατρικές και νευροεκφυλιστικές ασθένειες.⁵⁹

Στο καρδιαγγειακό σύστημα, η GSK-3β έχει μείζονα ρόλο στο μεταβολισμό της γλυκόζης, στην υπερτροφία του καρδιακού μυοκυττάρου και στον κυτταρικό θάνατο.⁶⁰

Οι αναστολείς της GSK-3 μπορούν έχουν ενδιαφέρον για:

> το νευρικό σύστημα: τη διπολική διαταραχή, τη νόσο *Alzheimer*, τη νόσο *Parkinson*, τη νόσο *Huntington*, το εγκεφαλικό επεισόδιο, τις νόσους από prions και τη σχιζοφρένεια καθώς οδηγούν σε νευροπροστασία. Πρόσφατα στον εγκέφαλο ασθενών με σχιζοφρένεια ανακαλύφθηκαν μειωμένες συγκεντρώσεις της AKT1 και μειωμένη φωσφορυλίωση (και κατά συνέπεια αυξημένη δραστηριότητα) της Ser9 στην GSK-3β.

>τον διαβήτη τύπου 2: την ευαισθητοποίηση στην ινσουλίνη, την απορρόφηση γλυκόζης και τη σύνθεση γλυκογόνου. Η ινσουλίνη μειώνει τη φωσφορυλίωση και έτσι αυξάνει τη δραστηριότητα της GS μέσω αναστολής της GSK-3. Φαρμακολογικοί αναστολείς της GSK-3 και το λίθιο, έχει αποδειχτεί ότι μιμούνται την προκαλούμενη από την ινσουλίνη ενεργοποίηση της GS, τη σύνθεση του γλυκογόνου, την καταστολή της γλυκονεογένεσης και αυξάνουν την απορρόφηση γλυκόζης σε κυτταροκαλλιέργειες. Η αναστολή της GSK-3 θεραπευτικά ίσως θα μπορούσε να βελτιώσει την ευαισθησία στη γλυκόζη.

>νόσους από πρωτόζωα: το πλασμώδιο (μαλάρια)

>τον καρκίνο: τη χημειοθεραπεία, την παρεμβολή στους μικροσωληνίσκους και τη ρύθμιση των καρκινικών βλαστικών κυττάρων. Υπό ορισμένες συνθήκες, οι αναστολείς της GSK-3 ίσως είναι χρήσιμοι στη θεραπεία του καρκίνου. Η αντοχή στον TRAIL, έναν συνδέτη που προκαλεί απόπτωση και ο οποίος θεωρείται αντικαρκινικός παράγοντας, συνδέεται με την ενεργοποίηση της GSK-3β.

>νόσους σχετικές με τους κirkάδιους ρυθμούς: τις διαταραχές ύπνου, το jet lag.

>τα αναγεννητικά φάρμακα: οι αναστολείς της GSK-3 μπορεί να χρησιμοποιηθούν για να κατευθύνουν τη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων/stem cells προς σαφώς καθορισμένες κυτταρικές σειρές. Οι καρκίνοι μπορεί να είναι αποτέλεσμα μεταλλάξεων των γονιδίων που ελέγχουν την κανονική ανανέωση των βλαστικών κυττάρων, οδηγώντας σε απορρύθμιση της ανανέωσης των stem cells. Η χρήση αναστολέων της κινάσης, ώστε να αναγκάσουν τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα να διαφορο-

ποιηθούν προς μη-ογκογόνα καρκινικά κύτταρα, αποτελεί μια από τις πιο ελκυστικές πιθανές εφαρμογές αυτών των μορίων.⁴²

Όπως αναφέρθηκε και για τις CDK κινάσες, η εκλεκτικότητα αποτελεί στοιχείο-κλειδί όταν οι αναστολείς της GSK-3 χρησιμοποιούνται ως εργαλεία για να μελετηθεί η φαρμακολογική εμπλοκή του ενζύμου σε μια συγκεκριμένη κυτταρική πορεία σηματοδότησης. Αντίθετα, η απόλυτη εκλεκτικότητα δεν είναι η καλύτερη προσέγγιση όταν οι αναστολείς της GSK-3 αναπτύσσονται ως πιθανή θεραπεία για σύνθετες ασθένειες διότι σε αυτές συνήθως διεγείρονται πολλαπλά σηματοδοτικά μονοπάτια και διότι η υψηλή εκλεκτικότητα θα μπορούσε να οδηγήσει ταχύτατα σε αντοχή. Οι 6-βρωμοιντιρουμπίνες φαίνεται να είναι μεταξύ των πιο εκλεκτικών αναστολέων που έχουν ταυτοποιηθεί ως τώρα για την GSK-3.⁴²

1.7.3.β) Υπάρχοντα στοιχεία για την επίδραση των ιντιρουμπινών επί της GSK-3β

Πολύ μικρός αριθμός φαρμακολογικών αναστολέων της GSK-3 είναι διαθέσιμος. Παρατηρήθηκε ότι διάφοροι φαρμακολογικοί αναστολείς των CDKs (cyclin-dependent kinases), ήταν αρκετά αποτελεσματικοί και επί των GSK-3s. Μεταξύ αυτών είναι και οι ιντιρουμπίνες (ταυτοποιημένες αρχικά ως CDK αναστολείς).¹⁶

Επίσης οι ιντιρουμπίνες, μετά από μακροχρόνιες μελέτες σε ζώα, βρέθηκε ότι δεν εμφανίζουν αιματοτοξικότητα και τοξικότητα για το μυελό των οστών, ενώ μετά από 6μηνη μελέτη σε σκύλους με δόσεις ιντιρουμπίνης έως και 25 φορές υψηλότερες από εκείνες που χρησιμοποιήθηκαν σε ανθρώπους, εμφανίστηκε αναστρέψιμη διάρροια και ελαφρά ηπατοτοξικότητα.⁶¹

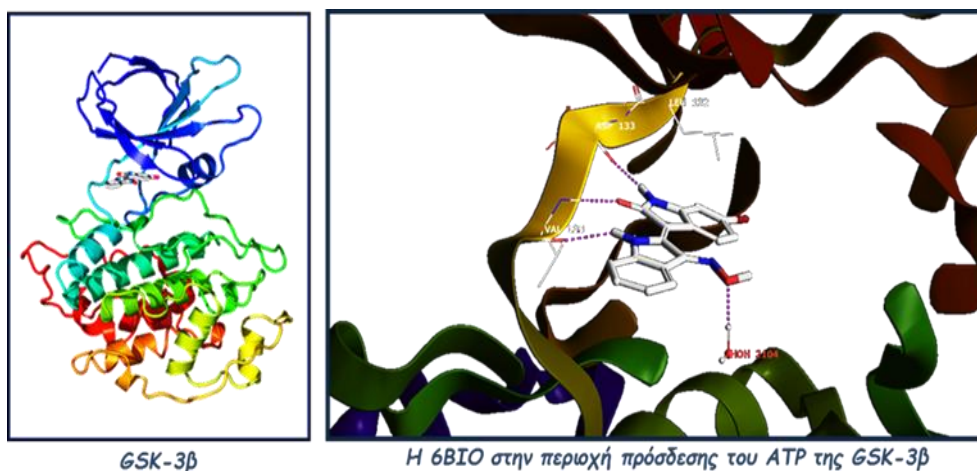
Μόρια με υποκατάσταση στη θέση 6 όπως η 6-βρωμοϊντιρουμπίνη και η 3'-οξίμη της, έχουν μεγάλη εκλεκτικότητα για την GSK-3. Επίσης μόρια με υποκατάσταση στη θέση 5 αναστέλλουν διάφορες CDKs. Έτσι, έχουν συντεθεί δισυποκατεστημένες στις θέσεις 5 και 6 ιντιρουμπίνες ώστε να συνδυάζουν την υψηλή ισχύ με την εκλεκτικότητα. Οι ενώσεις αυτές εμφάνισαν IC₅₀ 2 φορές μικρότερο σε σχέση με το IC₅₀ των 5-μονοϋποκατεστημένων παραγώγων. Κανένα από τα 6-μονοϋποκατεστημένα ή τα 5,6-δισυποκατεστημένα παράγωγα ιντιρουμπινών δεν εμφανίζει

ανασταλτική δράση έναντι των CDK1 και CDK5, λόγω της στερικής παρεμπόδισης μεταξύ του 6-υποκαταστάτη και της Phe80 των κινασών.³¹

Η 6-βρωμο-ιντιρουμπίνη, που ανήκει στις φυσικές βρωμο-ιντιρουμπίνες που παράγονται από τον *Hexarhex trunculus*, εμφάνισε ισχυρή ανασταλτική δράση επί της GSK-3 ενώ και το συνθετικό της παράγωγο 6-bromoindirubin-3'-oxime (6BIO) και σχετικά παράγωγα αποτελούν μοναδικούς εκλεκτικούς αναστολείς της GSK-3 ικανούς να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη.¹⁶

Η αναστολή της GSK-3 από τον εκλεκτικό αναστολέα της 6-bromoindirubin-3'-oxime (6BIO) ευνοεί την ανανέωση των ESCs (Embryonic stem cells/εμβρυικά βλαστικά κύτταρα) σε ανθρώπους και μύες και τη διατήρηση της πολυδυναμικότητάς τους απουσία τροφοδοτικών κυττάρων. Υπό αυτές τις συνθήκες, οι αναστολείς της GSK-3 ίσως έχουν πρακτική εφαρμογή στην ανανεωτική ιατρική.⁴²

Το φαρμακοφόρο αποτελεί ένα απαραίτητο τμήμα του μορίου που πρέπει να παραμένει ανέπαφο κατά τις δομικές τροποποιήσεις, καθώς παρέχει τις κύριες σταθεροποιητικές αλληλεπιδράσεις με τον συνδέτη του ενεργού κέντρου της κινάσης μέσω τριών δεσμών υδρογόνου. Επιπλέον, υποκατάσταση της θέσης 6 οδηγεί σε βελτίωση της εκλεκτικότητας, καθώς μια ογκώδης ομάδα σε αυτή τη θέση εκμεταλλεύεται την διαφορά των GSK-3 β και CDKs στα κατάλοιπα του ενεργού τους κέντρου. Η εκλεκτικότητα προκύπτει από τη στερική παρεμπόδιση μεταξύ του υποκαταστάτη της θέσης 6 και της φαινυλαλανίνης των CDKs.



Εικόνα 23: Αλληλεπίδραση 6BIO με την GSK-3 β

Οι θέσεις 4 και 7 δεν είναι κατάλληλες για υποκατάσταση. Άτομα μεγαλύτερα του υδρογόνου στη θέση 4 διαταράσσουν την επιπεδότητα του μορίου. Υποκατάσταση στη θέση 7 προκαλεί ανεπιθύμητες αλληλεπιδράσεις με το σκελετό της πρωτεΐνης. Εισαγωγή υδρόφιλης ομάδας στη θέση 5, πιθανόν οδηγεί σε ανεπιθύμητη αλληλεπίδραση με το ενεργό κέντρο. Η ομάδα της οξίμης στην 3' θέση προσφέρεται για εισαγωγή ομάδων οι οποίες αυξάνουν τον υδρόφιλο χαρακτήρα της 6BIO. Η οξίμη του προσδεδμένου στην κινάση αναστολέα, βρίσκεται στην περιφέρεια της περιοχής πρόσδεσης εν μέρει εκτεθειμένη στον διαλύτη. Έτσι, η εισαγωγή ογκωδών ομάδων ή αλυσίδων σε αυτή τη θέση είναι στερικά αποδεκτή.¹

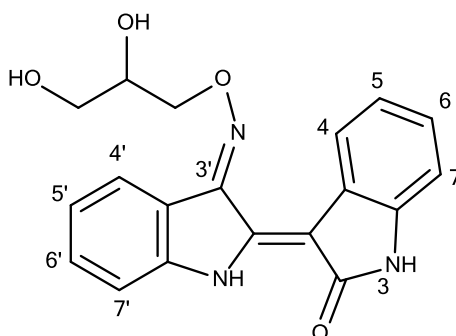
1.7.4) STAT πρωτεΐνες

Παράγωγα ιντιρουμπίνης έχει βρεθεί ότι σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα στήθους και προστάτη αναστέλλουν ισχυρά την STAT3 σηματοδότηση (Signal transducer and activator of transcription) η οποία έχει σημαντικό ρόλο στην ογκογένεση και αποτελεί πολλά υποσχόμενο αντικαρκινικό στόχο. 30 λεπτά μετά την χορήγηση παραγώγων ιντιρουμπίνης η φωσφορυλίωση τυροσόλης στην STAT3, που πραγματοποιείται από την c-Src μειώνεται όπως επίσης και η πρόσδεση της Stat3 στο DNA. Επίσης υπό επίδραση παραγώγων ιντιρουμπίνης, οι αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες Mcl-1 και Survivin, που κωδικοποιούνται από τα γονίδια που ελέγχει η STAT3, υποεκφράζονται με αποτέλεσμα επαγωγή της απόπτωσης. Από τα παραπάνω φαίνεται ότι τα παράγωγα ιντιρουμπίνης αναστέλλουν απευθείας την Src-STAT3 σηματοδότηση και σε αυτό οφείλεται σε ένα βαθμό, η αντικαρκινική δράση των ενώσεων αυτών.⁵²

Οι πρωτεΐνες STAT είναι οικογένεια πρωτεϊνών με επτά μέλη STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b και STAT6, που αποτελούν μεταγραφικούς παράγοντες. Στα εν ηρεμία κύτταρα, οι STATs βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα στην ανενεργή μορφή τους. Η φωσφορυλίωση συγκεκριμένων τυροσινικών καταλοίπων αποτελεί σημαντικό βήμα για την ενεργοποίηση των STATs. Άπαξ και ενεργοποιηθεί η STAT διμερίζεται σε άλλες STATs, και μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου προσδένεται στους ενισχυτές για να ξεκινήσει η μεταγραφή. Οι STAT πρωτεΐνες παίζουν καθοριστικό ρόλο σε διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες όπως η εμβρυική ανάπτυξη, η κυτταρική διαφοροποίηση, η ανοσοαπόκριση και η οργανογένεση.⁶²

Οι STATs πρωτεΐνες μετέχουν στο σύστημα JAK/STAT, ένα σηματοδοτικό μονοπάτι που διαβιβάζει πληροφορίες από χημικά σήματα που βρίσκονται εκτός του κυττάρου, διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης, εντός του πυρήνα προς τους υποκινητές γονιδίων στο DNA, γεγονός που προκαλεί τη μεταγραφή του DNA. Το JAK/STAT αποτελείται από 3 κύρια στοιχεία: έναν υποδοχέα, την JAK (Janus kinase) και τον STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription).⁶³

Το πιο δραστικό παράγωγο, το οποίο έχει βρεθεί μέχρι στιγμής είναι η:



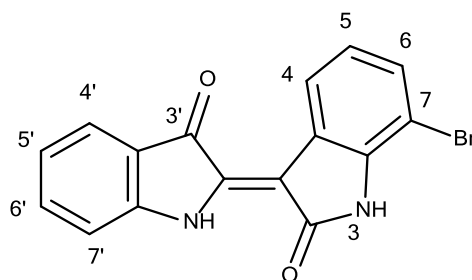
Εικόνα 24: Αναστολέας της *c-Src*, της *Jak1* και της *Stat3*

1.7.5) Aurora's

Οι κινάσες σερίνης-θρεονίνης Aurora A και B και η λιγότερο μελετημένη Aurora C είναι ρυθμιστικές πρωτεΐνες με σημαντικό ρόλο στις μιτωτικές διαδικασίες της κυτταρικής διαίρεσης. [62,63] Ορισμένα παράγωγα ιντιρουμπινών είναι αρκετά ισχυροί αναστολείς Αουρορών. Παρατηρήθηκε ότι η αλλαγή της θέσης του βρωμίου στην 6BIO, από τη θέση 6 στη θέση 7, μετατρέπει το μόριο από ισχυρό αναστολέα της GSK-3 α/β (6BIO) σε ισχυρό αναστολέα των κινασών Aurora B και Aurora C (7BIO). Η 7BIO εμφανίζει εκλεκτικότητα για αυτές τις δύο κινάσες, ενώ η ομόλογη κινάση Aurora A αναστέλλεται ελάχιστα. Το αμινοξύ που βρίσκεται στο ενεργό κέντρο των κινασών (Thr217^{AurA}, Glu161^{AurB}, Glu127^{AurC}) είναι αυτό που συμβάλλει στην αυξημένη συγγένεια της 7BIO για τις Aurora B και Aurora C κι όχι για την Aurora A.⁴⁵

Μετά από μελέτες μόντελινγκ και κρυσταλλογραφίας, παρατηρήθηκε ότι η 7-υποκατάσταση, ιδίως με ογκώδεις ομάδες, μειώνει την ανασταλτική επίδραση επί των GSK-3 και CDKs, καθώς ο υποκαταστάτης "συγκρούεται" με τον σκελετό του ενζύμου και οδηγεί σε μη ευνοϊκές αλληλεπιδράσεις ή

παραμορφώνεται η γεωμετρία των δεσμών υδρογόνου που ευθύνονται για την πρόσδεση. [61]



Εικόνα 25: 7BIO (7-βρωμοϊνδιτριουμπίνη)

Αυτό επιβεβαιώθηκε κι από tests της 7BIO επί των GSK-3β, CDK1 και CDK5 στις οποίες η 7BIO απεδείχθη αδρανής. Το ίδιο αποτέλεσμα ίσχυσε και για την κινάση Aurora A. Όταν όμως η 7BIO δοκιμάστηκε επί των κινασών Aurora B και Aurora C, αντίθετα με ό,τι αναμενόταν, φάνηκε να τις αναστέλλει. Οι κινάσες Aurora A, B και C είναι συγγενικές ομόλογες κινάσες που εμφανίζουν σε μεγάλο βαθμό παρόμοιες αλληλουχίες, ειδικά στην περιοχή του ενεργού κέντρου. Κατά συνέπεια η 7BIO αλληλεπιδρά με τις κινάσες μέσω κάποιου νέου εκλεκτικού προφίλ πιθανώς κι όχι μέσω του ενεργού κέντρου.⁴⁵

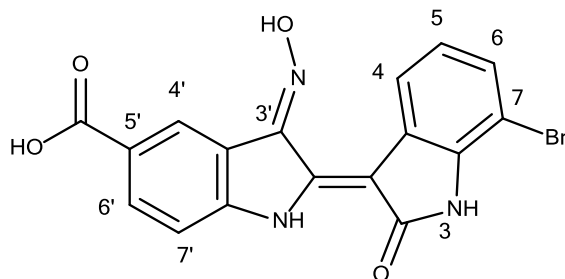
Η Aurora A και B έχουν διαφορετικούς ρόλους στη μίτωση. Η Aurora A ρυθμίζει κυρίως την συγκρότηση της ατράκτου και την ωρίμανση του κεντροσώματος, ενώ η Aurora B εμπλέκεται στο διαχωρισμό του χρωμοσώματος και στην κυτοκίνηση. Η Aurora C είναι, όπως η Aurora B, μια χρωμοσωμική πρωτεΐνη που συνεργάζεται με την Aurora B στη ρύθμιση του μιτωτικού διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων και της κυτοκίνησης, όμως η ακριβής λειτουργία και ρύθμισή της δεν έχουν γίνει πλήρως κατανοητές. Όπως με άλλες κινάσες που ελέγχουν την κυτταρική διαίρεση, μη κατάλληλη ρύθμιση ή υπερέκφραση των κινασών Aurora, μπορεί να οδηγήσει σε γενετική αστάθεια και καρκινογένεση. Έχει αποδειχθεί ότι και οι τρεις Aurora κινάσες συχνά υπερεκφράζονται σε πολλούς ανθρώπινους όγκους.⁶⁴

Αν και η υπερέκφραση των κινασών Aurora δεν είναι σαφώς συνδεδεμένη με την καρκινογένεση και μένουν να διευκρινιστούν διάφορα θέματα σχετικά με τους μηχανισμούς που εμπλέκουν την δράση των Auroras με τον καρκίνο, οι κινάσες αυτές φαίνεται να αποτελούν πολλά υποσχόμενους στόχους για την ανάπτυξη χημειοθεραπευτικών φαρμάκων.⁴⁵

1.7.6) DYRK

Οι κινάσες DYRK εμπλέκονται σε νευροπαθολογικές καταστάσεις όπως η νόσος Alzheimer και το σύνδρομο Down. Τροποποιήσεις του σκελετού των ιντιρουμπινών μέσω εισαγωγής πολικών ή όξινων ομάδων στις θέσεις 5' και 6' και βρωμίου ή τριφθορομεθυλομάδας στην θέση 7, καθιστούν τα μόρια αναστολείς των DYRKs με αυξημένη ισχύ και ενισχυμένη εκλεκτικότητα.

Ο τρόπος αλληλεπίδρασης των ιντιρουμπινών με τις DYRKs είναι πιθανώς διαφορετικός από αυτόν που τυπικά παρατηρούμε με τα συγκεκριμένα μόρια αφού φαίνεται ότι επί των DYRKs δεν δρουν ως συναγωνιστές του ATP. Η 7BIO διαθέτει σημαντικά βελτιωμένη εκλεκτικότητα ως προς τις DYRKs σε σύγκριση με την 6BIO. Παράγωγα χωρίς 7-βρωμο υποκατάσταση εμφανίζουν μειωμένη εκλεκτικότητα, ενώ η 5' θέση είναι καταλληλότερη της 6' για εισαγωγή όξινου υποκαταστάτη. Η παρουσία της 3'-οξίμης γενικά βελτιώνει την ισχύ επηρεάζοντας ελάχιστα την εκλεκτικότητα, ενώ η μεθυλίωση του N1 φαίνεται να μην είναι ευνοϊκή για την αναστολή των DYRKs. Πράγματι μετά το συνδυασμό των ανωτέρω σε μία ένωση, η 3'-οξίμη της 7-βρωμο-5'-καρβοξυιντιρουμπίνης απεδείχθη ισχυρός αναστολέας των DYRK1a και DYRK2.



Εικόνα 26: Η 3'-οξίμη της 7-βρωμο-5'-καρβοξυιντιρουμπίνης, αναστολέας των DYRK1a και DYRK2.

Η υποκατάσταση βρωμίου στη θέση 7 ενισχύει την ανασταλτική δράση επί των DYRKs μόνο σε συνδυασμό με την καρβοξυλομάδα στην 5' θέση. Ενώσεις υποκατεστημένες με ομάδα τετραζολίου εμφανίζονται αδρανείς.⁶⁵

Μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών DYRK συναντώνται σε 4 από τα 5 κύρια ταξα ή βασίλεια. Οι DYRK πρωτεΐνες συμμετέχουν σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια κρίσιμα για την ανάπτυξη και την κυτταρική ομοίωση.

Οι DYRK κινάσες εμπλέκονται σε διάφορες διαδικασίες όπως η ανάπτυξη του εγκεφάλου, η επαγόμενη από ιούς ογκογένεση, η γένεση των νευριτών, η διαφοροποίηση των μυοβλαστών και η επιβίωση των μυοκυττάρων, η ρύθμιση της ερυθροποίησης, το σύνδρομο Down, η μικροκεφαλία, η καθυστέρηση ενδομήτριας ανάπτυξης, η αναπτυξιακή καθυστέρηση, ο νευροεκφυλισμός, η καρδιακή υπερτροφία, η οστική ομοιόσταση, καρκίνοι (π.χ. εντέρου και πνευμόνων, αδενοκαρκίνωμα παγκρεατικού πόρου, γαστρικό, πνευμονικό και οισοφαγικό αδενοκαρκίνωμα, ραβδομυοσάρκωμα) και τέλος μπορεί να δρουν ως προαποπτωτικές κινάσες ή και προστατευτικές κατά της απόπτωσης κινάσες.⁶⁶

Οι DYRKs (dual-specificity yak-related kinases), ανήκουν στην CMGC ομάδα πρωτεϊνών, η οποία περιλαμβάνει επίσης τις CDKs, MAPKs, GSK-3 και RCK κινάσες. Δύο DYRK πρωτεΐνες έχουν ταυτοποιηθεί στη μαγιά (*Saccharomyces cerevisiae* και *Schizosaccharomyces pombe*), ο ρόλος των οποίων σχετίζεται με τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, της κυτοκίνησης και της κυτταρικής διαφοροποίησης. Η οικογένεια των DYRK κινάσων στα θηλαστικά αποτελείται από 5 μέλη: DYRK1A, DYRK1B, DYRK2, DYRK3 και DYRK4. Οι DYRK πρωτεΐνες χαρακτηρίζονται ως κινάσες διπλής εξειδίκευσης καθώς διαθέτουν δυνατότητα φωσφορυλίωσης τυροσίνης και σερίνης/θρεονίνης, παρόλο που η φωσφορυλίωση τυροσίνης περιορίζεται σε αυτοφωσφορυλίωση.

1.7.7) CRK3

Παράγωγα ιντιρουμπινών αναστέλλουν την CRK3 κινάση δρώντας ως αναστολείς της *Leishmania Mexicana*.⁶⁷

Οι CRK1 και CRK3 είναι κινάσες ομόλογες των CDKs (κινάσες σερίνης/θρεονίνης), πανταχού παρούσες στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, πολλές από τις οποίες έχουν καθοριστικό ρόλο στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Τα γονίδια των CRK1 και CRK3 απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια ερευνών του κυτταρικού κύκλου και του κύκλου ζωής των παρασίτων από την *Leishmania mexicana*. Η CRK3 κινάση φάνηκε, μετά από γενετική τροποποίηση του παρασίτου, ότι είναι κρίσιμη για τον πολλαπλασιασμό.⁶⁸

1.7.8) GP

Ένα παράγωγο ιντιρουμπίνης, η indirubin-3'-aminooxy-acetate αναστέλλει την φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP), μέσω πρόσδεσης στην ανασταλτική και στην αλλοστερική περιοχή.⁶⁹

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) είναι ένα αλλοστερικό ένζυμο που υπάρχει σε δύο αλληλομετατρέπόμενες μορφές. Η πρώτη, η GPb, έχει χαμηλή δραστηριότητα ενώ η GPa υψηλή, παίζοντας σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του καταβολισμού του γλυκογόνου και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Οι ιντιρουμπίνες αναστέλλουν και τις δύο μορφές της GP, συνδεόμενες στην ανασταλτική περιοχή, την περιοχή δηλαδή όπου προσδένονται επίσης η γλυκόζη, οι πουρίνες, οι νουκλεοσίδες και τα νουκλεοτίδια. Η περιοχή αυτή βρίσκεται στην επιφάνεια του ενζύμου, παρεμποδίζοντας την πρόσβαση του γλυκογόνου στην καταλυτική περιοχή. Η αναστολή της GP μέσω επίδρασης στην καταλυτική της περιοχή θα μπορούσε να είναι χρήσιμη στην θεραπεία του διαβήτη τύπου 2. Η ιντιρουμπίνη δρώντας επί της GP θα μπορούσε να έχει επιπρόσθετες δράσεις στα καρκινικά κύτταρα διαταράσσοντας τον κυτταρικό κύκλο και οδηγώντας τα σε απόπτωση μέσω πρόκλησης έλλειψης/ανεπάρκειας γλυκόζης.⁷⁰

1.7.9) AhR

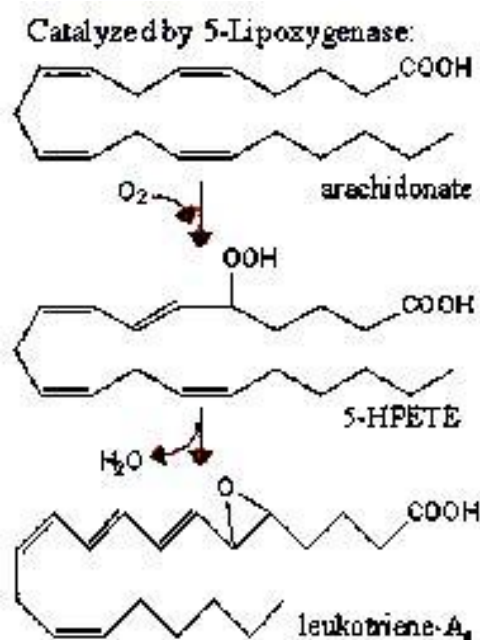
Οι ιντιρουμπίνες έχουν σαφή δράση κατά του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, η οποία προκύπτει από την αναστολή των CDKs, των GSK-3, αλλά και από την αλληλεπίδρασή τους με τον AhR (aryl hydrocarbon receptor), επίσης γνωστό κι ως "υποδοχέας διοξίνης". Η απορρύθμιση του υποδοχέα αυτού οδηγεί στην εμφάνιση στομαχικών όγκων. Οι AhR αγωνιστές εμποδίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και μερικοί ελέγχονται για την αντικαρκινική τους δράση.³¹

1.8) 5-LOX: Ένας νέος μοριακός στόχος για τις ιντιρουμπίνες

1.8.a) Γενικά στοιχεία για την 5-LOX

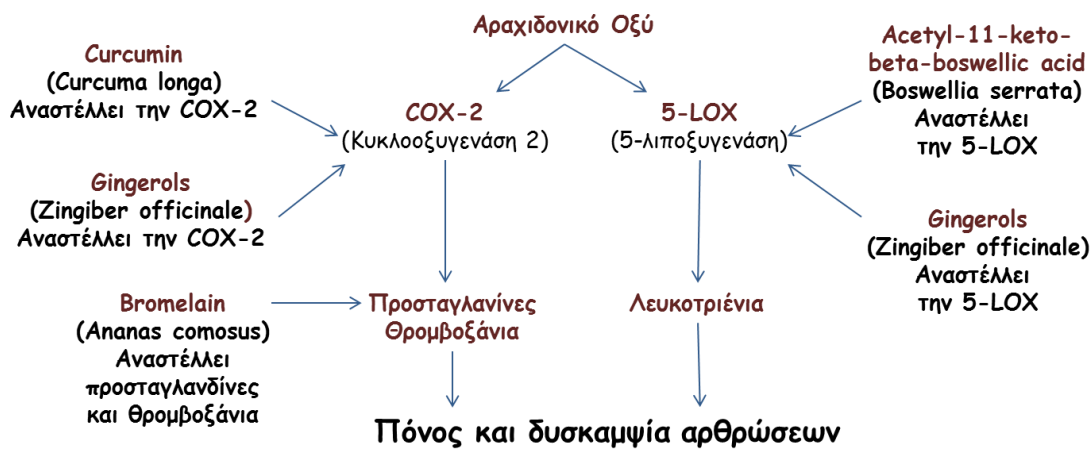
Η 5-LOX αποτελεί ένζυμο-κλειδί για τη βιοσύνθεση λευκοτριενίων (LTs) από το αραχιδονικό οξύ (AA). Το ένζυμο έχει μοριακό βάρος μεταξύ 72 και 80 kDa. Για την πλήρη δράση της η 5-LOX απαιτεί συμπατάγοντες όπως το Ca^{2+} και ATP, ενώ αλληλεπιδρά και με άλλες πρωτεΐνες όπως η FLAP (5-

LOX-activating protein, η οποία διευκολύνει την πρόσδεση του AA στην 5-LOX) και η CLP (coactosin-like protein, η οποία διεγείρει τη δράση της 5-LOX). Το ένζυμο περιλαμβάνει στο ενεργό κέντρο, σίδηρο ο οποίος δεν συνδέεται με ομάδα αίμης και είναι απαραίτητος για την ενζυματική δραστηριότητα. Στα εν ηρεμία κύτταρα, η 5-LOX βρίσκεται είτε στο κυτοσόλιο είτε στον πυρήνα αναλόγως τον τύπο του κυττάρου. Η διέγερση των κυττάρων από διάφορους αγωνιστές προκαλεί μετακίνηση της 5-LOX από άλλα διαμερίσματα προς την πυρηνική μεμβράνη και παραγωγή LTs. Τα LTs είναι προφλεγμονώδεις μεσολαβητές και συντίθενται κυρίως από φλεγμονώδη κύτταρα όπως τα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα (PMNs), τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα μαστοκύτταρα.⁷¹



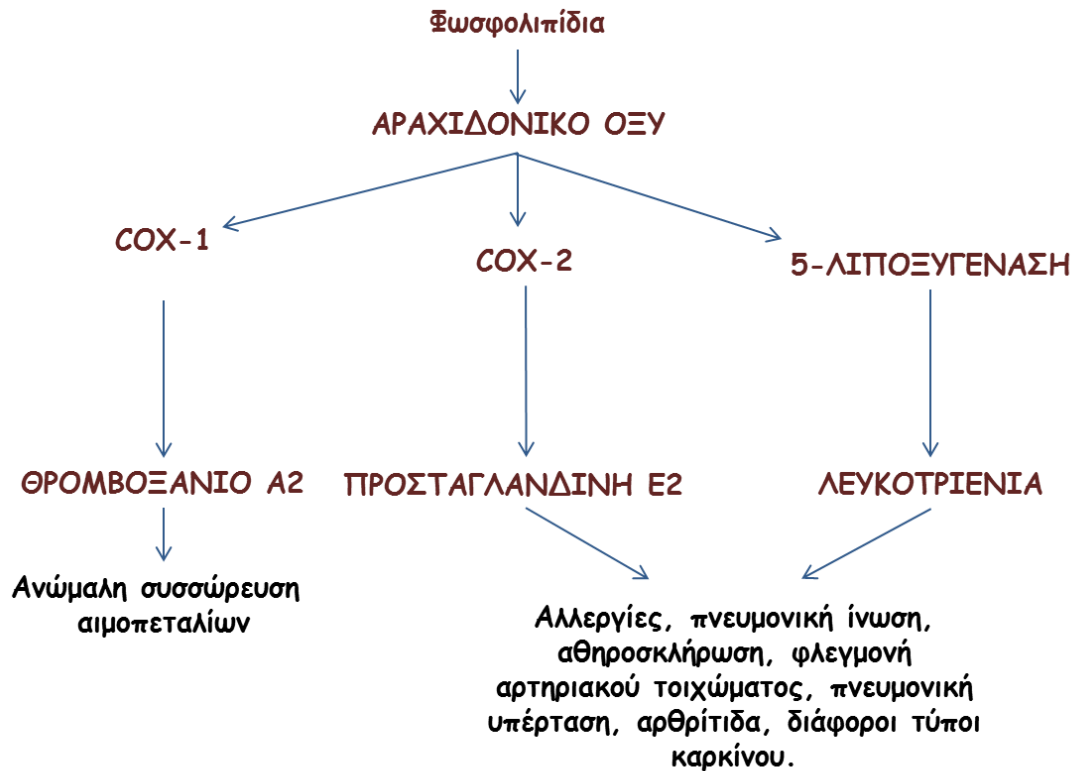
Εικόνα 27: Η οξείδωση του αραχιδονικού οξέος από την 5-LOX

Τα λευκοτριένια (LTs) είναι ισχυροί λιπιδικοί μεσολαβητές κυρίως γνωστοί για τους ρόλους τους στη ρύθμιση παθολογικών καταστάσεων. Προερχόμενα από το πολυακόρεστο λιπαρό οξύ αραχιδονικό (AA), τα LTs αποτελούν μαζί με τις προσταγλανδίνες (PGs) και τα θρομβοξάνια (TXs) που παράγονται από την COX, μια τάξη τοπικώς-δρώντων αγγελιοφόρων.⁷²



Σχήμα 3: Στην πορεία γένεσης λευκοτριενίων, προσταγλανδινών και θρομβοξανίων παρεμβαίνουν διάφορα φυσικά προϊόντα.

Τα LTs παράγονται αρχικά στον πυρηνικό φάκελο των λευκοκυττάρων όπου η ενεργοποιημένη κυτοσολική φωσφολιπάση A2 απελευθερώνει AA από τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης. Η 5-LOX αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη FLAP (Five Lipoxygenase Activating Protein) η οποία διευκολύνει τη μεταφορά του AA στην λιποξυγενάση, προκειμένου να ενσωματωθεί μοριακό οξυγόνο στον σκελετό του AA μέσω μιας αντίδρασης 2 σταδίων. Από την πρώτη αντίδραση προκύπτει το 5-HPETE και ακολουθεί ένα βήμα αφυδάτωσης που οδηγεί σε ασταθές εποξειδίο. Μετά την πρώτη αντίδραση, αρκετή ποσότητα 5-HPETE μπορεί να διαφύγει από το ενεργό κέντρο καθώς αποτελεί θερμοδυναμικά σταθερό παράγωγο και αν και δομικά δεν συνιστά τριένιο και δεν εμφανίζει πολλές βιολογικές δράσεις, αποτελεί κύριο μεταβολίτη της 5-LOX.⁷²



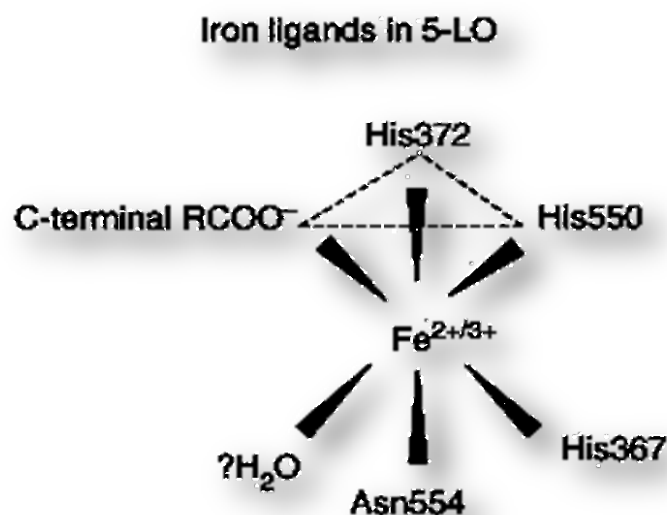
Σχήμα 4: Η πορεία που οδηγεί στη δημιουργία βλαβερών μεσολαβητών στο σώμα δείχνει πώς το αραχιδονικό οξύ προκαλεί καρκινογενέσεις, αρθριτικές και καρδιαγγειακές νόσους.

Η δομή της 5-LOX περιλαμβάνει ένα N-τελικό κι ένα μεγαλύτερο C-τελικό καταλυτικό άκρο. Το Ca^{2+} προσδένεται και ενισχύει την ενζυμική δραστικότητα. Το ATP είναι ένας άλλος παράγοντας που προσδενόμενος στην 5-LOX διεγείρει την ενζυμική δραστικότητα, αλλά η περιοχή πρόσδεσής του παραμένει ακόμη μη-καθορισμένη. Η καταλυτική περιοχή περιλαμβάνει σίδηρο που είναι απαραίτητος για τη δραστικότητα. Τεσσερις αλυσίδες αμινοξέων έχουν το ρόλο των υποκαταστατών του σιδήρου, ενώ ένα καρβοξυλικό οξυγόνο αποτελεί τον πέμπτο υποκαταστάτη. Στην ανθρώπινη 5-LOX το C-τελικό καρβοξυλικό άκρο της ισολευκίνης αποτελεί τον έναν από τους 5 ταυτοποιημένους υποκαταστάτες.⁷³

Ο σκελετός των λιποξυγενασών αποτελείται από δύο ξεχωριστά τμήματα: ένα αμινοτελικό άκρο (το οποίο στην 5-LOX εξυπηρετεί την Ca^{2+} -εξαρτώμενη σύνδεση στη μεμβράνη) και το μεγαλύτερο καταλυτικό τμήμα που είναι κυρίως μια α-έλικα και φιλοξενεί το σίδηρο. Ο σίδηρος περιβάλλεται από τρεις ιστιδίνες (His-367,372,550) και από την κύρια καρβοξυλική αλυσίδα του C-τελικού άκρου.⁷⁴

Η 5-LOX περιέχει 1 mol σιδήρου/mol ενζύμου. Έχει διερευνηθεί η γεωμετρία του κέντρου του σιδήρου στην λιποξυγενάση χρησιμοποιώντας ένζυμα σόγιας ως μοντέλο λόγω της μεγάλης σταθερότητας και διαθεσιμότητάς τους. Οι διάφορες αναλύσεις δείχνουν ότι ο σίδηρος είναι εξαϋποκατεστημένος και συνδέεται με 3 ή 4 αζωτούχους υποκαταστάτες (ιμιδαζόλια) και 1 ή 2 οξυγονούχους υποκαταστάτες σε οκταεδρική συμμετρία.

75



Εικόνα 28: Ο εξαϋποκατεστημένος Fe στο καταλυτικό κέντρο της 5-LOX

Η υπερπαραγωγή LTs έχει συσχετιστεί με αλλεργικές ασθένειες, πνευμονική ίνωση, υπέρταση και αρθρίτιδα. Επιπλέον, αυξημένη έκφραση της 5-LOX και κατά συνέπεια η αυξημένη σύνθεση LTs, έχει συσχετιστεί με διάφορους τύπους όγκων. Η 5-LOX και οι μεταβολίτες της έχουν ζωτική σημασία για διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως η πλευρίτιδα, η οξεία παγκρεατίτιδα, η κολίτιδα, η βλάβη νωτιαίου μυελού, το σηπτικό και μη-σηπτικό σοκ και η βλάβη ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, οι οποίες χαρακτηρίζονται από υπερβολική ενεργοποίηση ουδετερόφιλων.⁷¹

Κατανάλωση τροφών-πλούσιων σε αραχιδονικό οξύ όπως κρόκος αυγού, κόκκινο κρέας, πουλερικά και εντόσθια.

Κατανάλωση τροφών-διεγερτών του αραχιδονικού οξέος όπως ωμέγα-6 λιπαρά και υδατάνθρακες υψηλού γλυκαιμικού δείκτη.

ΠΕΡΙΣΣΕΙΑ ΑΡΑΧΙΔΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΟ ΣΩΜΑ

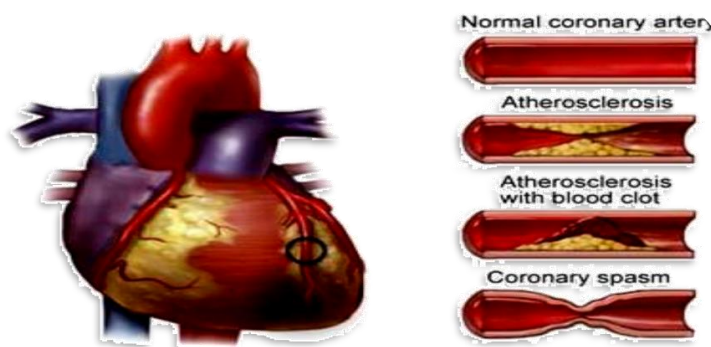
Αυξημένη παραγωγή 5-λιποξυγενάσης (5-LOX)
(ευνοείται ο πολλαπλασιασμός, η διήθηση και η μετάσταση καρκινικών κυττάρων)

Αυξημένη παραγωγή **5-ΗETE**
(5-hydroxyeicosatetraenoic acid: παρεμβαίνει στον προγραμματισμένο θάνατο καρκινικών κυττάρων [απόπτωση])

Υπερβολική συσσώρευση **Λευκοτριενίου B4**
(προφλεγμονώδης ένωση που επιτίθεται στις αρθρώσεις, στο αρτηριακό τοίχωμα και σε άλλους ιστούς)

Σχήμα 5: Η περίσσεια αραχιδονικού οξέος οδηγεί σε αρθριτικές, καρδιαγγειακές νόσους και καρκινογενέσεις.

Τα LTs είναι γνωστά για τις προφλεγμονώδεις δράσεις τους και το ρόλο τους σε παθολογικές καταστάσεις όπως το άσθμα και η καρδιαγγειακή νόσος (CVD). Η αθηροσκλήρωση είναι κύριο αίτιο της CVD και προκύπτει μέσα από μια διαδικασία δεκαετιών στον άνθρωπο η οποία χαρακτηρίζεται από την εναπόθεση λιπιδίων στο αρτηριακό τοίχωμα. Η πιθανότητα ρήξης της πλάκας που οδηγεί σε θρόμβωση και κατά συνέπεια σε μυοκαρδιακό έμφραγμα ή εγκεφαλικό είναι ευθέως ανάλογη με το ποσοστό της περιεχόμενης πλάκας στα φλεγμονώδη κύτταρα.



Εικόνα 29: Η αθηροσκλήρωση οδηγεί σε καρδιαγγειακές νόσους και προκύπτει από την εναπόθεση λιπιδίων στις αρτηρίες.

Εν ηρεμία (απουσία φλεγμονής), η 5-LOX είναι ανενεργή. Διάφοροι παράγοντες οδηγούν στην ενεργοποίηση της 5-LOX όπως εξωγενή σήματα, κυτοκίνες και το οξειδωτικό στρες. Στο καταλυτικό κέντρο της 5-LOX,

έντονες οξειδωτικές συνθήκες οδηγούν στην οξείδωση του σιδήρου, επιτρέποντας την εκτέλεση καταλυτικής αντίδρασης και τελικά την παραγωγή LTs.

Στην πρώιμη αθηρογένεση, η φλεγμονή ξεκινά με την κατακράτηση λιποπρωτεϊνών (VLDL, LDL) στο αρτηριακό τοίχωμα. Το λευκοτριένιο LT_{B4}, προϊόν της 5-LOX, ενισχύει την φλεγμονώδη απόκριση μέσω διάφορων μηχανισμών, ένας από τους οποίους είναι η απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτοκινών από τα λευκοκύτταρα.

Η δράση των LTs στα κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα εσωτερική υπερπλασία. Η μαζική νέκρωση των αφοκυττάρων αυξάνει εκ νέου την τοπική απελευθέρωση των προφλεγμονωδών προϊόντων της 5-LOX, προάγοντας την αποσταθεροποίηση και τη ρήξη της πλάκας.

Μελέτες σχετικά με το ρόλο των 12/15-LOX δείχνουν ότι χαμηλά ή κανονικά επίπεδα έκφρασης και δράσης των 12/15-LOX, συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο αγγειακής παθολογίας και ότι υψηλά επίπεδα των προϊόντων των 12/15-LOX μπορεί να είναι αγγειοπροστατευτικά. Η πραγματική κατάσταση όμως είναι πιο πολύπλοκη, καθώς δεν είναι σημαντικά μόνο τα επίπεδα έκφρασης των 12/15-LOX αλλά και οι παράγοντες που ρυθμίζουν το προφίλ των προϊόντων και οι ιδιαιτερότητες των κυττάρων κάθε ιστού.

Τα έως τώρα διαθέσιμα δεδομένα δείχνουν ότι τα LTs έχουν ρόλο στη διαδικασία της πρώιμης αθηροσκλήρωσης και υποδηλώνουν ότι η στόχευση του LT-μονοπατιού στα αρχικά στάδια της νόσου ίσως είναι ευεργετική.

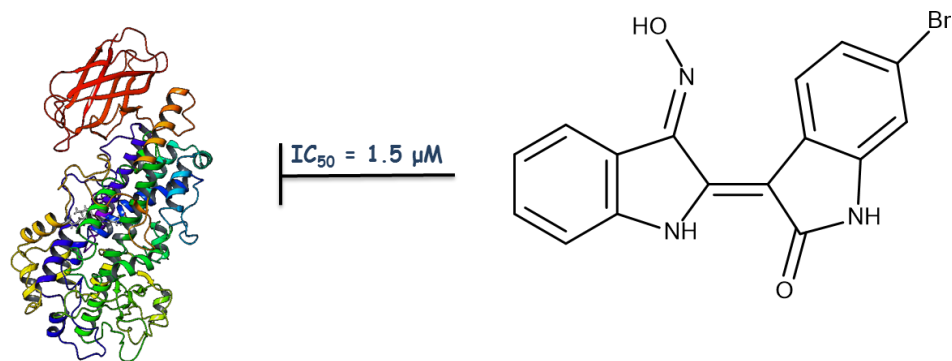
Τα ενεργά πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα (PMNL), μια πλούσια πηγή LTs, έχουν ρόλο-κλειδί στην πρώιμη παθογένεση της βλάβης ισχαιμίας-επαναιμάτωσης. Αυτά τα κύτταρα εκκινούν μια φλεγμονώδη απόκριση, που οδηγεί σε εξαγγείωση των PMNL, έκκριση προφλεγμονωδών μεσολαβητών και μεσολαβητών ενεργοποιητών των αιμοπεταλίων, απελευθέρωση επιθετικών ελευθέρων ριζών οξυγόνου και ακολούθως αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας και ιστική βλάβη. Τα παραγόμενα από την 5-LOX cysLTs, εμπλέκονται στην ισχαιμική βλάβη. Εκτός του ότι αυξάνουν την συστολή των τριχοειδών, και την αγγειακή διαπερατότητα, τα cysLTs μειώνουν τη συσταλτικότητα του μυοκαρδίου και την καρδιακή παροχή. Το LTC₄ (λευκοτριένιο που προωθεί τη μετανάστευση λευκοκυττάρων στους ιστούς), αυξάνεται κατά τη διάρκεια οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου. Σε ζωικά μοντέλα, η πειραματική ισχαιμία προκαλεί αυξημένη παραγωγή LTs

στον τραυματισμένο ιστό και φαίνεται ότι τα προϊόντα της 5-LOX παίζουν καθοριστικό ρόλο για την ανάρρωση του ιστού. Σε μελέτες σε σκύλους, ένας αναστολέας της 5-LOX μείωσε το μέγεθος του εμφράγματος του μυοκαρδίου και της ισχαιμίας, ενώ σε άλλες μελέτες ένας ανταγωνιστής LTs δεν φάνηκε να το μειώνει.⁷²

Έως τώρα το *Zileuton* (N-[1-(1-benzothien-2-yl)ethyl]-N-hydroxyurea), είναι ο μόνος εγκεκριμένος αναστολέας της 5-LOX και πιστεύεται ότι παρεμβαίνει σε αλλεργικές και φλεγμονώδεις νόσους καταστέλλοντας τη βιοσύνθεση λευκοτριενίων. Η ένωση ανήκει στους αλληλεπιδρώντες με το σίδηρο αναστολείς της 5-LOX. Δεδομένης της σημασίας των LTs στην φλεγμονή των αεραγωγών, το *Zileuton* αποτελεί μια επιπλέον θεραπευτική επιλογή στο χειρισμό χρόνιου και επίμονου άσθματος. Στην πραγματικότητα το *zileuton* ήταν ο πρώτος και μοναδικός αναστολέας της 5-LOX που εισήχθη στην αγορά των Η.Π.Α το 1997 ως ένα νέου τύπου φάρμακο για την προφύλαξη και τη χρόνια αντιμετώπιση του άσθματος. Λόγω του ότι το *zileuton* εμφανίζει ηπατοτοξικότητα, η κλινική του χρήση είναι περιορισμένη καθώς απαιτείται παρακολούθηση των επιπέδων των ηπατικών ενζύμων. Η ηπατική βλάβη που προκαλεί το *zileuton* φαίνεται να είναι τοξικό αποτέλεσμα άσχετο με την αναστολή της 5-LOX.⁷⁶

1.8.β) Υπάρχοντα στοιχεία για την επίδραση των ιντιρουμπινών επί της 5-LOX

Προηγούμενες μελέτες χρησιμοποίησαν τις ιντιρουμπίνες ώστε να τις κατευθύνουν σε έναν καινοτόμο για αυτές μοριακό στόχο: την περιοχή πρόσδεσης του ATP της 5-λιποξυγενάσης (5-LOX). Τελικά ταυτοποιήθηκε η 6BIO ως ισχυρός, άμεσος και αναστρέψιμος αναστολέας της 5-LOX με IC₅₀ = 1.5 μΜ. Έτσι οι ιντιρουμπίνες απεδείχθησαν πολλα υποσχόμενοι νέοι χημειότυποι για την ανάπτυξη αναστολέων της 5-LOX και οι παρεμβάσεις στην περιοχή πρόσδεσης του ATP παρουσιάζονται ως νέα στρατηγική για την στόχευση της 5-LOX.⁷

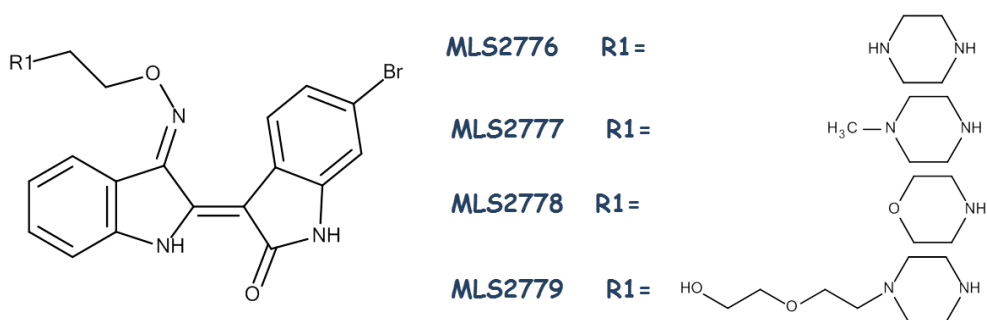


Εικόνα 30: Η 6BIO απεδείχθη αναστολέας της 5-LOX με $IC_{50} = 1.5 \mu M$.

1.9) Ερευνητικοί στόχοι

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, στο καρδιαγγειακό σύστημα, η GSK-3β έχει μείζονα ρόλο στο μεταβολισμό της γλυκόζης, στην υπερτροφία του καρδιακού μυοκυττάρου και στον κυτταρικό θάνατο.⁶⁰ Παρόλα αυτά, σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη επικεντρωμένη στο καρδιαγγειακό, στα πλαίσια της πτυχιακής εργασίας με θέμα "Η GSK-3β ως μοριακός στόχος για τη μείωση της έκτασης του εμφράγματος του μυοκαρδίου: μελέτη της αναστολής της κατά την επαναιμάτωση in vivo" (Ι. ΑνδρεΑδου, Α. Λάζαρη, Ν. Ζησόπουλος, Σ.Ι. Μπιμπλή, Α. Ζύγα, Α.Λ. Σκαλτσούνης, Δ.Θ. Κρεμαστινός, Μ. Αναστασίου-Νανά, ΕΚ. Ηλιοδρομίτης), ο βαθμός αναστολής της GSK-3β δεν φαίνεται να παίζει ρόλο στην προκαλούμενη από τις ιντιρουμπίνες μείωση της έκτασης του εμφράγματος του μυοκαρδίου.

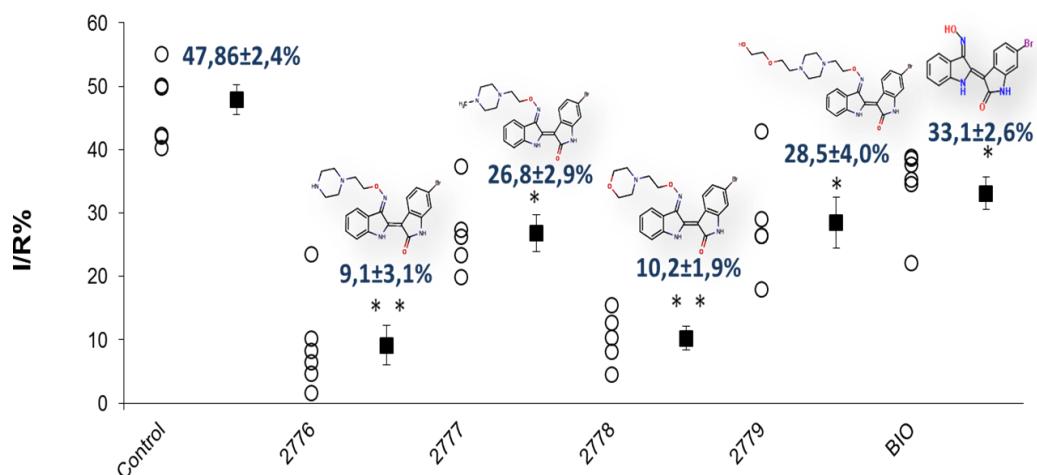
Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε η χορήγηση των εξής 4 νέων παραγώγων της 6BIO σε αναισθητοποιημένους κονίκλους στο τέλος της παρατεταμένης ισχαιμίας (20ό λεπτό ισχαιμίας):



Εικόνα 31: Τα ανάλογα που χορηγήθηκαν με υποκαταστάτες:

- Piperazine
- N-methyl-piperazine
- Morpholine
- 4-[2-(2-hydroxyethoxy)-ethyl]piperazine

Η χορήγηση μείωσε το μέγεθος του εμφράγματος προσομοιάζοντας τον ενδογενή μηχανισμό μετισταϊμικής προστασίας (postconditioning). Το MLS2776 και το MLS2778 ήταν τα δραστικότερα εκ των τεσσάρων στην μείωση του εμφράγματος και μάλιστα απεδείχθησαν πιο δραστικά και από την 6BIO, όπως φαίνεται στο διάγραμμα.



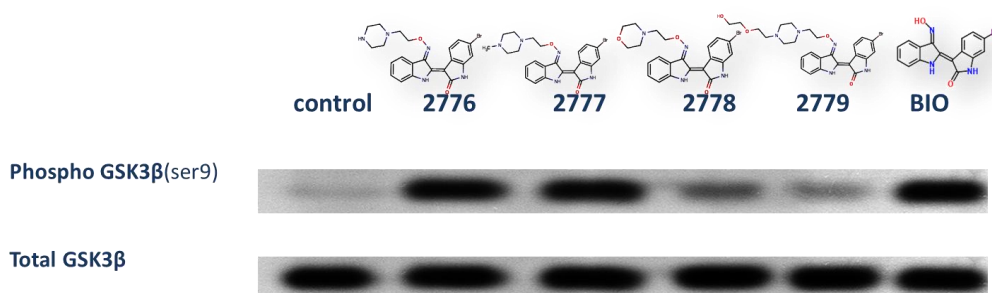
Εικόνα 32: Αποτελέσματα μελέτης του εμφράγματος

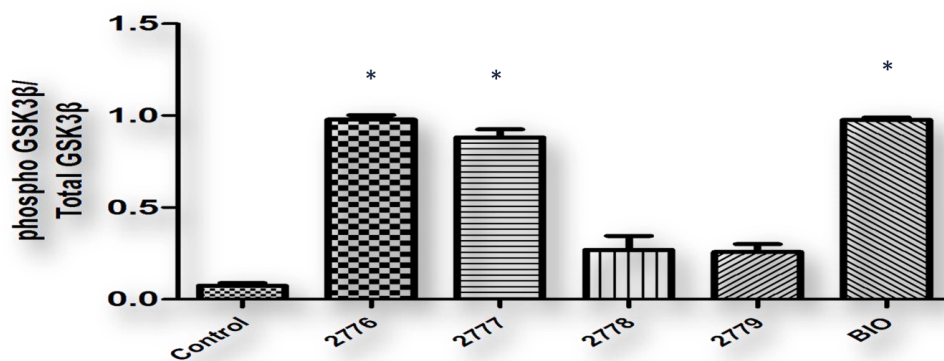
Επίδραση των διαφορετικών υπό μελέτη μορίων στην έκταση του εμφράγματος (εκφρασμένο ως προς το ποσοστό της ισχαιμικής περιοχής).

* $p < 0,05$ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου

** $p < 0,05$ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, την MLS2777, την MLS2779 και την BIO.

Όμως ισχυρότεροι αναστολείς της GSK-3 β απεδείχθησαν σύμφωνα με την Western Blot ανάλυση τα παράγωγα MLS2776 και MLS2777 (κι όχι τα MLS2776 και MLS2778), κάτι που συμφωνεί και με τα αποτελέσματα (IC₅₀) των *in vitro* πειραμάτων για την GSK-3 β .





Εικόνα 33: Αποτελέσματα Western blot: τα MLS2776 και MLS2777 προκάλεσαν στατιστικώς σημαντική αναστολή της GSK-3β συγκριτικά με τα υπόλοιπα παράγωγα και την ομάδα ελέγχου.

Έτσι παρατηρήθηκε ότι ενώ τα παράγωγα MLS2776 και MLS2778 οδήγησαν σε παρεμφερή μείωση της έκτασης του εμφράγματος, η οποία ήταν και η μεγαλύτερη που επετεύχθη, μόνο το ένα εξ αυτών (MLS2776) ανέστειλε το ένζυμο. Επίσης από τα παράγωγα MLS2777 και MLS2779 που και τα δύο οδήγησαν σε μείωση της έκτασης του εμφράγματος αντίστοιχη με εκείνη που προκάλεσε η 6BIO, μόνο το MLS2777 ανέστειλε την κινάση. Από τα παραπάνω κατέστη φανερό ότι δεν υπάρχει αντιστοιχία μεταξύ της μείωσης της έκτασης του εμφράγματος και της αναστολής της GSK-3β.⁷⁷

Λαμβάνοντας υπόψιν τα ανωτέρω αποτελέσματα δεν επιμείναμε περαιτέρω στην διερεύνηση του ρόλου της GSK-3β στην προκαλούμενη από ιντιρουμπίνες καρδιοπροστασία αλλά μετατοπίσαμε το ενδιαφέρον μας σε άλλα εμπλεκόμενα στην καρδιαγγειακή παθολογία ένζυμα. Ένα εξ αυτών πολύ κρίσιμο ένζυμο, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, είναι η 5-λιποξυγενάση και σε αυτή επικεντρώσαμε τις μελέτες μας στην παρούσα εργασία. Έτσι στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η σύνθεση νέων παραγώγων ιντιρουμπίνων και η αξιολόγηση της βιολογικής τους δράσης *in vitro* ως αναστολείς της 5-λιποξυγενάσης.

Συνθέσαμε 30 νέα παράγωγα ιντιρουμπίνης τα οποία φαρμακολογικά μπορούν να διαιρεθούν σε δύο κατηγορίες:

1ον) παράγωγα ιντιρουμπίνης με σκοπό τη στόχευση της θέσης πρόσδεσης του ATP που διαθέτει η 5-LOX και

2ον) παράγωγα ιντιρουμπίνης με σκοπό τη στόχευση της καταλυτικής περιοχής οξειδωσης του αραχιδονικού της 5-LOX.

Από άποψη δομής τα παράγωγα που συνθέσαμε αποτελούν:

1ον) παράγωγα της 6ΒΙΟ με 5'-υποκατάσταση

2ον) παράγωγα βενζο[g]ινδολίου και

3ον) ισοπρενικά παράγωγα ιντιρουμπίνης. Οι ισοπρενικές ομάδες επιλέχθησαν ως υποκαταστάτες αφού όντας υδρογονανθρακικές αλυσίδες που φέρουν διπλούς δεσμούς, προσομοιάζουν το αραχιδονικό οξύ, υπόστρωμα του ενζύμου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ: ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.1) Βασικές αντιδράσεις: Σύνθεση των πρόδρομων μορίων (ινδολίων και ισατινών), διμερισμός τους και σχηματισμός οξιμών

2.1.1) Εισαγωγή

Δεδομένου ότι η απομόνωση των ιντιρουμπινών από φυσικές πηγές είναι ιδιαίτερα δυσχερής ¹⁶, έγινε προφανής η ανάγκη σύνθεσης των απαραίτητων αρχικών σκελετών.

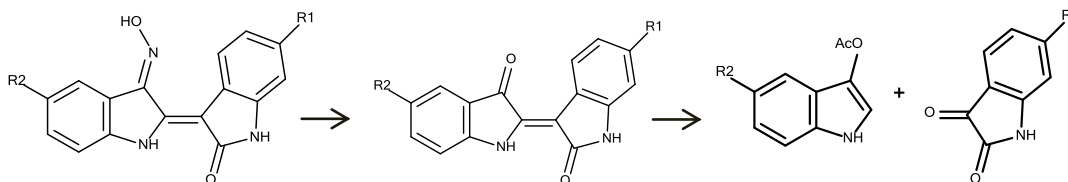
Παρασκευάστηκαν αρχικά τα απαραίτητα 3-ακετοξυϊνδόλια, τα οποία δεν ήταν εμπορικά, και χρησιμοποιήθηκαν οι κατάλληλα υποκατεστημένες ισατίνες. Ακολούθησε διμερισμός και παρασκευή των 3'-οξιμών.

Το 3-ακετοξυϊνδόλιο και η ισατίνη όπως επίσης και οι κατάλληλες ανιλίνες αγοράστηκαν στην εμπορική τους μορφή, αφού αυτή ήταν η οικονομικότερη λύση.

Γενικά, για τη σύνθεση των απαραίτητων υποκατεστημένων ισατινών ακολουθήθηκε, κατά κύριο λόγο, η κλασική μέθοδος Sandmeyer (Sandmeyer T., 1919), όπου μία κατάλληλα υποκατεστημένη ανιλίνη μετατρέπεται στο αντίστοιχο ισονιτροσοακετανιλίδιο και, στη συνέχεια, γίνεται κύκλωση του δακτυλίου και σχηματισμός των ισατινών.

Γενικό συνθετικό σχήμα των βασικών σκελετών

Η σύνθεση βασίζεται στο διμερισμό μιας κατάλληλα υποκατεστημένης ισατίνης και ενός κατάλληλα υποκατεστημένου ακετοξυϊνδολίου σε αλκαλικό περιβάλλον, οπότε και σχηματίζεται εκλεκτικά η 2'Z μορφή της ιντιρουμπίνης. ⁷⁸ Η αντίστοιχη οξίμη προκύπτει από την επίδραση υδροχλωρικής υδροξυλαμίνης, οπότε και σχηματίζεται εκλεκτικά το 2'Z, 3'E παράγωγο. ³¹



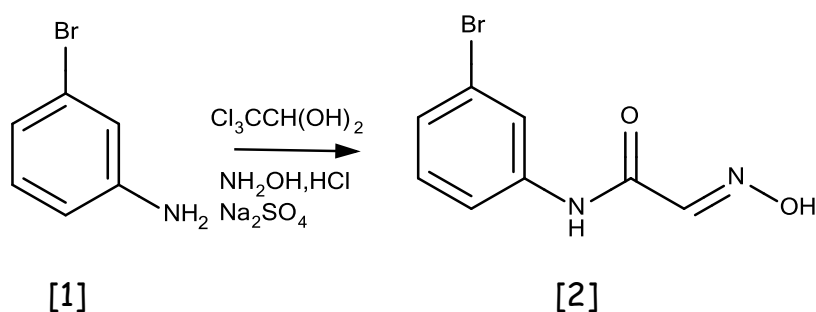
Σχήμα 6: Γενικό συνθετικό σχήμα παρασκευής της 6BIO

Από τις πρώτες ύλες, τα ινδόλια και οι κατάλληλες ανιλίνες αγοράστηκαν στην εμπορική τους μορφή.

2.1.2) Σύνθεση των απαραίτητων ισατινών

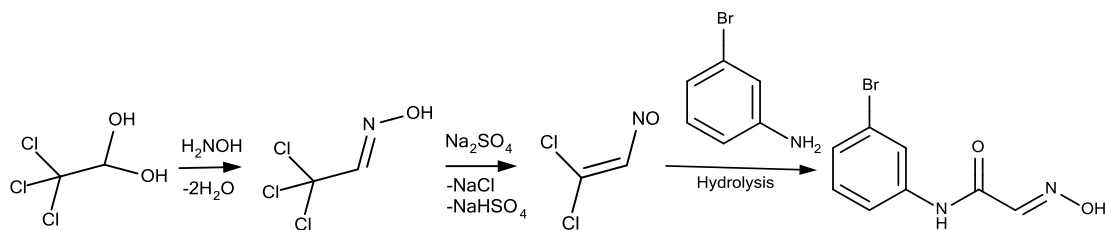
Σύνθεση της 6-βρωμοϊσατινής

Στο πρώτο στάδιο της σύνθεσης της 6-βρωμοϊσατινής [4], όξινο υδατικό διάλυμα 3-βρωμοανιλίνης [1] αναμίχθηκε με υδατικό διάλυμα μίγματος ένυδρης χλωράλης και θειϊκού νατρίου και ακολούθησε προσθήκη υδατικού διαλύματος υδροχλωρικής υδροξυλαμίνης, οπότε και το μίγμα θερμάνθηκε. Ακολούθησε ψύξη, διήθηση, καλή έκπλυση με νερό και ξήρανση, οπότε και προέκυψε ποσοτικά το 3-βρωμοϊσονιτροσοακετανιλίδιο [2], ως λευκό-υποκίτρινο ίζημα.



Σχήμα 7: Σύνθεση 3-βρωμοϊσονιτροσοακετανιλιδίου

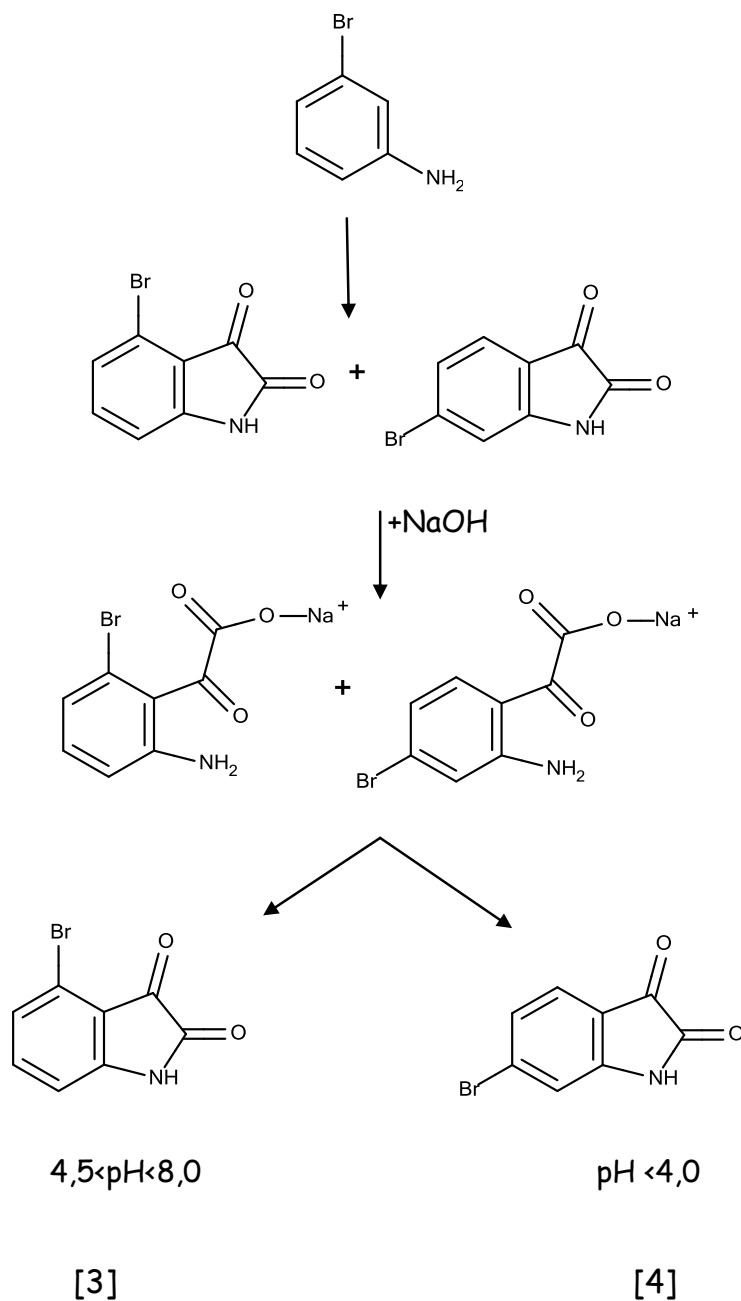
Ένας πιθανός τρόπος σχηματισμού του ισονιτροσοακετανιλιδίου φαίνεται στο παρακάτω σχήμα ⁷⁹:



Σχήμα 8: Τρόπος σχηματισμού του 3-βρωμοϊσονιτροσοακετανιλιδίου

Στο δεύτερο στάδιο, έγινε βρασμός του 3-βρωμοϊσονιτροσοακετανιλιδίου [2] με πυκνό θειϊκό οξύ, ο οποίος οδήγησε στο σχηματισμό δακτυλίου. Δεδομένου ότι οι μ-υποκατεστημένες ανιλίνες οδηγούν σε δύο ισομερή ⁷⁹, παραλήφθηκαν σε μίγμα η 4-βρωμοϊσατινή [3] και η 6-βρωμοϊσατινή [4]. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, ευνοείται ο σχηματισμός του δακτυλίου σε όρθο θέση ως προς το βρώμιο, (όσο μειώνεται η ηλεκτραρνητικότητα του αλογόνου, τόσο περισσότερο ευνοείται η όρθο ως προς αυτό υποκατάσταση) ⁷⁹ και έτσι η αναλογία του μίγματος 4-βρωμοϊσατινή/6-βρωμοϊσατινή ήταν της τάξεως 46%/25%.

Ο διαχωρισμός του παραπάνω μίγματος βασίστηκε στη σταδιακή κλασματική καθίζηση του με τά νατρίου άλατος των ισατινικών οξέων, όταν αυτά κυκλοποιούνται σε διαφορετικό pH, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα 79:



Σχήμα 9: Διαχωρισμός ισομερών ισατινών

Έτσι, μετά από προσθήκη στο μίγμα υδατικού διαλύματος NaOH, ακολούθησε προσθήκη CH₃COOH, μέχρις ότου το pH εξισωθεί με 4, οπότε και καταβυθίστηκε αρχικά η 4-βρωμοϊσατίνη [3], ως κόκκινη-πορτοκαλί κρυσταλλική σκόνη. Στη συνέχεια, προστέθηκε πυκνό HCl, μέχρις ότου το pH

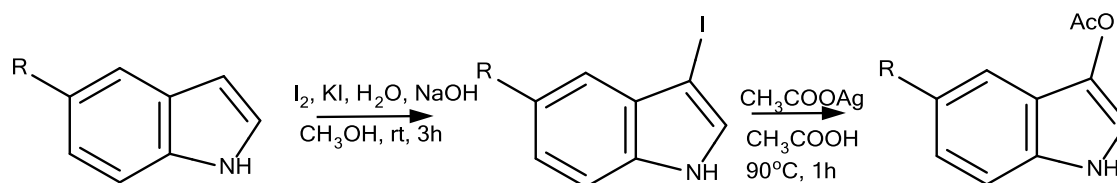
εξισωθεί με 1, οπότε και καταβυθίστηκε η 6-βρωμοϊσατίνη [4], ως πορτοκαλοκίτρινη κρυσταλλική σκόνη.

2.1.3) Σύνθεση των κατάλληλα υποκατεστημένων 3-ακετοξυϊνδολίων

Είναι γνωστό ότι η υποκατάσταση στο Β ινδολικό δακτύλιο 5-υποκατεστημένων παραγώγων (κυρίως στη θέση 5') ευνοεί την ανασταλτική δράση στις κινάσες και κυρίως στην GSK-3. (Wu Z.-L. et al., 2005a)

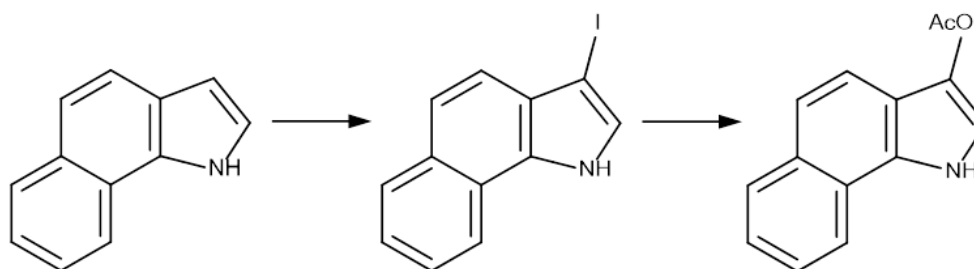
Παρασκευάστηκαν τα απαραίτητα 5-υποκατεστημένα 3-ακετοξυϊνδόλια καθότι δεν ήταν εμπορικά διαθέσιμα.

Για τη σύνθεση των κατάλληλα υποκατεστημένων 3-ακετοξυϊνδολίων χρησιμοποιήθηκαν τα αντίστοιχα εμπορικά ινδόλια, στα οποία έγινε αρχικά ιωδίωση στην 3' θέση με προσθήκη του I^+ , μέσω ηλεκτρονιόφιλης υποκατάστασης. Τα 3-ιωδιωμένα παράγωγα του ινδολίου είναι ασταθή και, έτσι, ακολούθησε, άμεση επίδραση CH_3COOAg σε διάλυμα του ιωδιωμένου ινδολίου σε CH_3COOH , με αποτέλεσμα, μετά από πυρηνόφιλη υποκατάσταση με CH_3COO^- , να παραληφθεί το επιθυμητό 3-ακετοξυϊνδόλιο.



Νέα παράγωγα: $R = OCH_3$ [5], CH_3 [6], CN [7]

Γνωστά παράγωγα: $R = NO_2$ [8], CHO [9], F [10], Br [11]



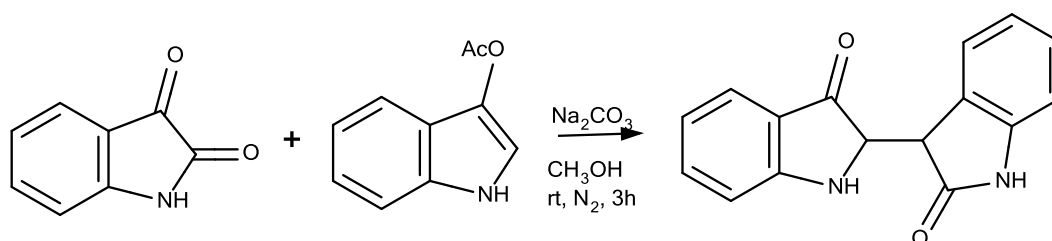
[12]

Σχήμα 10: Σύνθεση των 3'-ακετοξυϊνδολίων

Με τον τρόπο αυτό παραλήφθηκαν αρχικά τα ιωδιωμένα παράγωγα, τα οποία παραλαμβάνονται ποσοτικά, και στη συνέχεια, μετά από χρωματογραφικό διαχωρισμό, τα 5-υποκατεστημένα 3-ακετοξυϊνδόλια.

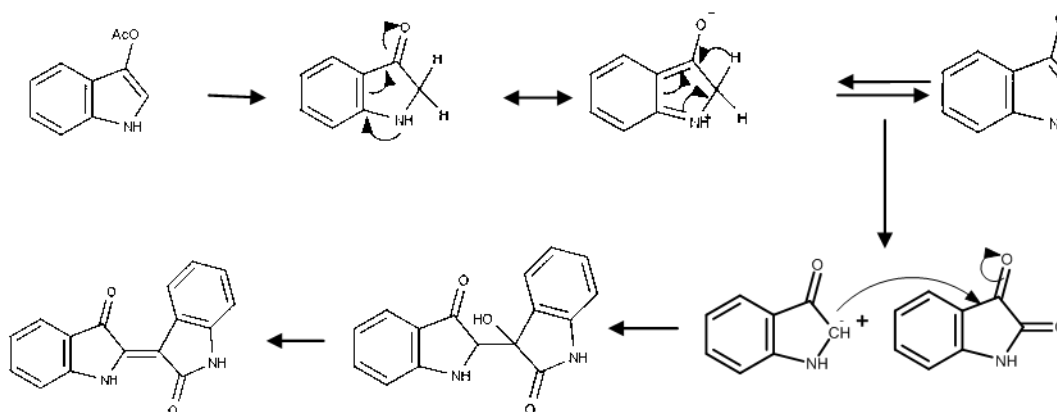
2.1.4) Σύνθεση ιντιρουμπινών

Για τη σύνθεση των ιντιρουμπινών πραγματοποιήθηκε διμερισμός μεταξύ του 3-ακετοξυϊνδολίου και περίσσειας της κατάλληλα υποκατεστημένης ισατίνης, ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία ίντιγκο (αναλογία 0,8:1 equiv.). Σε διάλυμα τους σε μεθανόλη, υπό ατμόσφαιρα αργού, προστέθηκε ανθρακικό νάτριο (1.1 equiv.) (ώστε να έχουμε αλκαλικό περιβάλλον) και το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 3 περίπου ώρες.



Σχήμα 11: Σύνθεση ιντιρουμπινών

Για να πραγματοποιηθεί ο παραπάνω διμερισμός είναι απαραίτητος ο ενδιάμεσος σχηματισμός ενός ινδοξυλίου (ασταθές προϊόν, το οποίο οξειδώνεται εύκολα παρουσία οξυγόνου), που πραγματοποιείται με την επίδραση αλκαλικού περιβάλλοντος στο 3-ακετοξυϊνδόλιο, και το οποίο στη συνέχεια προσβάλλει την 3 θέση της ισατίνης για να παραχθεί η αντίστοιχη ιντιρουμπίνη. Με βάση και τη βιβλιογραφία θα μπορούσε να προταθεί ο παρακάτω μηχανισμός:

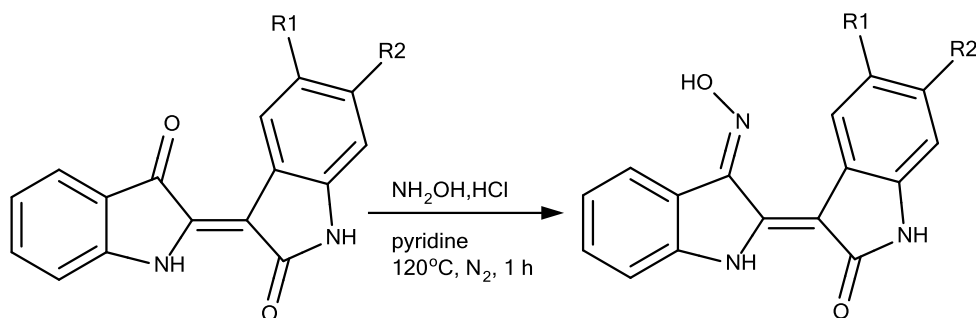


Σχήμα 12: Πιθανός μηχανισμός σύνθεσης ιντιρουμπινών

2.1.5) Σύνθεση οξιμών

Η παρασκευή των οξιμών βασίστηκε στην ικανότητα προσθήκης ενός πυρηνόφιλου αντιδραστήριου σε ένα πολλαπλό δεσμό άνθρακα-ετεροατόμου, όπως συμβαίνει για παράδειγμα στην περίπτωση επίδρασης της υδροξυλαμίνης σε μία κετόνη (η αντίδραση αυτή συνήθως ευνοείται σε αλκαλικό περιβάλλον, λόγω της μετατροπής της NH_2OH στο δραστικό πυρηνόφιλο ανιόν $-\text{NHOH}$, το οποίο προσβάλλει ευκολότερα το καρβονύλιο). Στην περίπτωση των ιντιρουμπινών, η προσθήκη έγινε εκλεκτικά στο καρβονύλιο της θέσης 3', αφού το καρβονύλιο στη θέση 2 αποτελεί λακταμικό καρβονύλιο και είναι πολύ λιγότερο δραστικό.

Έτσι οι οξιμές παρασκευάστηκαν με προσθήκη δεκαπλάσιας περίσσειας υδροχλωρικής υδροξυλαμίνης, παρουσία αζώτου, σε διάλυμα της κατάλληλης ιντιρουμπίνης σε άνυδρη πυριδίνη και βρασμό στους 120°C για περίπου μία ώρα. Η αντίδραση αυτή ήταν πρακτικά ποσοτική.



Σχήμα 13: Σύνθεση οξιμών

2.2) Σύνθεση νέων παραγώγων της 6-βρωμοϊντιρουμπίνης και της 3' οξιμής της στην 5'-θέση

Σε μια προσπάθεια να ταυτοποιήσουμε νέους αναστολείς της 5-λιποξυγενάσης (5-LOX) και να διερευνήσουμε περαιτέρω την αλληλεπίδρασή τους με την θέση πρόσδεσης του ATP, συνθέσαμε διάφορα παράγωγα ιντιρουμπίνης τροποποιώντας τον βασικό σκελετό με ομάδες κατάλληλες για τη βελτίωση της συγγένειας των μορίων με το ένζυμο.

Εισαγωγή: Υπάρχουσες αναφορές για την σημασία της 5'-υποκατάστασης

Η ιντιρουμπίνη και τα παράγωγά της, έχουν μελετηθεί όσον αφορά τη δραστικότητά τους ως αναστολείς σημαντικών πρωτεϊνικών κινασών όπως η CDKs, η GSK-3 β και οι αιμορα κινάσες. Ωστόσο δεν υπάρχουν αρκετές

μελέτες για τη σύνθεση και τη βιολογική αξιολόγηση των παραγώγων με υποκαταστάτες στην 5' θέση.⁸⁰

Μια πρόσφατη μελέτη πάνω στα 5,5'-δισυποκατεστημένα παράγωγα της 3'-οξίμης της ιντιρουμπίνης και στην επίδραση αυτών επί των CDKs έδειξε ότι η 5'-Br υποκατάσταση πιθανώς προβάλλει προς τον εξωτερικό υδατικό χώρο στην περιοχή πρόσδεσης του ATP κι εκεί αλληλεπιδρά με ένα θετικά φορτισμένο αμινοξικό κατάλοιπο. Η επιπλέον ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση μεταξύ του μονήρους ζεύγους ηλεκτρονίων του βρωμίου και του θετικά φορτισμένου αμινοξέος, έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη συγγένεια με την CDK2, συμβάλλοντας έτσι στην πιο ισχυρή ανασταλτική επί του κυτταρικού πολλαπλασιασμού δράση που εμφανίζει το 5'-βρωμο-παράγωγο σε σύγκριση με το 5'-μη υποκατεστημένο.⁸⁰

Έτσι η υποκατάσταση της θέσης 5' της ιντιρουμπίνης ίσως αποτελεί στρατηγική για τη βελτιστοποίηση της συγγένειας με την CDK2, όπως προέκυψε από την ίδια έρευνα μετά από διερεύνηση των σχέσεων δομής-δράσης για τις εξής υποκαταστάσεις:

- ✓ 5'-F και 5'-Cl (δημιουργούν ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τρόπο παρόμοιο με αυτόν του 5'-Br-παραγώγου.)
- ✓ 5'-OH, (δημιουργεί έναν επιπλέον δεσμό υδρογόνου με την CDK και προσδίδει υδρόφιλο χαρακτήρα στο σκελετό της ιντιρουμπίνης/αύξηση υδατοδιαλυτότητας.)
- ✓ 5'-OCH₃ και 5'-CH₃, (ομάδες δότες ηλεκτρονίων)

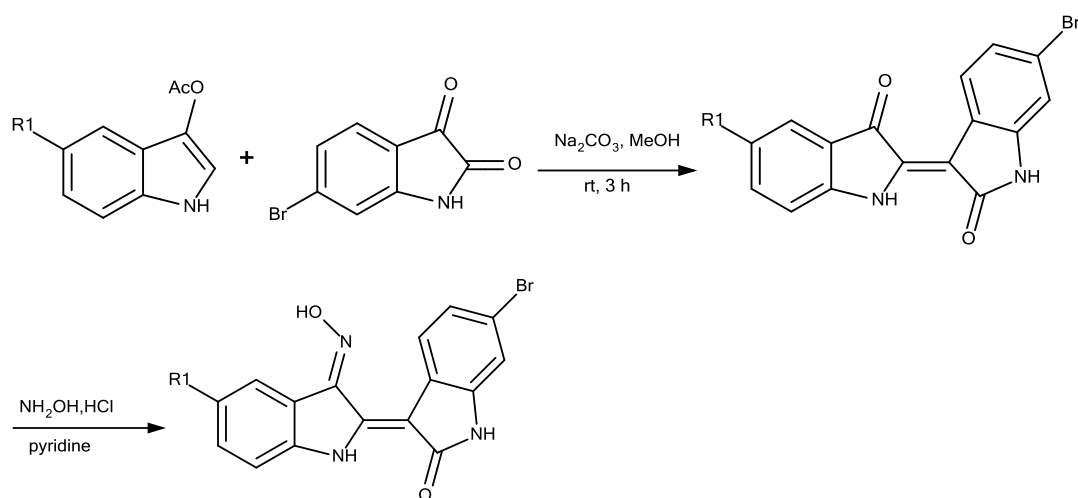
Η ανασταλτική ισχύς των 5'-υποκατεστημένων ιντιρουμπινών επί της CDK2 αυξάνεται με την εξής σειρά: -OCH₃ < Cl < -H, -CH₃ < -OH, -F. Η αυξημένη ανασταλτική δραστηριότητα των 5'-υποκατεστημένων παραγώγων σε σύγκριση με την 5'-μη υποκατεστημένη 3'-οξίμη της ιντιρουμπίνης, μπορεί να ερμηνευτεί καθώς τα υποκατεστημένα παράγωγα εμφανίζουν επιπλέον αλληλεπιδράσεις με αμινοξικά κατάλοιπα στη περιοχή πρόσδεσης του ATP.⁸⁰

Η πλειοψηφία των παραγώγων ιντιρουμπίνης-3'-οξίμης υποκατεστημένων με ομάδες-δότες-ηλεκτρονίων στην 5'-θέση (όπως η 5'-CH₃ ομάδα ή η 5'-OCH₃ ομάδα που χρησιμοποιήσαμε), έχει αποδειχθεί ότι είναι πολύ ασθενείς αναστολείς κινασών σε καρκινικές κυτταρικές σειρές. [13] Για αυτό το λόγο, τα τρία 5'-υποκατεστημένα παράγωγα της 6BIO που συντέθηκαν, αξιολογήθηκαν ως πιθανοί αναστολείς της 5-LOX κι όχι κινασών.

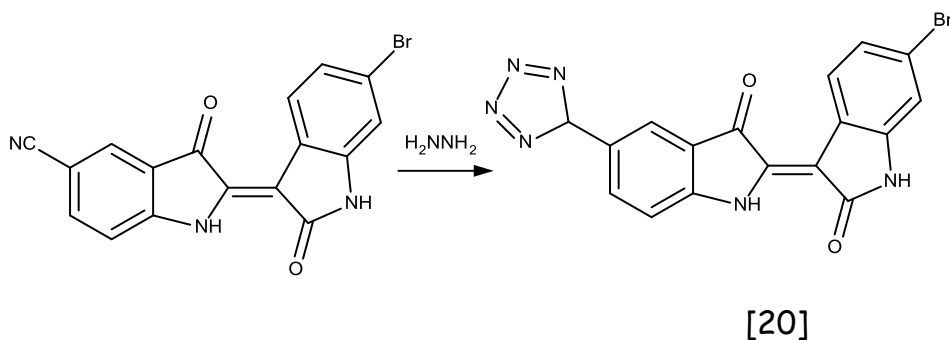
Από τα παραπάνω φαίνεται ότι οι τροποποιήσεις στην 5' θέση των ιντιρουμπινών έχουν τη δυνατότητα να ενισχύσουν την δραστικότητα των μορίων αυτών έναντι κινασών δηλαδή να ενισχύσουν την αλληλεπίδραση των ιντιρουμπινών με τις περιοχές πρόσδεσης του ATP στα ένζυμα. Η 5-LOX δεν αποτελεί ένζυμο-κινάση αλλά φέρει θέση πρόσδεσης του ATP αφού το ATP είναι μεταξύ των συμπαραγόντων που απαιτούνται για την πλήρη δραστικότητα της λιποξυγενάσης.

Γενικό συνθετικό σχήμα

Το γενικό συνθετικό σχήμα, το οποίο εφαρμόστηκε, είναι παρόμοιο με αυτό της σύνθεσης των ιντιρουμπινών, το οποίο περιγράφηκε στο πρώτο κεφάλαιο της παρούσας ενότητας. Η 6-βρωμοϊσατίνη διμερίστηκε με το κατάλληλα υποκατεστημένο στην 5 θέση 3-ακετοξυϊνδολίο, οπότε και παραλήφθηκε η αντίστοιχη 5'-υποκατεστημένη-ιντιρουμπίνη. Στη συνέχεια, με την επίδραση υδροχλωρικής υδροξυλαμίνης, παραλήφθηκε η επιθημητή οξίμη. Πολλές φορές, χρειάστηκε μεγαλύτερη περίσσεια υδροχλωρικής υδροξυλαμίνης. Παραλήφθηκαν τα παρακάτω παράγωγα της 6ΒΙΟ:



*Σχήμα 14: Νέα παράγωγα της 6ΒΙΟ: R₁= OCH₃[13], CH₃[14], CN[15]
Γνωστά παράγωγα της 6ΒΙΟ που ξανασυντέθηκαν με σκοπό την μετατροπή τους σε νέα ισοπρενικά ανάλογα: R₁= NO₂[16], CHO[17], F[18], Br[19]*

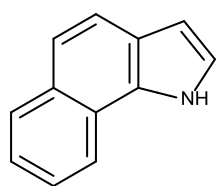


Σχήμα 15: Σύνθεση 5'-υποκατεστημένων παραγώγων ιντιρουμπινών

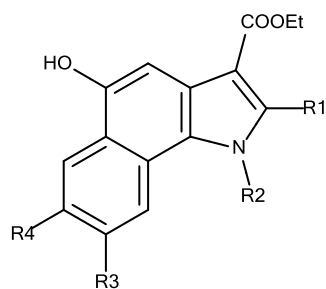
2.3) Σύνθεση παραγώγων με συζευγμένο επιπλέον βενζολικό δακτύλιο δομής βενζο[g]ινδολίου

Εισαγωγή

Έχει αποδειχθεί από πρόσφατες έρευνες ότι τα 3-καρβαιοξυ-βενζο[g]ινδόλια (benzo[g]indol-3-carboxylates), μόρια που περιλαμβάνουν στο σκελετό τους τη δομή του βενζο[g]ινδολίου, καταστέλλουν ισχυρώς την βιοσύνθεση λευκοτριενίων αναστέλλοντας την 5-λιποξυγενάση (5-LOX). Μάλιστα τα 3-καρβαιοξυ-βενζο[g]ινδόλια απεδείχθησαν πιο ισχυροί αναστολείς από τις αντίστοιχες ενώσεις που δεν φέρουν συμπυκνωμένο βενζολικό δακτύλιο, γεγονός που δείχνει ότι ο επιπλέον υδρόφοβος δακτύλιος είναι σημαντικός για την δραστικότητα. Έτσι τα μόρια αυτά αποτελούν πιθανούς νέους αντιφλεγμονώδεις παράγοντες με αξιόλογο φαρμακολογικό προφίλ.^{81,82}



benzo[g]indol



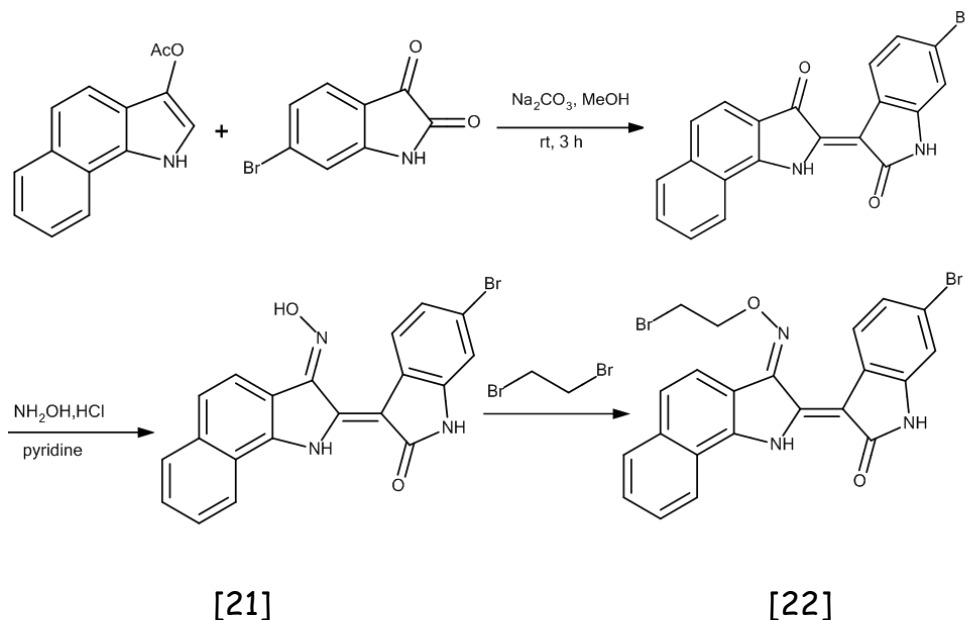
benzo[g]indol-3-carboxylates

Σχήμα 16: βενζο[g]ινδόλια, ισχυροί αναστολείς της 5-LOX

Βασιζόμενοι στα παραπάνω δεδομένα επιλέξαμε τη σύνθεση νέων παραγώγων ιντιρουμπινών με συμπυκνωμένο επιπλέον βενζολικό δακτύλιο.

Γενικό συνθετικό σχήμα

Η 6-βρωμοϊσατίνη διμερίστηκε με το αντίστοιχο 3-ακετοξυϊνδολίο, οπότε και παραλήφθηκε η αντίστοιχη 5'-υποκατεστημένη-ιντιρουμπίνη. Στη συνέχεια, με την επίδραση υδροχλωρικής υδροξυλαμίνης, παραλήφθηκε η οξίμη.



Σχήμα 17: Σύνθεση παραγώγων ιντιρουμπινών με συμπυκνωμένο βενζολικό δακτύλιο

2.4) Σύνθεση και βιολογική δράση ισοπρενικών παραγώγων της ιντιρουμπινο-3'-οξίμης

Εισαγωγή

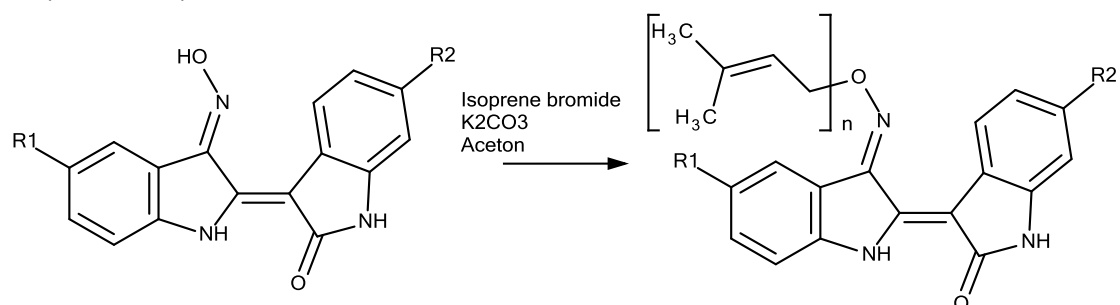
Καθώς, όπως προαναφέρθηκε, είναι άγνωστη ακόμη η δομή και η θέση της περιοχής της 5-LOX στην οποία προσδένεται το ATP, τροποποιήσαμε την ΙΟ ώστε εκτός από το ATP να προσομοιάζει ταυρόχρονα και το υπόστρωμα του ενζύμου, το αραχιδονικό οξύ.

Στα πλαίσια της μελέτης της σχέσης δομής-δράσης παραγώγων ιντιρουμπινών ως πιθανών αναστολέων της 5-LOX και στοχεύοντας στην αύξηση της συγγένειας των μορίων αυτών με το συγκεκριμένο ένζυμο μέσω ενός επιπλέον μηχανισμού διαφορετικού από τον συναγωνισμό με το ATP, παρασκευάστηκαν ισοπρενικά παράγωγα στην 3' θέση της 6-βρωμοϊντιρουμπίνης, της 5'-μεθυλο-6-βρωμοϊντιρουμπίνης, της 5'-μεθοξυ-6-βρωμοϊντιρουμπίνης, της 5'-νιτρο-6-βρωμοϊντιρουμπίνης, της 5'-φορμυλο-6-

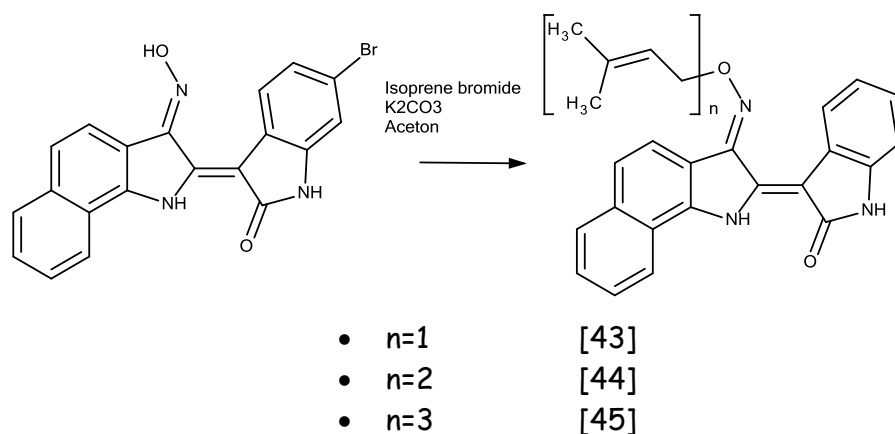
βρωμοϊντιρουμπίνης, της 5'-φθορο-6-βρωμοϊντιρουμπίνης, της 5',6-διβρωμοϊντιρουμπίνης, της 5'-κυανο-6-βρωμοϊντιρουμπίνης και της βενζο-6-βρωμοϊντιρουμπίνης. Οι ισοπρενικές ομάδες όπως προαναφέρθηκε επιλέχθησαν ως υποκαταστάτες αφού όντας υδρογονανθρακικές αλυσίδες που φέρουν διπλούς δεσμούς, προσομοιάζουν το αραχιδονικό οξύ, υπόστρωμα του ενζύμου. Τα ισοπρένια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το πρενύλιο (υδρογονανθρακική αλυσίδα 5 ατόμων άνθρακα με έναν διπλό δεσμό), το γερανύλιο (υδρογονανθρακική αλυσίδα 10 ατόμων άνθρακα με δύο διπλούς δεσμούς) και το φαρνεσύλιο (υδρογονανθρακική αλυσίδα 15 ατόμων άνθρακα με τρεις διπλούς δεσμούς). Η ιντιρουμπίνη αποτελεί έναν χαμηλής τοξικότητας πολλά υποσχόμενο φορέα ο οποίος θα μπορούσε να κατευθύνει τις ισοπρενικές αλυσίδες στην καταλυτική περιοχή οξειδωσης του αραχιδονικού στην 5-LOX.

Γενικό συνθετικό σχήμα

Τα ισοπρενικά παράγωγα σχηματίστηκαν με επίδραση επί των αντίστοιχων οξιμών, ενός ισοδυνάμου πρενυλοβρωμιδίου, γερανυλοβρωμιδίου ή φαρνεσυλοβρωμιδίου και δύο ισοδυνάμων K_2CO_3 .



- | | | | |
|------------------------------------|------|---|------|
| • R1=H, R2=H, n=1 | [23] | • R1=CN, R2=Br, n=2 | [34] |
| • R1=H, R2=H, n=2 | [24] | • R1=NO ₂ , R2=Br, n=1 | [35] |
| • R1=H, R2=H, n=3 | [25] | • R1=NO ₂ , R2=Br, n=2 | [36] |
| • R1=H, R2=Br, n=1 | [26] | • R1=(CH=NO-C ₅ H ₉), R2=Br, n=1 | [37] |
| • R1=H, R2=Br, n=2 | [27] | • R1=(CH=NOH), R2=Br, n=2 | [38] |
| • R1=H, R2=Br, n=3 | [28] | • R1=F, R2=Br, n=1 | [39] |
| • R1=OCH ₃ , R2=Br, n=1 | [29] | • R1=F, R2=Br, n=2 | [40] |
| • R1=OCH ₃ , R2=Br, n=2 | [30] | • R1=Br, R2=Br, n=1 | [41] |
| • R1=CH ₃ , R2=Br, n=1 | [31] | • R1=Br, R2=Br, n=2 | [42] |
| • R1=CH ₃ , R2=Br, n=2 | [32] | | |
| • R1=CN, R2=Br, n=1 | [33] | | |



Σχήμα 18: Σύνθεση ισοπρενικών παραγώγων ιντιρουμπινών

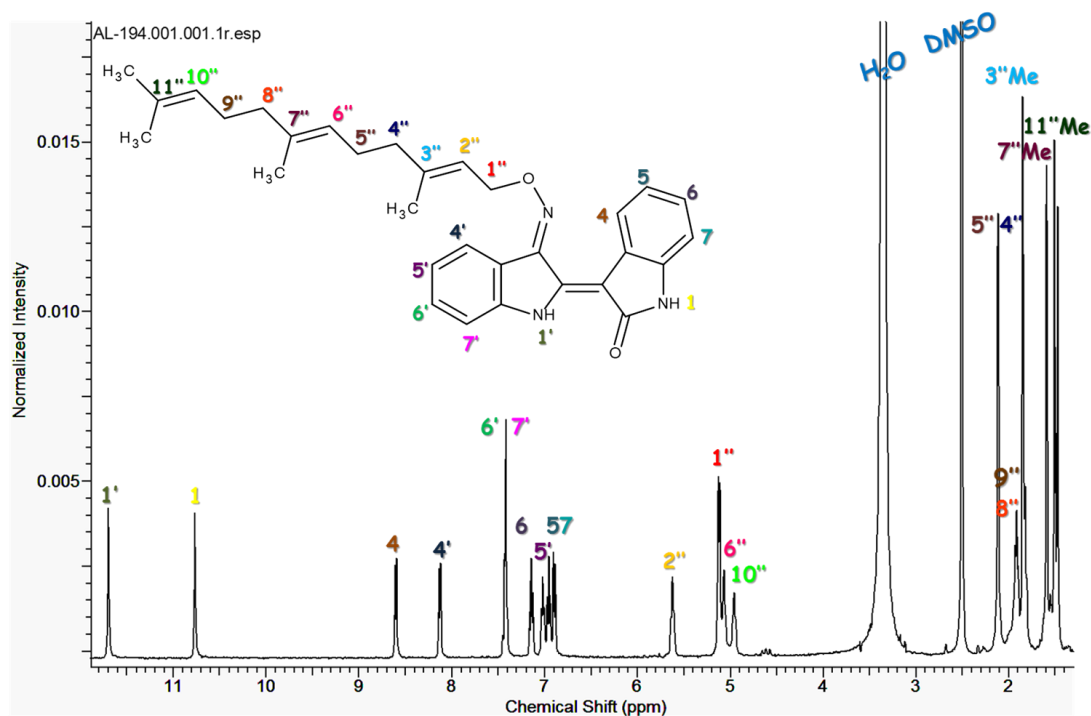
Οι οξίμες μπορούν να υποστούν O-αλκυλίωση και με την επίδραση αλκυλαλογονιδίων.

Η O-αλκυλίωση αποτελεί μία παραλλαγή της κλασσικής αντίδρασης σύνθεσης συμμετρικών και μη συμμετρικών αιθέρων Williamson, η οποία ακολουθεί μηχανισμό SN2. Με την επίδραση βάσης δημιουργείται το πυρηνόφιλο ανιόν της οξίμης, το οποίο στη συνέχεια προσβάλλει τον τετραεδρικό άνθρακα του αλκυλαλογονιδίου, οπότε και προκύπτει ένα ενδιάμεσο, το οποίο μετασχηματίζεται στον επιθυμητό αιθέρα.

Οι 3'-οξίμες των ιντιρουμπινών έχουν E διαμόρφωση, οπότε και πραγματοποιείται εκλεκτικά η O-αλκυλίωση. Οι αντιδράσεις αυτές ήταν ποσοτικές.

2.5) Ξασματοσκοπική Μελέτη

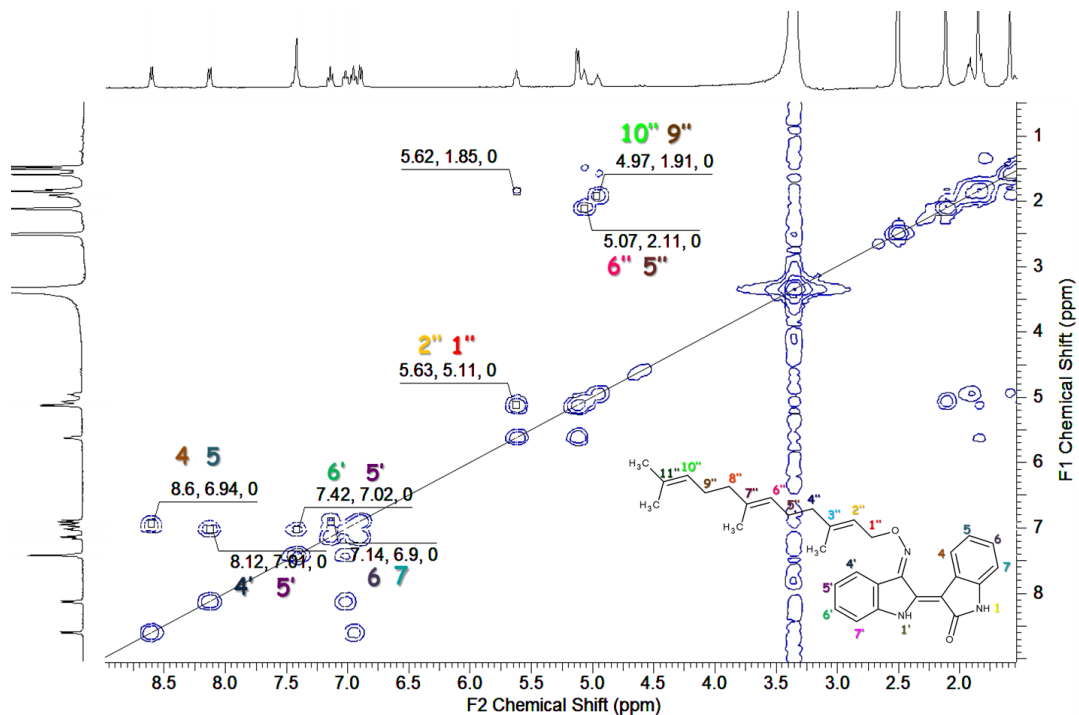
2.5.α) Φάσματα της 3'-O-farnesyl-IO [25]



Εικόνα 34: Φάσμα ^1H της 3'-O-farnesyl-IO [25]

Στο φάσμα πρωτονίου παρατηρούμε :

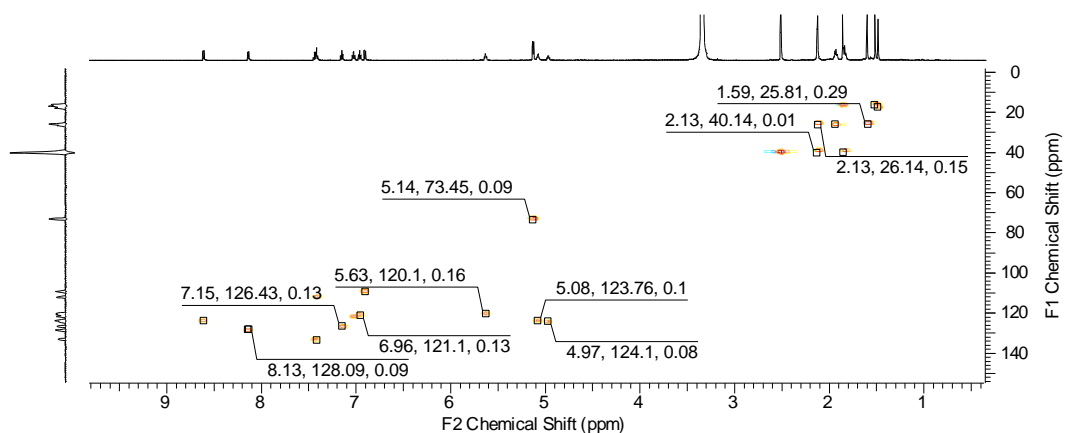
- Στην περιοχή πάνω από τα 10.5 ppm τα πρωτόνια που είναι συνδεδεμένα με τα ετεροάτομα του αζώτου.
- Στην περιοχή από τα 6.9 έως τα 8.6 ppm τα αρωματικά πρωτόνια.
- Στην περιοχή περίπου από τα 5.0 έως τα 5.6 ppm το οξυγονωμένο μεθυλένιο του φαρνεσουλίου αλλά και τα μεθινικά πρωτόνια της ισοπρενικής αλυσίδας που μετέχουν σε διπλούς δεσμούς.
- Σε υψηλότερα πεδία, στην περιοχή κάτω από τα 2,5 ppm εμφανίζονται τα λοιπά μεθυλένια του ισοπρενίου αλλά και οι 4 μεθυλικές του ομάδες.



Εικόνα 35: Φάσμα COSY της 3'-O-farnesyl-IO [25]

Στο φάσμα COSY (correlation spectroscopy) φαίνεται η συσχέτιση των πρωτονίων γειτονικών ανθράκων και έτσι μπορούμε να παρατηρήσουμε την αλληλεπίδραση μεταξύ:

- Των αρωματικών πρωτονίων πάνω από τα 6.9 ppm.
- Των μεθινικών πρωτονίων του φαρνεσυλίου με τα γειτονικά τους μεθυλένια μεταξύ των 5 και 5.6 ppm.



Εικόνα 36: Φάσμα HSQC της 3'-O-farnesyl-IO [25]

Στο HSQC (Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy) φάσμα παρατηρούμε τη συσχέτιση μεταξύ των πρωτονίων της ένωσης και των ανθράκων που φέρουν τα πρωτόνια αυτά. Στον κάθετο άξονα των ανθράκων παρατηρούμε:

- Πάνω από τα 100 ppm τους αρωματικούς άνθρακες του σκελετού της ιντιρουμπίνης αλλά και τους τρεις μεθινικούς άνθρακες του φαρνεσυλίου που μετέχουν σε διπλό δεσμό.
- Εντός της οξυγονωμένης περιοχής 50-80 ppm εμφανίζεται ο άνθρακας του οξυγονωμένου μεθυλενίου της ισοπρενικής αλυσίδας.
- Κάτω από τα 40 ppm τους λοιπούς μεθυλενικούς και μεθυλικούς άνθρακες.

| <i>PROTON</i> | ¹ H (ppm) 600 Hz | <i>COSY</i> (ppm) 400 Hz | <i>HSQC</i> ¹³ C (ppm) 600 Hz |
|---------------|-----------------------------|-----------------------------|---|
| N'-H | 11.70 s | - | - |
| N-H | 10.77 s | - | - |
| H-4 | 8.60 d, <i>J</i> =7.7 Hz | 6,95 H-5 | 123,730 C4 |
| H-4' | 8.13 d, <i>J</i> =6.9 Hz | 7,02 H-5' | 128,260 C4' |
| H-6', H-7' | 7.43 m | 7,02 H-5' | 133,138 & 112,231 C6' & C7' |
| H-6 | 7.14 t, <i>J</i> =7.7 Hz | 6,90 H-7 | 126,518 C6 |
| H-5' | 7.02 t, <i>J</i> =6.9 Hz | 8,13 & 7,43 H-4' & H-6' | 121,639 C5' |
| H-5 | 6.95 t, <i>J</i> =7.7 Hz | 8,60 H-4 | 120,942 C5 |
| H-7 | 6.90 d, <i>J</i> =7.7 Hz | 7,14 H-6 | 109,096 C7 |
| H-2'' | 5.62 t, <i>J</i> =6.5 Hz | 5,12 H-1'' | 120,594 C2'' |
| H-1'' | 5.12 d, <i>J</i> =6.5 Hz | 5,62 H-2'' | 73,206 C1'' |
| H-6'' | 5.07 brs | 2,11 H-5'' | 123,730 C6'' |
| H-10'' | 4.96 t, <i>J</i> =5.5 Hz | 1,91 H-9'' | 124,078 C10'' |
| H-5'', H-4'' | 2.11 m | 5,07 H-6'' | 26,167 & 40,104 C5'' & C4'' |
| H-9'', H-8'' | 1.91 s | 4,96 H-10'' | 26,167 & 39,916 C9'' & C8'' |
| 3''-CH3 | 1.85 s | - | 16,759 C3'' |
| 7''-CH3 | 1.59 s | - | 25,818 C7'' |
| 11''-CH3 | 1.51 s | - | 16,062 C11'' |
| 11''-CH3 | 1.47 s | - | 17,804 C11'' |

Πίνακας 1: Χημικές μετατοπίσεις για την 3'-O-farnesyl-IO [25]

2.5.β) Φάσματα των 5'-φθορο-παραγώγων

Η επίδραση του 5'-φθορίου σε συνδυασμό με την ισοπρενική ομάδα της 3' θέσης επί του Η-4' είναι εμφανής αν συγκρίνουμε τις χημικές μετατοπίσεις των αρωματικών πρωτονίων στην ιντιρουμπίνη και στα αντίστοιχα ισοπρενικά ανάλογα. Έτσι στην ιντιρουμπίνη έχουμε την εξής εικόνα:

| | <i>5'-F-6-Br-indirubin</i> | <i>Πρενυλιωμένο παράγωγο [40]</i> | <i>Γερανυλιωμένο παράγωγο [41]</i> |
|------|----------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| H-4 | 8.53 d, J=8.2 Hz | 8.49 d, J=8.2 Hz | 8.49 d, J=8.2 Hz |
| H-4' | 7.82 s | 7.46 s | 7.47 s |
| H-7' | 7.35 d, J=8.9 Hz | 7.87 d, J=7.5 Hz | 7.88 d, J=8.3 Hz |
| H-6' | 7.00-7.08 m | 7.35 d, J=7.5 Hz | 7.33 d, J=8.3 Hz |
| H-5 | 7.00-7.08 m | 7.11 d, J=8.2 Hz | 7.10 d, J=8.2 Hz |
| H-7 | 7.00-7.08 m | 7.04 s | 7.05 s |

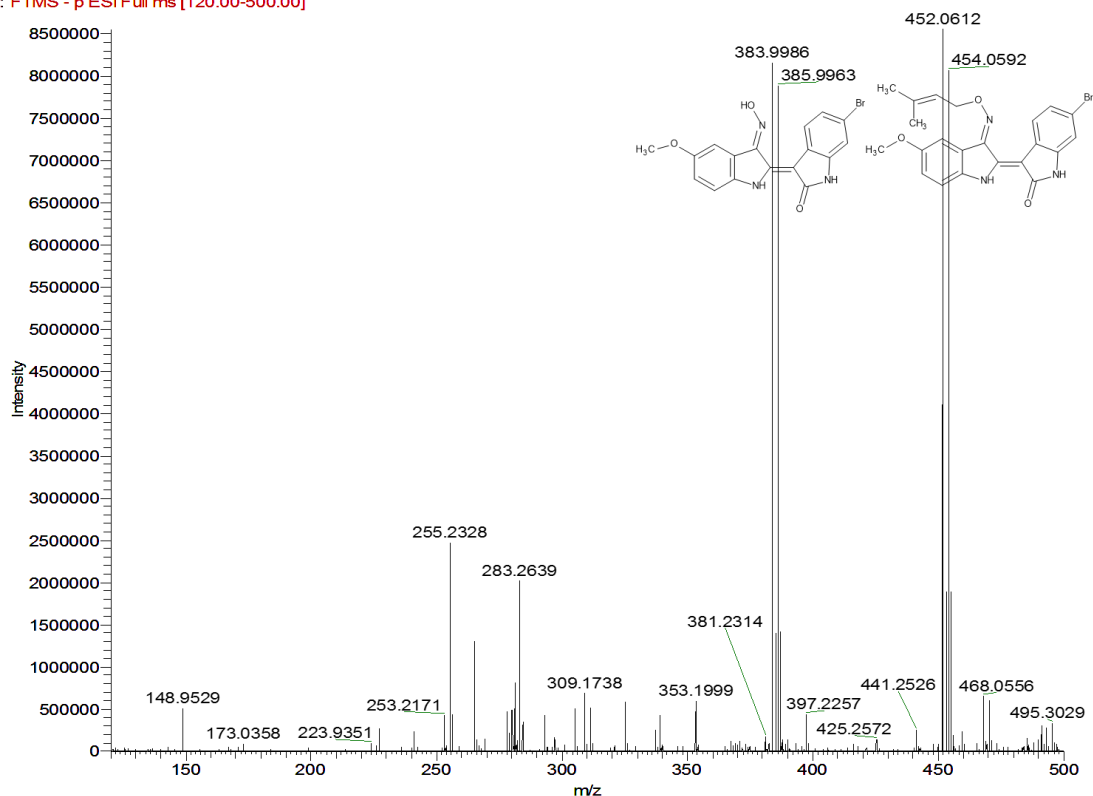
Πίνακας 2: Σύγκριση χημικών μετατοπίσεων στα φθοριωμένα παράγωγα

Όπως φαίνεται η συνδυασμένη επίδραση του φθορίου και του ισοπρενίου, θωρακίζει το Η-4', ενώ η επίδραση αποκλειστικά του φθορίου που δέχεται το Η-6' δεν είναι επαρκής ώστε να το θωρακίσει όπως το Η-4'. Επίσης οι κορυφές των Η-4' και Η-6' στα ισοπρενικά παράγωγα, δεν είναι καθαρές μονές (singlet -s) και διπλές (doublets -d) αντίστοιχα αλλά διαφαίνεται και μια σύζευξη με το άτομο του φθορίου στην 5' θέση.

2.6) Ενδεικτική παράθεση της θραυσματοποίησης ενός από τα ισοπρενικά παράγωγα

Τα φάσματα μάζας των παραπάνω μορίων παρατίθενται παρακάτω. Ο άξονας χ αντιστοιχεί στο μοριακό βάρος [m/z (amu)] και ο άξονας ψ στην ένταση [intensity (cps)].

AL106_ESI-#1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 8.55E6
F: FTMS - p ESI Full ms [120.00-500.00]



Εικόνα 37: Φάσμα της (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-5'-μεθοξυϊνδιρουμπινο-3'-(Ο-πρενυλ)οξίμης [29].

Το μοριακό ιόν εμφανίζεται στα 452 και 454 με τη χαρακτηριστική μορφή της ισοτοπικής κορυφής των βρωμιωμένων μορίων. Στα 384 και 386 παρατηρούμε το κυριότερο θραύσμα από το οποίο λείπει η πρενυλομάδα.

2.7) Βιολογική δράση των αναλόγων

Τα παραπάνω μόρια ελέγχθησαν ως προς την ανασταλτική τους δράση *in vitro* στην 5-LOX .

Στους παρακάτω πίνακες φαίνεται η συγκέντρωση κάθε παραγώγου (σε μM) η οποία απαιτείται για 50% *in vitro* αναστολή της 5-LOX όταν αυτή

είναι απομονωμένη από το κυτταρικό περιβάλλον ("IC50 5-LO Isolated"- 3η στήλη) αλλά και όταν το ένζυμο βρίσκεται εντός των ανθρώπινων πολυμορφοπύρηνων κυττάρων PMNLs ("IC50 5-LO PMNL"-4^η στήλη).

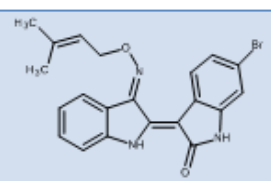
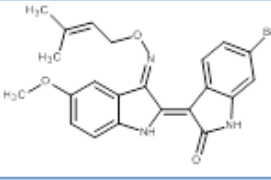
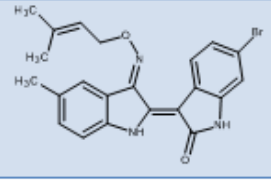
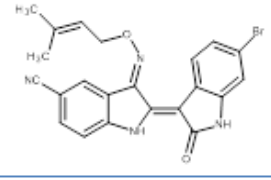
| OXIMES | Structure | IC50 5-LO Isolated (μM) | IC50 5-LO PMNL (μM) |
|--------|-----------|-------------------------|---------------------|
| εβ10 | | 2,14 | 1,95 |
| [18] | | 1,14 | 1,35 |
| [14] | | 6,31 | 1,49 |
| [15] | | 4,35 | >10 |

| OXIMES | Structure | IC50 5-LO Isolated (μM) | IC50 5-LO PMNL (μM) |
|--------|-----------|-------------------------|---------------------|
| [21] | | 1,77 | 2,68 |
| [22] | | >10 | >10 |
| [20] | | 4,36 | >10 |

Πίνακας 3: Βιολογική δράση των 5'-υποκατεστημένων παραγώγων και των παραγώγων βενζο[g]ινδολίου.

Οι ενώσεις 6-βρωμο-5'-μεθοξυϊντιρουμπινο-3'-οξίμη (1606) και 6-βρωμο-βενζο[*g*]ϊντιρουμπινο-3'-οξίμη (1609) εμφάνισαν *in vitro* ανασταλτική δράση επί της απομονωμένης 5-LOX ισχυρότερη από εκείνη της 6ΒΙΟ. Μάλιστα η πρώτη απεδείχθει δραστικότερη της 6ΒΙΟ και επί του εντός των κυττάρων ενζύμου ενώ η δεύτερη εμφάνισε δράση αντίστοιχη της 6ΒΙΟ.

Τα υπόλοιπα μόρια δεν εμφάνισαν αξιόλογη δραστικότητα σε σύγκριση με την 6ΒΙΟ επί της 5-LO.

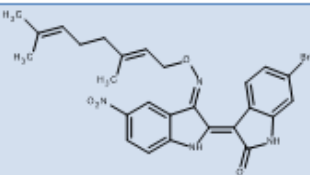
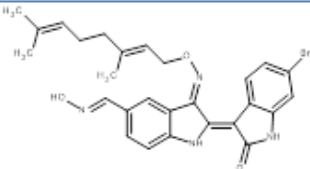
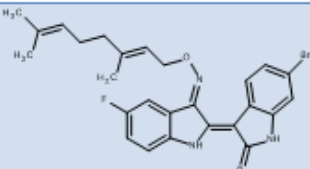
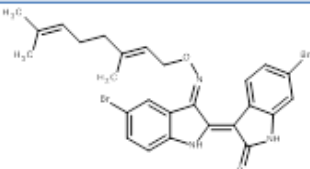
| RENVL- | Structure | IC50 5-LO Isolated (μM) | IC50 5-LO PMNL (μM) |
|--------|---|-------------------------|---------------------|
| [6] |  | >10 | >10 |
| [9] |  | >10 | >10 |
| [1] |  | >10 | >10 |
| [3] |  | 8,2 | >10 |

Πίνακας 4: Βιολογική δράση των ισοπρενικών παραγώγων

| FRENYL- | Structure | IC50 S-L0 Isolated (μM) | IC50 S-L0 PMNL (μM) |
|---------|-----------|-------------------------|---------------------|
| [35] | | 10 | >10 |
| [37] | | 10 | >10 |
| [39] | | 6,03 | >10 |
| [41] | | >10 | >10 |

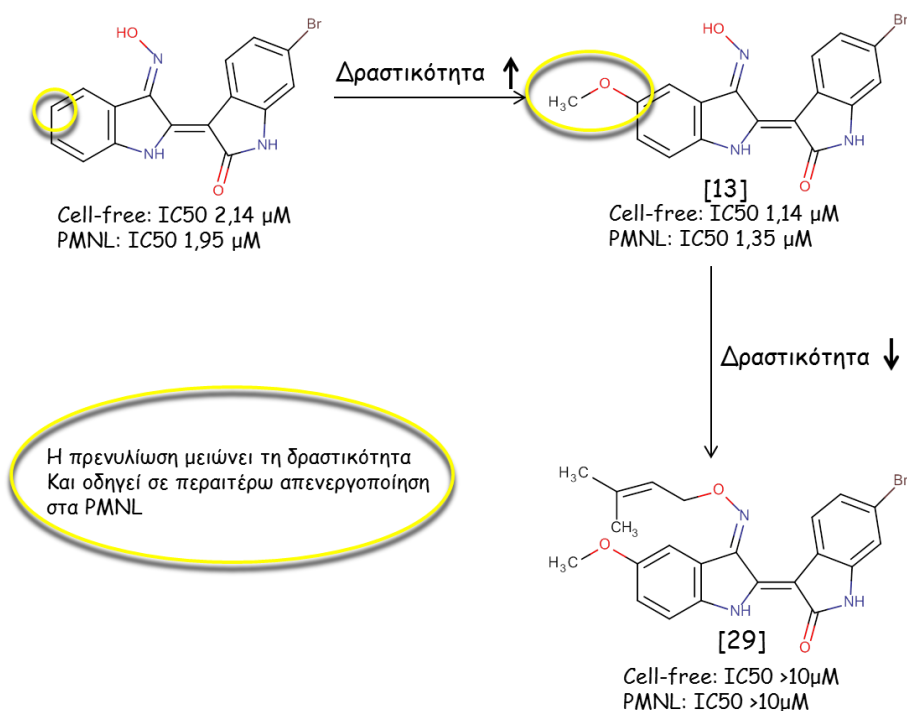
| GERANYL- | Structure | IC50 S-L0 Isolated (μM) | IC50 S-L0 PMNL (μM) |
|----------|-----------|-------------------------|---------------------|
| [27] | | 2,79 | >10 |
| [30] | | >10 | >10 |
| [32] | | 6,9 | >10 |
| [34] | | >10 | >10 |

Πίνακας 4: Βιολογική δράση των ισοπρενικών παραγώγων

| GERANYL- | Structure | IC50 5-LO Isolated (μ M) | IC50 5-LO PMNL (μ M) |
|----------|---|-------------------------------------|------------------------------|
| [36] |  | 4,97 | >10 |
| [38] |  | 10 | 10 |
| [40] |  | >10 | >10 |
| [42] |  | >10 | >10 |

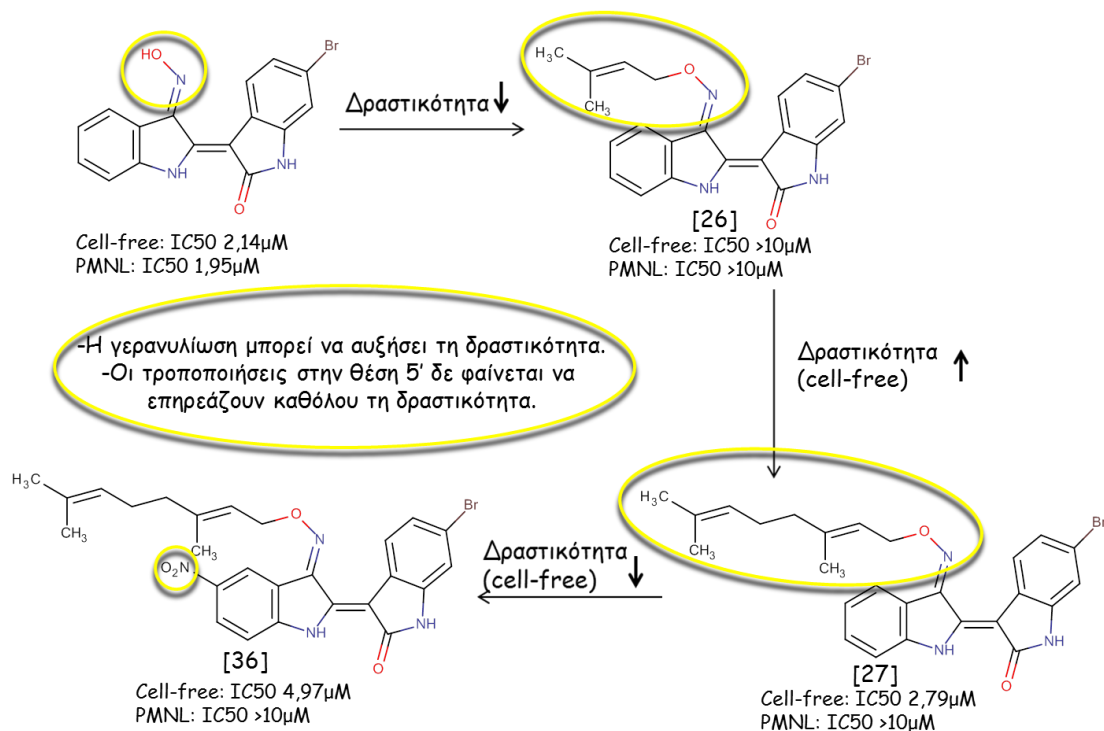
Πίνακας 4: Βιολογική δράση των ισοπρενικών παραγώγων

Η 6-βρωμοϊντιρουμπινο-3'-(Ο-γερανυλ)οξίμη (1611) ήταν το μόνο παράγωγο που εμφάνισε δραστικότητα αντίστοιχη της 6ΒΙΟ επί της απομονωμένης 5-LOX ενώ εντός των κυττάρων δεν εμφάνισε σημαντική δραστικότητα.



-Απομονωμένη 5-LOX σε PBS-EDTA [1mM] συν 1mM ATP ενεργοποιητή με 1mM CaCl₂ και 20μM AA; N=3
-5x10⁶ PMNL σε PBS-Glucose (0,1%) συν 1mM CaCl₂ ενεργοποιητή με 2,5μM A23187 +20μM AA; N=2

Σχήμα 19: Σχέσεις δομής δράσης: επίδραση 5'-μεθοξυλομάδας και επίδραση πρενυλίωσης



-Απομονωμένη 5-LOX σε PBS-EDTA [1mM] συν 1mM ATP ενεργοποιητή με 1mM CaCl₂ και 20μM AA; N=3
-5x10⁶ PMNL σε PBS-Glucose (0,1%) συν 1mM CaCl₂ ενεργοποιητή με 2,5μM A23187 +20μM AA; N=2

Σχήμα 20: Σχέσεις δομής δράσης: επίδραση πρενυλίωσης, γερανυλίωσης και 5'-υποκατάστασης των ισοπρενικών παραγώγων

2.8) Συμπεράσματα

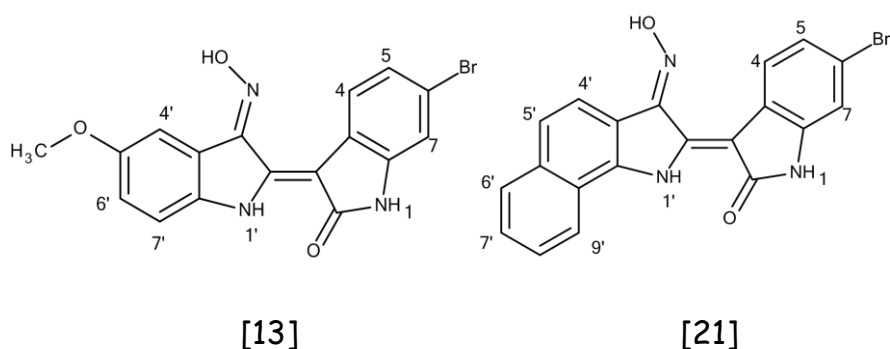
Συνθέσαμε 30 νέα παράγωγα ιντιρουμπίνης τα οποία φαρμακολογικά μπορούν να διαιρεθούν σε δύο κατηγορίες:

1. παράγωγα ιντιρουμπίνης με σκοπό τη στόχευση της θέσης πρόσδεσης του ATP που διαθέτει η 5-LOX και
2. παράγωγα ιντιρουμπίνης με σκοπό τη στόχευση της καταλυτικής περιοχής οξείδωσης του αραχιδονικού της 5-LOX.

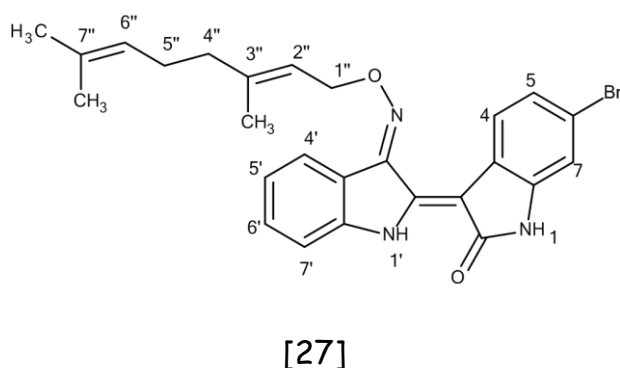
Από άποψης δομής τα παράγωγα που συνθέσαμε αποτελούν:

1. παράγωγα της 6ΒΙΟ με 5'-υποκατάσταση
2. παράγωγα βενζο[*g*]ινδολίου και
3. ισοπρενικά παράγωγα ιντιρουμπίνης.

Δύο εξ αυτών, τα ανάλογα [13] και [21] εμφάνισαν *in vitro* ανασταλτική δράση επί της απομονωμένης 5-LOX ισχυρότερη από εκείνη της 6ΒΙΟ. Μάλιστα το πρώτο με την 5'-μεθοξυ-υποκατάσταση, απεδείχθει δραστικότερο της 6ΒΙΟ και επί του εντός των κυττάρων ενζύμου.



Το ανάλογο [27] εμφάνισε δραστικότητα αντίστοιχη της 6ΒΙΟ επί της απομονωμένης 5-LOX ενώ δεν εμφάνισε σημαντική δραστικότητα εντός των κυττάρων.



Τα υπόλοιπα μόρια δεν εμφάνισαν αξιόλογη δραστικότητα σε σύγκριση με την 6ΒΙΟ επί της 5-LOX. Έτσι:

- Η πρενυλίωση φάνηκε ότι μειώνει τη δραστικότητα επί του απομονωμένου ενζύμου και οδηγεί σε περαιτέρω απενεργοποίηση και εντός των κυττάρων.
- Η γερανυλίωση μπορεί να αυξήσει τη δραστικότητα.
- Οι τροποποιήσεις στην θέση 5' δε φαίνεται να επηρεάζουν καθόλου τη δραστικότητα στην περιοχή πρόσδεσης του ATP αλλά μειώνουν τη δραστικότητα στην περιοχή πρόσδεσης του αραχιδονικού.

Παρατηρήσαμε ότι μόρια χωρίς μακριές ισοπρενικές αλυσίδες όπως το πρενύλιο, που δεν προσομοιάζουν σε επαρκή βαθμό το αραχιδονικό, δεν εμφάνισαν ανασταλτική δράση παρόλο που διατηρήθηκε η συναγωνιστική του ATP δομή. Αυτό συμβαίνει πιθανόν διότι η ισοπρενική αλυσίδα είναι πολύ ογκώδης ώστε να προσεγγίσουν την περιοχή πρόσδεσης του ATP και πολύ μικρή ώστε να προσομοιάζει επαρκώς το αραχιδονικό και να αλληλεπιδράσει με την θέση αυτού.

Μόρια που είχαν μόνο ATP-συναγωνιστική δομή (χωρίς ισοπρενικές ομάδες) και μόρια που προσομοιάζουν πιο πολύ το αραχιδονικό (με μακρές ισοπρενικές αλυσίδες πχ γερανύλιο, φαρνεσύλιο), ήταν δραστικά.

Τα παράγωγα ιντιρουμπίνης, μας παρέχουν έναν πολλά υποσχόμενο σκελετό πάνω στον οποίο μπορεί να δημιουργηθούν ισχυροί αναστολείς της 5-LOX που ανήκουν σε δύο διαφορετικές κατηγορίες:

1. παράγωγα ιντιρουμπίνης με σκοπό τη στόχευση της θέσης πρόσδεσης του ATP που διαθέτει η 5-LOX και
2. παράγωγα ιντιρουμπίνης με σκοπό τη στόχευση της καταλυτικής περιοχής οξείδωσης του αραχιδονικού της 5-LOX.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1) Γενικά (Τεχνικές-Οργανολογία)

Για τον ποιοτικό προσδιορισμό των μορίων, τα οποία συντέθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω τεχνικές:

• Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)

Για τον έλεγχο των μιγμάτων και των καθαρών συστατικών χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) σε υάλινες πλάκες και σε πλάκες αλουμινίου με επίστρωση πυριτίου (Silica gel 60 F254-Merck). Τα χρωματογραφήματα ελέγχθηκαν κατ'αρχάς με παρατήρηση στο ορατό, λόγω των χρωστικών ιδιοτήτων των ιντιρουμπινών και συμπληρωματικά και όπου αυτό δεν επαρκούσε ελέγχθησαν ως προς την απορρόφησή τους, με έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία, σε μήκος κύματος 254 και 366 nm και ενδεχομένως στη συνέχεια με ψεκασμό με μεθανολικό διάλυμα θειικής βανιλίνης.

• Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Η λήψη των φασμάτων πρωτονίου $^1\text{H-NMR}$, όπως και των φασμάτων δύο διαστάσεων COSY (Correlation Spectroscopy), έγινε σε συσκευή NMR Brüker DRX 400 (400 MHz). Η λήψη των φασμάτων άνθρακα $^{13}\text{C-NMR}$ (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) έγινε σε συσκευή NMR Brüker AC 200 (50 MHz).

Οι χημικές μετατοπίσεις (δ) εκφράζονται σε ppm (εσωτερικό πρότυπο TMS), ενώ οι σταθερές σύζευξης (J) σε Hz. Η πολλαπλότητα των κορυφών εκφράζεται ως s=απλή, d=διπλή, t=τριπλή, q=τετραπλή, c=πενταπλή, dd=διπλή-διπλών, td=τριπλή-διπλή, m=πολλαπλή και brs=ευρεία. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τη λήψη των φασμάτων ήταν δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3) και δευτεριωμένο διμεθυσουλφοξείδιο (DMSO-d_6).

• Φασματοσκοπία Μάζας (MS)

Τα φάσματα μάζας ελήφθησαν με τη χρήση υβριδικού φασματογράφου μάζας που αποτελείται από γραμμική παγίδα ιόντων (LTQ), σε σειρά με κυκλοτρονιακού τύπου αναλυτή μαζών μετασχηματισμού Fourier (Orbitrap) - (LTQ-Orbitrap Discovery -ThermoFinnigan, San Jose, USA).

Για τον ποσοτικό διαχωρισμό των μορίων, τα οποία συντέθηκαν, χρησιμοποιήθηκε η ακόλουθη τεχνική:

• **Υγρή χρωματογραφία στήλης υπό χαμηλή πίεση (300 mbar)**

Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου (silica gel) διαμέτρου 0.040-0.063 mm (flash) και ως κινητή, οργανικοί διαλύτες της επιθυμητής πολικότητας. Για την προετοιμασία της ξηρής εναπόθεσης χρησιμοποιήθηκε διοξείδιο του πυριτίου (silica gel 60 Merck 0.063-0.200 mm).

Για τη σύνθεση των τελικών προϊόντων, όπου δεν περιγράφεται η παρασκευή των πρώτων υλών, αυτές αγοράστηκαν στην εμπορική τους μορφή από την Aldrich Chemical Co (3-ακετοξυ-ινδόλιο, ισατίνη).

3.2) Βασικές αντιδράσεις: Σύνθεση των πρόδρομων μορίων (ινδολίων και ισατινών), διμερισμός τους και σχηματισμός οξιμών

3.2.1) Σύνθεση των απαραίτητων ισατινών

6-βρωμοϊσατίνη

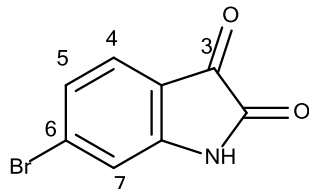
Ένυδρη χλωράλη (8,34 g) και Na_2SO_4 (58,34g) διαλύθηκαν σε H_2O (117 mL) εντός κωνικής φιάλης και το διάλυμα θερμάνθηκε στους 35 °C. Προστέθηκε 3-βρωμοανιλίνη (5 ml, 46 mmol) και υδατικό διάλυμα πυκνού HCl (5 mL), και σχηματίστηκε λευκό ίζημα θειϊκής αμίνης. Ακολούθησε προσθήκη θερμού διαλύματος υδροχλωρικής υδροξυλαμίνης (10,17 g) σε H_2O (46 mL). Το μίγμα αναδεύτηκε και θερμάνθηκε σε θερμαινόμενη πλάκα στους 80-90 °C για 2 h (στους 70-75 °C σχηματίστηκε μια παχιά πάστα καφέ-άσπρου ιζήματος). Μετά το μίγμα αφέθηκε να ψυχθεί για 1 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (η θερμοκρασία φτάνει στους 50 °C) και διηθήθηκε. Το ίζημα εκπλύθηκε ανακατεύοντας με H_2O (200 mL) και αφέθηκε να ξηρανθεί υπό κενό. Παραλήφθηκε το 3-βρωμοϊσονιτροωδοακετανιλίδιο (10,8 g, 96,5 %), ως ανοιχτόχρωμο καφέ-άσπρο ίζημα.

Σε δεύτερο στάδιο πυκνό H_2SO_4 (170 mL) θερμάνθηκε σε κωνική φιάλη στους 60 °C και στη συνέχεια απομακρύνθηκε από την θέρμανση. Το

ξηρό 3-βρωμοϊσονιτροωδοακετανιλίδιο προστέθηκε σε δόσεις αναδεύοντας επί 30 λεπτά προσέχοντας η θερμοκρασία να μην υπερβεί τους 65°C. Το μίγμα θερμάνθηκε για 15 min στους 80°C, αφέθηκε να κρυώσει στους 70°C και ψύχθηκε στους 0°C. Προστέθηκε θρυμματισμένος πάγος (900 mL) υπό ανάδευση και το μίγμα αφέθηκε για 1 ώρα. Το πορτοκαλοκόκκινο ίζημα που σχηματίστηκε (μίγμα 4-βρωμοϊσατίνης και 6-βρωμοϊσατίνης) υπέστη διήθηση υπό κενό και εκπλύθηκε πολύ καλά με H₂O.

Το παραπάνω ίζημα διαλύθηκε σε υδατικό διάλυμα NaOH (33,5 g NaOH σε 33,5 mL H₂O), θερμάνθηκε στους 60°C και οξινίστηκε μέσω προσθήκης CH₃COOH (10 mL) έως ότου το pH να γίνει 4-5. Το μίγμα αναδεύτηκε για 30 min και αφέθηκε να ψυχθεί ως τους 35°C και καταβυθίστηκε η 4-βρωμοϊσατίνη. Το ίζημα διηθήθηκε και ακολούθησε καλή έκπλυση με H₂O. Παραλάβαμε την 4-βρωμοϊσατίνη (6,3488 g, 61,6 %), ως κόκκινη-πορτοκαλί κρυσταλλική σκόνη.

Διηθήματα και εκπλύματα οξινίστηκαν μέσω πυκνού HCl (20-50 mL), έως ότου το pH γίνει 1 και ψύχθηκαν στους 5°C για 2 ώρες. Ακολούθησε διήθηση, έκπλυση με H₂O και ξήρανση, οπότε και παραλάβαμε την 6-βρωμοϊσατίνη (2,4062 g, 23,4 %), ως κίτρινη-πορτοκαλί κρυσταλλική σκόνη.



[4]

M.T: C₈H₄BrNO₂

M.B.: 226,03

Φασματοσκοπικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ταυτόσημα με εκείνα της βιβλιογραφίας (Clark R.J.H. & Cooksey C.J., 1999).

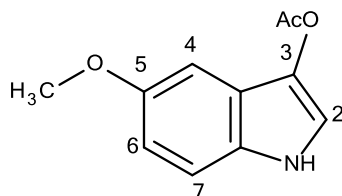
* Για όλα τα μόρια, τα οποία περιέχουν βρώμιο, το μοριακό βάρος είναι υπολογισμένο με βάση το μέσο όρο του ατομικού βάρους των ισοτόπων του βρωμίου.

3.2.2) Σύνθεση των κατάλληλων 5-υποκατεστημένων 3-ακετοξυϊνδολίων

3.2.2.α) 3-ακετοξυ-5-μεθοξυϊνδολίο

Σε διάλυμα 5-μεθοξυϊνδολίου (500 mg, 3,40 mmol) σε CH_3OH (16 mL) προστέθηκε NaOH (135,9 mg, 3,40 mmol), ιώδιο (862,3 mg, 3,40 mmol) και ιωδιούχο κάλιο (564,0 mg, 3,40 mmol) διαλυμένο σε H_2O (1 mL). Το μίγμα αναδεύτηκε για 4 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και μακριά από φως. Ακολούθησε προσθήκη 25 mL H_2O , διήθηση, καλή έκπλυση με H_2O και ξήρανση, οπότε και παραλήφθηκε το 3-ιωδο-5-μεθοξυϊνδολίο (895 mg), ως κρυσταλλική σκόνη.

Το 3-ιωδο-5-μεθυλοϊνδολίο (895 mg, 3,278 mmol) στο δεύτερο στάδιο της παρασκευής του 3-ακετοξυ-5-μεθοξυϊνδολίου, διαλύθηκε σε CH_3COOH (15 mL) και προστέθηκε οξικός άργυρος (547,1 mg, 3,278 mmol). Το μίγμα αναδεύτηκε για 2 h στους 90 °C. Ακολούθησε εξάτμιση του μίγματος υπό ελαττωμένη πίεση (με αντλία υψηλού κενού), μέχρι ξηρού, έως ότου δεν υπήρχε οσμή οξικού οξέος. Το στερεό υπόλειμμα υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία στήλης υπό χαμηλή πίεση (στατική φάση: silica gel flash) με διαλύτη έκλουσης CH_2Cl_2 . Από το χρωματογραφικό διαχωρισμό CH_2Cl_2 απομονώθηκε το προϊόν (87,6 mg, 12,6 %).



[5]

M.T.: $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NO}_3$

M.B.: 205,2099

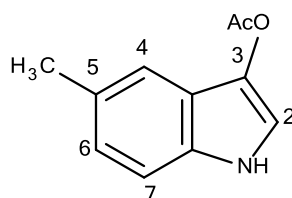
$^1\text{H NMR}$ (DMSO, 400 MHz, δ ppm, J σε Hz): 8.18 (1H, s, H-4), 8.06 (1H, dd, $J= 8.9/2$ Hz, H-6), 7.86 (1H, s, H-2), 7.62 (1H, d, $J= 8.9$ Hz, H-7), 2.51 (3H, s, CH_3), 2.37 (3H, s, OCOCH_3).

3.2.2.β) 3-ακετοξυ-5-μεθυλοϊνδολίο

Σε διάλυμα 5-μεθοξυϊνδολίου (161,2 mg, 1,229 mmol) σε CH_3OH (10 ml) προστέθηκε NaOH (49,15 mg, 1,229 mmol), ιώδιο (311,9 mg, 1,229 mmol) και ιωδιούχο κάλιο (204,0 mg, 1,229 mmol) διαλυμένο σε H_2O (1 mL).

Το μίγμα αναδεύτηκε για 4 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και μακριά από φως. Ακολούθησε προσθήκη 25 mL H₂O, διήθηση, καλή έκπλυση με H₂O και ξήρανση, οπότε και παραλήφθηκε το 3-ιωδο-5-μεθοξυϊνδόλιο (314,9 mg), ως κρυσταλλική σκόνη.

Το 3-ιωδο-5-μεθυλοϊνδόλιο (314,9 mg, 1,225 mmol) στο δεύτερο στάδιο της παρασκευής του 3-ακετοξυ-5-μεθοξυϊνδολίου, διαλύθηκε σε CH₃COOH (10 mL) και προστέθηκε οξικός άργυρος (204,5 mg, 1,225 mmol). Το μίγμα αναδεύτηκε για 2 h στους 90 °C. Ακολούθησε εξάτμιση του μίγματος υπό ελαττωμένη πίεση (με αντλία υψηλού κενού), μέχρι ξηρού, έως ότου δεν υπήρχε οσμή οξικού οξέος. Το στερεό υπόλειμμα υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία στήλης υπό χαμηλή πίεση (στατική φάση: silica gel flash) με διαλύτη έκλουσης CH₂Cl₂. Από το χρωματογραφικό διαχωρισμό CH₂Cl₂ απομονώθηκε το προϊόν (89,1 mg, 38,3 %).



[6]

M.T: C₁₁H₁₁NO₂

M.B: 189,2105

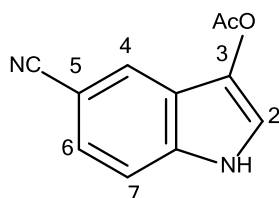
¹H NMR (DMSO, 400 MHz, δ ppm, *J* σε Hz): 7.77 (1H, brs, N-H), 7.35 (1H, s, H-4), 7.33 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-2), 7.25 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-6), 7.06 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-7), 2.47 (3H, s, CH₃), 2.38 (3H, s, OCOCH₃).

3.2.2.γ) 3-ακετοξυ-5-κυανοϊνδόλιο

Σε διάλυμα 5-μεθοξυϊνδολίου (1000 mg, 7,034 mmol) σε CH₃OH (40 mL) προστέθηκε NaOH (281,3 mg, 7,034 mmol), ιώδιο (1785 mg, 7,034 mmol) και ιωδιούχο κάλιο (1168 mg, 7,034 mmol) διαλυμένο σε H₂O (1 mL). Το μίγμα αναδεύτηκε για 4 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και μακριά από φως. Ακολούθησε προσθήκη 25 mL H₂O, διήθηση, καλή έκπλυση με H₂O και ξήρανση, οπότε και παραλήφθηκε το 3-ιωδο-5-μεθοξυϊνδόλιο (1759 mg) ως κρυσταλλική σκόνη.

Το 3-ιωδο-5-μεθυλοϊνδόλιο (1759 mg, 6,564 mmol) στο δεύτερο στάδιο της παρασκευής του 3-ακετοξυ-5-μεθοξυϊνδολίου, διαλύθηκε σε CH₃COOH (30 mL) και προστέθηκε οξικός άργυρος (1096 mg, 6,564 mmol).

Το μίγμα αναδεύτηκε για 2 h στους 90 °C. Ακολούθησε εξάτμιση του μίγματος υπό ελαττωμένη πίεση (με αντλία υψηλού κενού), μέχρι ξηρού, έως ότου δεν υπήρχε οσμή οξικού οξέος. Το στερεό υπόλειμμα υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία στήλης υπό χαμηλή πίεση (στατική φάση: silica gel flash) με διαλύτη έκλουσης CH₂Cl₂. Από το χρωματογραφικό διαχωρισμό CH₂Cl₂ απομονώθηκε το προϊόν (671 mg, 47,7 %).



[7]

M.T: C₁₁H₈N₂O₂

M.B: 200,1934

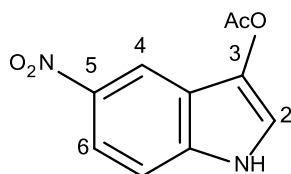
¹H NMR (DMSO, 400 MHz, δ ppm, *J* σε Hz): 8.28 (1H, brs, N-H), 7.95 (1H, d, *J* = 1.4 Hz, H-4), 7.51 (1H, d, *J* = 2.7 Hz, H-2), 7.44 (1H, dd, *J* = 8.5, 1.4 Hz, H-6), 7.39 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-7), 2.39 (3H, s, OCOCH₃).

3.2.2.δ) 3-ακετοξυ-5-νιτροϊνδόλιο

Σε διάλυμα 5-μεθοξυϊνδολίου (500 mg, 3,084 mmol) σε CH₃OH (20 mL) προστέθηκε NaOH (123,3 mg, 3,084 mmol), ιώδιο (782,7 mg, 3,084 mmol) και ιωδιούχο κάλιο (511,9 mg, 3,084 mmol) διαλυμένο σε H₂O (.... mL).

Το μίγμα αναδεύτηκε για 4 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και μακριά από φως. Ακολούθησε προσθήκη 25 mL H₂O, διήθηση, καλή έκπλυση με H₂O και ξήρανση, οπότε και παραλήφθηκε το 3-ιωδο-5-μεθοξυϊνδολίο (750,4 mg), ως κρυσταλλική σκόνη.

Το 3-ιωδο-5-μεθυλοϊνδολίο (750,4 mg, 2,605 mmol) στο δεύτερο στάδιο της παρασκευής του 3-ακετοξυ-5-μεθοξυϊνδολίου, διαλύθηκε σε CH₃COOH (15 mL) και προστέθηκε οξικός άργυρος (434,8 mg, 2,605 mmol). Το μίγμα αναδεύτηκε για 2 h στους 90 °C. Ακολούθησε εξάτμιση του μίγματος υπό ελαττωμένη πίεση (με αντλία υψηλού κενού), μέχρι ξηρού, έως ότου δεν υπήρχε οσμή οξικού οξέος. Το στερεό υπόλειμμα υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία στήλης υπό χαμηλή πίεση (στατική φάση: silica gel flash) με διαλύτη έκλουσης CH₂Cl₂. Από το χρωματογραφικό διαχωρισμό απομονώθηκε το προϊόν (313,3 mg, 46,1 %).



[8]

M.T: C₁₀H₈N₂O₄

M.B: 220,1815

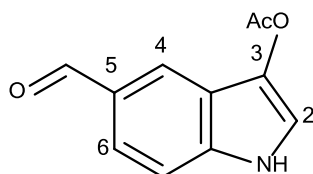
¹H NMR (DMSO, 400 MHz, δ ppm, *J* σε Hz): 8.58 (1H, s, H-4), 8.41 (1H, brs, N-H), 8.13 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H-6), 7.55 (1H, s, H-2), 7.39 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H-7), 2.43 (3H, s, OCOCH₃).

3.2.2. ε) 3-ακετοξυ-5-φορμυλϊνδολίο

Σε διάλυμα 5-μεθοξυϊνδολίου (519 mg, 3,577 mmol) σε CH₃OH (15 mL) προστέθηκε NaOH (143,1 mg, 3,577 mmol), ιώδιο (907,8 mg, 3,577 mmol) και ιωδιούχο κάλιο (593,8 mg, 3,577 mmol) διαλυμένο σε H₂O (1 mL). Το μίγμα αναδεύτηκε για 4 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και μακριά από φως. Ακολούθησε προσθήκη 25 mL H₂O, διήθηση, καλή έκπλυση με H₂O και ξήρανση, οπότε και παραλήφθηκε το 3-ιωδο-5-μεθοξυϊνδολίο (866,4 mg), ως κρυσταλλική σκόνη.

Το 3-ιωδο-5-μεθυλοϊνδολίο (866,4 mg, 3,196 mmol) στο δεύτερο στάδιο της παρασκευής του 3-ακετοξυ-5-μεθοξυϊνδολίου, διαλύθηκε σε CH₃COOH (15 mL) και προστέθηκε οξικός άργυρος (533,5 mg, 3,196 mmol).

Το μίγμα αναδεύτηκε για 2 h στους 90 °C. Ακολούθησε εξάτμιση του μίγματος υπό ελαττωμένη πίεση (με αντλία υψηλού κενού), μέχρι ξηρού, έως ότου δεν υπήρχε οσμή οξικού οξέος. Το στερεό υπόλειμμα υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία στήλης υπό χαμηλή πίεση (στατική φάση: silica gel flash) με διαλύτη έκλουσης CH₂Cl₂. Από το χρωματογραφικό διαχωρισμό απομονώθηκε το προϊόν (384,8 mg, 52,9 %).



[9]

M. T: C₁₁H₉NO₃

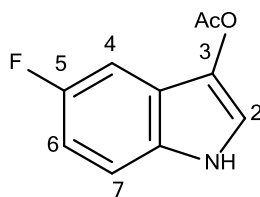
M. B: 203,1941

¹H NMR (DMSO, 400 MHz, δ ppm, *J* σε Hz): 10.00 (1H, s, CHO), 8.75 (1H, brs, N-H), 8.08 (1H, s, H-4), 7.72 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-6), 7.37 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2), 7.34 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-7), 2.37 (3H, s, CH₃).

3.2.2.στ) 3-ακετοξυ-5-φθοροϊνδόλιο

Σε διάλυμα 5-μεθοξυϊνδολίου (521,6 mg, 3,860 mmol) σε CH₃OH (20 mL) προστέθηκε NaOH (154,4 mg, 3,860 mmol), ιώδιο (979,6 mg, 3,860 mmol) και ιωδιούχο κάλιο (640,7 mg, 3,860 mmol) διαλυμένο σε H₂O (1 mL). Το μίγμα αναδεύτηκε για 4 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και μακριά από φως. Ακολούθησε προσθήκη 25 mL H₂O, διήθηση, καλή έκπλυση με H₂O και ξήρανση, οπότε και παραλήφθηκε το 3-ιωδο-5-μεθοξυϊνδόλιο (765,8 mg), ως κρυσταλλική σκόνη.

Το 3-ιωδο-5-μεθυλοϊνδόλιο (765,8 mg, 2,934 mmol) στο δεύτερο στάδιο της παρασκευής του 3-ακετοξυ-5-μεθοξυϊνδολίου, διαλύθηκε σε CH₃COOH (15 mL) και προστέθηκε οξικός άργυρος (489,7 mg, 2,934 mmol). Το μίγμα αναδεύτηκε για 2 h στους 90 °C. Ακολούθησε εξάτμιση του μίγματος υπό ελαττωμένη πίεση (με αντλία υψηλού κενού), μέχρι ξηρού, έως ότου δεν υπήρχε οσμή οξικού οξέος. Το στερεό υπόλειμμα υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία στήλης υπό χαμηλή πίεση (στατική φάση: silica gel flash) με διαλύτη έκλουσης CH₂Cl₂. Από το χρωματογραφικό διαχωρισμό απομονώθηκε το προϊόν (100,1 mg, 13,4 %).



[10]

M.T: $C_{10}H_8FNO_2$

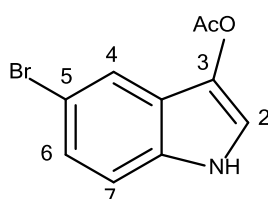
M.B: 193,1744

1H NMR (DMSO, 400 MHz, δ ppm, J σε Hz): Φασματοσκοπικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ταυτόσημα με εκείνα της βιβλιογραφίας (Tanoue Y. et al. 2004).

3.2.2.ζ) 3-ακετοξυ-5-βρωμοϊνδόλιο

Σε διάλυμα 5-βρωμοϊνδολίου (1000 mg, 5,101 mmol) σε CH_3OH (40 mL) προστέθηκε $NaOH$ (204,0 mg, 5,101 mmol), ιώδιο (1295 mg, 5,101 mmol) και ιωδιούχο κάλιο (846,8 mg, 5,101 mmol) διαλυμένο σε H_2O (1 mL). Το μίγμα αναδεύτηκε για 4 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και μακριά από φως. Ακολούθησε προσθήκη 50 mL H_2O , διήθηση, καλή έκπλυση με H_2O και ξήρανση, οπότε και παραλήφθηκε το 3-ιωδο-5-μεθοξυϊνδόλιο (1427 mg), ως κρυσταλλική σκόνη.

Το 3-ιωδο-5-μεθυλοϊνδόλιο (1427 mg, 4,433 mmol) στο δεύτερο στάδιο της παρασκευής του 3-ακετοξυ-5-μεθοξυϊνδολίου, διαλύθηκε σε CH_3COOH (35 mL) και προστέθηκε οξικός άργυρος (739,9 mg, 4,433 mmol). Το μίγμα αναδεύτηκε για 2 h στους 90 °C. Ακολούθησε εξάτμιση του μίγματος υπό ελαττωμένη πίεση (με αντλία υψηλού κενού), μέχρι ξηρού, έως ότου δεν υπήρχε οσμή οξικού οξέος. Το στερεό υπόλειμμα υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία στήλης υπό χαμηλή πίεση (στατική φάση: silica gel flash) με διαλύτη έκλουσης CH_2Cl_2 . Από το χρωματογραφικό διαχωρισμό απομονώθηκε το προϊόν (365,0 g, 28,2 %).



[11]

M.T: $C_{10}H_8BrNO_2$

M.B: 254,080

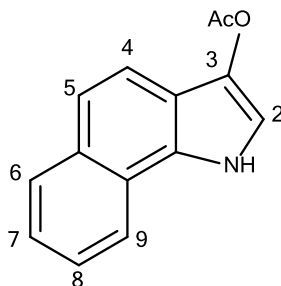
1H NMR (DMSO, 400 MHz, δ ppm, J σε Hz): 7.92 (1H, brs, N-H), 7.72 (1H, d, J = 1.7 Hz, H-4), 7.40 (1H, d, J = 2.7 Hz, H-2), 7.32 (1H, dd, J = 8.9, 1.7 Hz, H-6), 7.23 (1H, d, J = 8.9 Hz, H-7), 2.38 (3H, s, OCOCH₃).

3.2.2.η) 3-ακετοξυ-βενζο[γ]ϊνδόλιο

Σε διάλυμα βενζο[γ]ϊνδολίου (400 mg, 2,392 mmol) σε CH₃OH (16 mL) προστέθηκε NaOH (95,682 mg, 2,392 mmol), ιώδιο (607,16 mg, 2,392 mmol) και ιωδιούχο κάλιο (397,11 mg, 2,392 mmol) διαλυμένο σε H₂O (1 mL). Το μίγμα αναδεύτηκε για 4 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και μακριά από φως. Ακολούθησε προσθήκη 30 mL H₂O, διήθηση, καλή έκπλυση με H₂O και ξήρανση, οπότε και παραλήφθηκε το 3-ιωδο-βενζο[γ]ϊνδόλιο (700,52 mg), ως κρυσταλλική σκόνη.

Το 3-ιωδο-βενζο[γ]ϊνδόλιο (700,52 mg, 2,390 mmol) στο δεύτερο στάδιο της παρασκευής του 3-ακετοξυ-βενζο[γ]ϊνδολίου, διαλύθηκε σε CH₃COOH (25 mL) και προστέθηκε οξικός άργυρος (398,92 mg, 2,390 mmol). Το μίγμα αναδεύτηκε για 2 h στους 90 °C. Ακολούθησε εξάτμιση του μίγματος υπό ελαττωμένη πίεση (με αντλία υψηλού κενού), μέχρι ξηρού, έως

όπου δεν υπήρχε οσμή οξικού οξέος. Το στερεό υπόλειμμα υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία στήλης υπό χαμηλή πίεση (στατική φάση: silica gel flash) με διαλύτη έκλουσης CH_2Cl_2 . Από το χρωματογραφικό διαχωρισμό απομονώθηκε το προϊόν (149,1 mg, 27,7 %).



[12]

M.T: $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_2$

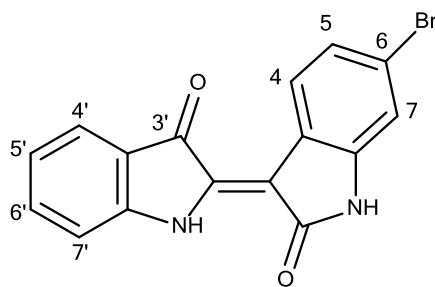
M.B: 225,2426

$^1\text{H NMR}$ (DMSO, 400 MHz, δ ppm, J σε Hz): 8.66 (1H, brs, NH), 7.98 (1H, d, $J=8.1$ Hz, H-9 ή H-6), 7.94 (1H, d, $J=8.1$ Hz, H-6 ή H-9), 7.65 (1H, d, $J=8.6$ Hz, H-4 ή H-5), 7.55 (2H, m, H-5 ή H-4 και H-8 ή H-7), 7.47 (1H, t, $J=7.4$ Hz, H-7 ή H-8), 7.40 (1H, s, H-2), 2.42 (3H, s, CH_3)

3.2.3) Σύνθεση ιντιρουμπινών

3.2.3.α) (2'Z)-6-βρωμοϊντιρουμπίνη

Ανυδρή CH_3OH (50 mL) αναδεύτηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και υπό ατμόσφαιρα αργού για 20 min. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 6-βρωμοϊσατίνη (500 mg, 2,2121 mmol) και 3-ακετοξυϊνδόλιο (310,03 mg, 1,767 mmol) και συνεχίστηκε η ανάδευση, υπό τις ίδιες συνθήκες, για άλλα 5 min. Ακολούθως, προστέθηκε Na_2CO_3 (257,9 mg, 2,4333 mmol) και συνεχίστηκε η ανάδευση, υπό τις ίδιες συνθήκες, για άλλες 3 h (αναλογία ισατίνη:ινδόλιο: Na_2CO_3 1:0,8:1,1). Μετά από το πέρας των 3 h, προστέθηκε μίγμα $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 50/50 και το ίζημα το οποίο σχηματίστηκε διηθήθηκε και εκπλύθηκε με μίγμα $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50). Ακολούθησε εκτενής έκπλυση με H_2O και καλή ξήρανση. Παραλήφθηκαν 417,4 mg της ιντιρουμπίνης ως μωβ κρυσταλλική σκόνη, με απόδοση 69,24 %.



M.T: $C_{16}H_9BrN_2O_2$

M.B: 341,159

1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm, J σε Hz): 11.10 (1H, s, N'-H), 11.00 (1H, s, N-H), 8.67 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-4), 7.65 (1H, d, J = 7.5 Hz, H-4'), 7.58 (1H, t, J = 7.5 Hz, H-6'), 7.42 (1H, d, J = 7.5 Hz, H-7'), 7.22 (1H, dd, J = 8.1, 1.7 Hz, H-5), 7.04 (1H, d, J = 1.7 Hz, H-7), 7.03 (1H, t, J = 7.5 Hz, H-5').



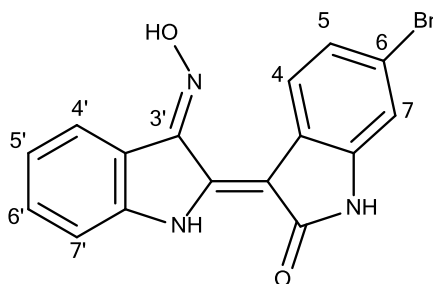
Φασματοσκοπικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ταυτόσημα με εκείνα της βιβλιογραφίας.

3.2.4) Σύνθεση οξιμών

3.2.4.α) (2'Z, 3'E)-6-βρωμοϊντιρουμπινο-3'-οξίμη

Σε διάλυμα ιντιρουμπίνης (400 mg, 1,172 mmol) σε πυριδίνη (150 mL) προστέθηκε υδροχλωρική υδροξυλαμίνη (814,75 mg, 11,72 mmol) (αναλογία ιντιρουμπίνης:υδροξυλαμίνης 1:10) και το μίγμα αναδεύτηκε για 2 h στους 130 °C. Ακολούθησε προσθήκη 200 ml H_2O , διήθηση, καλή έκπλυση με H_2O και

ξήραση. Το προϊόν (410,0 mg, 98,22 %) παραλήφθηκε ως κόκκινη κρυσταλλική σκόνη.



M.T: $C_{16}H_{10}BrN_3O_2$

M.B: 356,174

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm, J σε Hz): 13.61 (1H, brs, NOH), 11.72 (1H, s, N'-H), 10.85 (1H, s, N-H), 8.53 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-4), 8.19 (1H, d, J = 7.5 Hz, H-4'), 7.39 (2H, brs, H-7', 6'), 7.07 (1H, d, J = 8.2, Hz, H-5), 7.01 (2H, brs, H-7, 5').

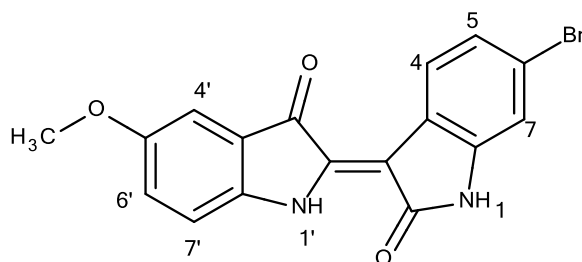


3.3) Σύνθεση παραγώγων της 6-βρωμοϊντιρουμπίνης και της 3' οξίμης της στην 5'-θέση

3.3.1) Νέα παράγωγα

3.3.1.α) (2'Z)-6-βρωμο-5'-μεθοξυϊντιρουμπίνη

Άνυδρη CH₃OH (25 mL) αναδεύτηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και υπό ατμόσφαιρα αργού για 20 min. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 6-βρωμοϊσατίνη (120,61 mg, 0,5336 mmol) και 3-ακετοξυ-5-μεθοξυϊνδολίο (87,6 mg, 0,4269 mmol) και συνεχίστηκε η ανάδευση, υπό τις ίδιες συνθήκες, για άλλα 5 min. Ακολούθως, προστέθηκε Na₂CO₃ (62,2 mg, 0,5870 mmol) και συνεχίστηκε η ανάδευση, υπό τις ίδιες συνθήκες, για άλλες 3 h (αναλογία ισατίνης:ινδολίου:Na₂CO₃ 1:0,8:1,1). Μετά από το πέρας των 3 h, προστέθηκαν 50ml H₂O/CH₃OH 50/50 και το ίζημα το οποίο σχηματίστηκε διηθήθηκε και εκπλύθηκε με μίγμα H₂O/CH₃OH (50/50). Ακολούθησε εκτενής έκπλυση με H₂O και καλή ξήρανση. Παραλήφθηκαν 115,5 mg ως μωβ κρυσταλλική σκόνη, με απόδοση 69,9 %.



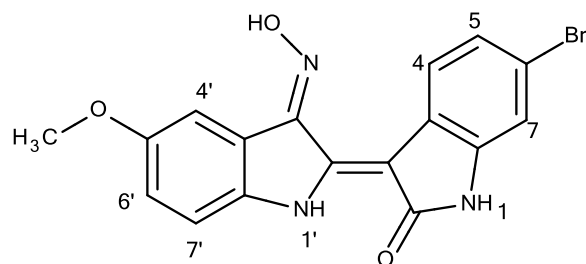
M.T.: C₁₇H₁₁BrN₂O₃

M.B.: 371,185

¹H NMR (DMSO, 400 MHz, δ ppm, J σε Hz): 11.02 (1H, s, N'-H), 10.93 (1H, s, N-H), 8.66 (1H, d, *J*= 8.5 Hz, H-4), 7.35 (1H, d, *J*= 8.7 Hz, H-7'), 7,22 (2H, dd, *J*= 8.5/2 Hz, H-6', H-5), 7.15 (1H, d, *J*= 2.2 Hz, H-4'), 7.05 (1H, s, H-7), 3.78 (3H, s, OCH₃).

3.3.1.β) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-5'-μεθοξυϊντιρουμπινο-3'-οξίμη

Σε διάλυμα της ιντιρουμπίνης (115,5 mg, 0,2983 mmol) σε πυριδίνη (40 mL) προστέθηκε υδροχλωρική υδροξυλαμίνη (207,27 mg, 2,983 mmol) και το μίγμα αναδεύτηκε για 2 h στους 130 °C (αναλογία ιντιρουμπίνης:υδροξυλαμίνης 1:10). Ακολούθησε προσθήκη H₂O, διήθηση, καλή έκπλυση με H₂O και ξήρανση. Το προϊόν (113,9 mg, 98,9 %) παραλήφθηκε ως κόκκινη κρυσταλλική σκόνη.



[13]

M.T.: $C_{17}H_{12}BrN_3O_3$

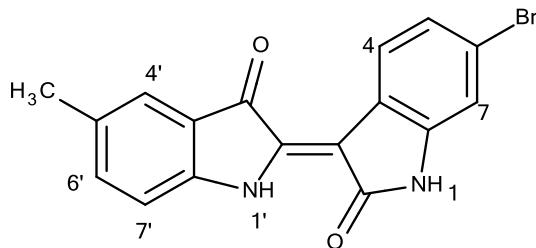
M.B.: 386,199

Exact mass: 385,0062

$^1\text{H NMR}$ (DMSO, 400 MHz, δ ppm, J σε Hz): 13.71 (1H, brs, NOH), 11.71 (1H, s, N'-H), 10.91 (1H, s, N-H), 8.59 (1H, d, $J=8.2$ Hz, H-4), 7.89 (1H, s, H-4'), 7.45 (1H, d, $J=8.6$ Hz, H-7'), 7.10 (3H, m, H-6', H-5, H-7), 3.78 (3H, s, OCH_3)

3.3.1.γ) (2'Z)-6-βρωμο-5'-μεθυλοϊντιρουμπίνη

Άνυδρη CH_3OH (25 mL) αναδεύτηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και υπό ατμόσφαιρα αργού για 20 min. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 6-βρωμοϊσατίνη (133,05 mg, 0,5886 mmol) και 3-ακετοξυ-5-μεθυλοϊνδολίο (89,1 mg, 0,4709 mmol) και συνεχίστηκε η ανάδευση, υπό τις ίδιες συνθήκες, για άλλα 5 min. Ακολούθως, προστέθηκε Na_2CO_3 (68,6 mg, 0,6475 mmol) και συνεχίστηκε η ανάδευση, υπό τις ίδιες συνθήκες, για άλλες 3 h (αναλογία ισατίνης:ινδολίου: Na_2CO_3 1:0,8:1,1). Μετά από το πέρας των 3 h, προστέθηκε μίγμα $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ 50/50 και το ίζημα το οποίο σχηματίστηκε διηθήθηκε και εκπλύθηκε με μίγμα $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50). Ακολούθησε εκτενής έκπλυση με H_2O και καλή ξήρανση. Παραλήφθησαν 111,5 mg ως μωβ κρυσταλλική σκόνη, με απόδοση 66,7 %.



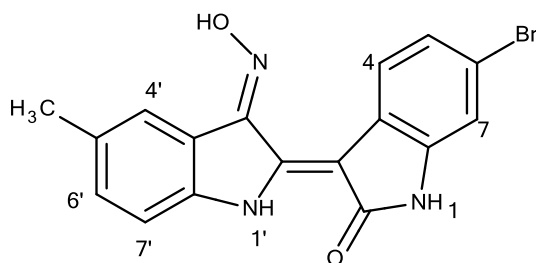
M.T.: $C_{17}H_{11}BrN_2O_2$

M.B.: 355,185

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz, δ ppm, J σε Hz): 10.99 (1H, s, N'-H), 10.33 (1H, s, N-H), 8.68 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-4), 7.47 (1H, s, H-4'), 7.42 (1H, d, $J=7.9$ Hz, H-6'), 7.33 (1H, d, $J=7.9$ Hz, H-7'), 7.23 (1H, dd, $J=7.6/1.6$ Hz, H-5), 7.06 (1H, d, $J=1.3$ Hz, H-7), 2.31 (3H, s, 5'-CH₃).

3.3.1.δ) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-5'-μεθυλοϊντιρουμπινο-3'-οξίμη

Σε διάλυμα της ιντιρουμπίνης (111,5 mg, 0,3139 mmol) σε πυριδίνη (40 mL) προστέθηκε υδροχλωρική υδροξυλαμίνη (218,14 mg, 3,1392 mmol) και το μίγμα αναδεύτηκε για 2 h στους 130 °C (αναλογία ιντιρουμπίνης:υδροξυλαμίνη 1:10). Ακολούθησε προσθήκη H₂O, διήθηση, καλή έκπλυση με H₂O και ξήρανση. Το προϊόν (106,8 mg, 91,9 %) παραλήφθηκε ως κόκκινη κρυσταλλική σκόνη.



[14]

M.T.: C₁₇H₁₂BrN₃O₂

M.B.: 370,200

Exact mass: 369,0113

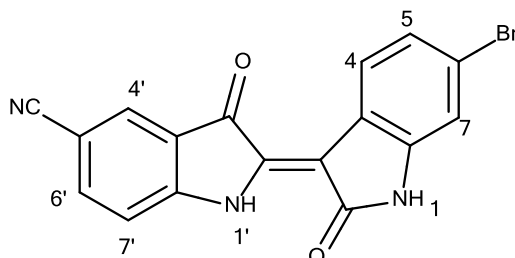
$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm, J σε Hz): 13.70 (1H, brs, NOH), 11.71 (1H, s, N'-H), 10.81 (1H, s, N-H), 8.60 (1H, d, $J=8.6$ Hz, H-4), 8.09 (1H, s, H-4'), 7.34 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-6'), 7.26 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-7'), 7.11 (1H, d, $J=8.6$ Hz, H-5), 7.04 (1H, s, H-7), 2.35 (3H, s, CH₃).

ESI-MS m/z: 368.0037, 370.0015 (M-H)⁻

3.3.1.ε) (2'Z)-6-βρωμο-5'-κυανοϊντιρουμπίνη

Άνυδρη CH₃OH (50 mL) αναδεύτηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και υπό ατμόσφαιρα αργού για 20 min. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 6-βρωμοϊσατίνη (705,0 mg, 3,119 mmol) και 3-ακετοξυ-5-κυανοϊνδόλιο (499,5 mg, 2,495 mmol) και συνεχίστηκε η ανάδευση, υπό τις ίδιες συνθήκες, για άλλα 5 min. Ακολούθως, προστέθηκε Na₂CO₃ (363,6 mg, 3,431 mmol) και συνεχίστηκε η ανάδευση, υπό τις ίδιες συνθήκες, για άλλες 3 h (αναλογία

ισατίνης:ινδολίου:Na₂CO₃ 1:0,8:1,1). Μετά από το πέρας των 3 h, προστέθηκε μίγμα H₂O/CH₃OH 50/50 και το ίζημα το οποίο σχηματίστηκε διηθήθηκε και εκπλύθηκε με μίγμα H₂O/CH₃OH (50/50). Ακολούθησε εκτενής έκπλυση με H₂O και καλή ξήρανση. Παραλήφθησαν 764,0 mg ως μωβ κρυσταλλική σκόνη, με απόδοση 83,6 %.



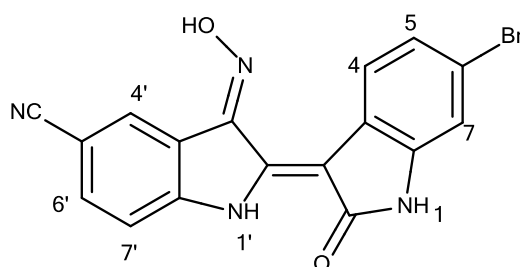
M. T.: C₁₇H₈BrN₃O₂

M. B.: 366,168

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz, δ ppm, *J* σε Hz): 11.95 (1H, s, N'-H), 10.99 (1H, s, N-H), 8.57 (1H, d, *J*=7.3 Hz, H-4), 8.53 (1H, s, H-4'), 7.89 (1H, d, *J*=7.8/1.5 Hz, H-6'), 7.62 (1H, d, *J*=7.8 Hz, H-7'), 7.19 (1H, d, *J*=7.3/2.1 Hz, H-5), 7.05 (1H, s, H-7).

3.3.1.στ) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-5'-κυανοϊντιρουμπινο-3'-οξίμη

Σε διάλυμα της ιντιρουμπίνης (358,7 mg, 0,9796 mmol) σε πυριδίνη (100 ml) προστέθηκε υδροχλωρική υδροξυλαμίνη (680,7 mg, 9,795 mmol) και το μίγμα αναδεύτηκε για 2 h στους 130 °C. Ακολούθησε προσθήκη 200 ml H₂O, διήθηση, καλή έκπλυση με H₂O και ξήρανση. Το προϊόν (338,6 mg, 90,7 %) παραλήφθηκε ως κόκκινη κρυσταλλική σκόνη.



[15]

M. T.: C₁₇H₉BrN₄O₂

M. B.: 381,183

Exact mass: 379,9909

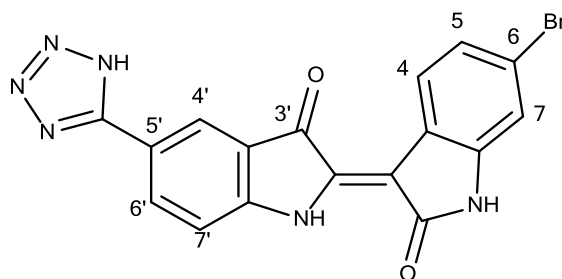
¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz, δ ppm, *J* σε Hz): 14.02 (1H, brs, NOH), 11.97 (1H, s, N'-H), 10.92 (1H, s, N-H), 8.56 (1H, d, *J*= 8.5 Hz, H-4), 8.53

(1H, s, H-4'), 7.84 (1H, dd, $J=8.2/1.7$ Hz, H-6'), 7.60 (1H, d, $J=8.2$ Hz, H-7'), 7.13 (1H, dd, $J=8.5/2.1$ Hz, H-5), 7.07 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-7).

ESI-MS m/z: 378.9828, 380.9810 (M-H)⁻

3.3.1.ζ) (2'Z)-6-βρωμο-5'-τετραζολοϊντιρουμπίνη

Σε διάλυμα της ιντιρουμπίνης (23,3 mg, 0,063631 mmol), σε πυριδίνη (15 ml), προστίθεται TMS-N3 (trimethylsilylazide: 12,69 μl, 0,09561 mmol) και TBAF (tetrabutylammonium trihydrate: 0,03016 g, 0,09561 mmol). Το μίγμα αναδεύτηκε για 24 h στους 130 °C (reflux) και ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό πίεση. Προστέθηκε THF και εξατμίστηκε υπό πίεση. Το στερεό υπόλειμμα υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία στήλης υπό χαμηλή πίεση (στατική φάση: silica gel flash) με διαλύτη έκλουσης CH₂Cl₂:CH₃OH (βαθμιαία 100:0 έως 99:1). Από το χρωματογραφικό διαχωρισμό απομονώθηκε το προϊόν (4,9 mg, 18,8 %).



[20]

M.T.: C₁₇H₉BrN₆O₂

M.B.: 409,196

Exact mass: 407,9970

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz, δ ppm, J σε Hz): 11.21 (1H, s, N'-H), 11.20 (1H, s, N-H), 9.25 (1H, s, NH του τετραζολίου), 8.72 (1H, d, $J=8,2$ Hz, H-4), 8.27 (2H, m, H-4', H-6'), 7.54 (1H, d, $J=8,6$ Hz, H-7'), 7.25 (1H, d, $J=8,2$ Hz, H-5), 7.11 (1H, s, H-7).

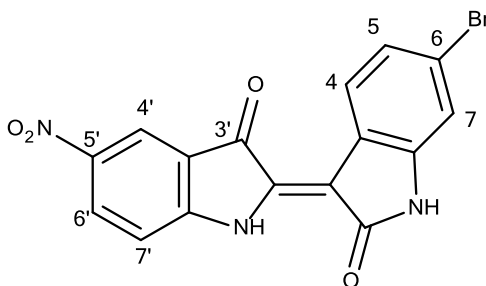
ESI-MS m/z: 406.9899, 408.9878 (M-H)⁻

3.3.2) Γνωστά 5'-υποκατεστημένα παράγωγα που μετατράπηκαν σε νέα ισοπρενικά ανάλογα ιντιρουμπίνης

3.3.2.α) (2'Z)-6-βρωμο-5'-νιτροϊντιρουμπίνη

Άνυδρη CH₃OH (75 mL) αναδεύτηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και υπό ατμόσφαιρα αργού για 20 min. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 6-

βρωμοϊσατίνη (402,03 mg, 1,779 mmol) και 3-ακετοξυ-5-μεθοξυϊνδολίο (313,3 mg, 1,423 mmol) και συνεχίστηκε η ανάδευση, υπό τις ίδιες συνθήκες, για άλλα 5 min. Ακολούθως, προστέθηκε Na_2CO_3 (207,4 mg, 1,957 mmol) και συνεχίστηκε η ανάδευση, υπό τις ίδιες συνθήκες, για άλλες 3 h (αναλογία ισατίνης:ινδολίου: Na_2CO_3 1:0,8:1,1) . Μετά από το πέρας των 3 h, προστέθηκε μίγμα $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ 50/50 και το ίζημα το οποίο σχηματίστηκε διηθήθηκε και εκπλύθηκε με μίγμα $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50). Ακολούθησε εκτενής έκπλυση με H_2O και καλή ξήρανση. Παραλήφθησαν 317,5 mg ως μωβ κρυσταλλική σκόνη, με απόδοση 57,78 %.

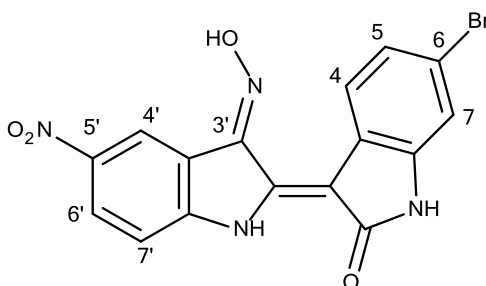


M.T: $\text{C}_{16}\text{H}_8\text{BrN}_3\text{O}_4$

M.B: 386,156

3.3.2.β) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-5'-νιτροϊντιρουμπινο-3'-οξίμη

Σε διάλυμα της ιντιρουμπίνης (317,5 mg, 0,8222 mmol) σε πυριδίνη (100 ml) προστέθηκε υδροχλωρική υδροξυλαμίνη (571,4 mg, 8,2221 mmol) και το μίγμα αναδεύτηκε για 2 h στους 130 °C. Ακολούθησε προσθήκη 200 mL H_2O , διήθηση, καλή έκπλυση διαδοχικά με H_2O και ξήρανση. Το προϊόν (328,9 mg, 99,7 %) παραλήφθηκε ως κόκκινη κρυσταλλική σκόνη.



[16]

M.T: $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{BrN}_4\text{O}_4$

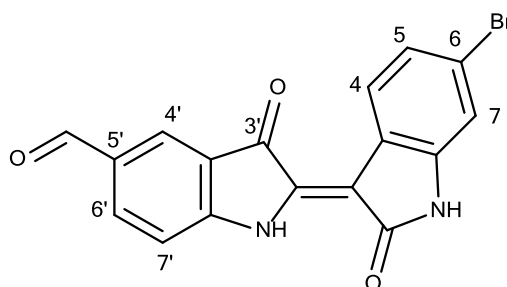
M.B: 401,171

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm, J σε Hz): 14.00 (1H, brs, NOH), 12.10 (1H, s, N'-H), 11.00 (1H, s, N-H), 8.97 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-4), 8.56

(1H, s, H-4'), 8.34 (1H, dd, $J=8.2/1.7$ Hz, H-6'), 7.61 (1H, d, $J=8.2$ Hz, H-7'), 7.13 (1H, dd, $J=8.5/2.1$ Hz, H-5), 7.05 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-7).

3.3.2.γ) (2'Z)-6-βρωμο-5'-φορμυλοϊντιρουμπίνη

Άνυδρη CH_3OH (100 mL) αναδεύτηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και υπό ατμόσφαιρα αργού για 20 min. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 6-βρωμοϊσατίνη (535,0 mg, 2,367 mmol) και 3-ακετοξυ-5-μεθοξυϊνδόλιο (384,8 mg, 1,894 mmol) και συνεχίστηκε η ανάδευση, υπό τις ίδιες συνθήκες, για άλλα 5 min. Ακολούθως, προστέθηκε Na_2CO_3 (276,0 mg, 2,604 mmol) και συνεχίστηκε η ανάδευση, υπό τις ίδιες συνθήκες, για άλλες 3 h (αναλογία ισατίνης:ινδόλιο: Na_2CO_3 1:0,8:1,1). Μετά από το πέρας των 3 h, προστέθηκε μίγμα $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ 50/50 και το ίζημα το οποίο σχηματίστηκε διηθήθηκε και εκπλύθηκε με μίγμα $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50). Ακολούθησε εκτενής έκπλυση με H_2O και καλή ξήρανση. Παραλήφθηκαν 670,1 mg ως μωβ κρυσταλλική σκόνη, με απόδοση 95,8 %.



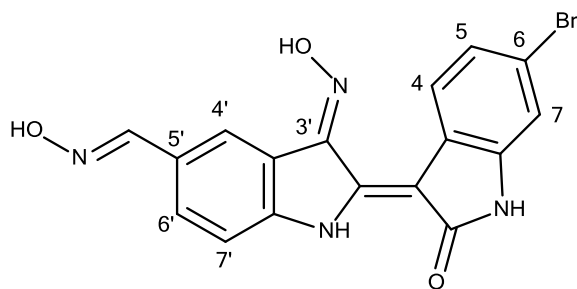
M.T: $\text{C}_{17}\text{H}_9\text{BrN}_2\text{O}_3$

M.B: 369,169

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm, J σε Hz): 11.47 (1H, s, N'-H), 11.11 (1H, s, N-H), 9.91 (1H, s, CHO), 8.70 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-4), 8.18 (1H, brs, H-4'), 8.08 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-6'), 7.57 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-7'), 7.25 (1H, dd, $J = 8.6, 1.6$ Hz, H-5), 7.06 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-7).

3.3.2.δ) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-5'-φορμυλοϊντιρουμπινο-3'-οξίμη

Σε διάλυμα της ιντιρουμπίνης (670,1 mg, 1,815 mmol) σε πυριδίνη (80 ml) προστέθηκε υδροχλωρική υδροξυλαμίνη (1892 mg, 27,227 mmol) και το μίγμα αναδεύτηκε για 2 h στους 130 °C (αναλογία ιντιρουμπίνης:υδροξυλαμίνης 1:15). Ακολούθησε προσθήκη 150 mL H_2O , διήθηση, καλή έκπλυση διαδοχικά με H_2O και ξήρανση. Το προϊόν (718,6 mg, 99,2 %) παραλήφθηκε ως κόκκινη κρυσταλλική σκόνη.



[17]

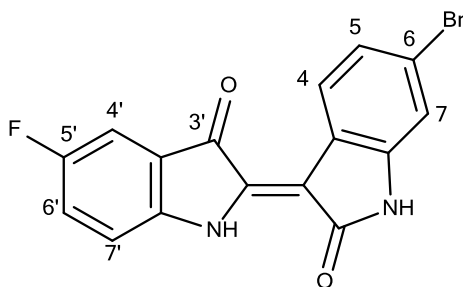
M. T: $C_{17}H_{11}BrN_4O_3$

M. B: 399,198

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm, J σε Hz): 12.09 (1H, brs, NOH), 11.87 (1H, s, N'-H), 11.10 (1H, s, CHNOH), 10.93 (1H, s, N-H), 8.59 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, H-4), 8.52 (1H, s, H-4'), 8.18 (1H, s, CHNOH), 7.66 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-6'), 7.48 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-7'), 7.14 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, H-5), 7.07 (1H, s, H-7).

3.3.2.ε) (2'Z)-6-βρωμο-5'-φθοροϊντιρουμπίνη

Άνυδρη CH_3OH (20 mL) αναδεύτηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και υπό ατμόσφαιρα αργού για 20 min. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 6-βρωμοϊσατίνη (146,4 mg, 0,6477 mmol) και 3-ακετοξυ-5-φθοροϊνδόλιο (100,1 mg, 0,5182 mmol) και συνεχίστηκε η ανάδευση, υπό τις ίδιες συνθήκες, για άλλα 5 min. Ακολούθως, προστέθηκε Na_2CO_3 (75,5 mg, 0,7125 mmol) και συνεχίστηκε η ανάδευση, υπό τις ίδιες συνθήκες, για άλλες 3 h (αναλογία ισατίνης:ινδολίου: Na_2CO_3 1:0,8:1,1). Μετά από το πέρας των 3 h, προστέθηκε μίγμα $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ 50/50 και το ίζημα το οποίο σχηματίστηκε διηθήθηκε και εκπλύθηκε με με $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50). Ακολούθησε εκτενής έκπλυση με H_2O και καλή ξήρανση. Παραλήφθηκαν 144,8 mg ως μωβ κρυσταλλική σκόνη, με απόδοση 77,8 %.



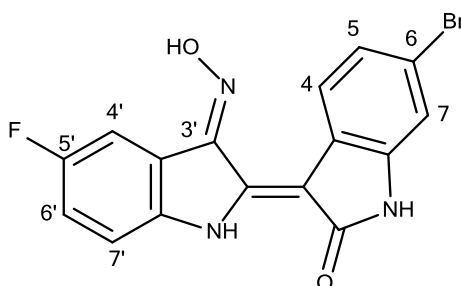
M. T: $C_{16}H_8BrFN_2O_2$

M. B: 359,149

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm, J σε Hz): 11.73 (1H, s, N'-H), 10.80 (1H, s, N-H), 8.53 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-4), 7.82 (1H, s, H-4'), 7.35 (1H, d, $J = 8.9, 1.6$ Hz, H-7'), 7.08-7.00 (3H, m, H-6', H-5, H-7).

3.3.2.στ) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-5'-φθοροϊντιρουμπινο-3'-οξιμη

Σε διάλυμα της ιντιρουμπίνης (144,8 mg, 0,4032 mmol) σε πυριδίνη (40 mL) προστέθηκε υδροχλωρική υδροξυλαμίνη (280,2 mg, 4,0318 mmol) και το μίγμα αναδεύτηκε για 2 h στους 130 °C. Ακολούθησε προσθήκη 100 mL H_2O , διήθηση, καλή έκπλυση διαδοχικά με H_2O και ξήρανση. Το προϊόν (131,5 mg, 87,2 %) παραλήφθηκε ως κόκκινη κρυσταλλική σκόνη.



[18]

M.T: $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{BrFN}_3\text{O}_2$

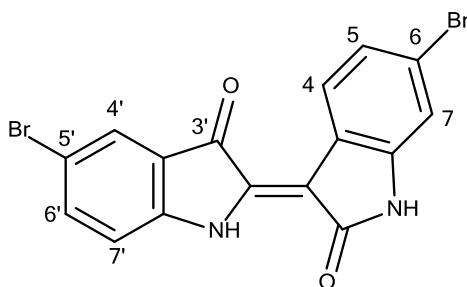
M.B: 374,164

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm, J σε Hz): 13.85 (1H, brs, NOH), 11.77 (1H, s, N'-H), 10.85 (1H, s, N-H), 8.52 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-4), 7.96 (1H, dd, $J = 8.6, 2.5$ Hz, H-4'), 7.45 (1H, dd, $J = 8.8/4.5$ Hz, H-7'), 7.29 (1H, td, $J = 8.8/2.5$ Hz, H-6'), 7.09 (1H, dd, $J = 8.4, 2.0$ Hz, H-5), 7.02 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-7).

3.3.2.ζ) (2'Z)-6-βρωμο-5'-βρωμοϊντιρουμπίνη

Άνυδρη CH_3OH (mL) αναδεύτηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και υπό ατμόσφαιρα αργού για 20 min. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 6-βρωμοϊσατίνη (200,4 mg, 0,8865 mmol) και 3-ακετοξυ-5-μεθοξυϊνδολίο (180,2 mg, 0,7092 mmol) και συνεχίστηκε η ανάδευση, υπό τις ίδιες συνθήκες, για άλλα 5 min. Ακολούθως, προστέθηκε Na_2CO_3 (103,4 mg, 0,9752 mmol) και συνεχίστηκε η ανάδευση, υπό τις ίδιες συνθήκες, για άλλες 3 h (αναλογία ισατίνης:ινδολίου: Na_2CO_3 1:0,8:1,1). Μετά από το πέρας των 3 h, προστέθηκε μίγμα $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{OH}$ 50/50) και το ίζημα το οποίο σχηματίστηκε διηθήθηκε και εκπλύθηκε με μίγμα $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50).

Ακολούθησε εκτενής έκπλυση με H₂O και καλή ξήρανση. Παραλήφθησαν 203,2 mg ως μωβ κρυσταλλική σκόνη, με απόδοση 68,2 %.



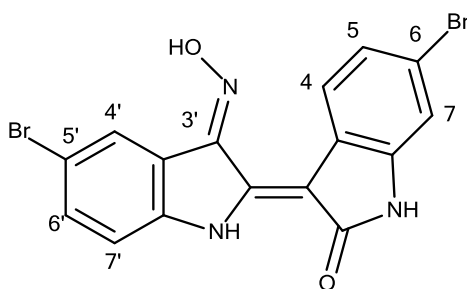
M.T: C₁₆H₈Br₂N₂O₂

M.B: 420,055

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz, δ ppm, J σε Hz): 11.83 (1H, s, N-H'), 10.86 (1H, s, N-H), 8.54 (1H, d, J=8.1 Hz, H-4), 8.34 (1H, s, H-4'), 7.56 (1H, d, J=7.8 Hz, H-6'), 7.43 (1H, d, J=7.8 Hz, H-7'), 7.09 (1H, d, J=8.1 Hz, H-5), 7.03 (1H, s, H-7).

3.3.2.η) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-5'-βρωμοϊντιρουμπινο-3'-οξίμη

Σε διάλυμα της ιντιρουμπίνης (203,2 mg, 0,4837 mmol) σε πυριδίνη (60 mL) προστέθηκε υδροχλωρική υδροξυλαμίνη (336,2 mg, 4,837 mmol) και το μίγμα αναδεύτηκε για 2 h στους 130 °C. Ακολούθησε προσθήκη 150 mL H₂O, διήθηση, καλή έκπλυση με H₂O και ξήρανση. Το προϊόν (151,2 mg, 71,8 %) παραλήφθηκε ως κόκκινη κρυσταλλική σκόνη.



[19]

M.T: C₁₆H₉Br₂N₃O₂

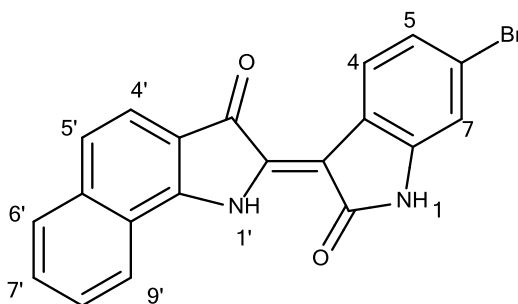
M.B: 435,070

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz, δ ppm, J σε Hz): 14.04 (1H, brs, NOH), 11.69 (1H, s, N'-H), 10.86 (1H, s, N-H), 8.83 (1H, s, H-4'), 8.49 (1H, d, J= 8.2 Hz, H-4), 8.29 (1H, s, H-), 7.99 (1H, d, J= 7.0 Hz, H-6'), 7.56 (1H, d, J= 7.0 Hz, H-7'), 7.34 (1H, d, J= 8.2 Hz, H-5), 7.09 (1H, s, H-7).

3.4) Σύνθεση παραγώγων με συζευγμένο επιπλέον βενζολικό δακτύλιο δομής βενζο[*g*]ινδολίου

3.4.1) 6-βρωμο-βενζο[*g*]ιντιρουμπίνη

CH₃OH (10 mL) αναδεύτηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και υπό ατμόσφαιρα αργού για 20 min. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 6-βρωμοϊσατίνη (63,1 mg, 0,2791 mmol) και 3-ακετοξυ-5-μεθοξυϊνδολίο (50,3 mg, 0,2233 mmol) και συνεχίστηκε η ανάδευση, υπό τις ίδιες συνθήκες, για άλλα 5 min. Ακολούθως, προστέθηκε Na₂CO₃ (32,5 mg, 0,3071 mmol) και συνεχίστηκε η ανάδευση, υπό τις ίδιες συνθήκες, για άλλες 3 h (αναλογία ισατίνης:ινδολίου:Na₂CO₃ 1:0,8:1,1). Μετά από το πέρας των 3 h, προστέθηκε μίγμα H₂O:CH₃OH 50/50 και το ίζημα το οποίο σχηματίστηκε διηθήθηκε και εκπλύθηκε με μίγμα H₂O/CH₃OH (50/50). Ακολούθησε εκτενής έκπλυση με H₂O και καλή ξήρανση. Παραλήφθηκαν 60,4 mg ως μωβ κρυσταλλική σκόνη, με απόδοση 69,1 %.



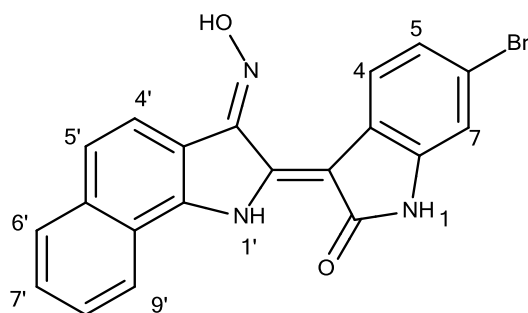
M. T.: C₂₀H₁₁BrN₂O₂

M. B.: 391,218

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz, δ ppm, *J* σε Hz): 11.23 (1H, s, N'-H), 11.05 (1H, s, N-H), 8.77 (1H, d, *J*=8,2 Hz, H-4), 8.65 (1H, d, *J*=8.1 Hz, H-4'), 8.30 (1H, d, *J*=8.6 Hz, H-9'), 8.02 (1H, t, *J*=8.6 Hz, H-6'), 7.78-7.64 (2H, m, H-7', H-8'), 7.54 (1H, d, *J*=8.1 Hz, H-5'), 7.29 (1H, d, *J*=8,2 Hz, H-5), 7.12 (1H, s, H-7).

3.4.2) (2'*Z*, 3'*E*)-6-βρωμο-βενζο[*g*]ιντιρουμπινο-3'-οξίμη

Σε διάλυμα της ιντιρουμπίνης (60,4 mg, 0,1544 mmol) σε πυριδίνη (15 mL) προστέθηκε υδροχλωρική υδροξυλαμίνη (107,3 mg, 1,5438 mmol) και το μίγμα αναδεύτηκε για 2 h στους 130 °C. Ακολούθησε προσθήκη 30 mL H₂O, διήθηση, καλή έκπλυση με H₂O και ξήρανση. Το προϊόν (53,9 mg, 85,9 %) παραλήφθηκε ως κόκκινη κρυσταλλική σκόνη.



[21]

M. T.: $C_{20}H_{12}BrN_3O_2$

M. B.: 406,232

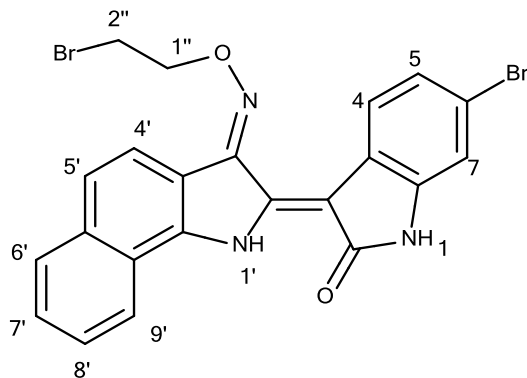
Exact mass: 405,0113

1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm, J σε Hz): 13.80 (1H, brs, NOH), 12.32 (1H, s, N'-H), 11.08 (1H, s, N-H), 8.60 (1H, d, $J=8,3$ Hz, H-4), 8.32 (1H, d, $J=8,5$ Hz, H-4'), 8.03 (2H, m, H-9' και H-6'), 7.67 (2H, m, H-8' και H-7'), 7.61 (1H, d, $J=8,5$ Hz, H-5'), 7.17 (1H, d, $J=8,3$ Hz, H-5), 7.11 (1H, s, H-7).

ESI-MS m/z: 404.0034, 406.0011 (M-H)⁻

3.4.3) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-βενζο[g]ιντιρουμπινο-3'-[O-(2-βρωμοαιθυλ)]οξίμη

Σε διάλυμα της οξίμης (21,8 mg, 0,05366 mmol) σε άνυδρο DMF (0,3823 mL προστέθηκαν Et₃N (6,371 μl) και 1,2-διβρωμοαιθάνιο (9,25 μl) και το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, υπό ατμόφαιρα αργού, για 48 h. Στη συνέχεια, ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση (σε αντλία υψηλού κενού για την απομάκρυνση του DMF). Το στερεό υπόλειμμα αναμείχθηκε με H₂O, διηθήθηκε και εκπλύθηκε καλά με H₂O. Ακολούθησε ξήρανση υπό κενό, μετά από την οποία παραλήφθηκε το προϊόν (27,2 mg, 98,8 %), ως μπροντώ κρυσταλλική σκόνη.



[22]

M.T.: C₂₂H₁₅BrN₃O₂

M.B.: 513,181

EXACT MASS: 510,9531

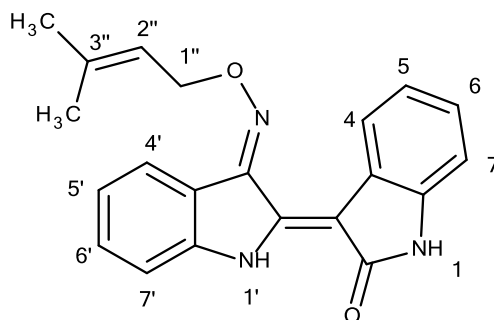
¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz, δ ppm, *J* σε Hz): 12.22 (1H, s, N'-H), 11.19 (1H, s, N-H), 9.165 (1H, d, *J*=7.0 Hz, H-4), 8.545 (1H, d, *J*=8,6 Hz, H-4'), 8.285 (1H, d, *J*=7.0 Hz, H-9'), 8.025 (2H, m, H-7', H-8'), 7.655 (1H, d, *J*=7.0 Hz, H-6'), 7.62 (1H, d, *J*=8,6 Hz, H-5'), 7.235 (1H, d, *J*=7.0 Hz, H-5), 7.11 (1H, s, H-7), 4.975 (2H, t, *J*=5,1 Hz, H-1''), 4.025 (2H, t, *J*=5,5 Hz, H-2'')

3.5) Σύνθεση ισοπρενικών παραγώγων ιντιρουμπινο-3'-οξίμης

Τα ισοπρενικά παράγωγα σχηματίστηκαν με επίδραση επί των αντίστοιχων οξιμών, 1 ισοδύναμο πρενυλοβρωμιδίου, γερανυλοβρωμιδίου ή φαρνεσυλοβρωμιδίου και 2 ισοδύναμων K₂CO₃. Η αντίδραση έγινε υπό αδρανή ατμοσφαιρα σε θερμοκρασία 40°C κι όχι υπό reflux για την αποφυγή περαιτέρω υποκατάστασης του μορίου στους αρωματικούς πυρήνες. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε ακετόνη αφού κατέστη άνυδρη με τη βοήθεια μοριακών κόσκινων 3A. Η πορεία της αντίδρασης ελεγχόταν με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Με ορισμένα παράγωγα οξίμης με τα οποία η αντίδραση εξελισσόταν ιδιαίτερος αργά, χρησιμοποιήθηκαν παραπάνω ισοδύναμα του βρωμιδίου και του K₂CO₃ ή και θέρμανση 60°C (reflux).

3.5.1) (2'Z, 3'E)-ιντιρουμπινο-3'-(O-πρενυλ)οξίμη

Σε διάλυμα της οξίμης (43,7 mg, 0,1576 mmol) σε ακετόνη (25 ml) που κατέστη άνυδρη με τη βοήθεια μοριακών κόσκινων 3A, προστέθηκαν ένα ισοδύναμο πρενυλοβρωμιδίου (18,4 μl) και δύο ισοδύναμα K₂CO₃ (43,56 mg) και το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία 50°C, υπό ατμόφαιρα αργού, για 24 h. Στη συνέχεια, η ακετόνη εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό υπόλειμμα αναμείχθηκε με H₂O, διηθήθηκε για την απομάκρυνση του K₂CO₃ και εκπλύθηκε καλά με H₂O. Ακολούθησε ξήρανση υπό κενό, μετά από την οποία παραλήφθηκε το προϊόν (53,35 mg, 98,0 %), ως μπορντώ κρυσταλλική σκόνη.



[23]

M.T.: $C_{21}H_{19}N_3O_2$

M.B.: 345.3945

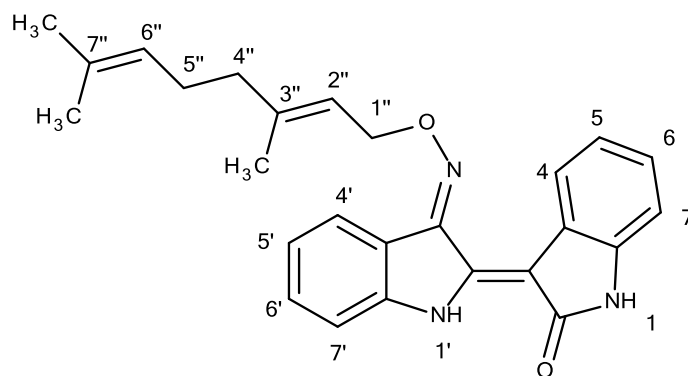
Exact mass: 345.1477

1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm, J σε Hz): 11.70 (1H, s, N'-H), 10.78 (1H, s, N-H), 8.61 (1H, d, $J=7.7$ Hz, H-4), 8.13 (1H, d, $J=6.9$ Hz, H-4'), 7.43 (2H, m, H-6', H-7') 7.15 (1H, t, $J=7.7$ Hz, H-6), 7.04 (1H, t, $J=6.9$ Hz, H-5'), 6.97 (1H, t, $J=7.7$ Hz, H-5), 6.90 (1H, d, $J=7.7$ Hz, H-7), 5.63 (1H, t, $J=6.5$ Hz, H-2''), 5.11 (2H, d, $J=6.5$ Hz, H-1''), 1.85 (3H, s, 3''-CH₃), 1.82 (3H, s, 3''-CH₃).

ESI-MS m/z: 344.1403 (M-H)⁻

3.5.2) (2'Z, 3'E)-ιντιρουμπινο-3'-(O-γερανυλ)οξίμη

Σε διάλυμα της οξίμης (42,0 mg, 0,1515 mmol) σε ακετόνη (25 ml) που κατέστη άνυδρη με τη βοήθεια μοριακών κόσκινων 3A, προστέθηκαν ένα ισοδύναμο γερανυλοβρωμιδίου (28,9 ml) και δύο ισοδύναμα K_2CO_3 (41,87 mg) και το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία 50°C, υπό ατμόφαιρα αργού, για 24 h. Στη συνέχεια, η ακετόνη εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό υπόλειμμα αναμείχθηκε με H_2O , διηθήθηκε για την απομάκρυνση του K_2CO_3 και εκπλύθηκε καλά με H_2O . Ακολούθησε ξήρανση υπό κενό, μετά από την οποία παραλήφθηκε το προϊόν (60,63 mg, 96,8 %), ως μπορντώ κρυσταλλική σκόνη.



[24]

M.T.: $C_{26}H_{27}N_3O_2$

M.B.: 413,5115

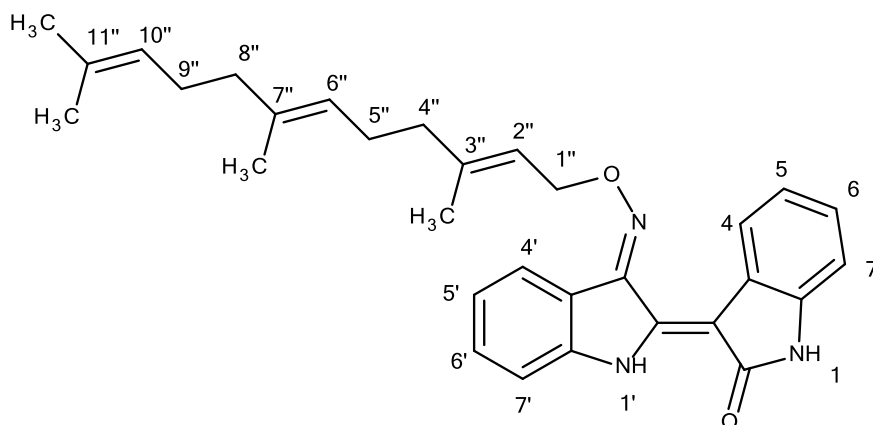
Exact mass: 413.2103

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm, J σε Hz): 11.70 (1H, s, N'-H), 10.77 (1H, s, N-H), 8.61 (1H, d, $J=7.7$ Hz, H-4), 8.13 (1H, d, $J=6.9$ Hz, H-4'), 7.44 (2H, m, H-6', H-7') 7.15 (1H, t, $J=7.7$ Hz, H-6), 7.03 (1H, t, $J=6.9$ Hz, H-5'), 6.96 (1H, t, $J=7.7$ Hz, H-5), 6.90 (1H, d, $J=7.7$ Hz, H-7), 5.63 (1H, t, $J=6.5$ Hz, H-2''), 5.12 (2H, d, $J=6.5$ Hz, H-1''), 5.07 (1H, brs, H-6''), 2.11 (4H, s, H-5'', H-4''), 1.85 (3H, s, 3''-CH₃), 1.57 (3H, s, 7''-CH₃), 1.52 (3H, s, 7''-CH₃).

ESI-MS m/z : 412.2034 (M-H)⁻

3.5.3) (2'Z, 3'E)-ιντιρουμπινο-3'-(O-φαρνεσυλ)οξίμη

Σε διάλυμα της οξίμης (41,2 mg, 0,1486 mmol) σε ακετόνη (25 ml) που κατέστη άνυδρη με τη βοήθεια μοριακών κόσκινων 3A, προστέθηκαν ένα ισοδύναμο φαρνεσυλοβρωμιδίου (40,3 μl) και δύο ισοδύναμα K_2CO_3 (41,07 mg) και το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία 50°C, υπό ατμόφαιρα αργού, για 24 h. Στη συνέχεια, η ακετόνη εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό υπόλειμμα αναμείχθηκε με H_2O , διηθήθηκε για την απομάκρυνση του K_2CO_3 και εκπλύθηκε καλά με H_2O . Ακολούθησε ξήρανση υπό κενό, μετά από την οποία παραλήφθηκε το προϊόν (69,85 mg, 97,6 %), ως μπορντώ κρυσταλλική σκόνη.



[25]

M.T.: $C_{31}H_{35}N_3O_2$

M.B.: 481.6285

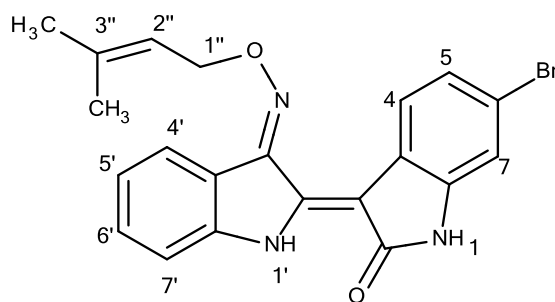
Exact mass: 481.2729

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm, J σε Hz): 11.70 (1H, s, N'-H), 10.77 (1H, s, N-H), 8.60 (1H, d, $J=7.7$ Hz, H-4), 8.13 (1H, d, $J=6.9$ Hz, H-4'), 7.43 (2H, m, H-6', H-7') 7.14 (1H, t, $J=7.7$ Hz, H-6), 7.02 (1H, t, $J=6.9$ Hz, H-5'), 6.95 (1H, t, $J=7.7$ Hz, H-5), 6.90 (1H, d, $J=7.7$ Hz, H-7), 5.62 (1H, t, $J=6.5$ Hz, H-2''), 5.12 (2H, d, $J=6.5$ Hz, H-1''), 5.07 (1H, brs, H-6''), 4.96 (1H, t, $J=5.5$ Hz, H-10''), 2.11 (4H, s, H-5'', H-4''), 1.91 (4H, s, H-9'', H-8''), 1.85 (3H, s, 3''-CH₃), 1.59 (3H, s, 7''-CH₃), 1.51 (3H, s, 11''-CH₃), 1.47 (3H, s, 11''-CH₃).

ESI-MS m/z : 480.2641 (M-H)⁻

3.5.4) (2'Z, 3'E)-6-βρωμοϊντιρουμπινο-3'-(O-πρενυλ)οξίμη

Σε διάλυμα της οξίμης (60 mg, 0,1685 mmol) σε ακετόνη (25 ml) που κατέστη άνυδρη με τη βοήθεια μοριακών κόσκινων 3A, προστέθηκαν ένα ισοδύναμο πρενυλοβρωμιδίου (19,62 ml) και δύο ισοδύναμα K₂CO₃ (46,59 mg) και το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, υπό ατμόφαιρα αργού, για 24 h . Στη συνέχεια, η ακετόνη εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό υπόλειμμα αναμείχθηκε με H₂O, διηθήθηκε για την απομάκρυνση του K₂CO₃ και εκπλύθηκε καλά με H₂O. Ακολούθησε ξήρανση υπό κενό, μετά από την οποία παραλήφθηκε το προϊόν (67,8 mg, 94,8 %), ως μπορντώ κρυσταλλική σκόνη.



[26]

M. T.: $C_{21}H_{18}BrN_3O_2$

M. B.: 424,291

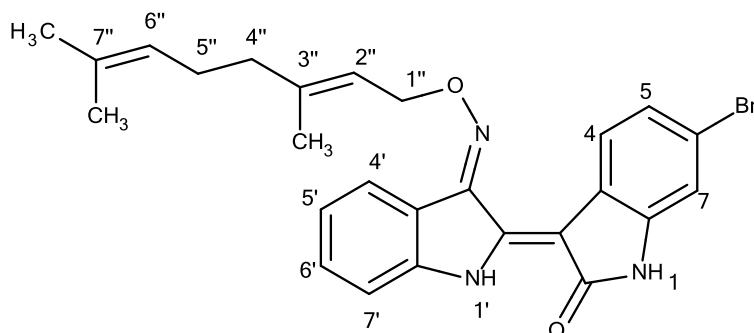
Exact mass: 423,0582

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm, J σε Hz): 11.72 (1H, s, N'-H), 10.89 (1H, s, N-H), 8.535 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-4), 8.125 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-4'), 7.45 (2H, m, H-6', H-7'), 7.125 (1H, dd, $J=8.5/1.8$ Hz, H-5), 7.04 (2H, m, H-5', H-7), 5.63 (1H, t, $J=6.5$ Hz, H-2''), 5.12 (2H, d, $J=6.5$ Hz, H-1''), 1.85 (3H, s, 3''-CH₃), 1.83 (3H, s, 3''-CH₃)

ESI-MS m/z: 422.0507, 424.0485 (M-H)⁻

3.5.5) (2'Z, 3'E)-6-βρωμοϊντιρουμπινο-3'-(O-γερανυλ)οξίμη

Σε διάλυμα της οξίμης (60 mg, 0,1685 mmol) σε ακετόνη (25 ml) που κατέστη άνυδρη με τη βοήθεια μοριακών κόσκινων 3A, προστέθηκαν ένα ισοδύναμο γερανυλοβρωμιδίου (32,11 ml) και δύο ισοδύναμα K_2CO_3 (46,6 mg) και το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, υπό ατμόφαιρα αργού, για 48 h. Στη συνέχεια, η ακετόνη εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό υπόλειμμα αναμειχθηκε με H_2O , διηθήθηκε για την απομάκρυνση του K_2CO_3 και εκπλύθηκε καλά με H_2O . Ακολούθησε ξήρανση υπό κενό, μετά από την οποία παραλήφθηκε το προϊόν (80 mg, 96,4%), ως μπορντώ κρυσταλλική σκόνη.



[27]

M.T.: C₂₆H₂₆BrN₃O₂

M.B.: 492,408

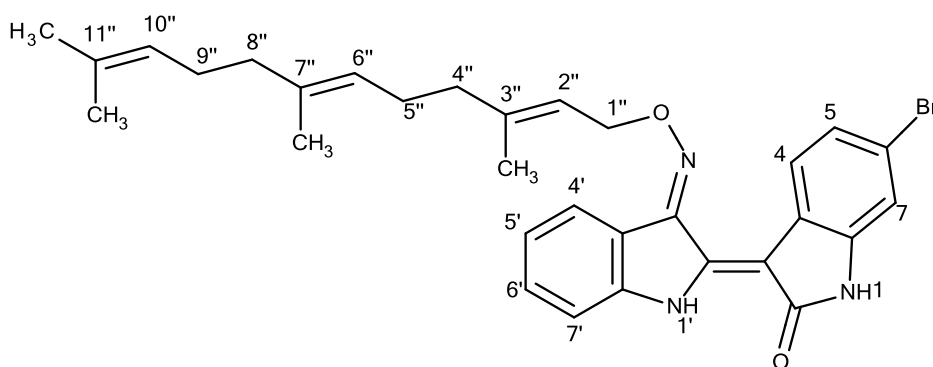
Exact mass: 491,1208

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz, δ ppm, J σε Hz): 11.71 (1H, s, N'-H), 10.89 (1H, s, N-H), 8.54 (1H, d, J=8.6 Hz, H-4), 8.14 (1H, d, J=7.9 Hz, H-4'), 7.45 (2H, m, H-6', H-7'), 7.12 (1H, dd, J=8.6/2.0 Hz, H-5), 7.05 (2H, m, H-7, H-5'), 5.62 (1H, t, J=6.3 Hz, H-2''), 5.13 (2H, d, J=6,3 Hz, H-1''), 5.07 (1H, brs, H-6''), 2.1 (4H, s, H-5'', H-4''), 1.83 (3H, s, 3''-CH₃), 1.52 (6H, s, 7''-CH₃)

ESI-MS m/z: 490.1142, 492.1120 (M-H)⁻

3.5.6) (2'Z, 3'E)-6-βρωμοϊντιρουμπινο-3'-(O-φαρνεσυλ)οξίμη

Σε διάλυμα της οξίμης (37,2 mg, 0,1045 mmol) σε ακετόνη (25 ml) που κατέστη άνυδρη με τη βοήθεια μοριακών κόσκινων 3A, προστέθηκαν ένα ισοδύναμο φαρνεσυλοβρωμιδίου (28,3 μl) και δύο ισοδύναμα K₂CO₃ (28,88 mg) και το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, υπό ατμόφαιρα αργού, για 48 h . Στη συνέχεια, η ακετόνη εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό υπόλειμμα αναμείχθηκε με H₂O, διηθήθηκε για την απομάκρυνση του K₂CO₃ και εκπλύθηκε καλά με H₂O. Ακολούθησε ξήρανση υπό κενό, μετά από την οποία παραλήφθηκε το προϊόν (38,9 mg, 66,45 %), ως μπροντώ κρυσταλλική σκόνη.



[28]

M.T.: C₃₁H₃₄BrN₃O₂

M.B.: 560.525

Exact mass: 559.1834

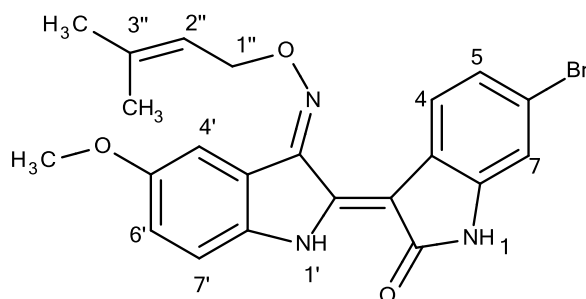
¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz, δ ppm, J σε Hz): 11.71 (1H, s, N'-H), 10.90 (1H, s, N-H), 8.53 (1H, d, J=8.5 Hz, H-4), 8.12 (1H, d, J=7.4 Hz, H-4'),

7.44 (2H, m, H-6', H-7'), 7.10 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-5), 7.04 (2H, m, H-7, H-5'), 5.62 (1H, t, $J=6.9$ Hz, H-2''), 5.13 (2H, d, $J=6.9$ Hz, H-1'), 5.06 (1H, brs, H-6''), 4.95 (1H, t, $J=7.1$ Hz, H-10''), 2.11 (4H, s, H-5'', H-4''), 1.89 (2H, m, H-9''), 1.84 (5H, m, H-8'', 3''-CH₃), 1.59 (3H, s, 7''-CH₃), 1.51 (3H, s, 11''-CH₃), 1.47 (3H, s, 11''-CH₃).

ESI-MS m/z: 558.1764, 560.1742 (M-H)⁻

3.5.7) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-5'-μεθοξυϊντιρουμπινο-3'-(O-πρενυλ)οξίμη

Σε διάλυμα της οξίμης (34,5 mg, 0,08933 mmol) σε ακετόνη (10 ml) που κατέστη άνυδρη με τη βοήθεια μοριακών κόσκινων 3A, προστέθηκαν ένα ισοδύναμο πρενυλοβρωμιδίου (10,41 μl) και δύο ισοδύναμα K₂CO₃ (24,7 mg) και το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, υπό ατμόφαιρα αργού, για 48 h. Στη συνέχεια, η ακετόνη εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό υπόλειμμα αναμείχθηκε με H₂O, διηθήθηκε για την απομάκρυνση του K₂CO₃ και εκπλύθηκε καλά με H₂O. Ακολούθησε ξήρανση υπό κενό. Το στερεό υπόλειμμα υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία στήλης υπό χαμηλή πίεση (στατική φάση: silica gel flash) με διαλύτη έκλουσης CH₂Cl₂. Από το χρωματογραφικό διαχωρισμό απομονώθηκε το προϊόν (38,6 mg, 95,1 %).



[29]

M. T.: C₂₂H₂₀BrN₃O₃

M. B.: 454,317

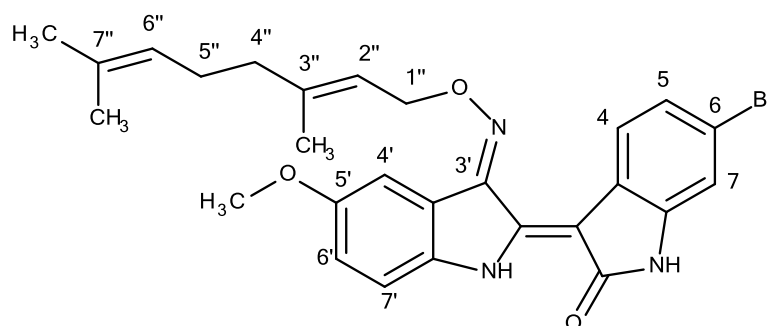
Exact mass: 453,0688

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz, δ ppm, J σε Hz): 11.61 (1H, s, N'-H), 10.81 (1H, s, N-H), 8.51 (1H, d, $J=8.6$ Hz, H-4), 7.69 (1H, s, H-4'), 7.41 (1H, d, $J=8.6$ Hz, H-7'), 7.13 (2H, m, H-6', H-5), 7.03 (1H, s, H-7), 5.66 (1H, t, $J=6.3$ Hz, H-2''), 5.13 (2H, d, $J=6.3$ Hz, H-1''), 3.78 (3H, s, OCH₃), 1.87 (6H, 2x d, 3''-CH₃)

ESI-MS m/z: 452.0612, 454.0592 (M-H)⁻

3.5.8) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-5'-μεθοξυϊντιρουμπινο-3'-(O-γερανυλ)οξίμη

Σε διάλυμα της οξίμης (61,7 mg, 0,1598 mmol) σε ακετόνη (25 ml) που κατέστη άνυδρη με τη βοήθεια μοριακών κόσκινων 3A, προστέθηκαν ένα ισοδύναμο γερανυλοβρωμιδίου (30,43 μl) και δύο ισοδύναμα K₂CO₃ (44,2 mg) και το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία 35°C, υπό ατμόφαιρα αργού, για 24 h. Στη συνέχεια, η ακετόνη εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό υπόλειμμα αναμείχθηκε με H₂O, διηθήθηκε για την απομάκρυνση του K₂CO₃ και εκπλύθηκε καλά με H₂O. Ακολούθησε ξήρανση υπό κενό, μετά από την οποία παραλήφθηκε το προϊόν (62,9 mg, 75,3 %), ως μπορντώ κρυσταλλική σκόνη.



[30]

M.T.: C₂₇H₂₈BrN₃O₃

M.B.: 522,434

Exact mass: 521,1314

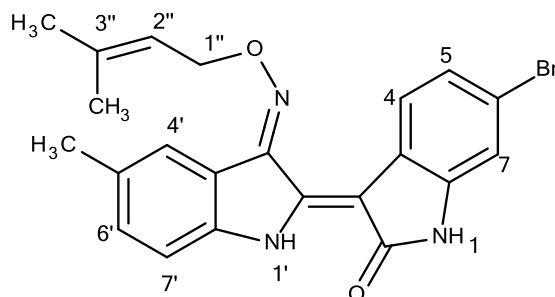
¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz, δ ppm, J σε Hz): 11.63 (1H, s, N-H'), 10.88 (1H, s, N-H), 8.49 (1H, d, J=8.5 Hz, H-4), 7.70 (1H, s, H-4'), 7.38 (2H, d, J=8.3 Hz, H-7', H-6'), 7.09 (1H, d, J=8.5 Hz, H-5), 7.03 (1H, s, H-7), 5.64 (1H, t, J=6.3 Hz, H-2''), 5.14 (2H, d, J=6.3 Hz, H-1''), 5.06 (1H, brs, H-6''), 2.10 (4H, s, H-5'', H-4''), 1.84 (3H, s, 3''-CH₃), 1.56 (3H, s, 7''-CH₃), 1.52 (3H, s, 7''-CH₃).

ESI-MS m/z: 522.1375, 524.1353 (M+H)⁺

3.5.9) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-5'-μεθυλοϊντιρουμπινο-3'-(O-πρενυλ)οξίμη

Σε διάλυμα της οξίμης (31 mg, 0,1015 mmol) σε ακετόνη (35 ml) που κατέστη άνυδρη με τη βοήθεια μοριακών κόσκινων 3A, προστέθηκαν ένα ισοδύναμο πρενυλοβρωμιδίου (11,82 μl) και δύο ισοδύναμα K₂CO₃ (28,1 mg) και το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία 35°C, υπό ατμόφαιρα αργού, για 48 h. Στη συνέχεια, η ακετόνη εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό

υπόλειμμα αναμείχθηκε με H₂O, διηθήθηκε για την απομάκρυνση του K₂CO₃ και εκπλύθηκε καλά με H₂O. Ακολούθησε ξήρανση υπό κενό. Το στερεό υπόλειμμα υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία στήλης υπό χαμηλή πίεση (στατική φάση: silica gel flash) με διαλύτη έκλουσης CH₂Cl₂. Από το χρωματογραφικό διαχωρισμό απομονώθηκε το προϊόν (43,4 mg, 97,6 %) ως μπορντώ κρυσταλλική σκόνη.



[31]

M.T.: C₂₂H₂₀BrN₃O₂

M.B.: 438,317

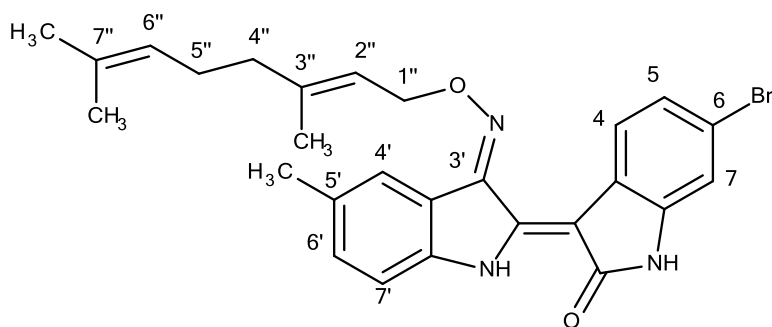
Exact mass: 437,0739

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz, δ ppm, *J* σε Hz): 11.61 (1H, s, N'-4), 10.81 (1H, s, N-H), 8.53 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-4), 7.96 (1H, s, H-4'), 7.34 (1H, d, *J*=7.8 Hz, H-6'), 7.27 (1H, d, *J*=7.8 Hz, H-7'), 7.11 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-5), 7.04 (1H, s, H-7), 5.65 (1H, t, *J*=6.3 Hz, H-2''), 5.14 (2H, d, *J*=6.3 Hz, H-1''), 2.33 (3H, s, 5'-CH₃), 1.85 (6H, s, 3''-CH₃)

ESI-MS m/z: 436.0666, 438.0644 (M-H)⁻

3.5.10) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-5'-μεθυλίντιρουμπινο-3'-(Ο-γερανυλ)οξίμη

Σε διάλυμα της οξίμης (60,7 mg, 0,1988 mmol) σε ακετόνη (25 ml) που κατέστη άνυδρη με τη βοήθεια μοριακών κόσκινων 3A, προστέθηκαν ένα ισοδύναμο γερανυλοβρωμιδίου (37,9 μl) και δύο ισοδύναμα K₂CO₃ (54,9 mg) και το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία 60°C (reflux), υπό ατμόφαιρα αργού, για 4 h. Στη συνέχεια, η ακετόνη εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό υπόλειμμα αναμείχθηκε με H₂O, διηθήθηκε για την απομάκρυνση του K₂CO₃ και εκπλύθηκε καλά με H₂O. Ακολούθησε ξήρανση υπό κενό, μετά από την οποία παραλήφθηκε το προϊόν (96,2 mg, 95,6 %), ως μπορντώ κρυσταλλική σκόνη.



[32]

M.T.: $C_{27}H_{28}BrN_3O_2$

M.B.: 506,434

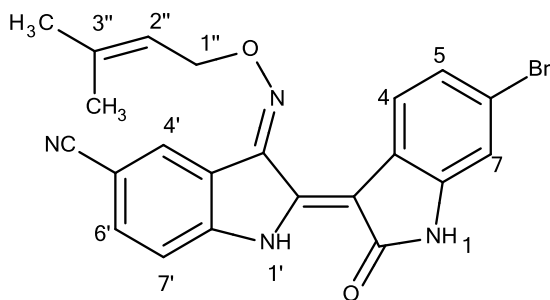
Exact mass: 505,1365

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm, J σε Hz): 11.66 (1H, s, N'-H), 10.88 (1H, s, N-H), 8.51 (1H, d, $J=7.9$ Hz, H-4), 7.96 (1H, s, H-4'), 7.32 (1H, d, $J=7.9$ Hz, H-7'), 7.26 (1H, d, $J=7.9$ Hz, H-6'), 7.08 (1H, d, $J=7.9$ Hz, H-5), 7.03 (1H, s, H-7), 5.62 (1H, t, $J=6.2$ Hz, H-2''), 5.13 (1H, d, $J=6.2$ Hz, H-1''), 5.06 (1H, brs, H-6''), 2.32 (3H, s, 5'-CH₃), 2.10 (4H, s, H-5'', H-4''), 1.84 (3H, s, 3''-CH₃), 1.55 (3H, s, 7''-CH₃), 1.52 (3H, s, 7''-CH₃).

ESI-MS m/z: 506.1434, 508.1412 (M+H)⁺

3.5.11) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-5'-κυανοϊντιρουμπινο-3'-(O-πρενυλ)οξίμη

Σε διάλυμα της οξίμης (40,7 mg, 0,1068 mmol) σε ακετόνη (25 ml) που κατέστη άνυδρη με τη βοήθεια μοριακών κόσκινων 3A, προστέθηκαν ένα ισοδύναμο πρενυλοβρωμιδίου (12,43 μl) και δύο ισοδύναμα K_2CO_3 (29,5 mg) και το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία 35°C, υπό ατμόφαιρα αργού, για 8 h. Στη συνέχεια, η ακετόνη εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό υπόλειμμα αναμείχθηκε με H_2O , διηθήθηκε για την απομάκρυνση του K_2CO_3 και εκπλύθηκε καλά με H_2O . Ακολούθησε ξήρανση υπό κενό, μετά από την οποία παραλήφθηκε το προϊόν (46,2 mg, 96,3 %), ως μπορντώ κρυσταλλική σκόνη.



[33]

M.T: C₂₂H₁₇BrN₄O₂

M.B: 449,300

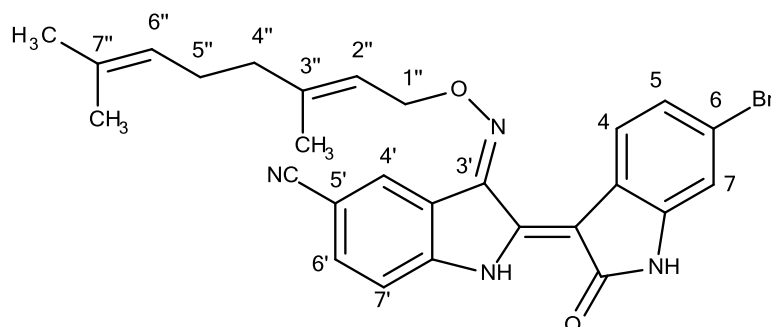
Exact mass: 448,0535

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz, δ ppm, *J* σε Hz): 11.96 (1H, s, N'-H), 11.00 (1H, s, N-H), 8.52 (1H, d, *J*=8.3 Hz, H-4), 8.46 (1H, s, H-4'), 7.89 (1H, d, *J*=8.2 Hz, H-7'), 7.62 (1H, d, *J*=8.2 Hz, H-6'), 7.13 (1H, d, *J*=8.3 Hz, H-5), 7.06 (1H, s, H-7), 5.64 (1H, t, *J*=5.8 Hz, H-2''), 5.16 (2H, d, *J*=5.8 Hz, H-1''), 1.86 (3H, s, 3''-CH₃), 1.82 (3H, s, 3''-CH₃).

ESI-MS m/z: 447.0446, 449.0424 (M-H)⁻

3.5.12) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-5'-κυανοϊντιρουμπινο-3'-(O-γερανυλ)οξίμη

Σε διάλυμα της οξίμης (40,3 mg, 0,1057 mmol) σε ακετόνη (25 ml) που κατέστη άνυδρη με τη βοήθεια μοριακών κόσκινων 3A, προστέθηκαν ένα ισοδύναμο γερανυλοβρωμιδίου (20,14 μl) και δύο ισοδύναμα K₂CO₃ (29,2 mg) και το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία 60°C (reflux) για 4 h. Στη συνέχεια, η ακετόνη εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό υπόλειμμα αναμείχθηκε με H₂O, διηθήθηκε για την απομάκρυνση του K₂CO₃ και εκπλύθηκε καλά με H₂O. Ακολούθησε ξήρανση υπό κενό. Το στερεό υπόλειμμα υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία στήλης υπό χαμηλή πίεση (στατική φάση: silica gel flash) με διαλύτη έκλουσης CH₂Cl₂. Από το χρωματογραφικό διαχωρισμό απομονώθηκε το προϊόν (51,7 mg, 94,5 %) ως μπορντώ κρυσταλλική σκόνη.



[34]

M.T: C₂₇H₂₅BrN₄O₂

M.B: 517,417

Exact mass: 516,1161

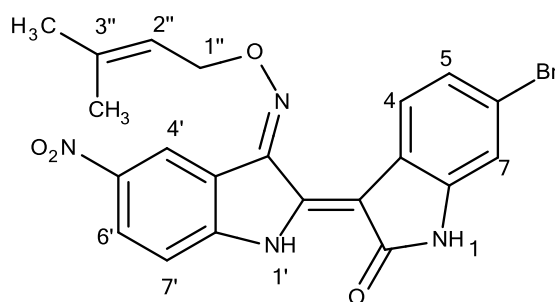
¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz, δ ppm, *J* σε Hz): 11.94 (1H, s, N'-H), 10.99 (1H, s, N-H), 8.50 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-4), 8.45 (1H, s, H-4'), 7.88 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-7'), 7.61 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-6'), 7.10 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-5),

7.04 (1H, s, H-7), 5.63 (1H, t, $J=6.5$ Hz, H-2''), 5.17 (2H, d, $J=6.5$ Hz, H-1''), 5.05 (1H, brs, H-6''), 2.10 (4H, s, H-5'', H-4''), 1.85 (3H, s, 3''-CH₃), 1.55 (3H, s, 7''-CH₃), 1.52 (3H, s, 7''-CH₃).

ESI-MS m/z: 515.1082, 517.1060 (M-H)⁻

3.5.13) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-5'-νιτροϊντιρουμπινο-3'-(O-πρενυλ)οξίμη

Σε διάλυμα της οξίμης (62,1 mg, 0,1548 mmol) σε ακετόνη (25 ml) που κατέστη άνυδρη με τη βοήθεια μοριακών κόσκινων 3A, προστέθηκαν ένα ισοδύναμο πρενυλοβρωμιδίου (18,02 μl) και δύο ισοδύναμα K₂CO₃ (42,8 mg) και το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία 35°C, υπό ατμόφαιρα αργού, για 6 h. Στη συνέχεια, η ακετόνη εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό υπόλειμμα αναμείχθηκε με H₂O, διηθήθηκε για την απομάκρυνση του K₂CO₃ και εκπλύθηκε καλά με H₂O. Ακολούθησε ξήρανση υπό κενό, μετά από την οποία παραλήφθηκε το προϊόν (54,9 mg, 75,6 %), ως μπροντώ κρυσταλλική σκόνη.



[35]

M.T: C₂₁H₁₇BrN₄O₄

M.B: 469,288

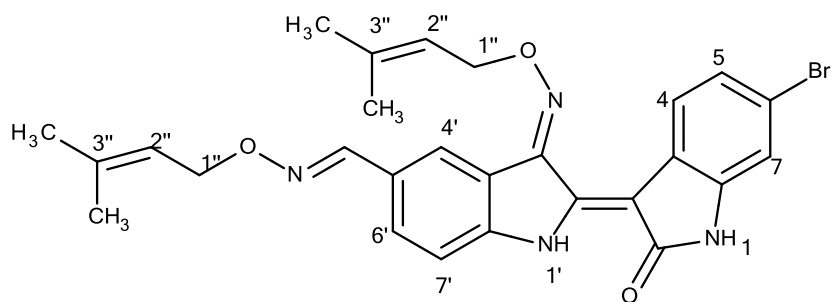
Exact mass: 468,0433

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz, δ ppm, J σε Hz): 12.06 (1H, s, N'-H), 11.01 (1H, s, N-H), 8.83 (1H, s, H-4'), 8.49 (1H, d, $J=8.2$ Hz, H-4), 8.34 (1H, d, $J=9.0$ Hz, H-6'), 7.61 (1H, d, $J=9.0$ Hz, H-7'), 7.12 (1H, d, $J=8.2$ Hz, H-5), 7.03 (1H, s, H-7), 5.63 (1H, t, $J=5.8$ Hz, H-2''), 5.17 (2H, d, $J=5.8$ Hz, H-1''), 1.85 (3H, s, 3''-CH₃), 1.81 (3H, s, 3''-CH₃)

ESI-MS m/z: 467.0360, 469.0339 (M-H)⁻

3.5.14) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-5'-νιτροϊντιρουμπινο-3'-(O-γερανυλ)οξίμη

Σε διάλυμα της οξίμης (62,2 mg, 0,1550 mmol) σε ακετόνη (25 ml) που κατέστη άνυδρη με τη βοήθεια μοριακών κόσκινων 3A, προστέθηκαν ένα



[37]

M.T: $C_{27}H_{27}BrN_4O_3$

M.B: 535,432

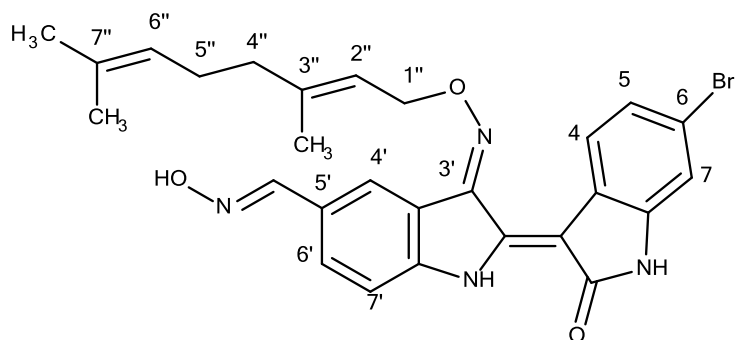
Exact mass: 534,1267

1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm, J σε Hz): 11.80 (1H, s, N'-H), 10.95 (1H, s, N-H), 8.48 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-4), 8.35 (1H, s, H-4'), 8.13 (1H, s, 5'-CHNO), 7.61 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-6'), 7.42 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-7'), 7.07 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-5), 7.01 (1H, s, H-7), 5.60 (2H, t, $J=6.7$ Hz, H-2''), 5.105 (4H, d, $J=6.7$ Hz, H-1''), 1.83 (6H, s, 3''-CH₃), 1.80 (6H, s, 3''-CH₃)

ESI-MS m/z: 533.1192, 535.1170 (M-H)⁻

3.5.16) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-5'-φορμυλοϊντιρουμπινο-3'-(Ο-γερανυλ)οξίμη

Σε διάλυμα της οξίμης (62,5 mg, 0,1565 mmol) σε ακετόνη (30 ml) που κατέστη άνυδρη με τη βοήθεια μοριακών κόσκινων 3A, προστέθηκαν δύο ισοδύναμα γερανυλοβρωμιδίου (59,7 μl) και τέσσερα ισοδύναμα K_2CO_3 (43,3 mg) και το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία 48°C, υπό ατμόφαιρα αργού, για 6 h. Στη συνέχεια, η ακετόνη εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό υπόλειμμα αναμείχθηκε με H_2O , διηθήθηκε για την απομάκρυνση του K_2CO_3 και εκπλύθηκε καλά με H_2O . Ακολούθησε ξήρανση υπό κενό, μετά από την οποία παραλήφθηκε το προϊόν (65,3 mg, 62,1 %), ως μπορντώ κρυσταλλική σκόνη.



[38]

M.T: $C_{27}H_{27}BrN_4O_3$

M.B: 535.432

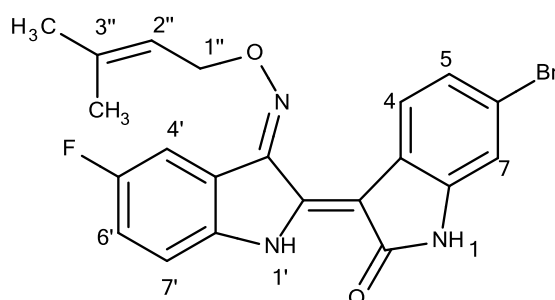
Exact mass: 534.1267

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm, J σε Hz): 11.79 (1H, s, N'-H), 11.12 (1H, s, 5'-CH=NOH), 10.93 (1H, s, N-H), 8.51 (1H, d, $J=7.9$ Hz, H-4), 8.37 (1H, s, H-4'), 8.14 (1H, s, 5'-CHNO), 7.66 (1H, d, $J=7.7$ Hz, H-6'), 7.45 (1H, d, $J=7.7$ Hz, H-7'), 7.09 (1H, d, $J=7.9$ Hz, H-5), 7.04 (1H, s, H-7), 5.62 (1H, brs, H-2''), 5.15 (2H, d, $J=4.9$ Hz, H-1''), 5.05 (1H, brs, H-6''), 2.09 (4H, s, H-5'', H-4''), 1.85 (3H, s, 3''-CH₃), 1.53 (3H, s, 7''-CH₃), 1.51 (3H, s, 7''-CH₃)

ESI-MS m/z : 535.1329, 537.1330 ($M+H$)⁺

3.5.17) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-5'-φθοριοϊντιρουμπινο-3'-(O-πρενυλ)οξίμη

Σε διάλυμα της οξίμης (61,3 mg, 0,1638 mmol) σε ακετόνη (30 ml) που κατέστη άνυδρη με τη βοήθεια μοριακών κόσκινων 3A, προστέθηκαν ένα ισοδύναμο πρενυλοβρωμιδίου (19,1 μl) και δύο ισοδύναμα K_2CO_3 (45,3 mg) και το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία 35°C, υπό ατμόφαιρα αργού, για 7 h. Στη συνέχεια, η ακετόνη εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό υπόλειμμα αναμείχθηκε με H_2O , διηθήθηκε για την απομάκρυνση του K_2CO_3 και εκπλύθηκε καλά με H_2O . Ακολούθησε ξήρανση υπό κενό, μετά από την οποία παραλήφθηκε το προϊόν (70,8 mg, 97,7 %), ως μπορντώ κρυσταλλική σκόνη.



[39]

M.T: $C_{21}H_{17}BrFN_3O_2$

M.B: 442,281

Exact mass: 441,0488

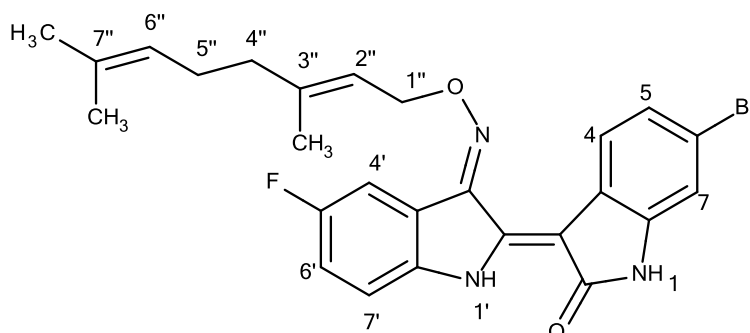
$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm, J σε Hz): 11.70 (1H, s, N'-H), 10.92 (1H, s, N-H), 8.49 (1H, d, $J=8.2$ Hz, H-4), 7.87 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H-7'), 7.46 (1H, s, H-4'), 7.35 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H-6'), 7.11 (1H, d, $J=8.2$ Hz, H-

5), 7.04 (1H, s, H-7), 5.63 (1H, brs, H-2''), 5.14 (2H, d, $J=6.3$ Hz, H-1''), 1.85 (3H, s, 3''-CH₃), 1.82 (3H, s, 3''-CH₃)

ESI-MS m/z: 442.0564, 444.0542 (M+H)⁺

3.5.18) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-5'-φθοριοϊντιρουμπινο-3'-(O-γερανυλ)οξίμη

Σε διάλυμα της οξίμης (61,0 mg, 0,1630 mmol) σε ακετόνη (30 ml) που κατέστη άνυδρη με τη βοήθεια μοριακών κόσκινων 3A, προστέθηκαν ένα ισοδύναμο γερανυλοβρωμιδίου (31,1 μl) και δύο ισοδύναμα K₂CO₃ (45,1 mg) και το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία 35°C, υπό ατμόφαιρα αργού, για 6 h. Στη συνέχεια, η ακετόνη εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό υπόλειμμα αναμείχθηκε με H₂O, διηθήθηκε για την απομάκρυνση του K₂CO₃ και εκπλύθηκε καλά με H₂O. Ακολούθησε ξήρανση υπό κενό, μετά από την οποία παραλήφθηκε το προϊόν (74,6 mg, 89,7 %), ως μπορντώ κρυσταλλική σκόνη.



[40]

M.T: C₂₆H₂₅BrFN₃O₂

M.B: 510,398

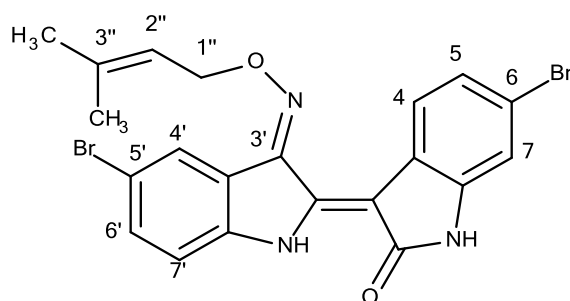
Exact mass: 509,1114

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz, δ ppm, J σε Hz): 11.69 (1H, s, N'-H), 10.91 (1H, s, N-H), 8.49 (1H, d, $J=8.2$ Hz, H-4), 7.88 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-7'), 7.47 (1H, s, H-4'), 7.33 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-6'), 7.10 (1H, d, $J=8.2$ Hz, H-5), 7.05 (1H, s, H-7), 5.63 (1H, t, $J=6.0$ Hz, H-2''), 5.15 (2H, d, $J=6.0$ Hz, H-1''), 5.05 (1H, brs, H-6''), 2.09 (4H, s, H-5'', H-4''), 1.84 (6H, s, 7''-CH₃), 1.55 (3H, s, 3''-CH₃)

ESI-MS m/z: 510.1180, 512.1158 (M+H)⁺

3.5.19) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-5'-βρωμοϊντιρουμπινο-3'-(O-πρενυλ)οξίμη

Σε διάλυμα της οξίμης (52,0 mg, 0,1201 mmol) σε ακετόνη (30 ml) που κατέστη άνυδρη με τη βοήθεια μοριακών κόσκινων 3A, προστέθηκαν ένα ισοδύναμο πρενυλοβρωμιδίου (14,0 mL) και δύο ισοδύναμα K_2CO_3 (33,2 mg) και το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία 45°C, υπό ατμόφαιρα αργού, για 6 h. Στη συνέχεια, η ακετόνη εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό υπόλειμμα αναμείχθηκε με H_2O , διηθήθηκε για την απομάκρυνση του K_2CO_3 και εκπλύθηκε καλά με H_2O . Ακολούθησε ξήρανση υπό κενό. Το στερεό υπόλειμμα υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία στήλης υπό χαμηλή πίεση (στατική φάση: silica gel flash) με διαλύτη έκλουσης cHex:EtOAc 7:3. Από το χρωματογραφικό διαχωρισμό απομονώθηκε το προϊόν (39,6 mg, 65,5 %) ως μπορντώ κρυσταλλική σκόνη.



[41]

M.T: $C_{21}H_{17}Br_2N_3O_2$

M.B: 503,187

Exact mass: 500,9688

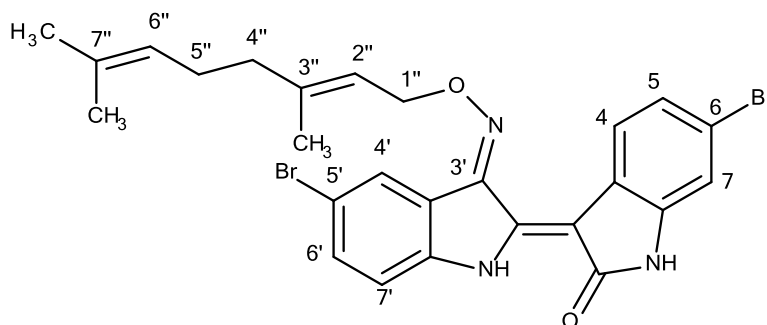
1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm, J σε Hz): 11.75 (1H, s, N'-H), 10.93 (1H, s, N-H), 8.48 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-4), 8.21 (1H, s, H-4'), 7.61 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-6'), 7.42 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-7'), 7.09 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5), 7.03 (1H, s, H-7), 5.62 (1H, t, $J=6.5$ Hz, H-2''), 5.13 (2H, d, $J=6.5$ Hz, H-1''), 1.85 (3H, s, 3''- CH_3), 1.81 (3H, s, 3''- CH_3)

ESI-MS m/z: 501.9766 ($M+H$)⁺

3.5.20) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-5'-βρωμοϊντιρουμπινο-3'-(O-γερανυλ)οξίμη

Σε διάλυμα της οξίμης (50,9 mg, 0,1175 mmol) σε ακετόνη (25 ml) που κατέστη άνυδρη με τη βοήθεια μοριακών κόσκινων 3A, προστέθηκαν ένα ισοδύναμο γερανυλοβρωμιδίου (22,4 μ l) και δύο ισοδύναμα K_2CO_3 (32,5 mg) και το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία 45°C, υπό ατμόφαιρα αργού, για 6 h. Στη συνέχεια, η ακετόνη εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό

υπόλειμμα αναμείχθηκε με H₂O, διηθήθηκε για την απομάκρυνση του K₂CO₃ και εκπλύθηκε καλά με H₂O. Ακολούθησε ξήρανση υπό κενό. Το στερεό υπόλειμμα υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία στήλης υπό χαμηλή πίεση (στατική φάση: silica gel flash) με διαλύτη έκλουσης cHex:EtOAc 7:3. Από το χρωματογραφικό διαχωρισμό απομονώθηκε το προϊόν (34,0 mg, 50,6 %) ως μπροντώ κρυσταλλική σκόνη.



[42]

M.T: C₂₆H₂₅Br₂N₃O₂

M.B: 571,304

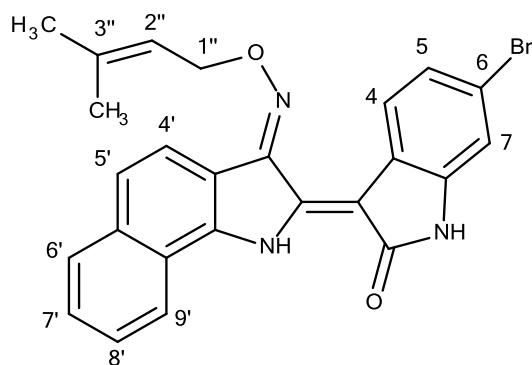
Exact mass: 569,0314

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz, δ ppm, J σε Hz): 11.75 (1H, s, N'-H), 10.94 (1H, s, N-H), 8.49 (1H, d, J=8.2 Hz, H-4), 8.23 (1H, s, H-4'), 7.63 (1H, d, J=8.3 Hz, H-6'), 7.43 (1H, d, J=8.3 Hz, H-7'), 7.10 (1H, d, J=8.2 Hz, H-5), 7.04 (1H, s, H-7), 5.62 (1H, t, J=6.6 Hz, H-2''), 5.16 (2H, d, J=6.6 Hz, H-1''), 5.06 (1H, brs, H-6''), 2.10 (4H, s, H-5'', H-4''), 1.84 (6H, s, 7''-CH₃)

ESI-MS m/z: 570.0421 (M+H)⁺

3.5.21) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-βενζο[g]ιντιρουμπινο-3'-[O-(πρενυλ)]οξίμη

Σε διάλυμα της οξίμης (14,8 mg, 0,0364 mmol) σε ακετόνη (20 ml) που κατέστη άνυδρη με τη βοήθεια μοριακών κόσκινων 3A, προστέθηκαν δύο ισοδύναμα πρενυλοβρωμιδίου (8,5 μL) και δύο ισοδύναμα K₂CO₃ (10,1 mg) και το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία 45°C, υπό ατμόφαιρα αργού, για 6 h. Στη συνέχεια, η ακετόνη εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό υπόλειμμα αναμείχθηκε με H₂O, διηθήθηκε για την απομάκρυνση του K₂CO₃ και εκπλύθηκε καλά με H₂O. Ακολούθησε ξήρανση υπό κενό. Το στερεό υπόλειμμα υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία στήλης υπό χαμηλή πίεση (στατική φάση: silica gel flash) με διαλύτη έκλουσης cHex:EtOAc 9:1. Από το χρωματογραφικό διαχωρισμό απομονώθηκε το προϊόν (3,9 mg, 26,4 %) ως μπροντώ κρυσταλλική σκόνη.



[43]

M. T.: $C_{25}H_{20}BrN_3O_2$

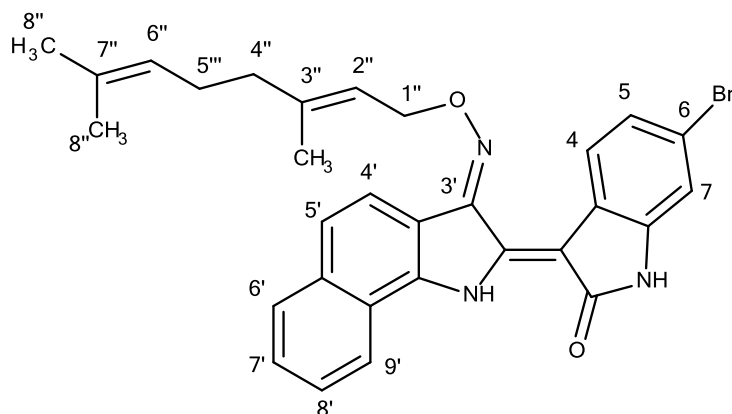
M. B.: 474,349

Exact mass: 473.0739

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm, J σε Hz): 12.25 (1H, s, N'-H), 11.12 (1H, s, N-H), 8.56 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-4), 8.19 (1H, d, $J=8.6$ Hz, H-4'), 8.04 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-9' ή H-6'), 8.01 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-6' ή H-9'), 7.68 (2H, m, H-8' και H-7'), 7.60 (1H, d, $J=8.6$ Hz, H-5'), 7.17 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5), 7.11 (1H, s, H-7), 5.67 (1H, t, $J=6.6$ Hz, H-2''), 5.16 (2H, d, $J=6.6$ Hz, H-1''), 1.87 (3H, s, 3''-CH₃), 1.83 (3H, s, 3''-CH₃).

3.5.22) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-βενζο[g]ιντιρουμπινο-3'-[O-(γερανυλ)]οξίμη

Σε διάλυμα της οξίμης (14,5 mg, 0,0357 mmol) σε ακετόνη (20 ml) που κατέστη άνυδρη με τη βοήθεια μοριακών κόσκινων 3A, προστέθηκαν δύο ισοδύναμα γερανυλοβρωμιδίου (13,6 ml) και δύο ισοδύναμα K_2CO_3 (9,9 mg) και το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία 45°C, υπό ατμόφαιρα αργού, για 6 h. Στη συνέχεια, η ακετόνη εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό υπόλειμμα αναμείχθηκε με H_2O , διηθήθηκε για την απομάκρυνση του K_2CO_3 και εκπλύθηκε καλά με H_2O . Ακολούθησε ξήρανση υπό κενό. Το στερεό υπόλειμμα υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία στήλης υπό χαμηλή πίεση (στατική φάση: silica gel flash) με διαλύτη έκλουσης cHex:EtOAc 9:1. Από το χρωματογραφικό διαχωρισμό απομονώθηκε το προϊόν (7,4 mg, 51,0 %) ως μπορντώ κρυσταλλική σκόνη.



[44]

M.T: $C_{30}H_{28}BrN_3O_2$

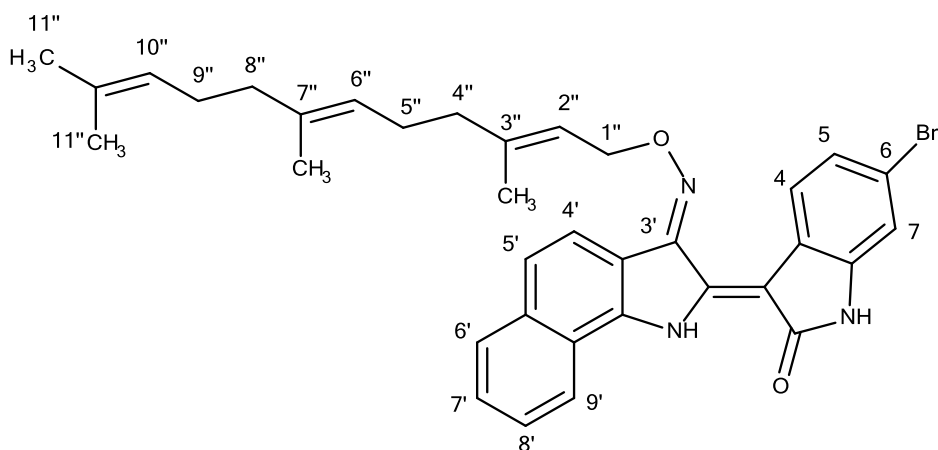
M.B: 542,466

Exact mass: 541.1365

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm, J σε Hz): 12.25 (1H, s, N'-H), 11.12 (1H, s, N-H), 8.56 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H-4), 8.19 (1H, d, $J=8.7$ Hz, H-4'), 8.02 (2H, m, H-9' και H-6'), 7.68 (2H, m, H-8' και H-7'), 7.59 (1H, d, $J=8.7$ Hz, H-5'), 7.16 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H-5), 7.11 (1H, s, H-7), 5.66 (1H, t, $J=6.6$ Hz, H-2''), 5.17 (2H, d, $J=6.6$ Hz, H-1''), 5.08 (1H, brs, H-6''), 2.12 (4H, s, H-5'', H-4''), 1.86 (6H, s, 3''-CH $_3$), 1.57 (3H, s, 7''-CH $_3$), 1.53 (3H, s, 7''-CH $_3$).

3.5.23) (2'Z, 3'E)-6-βρωμο-βενζο[*g*]ιντιρουμπινο-3'-[O-(φαρνεσυλ)]οξίμη

Σε διάλυμα της οξίμης (36,0 mg, 0,08862 mmol) σε ακετόνη (25 ml) που κατέστη άνυδρη με τη βοήθεια μοριακών κόσκινων 3A, προστέθηκε ένα ισοδύναμο φαρνεσυλοβρωμιδίου (24,0 μl) και δύο ισοδύναμα K_2CO_3 (24,49 mg) και το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία 50°C, υπό ατμόφαιρα αργού, για 24 h. Στη συνέχεια, η ακετόνη εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό υπόλειμμα αναμείχθηκε με H_2O , διηθήθηκε για την απομάκρυνση του K_2CO_3 και εκπλύθηκε καλά με H_2O . Ακολούθησε ξήρανση υπό κενό, μετά από την οποία παραλήφθηκε το προϊόν (51,57 mg, 95,3 %), ως μπορντώ κρυσταλλική σκόνη.



[45]

M.T.: $C_{35}H_{36}BrN_3O_2$

M.B.: 610.583

Exact mass: 609.1991

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm, J $\sigma\epsilon$ Hz): 12.27 (1H, s, N'-H), 11.12 (1H, s, N-H), 8.57 (1H, d, $J=8.6$ Hz, H-4), 8.20 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-4'), 8.01 (2H, m, H-9', H-6'), 7.68 (2H, m, H-8', H-7'), 7.59 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-5'), 7.16 (1H, d, $J=8.6$ Hz, H-5), 7.10 (1H, s, H-7), 5.65 (1H, t, $J=6.9$ Hz, H-2''), 5.17 (2H, d, $J=6.9$ Hz, H-1''), 5.06 (1H, brs, H-6''), 4.90 (1H, t, $J=5.6$ Hz, H-10''), 2.13 (4H, s, H-5'', H-4''), 1.87 (2H, m, H-9''), 1.76 (5H, m, H-8'', 7''-CH₃), 1.64 (3H, s, 3''-CH₃), 1.50 (3H, s, 11''-CH₃), 1.43 (3H, s, 11''-CH₃).

ESI-MS m/z: 608.1912, 610.1890 (M-H)⁻

ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΕΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

- 5-HPETE: 5-Hydroperoxyeicosatetraenoic acid
- 5-LOX: 5-Lipoxygenase
- 6BIO: 6-bromo-indirubin-3'-oxime
- 7BIO: 7-bromo-indirubin-3'-oxime
- AA: Arachidonic Acid
- AhR: Aryl hydrocarbon Receptor
- ATP: Adenosine Triphosphate
- BCS: Biopharmaceutics Classification System
- CAK: CDK-activating kinase
- CDK: Cyclin Dependent Kinase
- CDV: Cardiovascular Disease
- CML: Chronic Myelogenous Leukemia
- CMV: Cytomegalovirus
- COX: Cyclooxygenase
- CRK: Cdc2-related kinase
- DBI: 6,6'-dibromo-indigotin
- DLW: Danggui Longhui Wan
- DYRK: Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase
- ESCs: Embryonic stem cells
- FLAP: 5-LOX-activating protein
- GP: Glycogen Phosphorylase
- GSK-3: Glycogen Synthase Kinase 3
- HIV: Human Immunodeficiency Virus
- HPLC: High Performance Liquid Chromatography
- HSV: Herpes Simplex Virus
- IC₅₀: Half Maximal Inhibitory Concentration
- IL: Interleukin
- IO: Indirubin-3'-oxime
- JAK: Janus Kinase
- LDL: Low-density lipoprotein
- LTs: Leukotrienes
- MBI: 6-bromo-indigotin
- NO: Nitric Oxide

- NOS: Nitric Oxide Synthase
- PG: Prostaglandin
- PKB: Protein Kinase B
- PMN ή PMNL: Polymorphonuclear Leukocytes
- STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription
- TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand
- TXs: Thromboxanes
- UWL: Unstirred Water Layer
- VLDL: Very-low-density lipoprotein

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ιντιρουμπίνες είναι διμερή του ινδολίου και τα τελευταία χρόνια έχουν μελετηθεί εκτενώς καθώς από τις πρώτες κιόλας έρευνες φάνηκε η δυναμική τους ως πολλά υποσχόμενοι φαρμακολογικοί παράγοντες.

Κλασικοί μοριακοί στόχοι των ιντιρουμπινών είναι οι κινάσες καθώς ο σκελετός τους έχει προδιαγραφές αναστολέα των κινασών, δράση οφειλόμενη στην υψηλή συγγένεια της για την περιοχή πρόσδεσης του ATP.

Η 5-λιποξυγενάση (5-LOX) δεν ανήκει στους παραδοσιακούς στόχους των ιντιρουμπινών, μιας και δεν αποτελεί ένζυμο-κινάση. Η 5-LOX είναι το ένζυμο-κλειδί για τη βιοσύνθεση λευκοτριενίων (LTs) από το αραχιδονικό οξύ και έτσι εμπλέκεται σε διάφορες φλεγμονώδεις νόσους. Πρόσφατες μελέτες χρησιμοποίησαν τις ιντιρουμπίνες ώστε να τις κατευθύνουν σε έναν καινοτόμο για αυτές μοριακό στόχο: την περιοχή πρόσδεσης του ATP της 5-LOX. Τελικά ταυτοποιήθηκε η 6BIO ως ισχυρός, άμεσος και αναστρέψιμος αναστολέας της 5-LOX με IC50 = 1.5 μΜ.

Βασιζόμενοι σε αποτελέσματα σαν τα ανωτέρω, ασχοληθήκαμε με τη διερεύνηση συνθετικών αναλόγων των ιντιρουμπινών με στόχο να ταυτοποιήσουμε νέους αναστολείς της 5-LOX.

Συνθέσαμε 30 νέα παράγωγα ιντιρουμπίνης τα οποία δομικά μπορούν να διαιρεθούν σε τρεις κατηγορίες: 1) παράγωγα της 6BIO με 5'-υποκατάσταση 2) παράγωγα βενζο[g]ινδολίου και 3) ισοπρενικά παράγωγα ιντιρουμπίνης.

Από τα αποτελέσματα που έχουν προκύψει μέχρι σήμερα μετά την *in vitro* αξιολόγηση των αναλόγων επί της 5-LOX, φαίνεται ότι:

- Η πρενυλίωση μειώνει τη δραστικότητα επί του απομονωμένου ενζύμου και οδηγεί σε περαιτέρω απενεργοποίηση και εντός των κυττάρων.
- Η γερανυλίωση μπορεί να αυξήσει τη δραστικότητα.
- Οι τροποποιήσεις στην θέση 5' δε φαίνεται να επηρεάζουν καθόλου τη δραστικότητα στην περιοχή πρόσδεσης του ATP αλλά μειώνουν τη δραστικότητα στην περιοχή πρόσδεσης του αραχιδονικού.
- Επίσης, η πρενυλομάδα φαίνεται να είναι πολύ ογκώδης ώστε να προσεγγίσουν τα αντίστοιχα ανάλογα την περιοχή πρόσδεσης του ATP και πολύ μικρή ως υδρογονανθρακική αλυσίδα ώστε να προσομοιάσει επαρκώς το αραχιδονικό και να αλληλεπιδράσει με την καταλυτική περιοχή. Μόρια που είχαν μόνο ATP-συναγωνιστική δομή (χωρίς ισοπρενικές ομάδες) και μόρια που προσομοιάζουν πιο πολύ το αραχιδονικό (με μακρές ισοπρενικές αλυσίδες πχ γερανύλιο, φαρνεσύλιο), ήταν δραστικά.

Τα παράγωγα ιντιρουμπίνης, μας παρέχουν έναν πολλά υποσχόμενο σκελετό πάνω στον οποίο μπορεί να δημιουργηθούν ισχυροί αναστολείς της 5-LOX που ανήκουν φαρμακολογικά σε δύο διαφορετικές κατηγορίες: 1) παράγωγα

ιντιρουμπίνης με σκοπό τη στόχευση της θέσης πρόσδεσης του ATP που διαθέτει η 5-LOX και 2) παράγωγα ιντιρουμπίνης με σκοπό τη στόχευση της καταλυτικής περιοχής οξείδωσης του αραχιδονικού της 5-LOX.

SUMMARY

It is a bis-indole and its derivatives have been studied extensively the last years, since from the first studies they seemed to be very promising pharmacological factors.

Typical Molecular Targets of Indirubins are the kinases as indirubin 's skeleton has the structural characteristics of a kinase inhibitor and its high potency is a result of an interaction with the ATP binding pocket through three hydrogen bonds.

5-lipoxygenase (5-LOX) is not one of the typical molecular targets of indirubins as it is not a kinase enzyme. 5-LOX is the key enzyme in leukotriene (LT) biosynthesis from arachidonic acid (AA) and as a result it is associated with inflammatory diseases. Recent studies used indirubins to innovatively target 5-LOX at the ATP-binding site. Finally 6BIO was identified as a potent, direct and reversible 5-LOX inhibitor ($IC_{50}=1.5 \mu M$).

The assesment of all the information described before led to the principal aim of this master thesis, which consisted of the synthesis of new indirubin derivatives in order to identify new inhibitors of the 5-LOX.

We synthesized 30 new indirubin derivatives, which structurally can be separated in three categories: 1) 6BIO analogs with 5'-substitution 2) benzo[g]indole derivatives and 3) isoprene derivatives of indirubin.

The first results concerning the inhibitory 5-LOX activity of the derivatives showed that:

- The prenylation seemed to decrease the activity on the isolated enzyme and in the PMNLs in higher degree.
- Geranylation could increase the activity.
- Modifications on 5' position do not seem to affect the activity in the ATP-binding pocket but they decrease the activity in the position where the arachidonate binds.
- In addition the prenyl-group seems to be too bulky for the ATP-binding-pocket and too sort to mimic the arachidonic acid and interact with its binding pocket. Analogs that were only ATP-competitive (without isoprene cains at all) and analogs more similar to the arachidonic acid (with long isoprene chains such as geranyl and farnesyl), proved to be active.

Indirubin derivatives represent a promising scaffold for the development of potent 5-LOX inhibitors of two different categories: 1) indirubin derivatives that target the ATP-binding site on the 5-LOX and 2) indirubin derivatives that target the active site where the arachidonic acid is being oxidated.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Vougiannopoulou, K.; Ferandin, Y.; Bettayeb, K.; Myriantopoulos, V.; Lozach, O.; Fan, Y.; Johnson, C. H.; Magiatis, P.; Skaltsounis, A. L.; Mikros, E.; Meijer, L. *Soluble 30,6-substituted indirubins with enhanced selectivity toward glycogen synthase kinase -3 alter circadian period*. J. Med. Chem. 2008, 51, 6421-6431
2. Christie, R.M. *Why is indigo blue?*. Biotechnic & Histochemistry 2007, 82(2): 5156.
3. Sumpter, W.C.; Miller, F.M. *Heterocyclic compounds with indole and carbazole systems*. 8th volume published in the series *The Chemistry of heterocyclic compounds*
4. Cheng, X.; Rasqué, P.; Vatter, S.; Merz, K.H.; Eisenbrand, G. *Synthesis and cytotoxicity of novel indirubin-5-carboxamides*. Elsevier Ltd 2010
5. Heshmati, N.; Wagner, B.; Cheng, X.; Scholz, T.; Kansy, M.; Eisenbrand, G.; Fricker, G. *Physicochemical characterization and in vitro permeation of an indirubin derivative*. Elsevier B.V. 2013
6. McGovern, P.E.; Michel, R.H. *Royal Purple Dye: The Chemical Reconstruction of the Ancient Mediterranean Industry*. Acc. Chem. Res., Vol. 23, No. 5, 1990
7. Karapanagiotis, I.; Villemereuil, V.; Magiatis, P.; Polychronopoulos, P.; Vougiannopoulou, V.; Skaltsounis, A.L. *Identification of the Coloring Constituents of Four Natural Indigoid Dyes* Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies 2006, 29: 1491-1502
8. Michel, R.H.; Lazar, J.; McGovern, P.E. *The chemical composition of the indigoid dyes derived from the hypobranchial glandular secretions of Murex molluscs*. Journal of the Society of Dyers and Colourists, March 1992, Volume 108, Issue 3, pages 145-150
9. Perpete, E.A.; Preat, J.; Andre', J.M.; Jacquemin, D. *An ab Initio Study of the Absorption Spectra of Indirubin, Isoindirubin, and Related Derivatives*. J. Phys. Chem. A 2006, 110, 5629-5635
10. Arsenault, N.; Rose, C.; Azulay, A.; Meyer, R. *Explorers, Traders & Immigrants: Tracking the Cultural and Social Impacts of the Global Commodity Trade*. October 2008
11. Shim, J.Y.; Chang, Y.J.; Kim, S.U. *Indigo and indirubin derivatives from indoles in Polygonum tinctorium tissue cultures*. Biotechnology Letters, December 1998, Vol 20, No 12, pp. 1139-1143

12. Maugarda, T.; Enauda, E.; Choisyb, P.; Legoya, M.D. *Identification of an indigo precursor from leaves of Isatis tinctoria (Woad)*. *Phytochemistry* 58, 2001, 897-904
13. Michel, R.H.; McGovern, P.E. *The Chemical Processing of Royal Purple Dye: Ancient Descriptions as Elucidated by Modern Science*. *Archeomaterials*, 1987, Vol. 1, No. 2
14. Heron, B.M.; Tian, H.; Wainwright, M. *Dyes and Pigments*. Elsevier Ltd., 2012
15. Vougianniopoulou, K.; Skaltsounis, A.L. *From Tyrian Purple to Kinase Modulators: Naturally Halogenated Indirubins and Synthetic Analogues*. *Planta Med* 2012; 78: 1515-1528
16. Meijer, L.; Skaltsounis, A.L.; Magiatis, P.; Polychronopoulos, P.; Knockaert, M.; Leost, M.; Ryan, X.P.; Vonica, C.A.; Brivanlou, A.; Dajani, R.; Crovace, C.; Tarricone, C.; Musacchio, A.; Roe, S.M.; Pearl, L.; Greengard, P. *GSK-3-Selective Inhibitors Derived from Tyrian Purple Indirubins*. *Chemistry & Biology*, 2003, Vol. 10, 1255-1266
17. Koren, Z.C.; *The First Optimal All-Murex All-Natural Purple Dyeing in the Eastern Mediterranean in a Millennium and a Half*. *Dyes in History and Archaeology* 20, 2005, pp. 136-149, Color Plates 15.1-15.5
18. Hoessel, R.; Leclerc†, S.; Endicott, J.A.; Nobel, M.E.M.; Lawrie, A.; Tunnah, P.; Leost, M.; Damiens, E.; Marie, D.; Marko, D.; Niederberger, E.; Tang, W.; Eisenbrand, G.; Meijer, L. *Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases*. *Macmillan Magazines Ltd*, 1999
19. Xiao, Z.; Hao, Y.; Liu, B.; Qian, L. *Indirubin and Meisoindigo in the Treatment of Chronic Myelogenous Leukemia in China*. *Leukemia and Lymphoma*, 2002 Vol. 43 (9), pp. 1763-1768
20. Adachi, J.; Mori, Y.; Matsui, S.; Takigami, H.; Fujino, J.; Kitagawa, H.; Miller, C.A.; Kato, T.; Saeki, K.; Matsuda, T.; *Indirubin and Indigo Are Potent Aryl Hydrocarbon Receptor Ligands Present in Human Urine*. *J. Biol. Chem.* 2001, 276:31475-31478.
21. Monteleone, I.; Rizzo, A.; Sarra, M.; Sica, G.; Sileri, P.; Biancone, L.; MacDonald, T.T; Pallone, F.; Monteleone, G. *Aryl Hydrocarbon Receptor-Induced Signals Up-regulate IL-22 Production and Inhibit Inflammation in the Gastrointestinal Tract*. *Gastroenterology* 2011, 141:237-248
22. Κριτσανίδα, Μ. *Σχεδιασμός, Ανάπτυξη και Φαρμακολογική Αξιολόγηση Νέων Παραγώγων Ιντιρουμπίνης*. Διδακτορική διατριβή
23. Ponnusamy, K.; Petchiammal, C.; Mohankumard, R.; Hopperc, W. *In vitro antifungal activity of indirubin isolated from a South Indian*

- ethnomedicinal plant Wrightia tinctoria R. Br.* Journal of Ethnopharmacology 132, 2010, 349-354
24. Cooksey, C.J. *Tyrian Purple: 6,6'-Dibromoindigo and Related Compounds.* Molecules 2001, 6, 736-769
 25. MacNeil, I.A.; Tiong, C.L.; Minor, C.; August, P.R.; Grossman, T.H.; Loiacono, K.A.; Lynch, B.A.; Phillips, T.; Narula, S.; Sundaramoorthi, R.; Tyler, A.; Aldredge, T.; Long, H.; Gilman, M.; Holt, D.; Osburne, M.S. *Expression and Isolation of Antimicrobial Small Molecules from Soil DNA Libraries.* J. Mol. Microbiol. Biotechnol., 2001, 3(2): 301-308.
 26. Tan, C.K.; Wu, Y.P.; Wu, H.Y.; Lai, C.C. *Purple urine bag syndrome.* CMAJ, 2008, 179(5)
 27. Fujioka, M.; Wada, H., *The bacterial oxidation of indole.* Biochim Biophys Acta., 1968, 158(1):70-8
 28. Gillam, E.M.J.; Notley, L.M.; Cai, H.; De Voss, J.J.; Guengerich, F.P. *Oxidation of Indole by Cytochrome P450 Enzymes.* Biochemistry 2000, 39, 13817-13824
 29. Nam, S.; Scutoa, A.; Yanga, F.; Chen, W.Y.; Park, S.; Yoo, H.S.; Konig, H.; Bhatia, R.; Cheng, X.; Merz, K.H.; Eisenbrand, G.; Jove, R. *Indirubin derivatives induce apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells involving inhibition of Stat5 signaling.* Molecular Oncology 6, 2012, 276-283
 30. Marko, D.; Schätzle, S.; Friedel, A.; Genzlinger, A.; Zankl, H.; Meijer, L.; Eisenbrand, G. *Inhibition of cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) by indirubin derivatives in human tumour cells.* British Journal of Cancer, 2001, 84(2), 283-289
 31. Polychronopoulos, P.; Magiatis, P.; Skaltsounis, A.L.; Myrianthopoulos, V.; Mikros, E.; Tarricone, A.; Musacchio, A.; Roe, S.M.; Pearl, L.; Leost, M.; Greengard, P.; Meijer, L. *Structural Basis for the Synthesis of Indirubins as Potent and Selective Inhibitors of Glycogen Synthase Kinase-3 and Cyclin-Dependent Kinases.* J. Med. Chem. 2004, 47, 935-946
 32. Barillas, R.; Friehs, I.; Cao-Danh, H.; Martinez, J.F.; del Nido, P.J. *Inhibition of Glycogen Synthase Kinase-3 Improves Tolerance to Ischemia in Hypertrophied Hearts.* Ann Thorac Surg, 2007, 84:126 -33
 33. Kosmopoulou, M.N.; Chrysina, E.D.; Eisenbrand, G.; Kardakaris, R.; Leonidas, D.D.; Oikonomakos, N.G. *Indirubin analogue E243 promotes allosteric inhibition to glycogen phosphorylase by binding at the allosteric and inhibitor site.*
 34. Mussmann, R.; Geese, M.; Harder, F.; Kegel, S.; Andag, U.; Lomow, A.; Burk, U.; Onichtchouk, D.; Dohrmann, C.; Austen, M. *Inhibition of GSK3*

- Promotes Replication and Survival of Pancreatic Beta Cells.* J. Biol. Chem. 2007, 282:12030-12037.
35. Schang, L.M. *Cellular proteins (cyclin dependent kinases) as potential targets for antiviral drugs.* Antivir Chem Chemother, 2001, 12 Suppl 1:157-78
36. Heredia, A.; Davis, C.; Bamba, D.; Le, N.; Gwarzo, M.Y.; Sadowska, M.; Gallo, R.C.; Redfield, R.R.; *Indirubin-3'-monoxime, a derivative of a Chinese antileukemia medicine, inhibits P-TEFb function and HIV-1 replication.* AIDS, 2005, 2;19(18):2087-95.
37. Hertel, L.; Chou, S.; Mocarski, E.S. *Viral and Cell Cycle-Regulated Kinases in Cytomegalovirus-Induced Pseudomitosis and Replication.* PLoS Pathogens, 2007, Volume 3, Issue 1, e6
38. Xingi, E.; Smirlis, D.; Myriantopoulos, M.; Magiatis, P.; Grant, K.M.; Meijer, L.; Mikros, E.; Skaltsounis, A.L.; Soteriadou, K. *6-Br-5methylindirubin-3Oxime (5-Me-6-BIO) targeting the leishmanial glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) short form affects cell-cycle progression and induces apoptosis-like death: Exploitation of GSK-3 for treating leishmaniasis.* International Journal for Parasitology 39, 2009, 1289-1303
39. Kim, J-K.; Park, G.M. *Indirubin-3-monoxime exhibits anti-inflammatory properties by down-regulating NF- κ B and JNK signaling pathways in lipopolysaccharide-treated RAW264.7 cells.* Inflamm. Res., 2012, 61:319-325
40. Jautelat, R.; Brumby, T.; Schfer, M.; Briem, H.; Eisenbrand, G.; Schwahn, S.; Kruger, M.; Lucking, U.; Prien, O.; Siemeister, G. *From the Insoluble Dye Indirubin towards Highly Active, Soluble CDK2-Inhibitors.* ChemBioChem 2005, 6, 531 -540
41. Ginzinger, W.; Egger, A.; Muhlgassner, G.; Arion, V.B.; Jakupec, M.A.; Galanski, M.; Walter Berger, W.; Keppler, B.K. *Water-Soluble Cationic Derivatives of Indirubin, the Active Anticancer Component from Indigo naturalis.* Chemistry and Biodiversity, 2012, Vol. 9
42. Meijer, L.; Flajolet, M.; Greengard, P.; *Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3.* TRENDS in Pharmacological Sciences, 2004, Vol.25 No.9
43. Druker, B. J.; Talpaz, M.; Resta, D. J.; Peng, B.; Buchdunger, E.; Ford, J. M.; Lydon, N. B.; Kantariian, H.; Capedeville, R.; Ohno Jones, S.; Sawyer, C. L. *Efficacy and safety of a specific inhibitor of Bcr-Abl tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia.* N. Engl. J.Med., 2001, 344, 1031-1037.

44. Vieth, M.; Sutherland, J. J.; Robertson, D. H.; Campbell, R. M. *Kinomics: characterizing the therapeutically validated kinase space*. Drug Discovery Today 2005, 10, 839-46.
45. Myrianthopoulos, V.; Magiatis, P.; Ferandin, Y.; Skaltsounis, A.L.; Meijer, L.; Mikros, E. *An Integrated Computational Approach to the Phenomenon of Potent and Selective Inhibition of Aurora Kinases B and C by a Series of 7-Substituted Indirubins*. J. Med. Chem. 2007, 50, 4027-4037
46. C. Doerig and L. Meijer. *Antimalarial drug discovery: targeting protein kinases.*, in *Expert opinion on therapeutic targets*. 2007, vol. 11, num. 3, p. 279-90
47. Davies, T. G.; Tunnah, P.; Meijer, L.; Marko, D.; Eisenbrand, G.; Endicott, J. A.; Noble, M. E. M. *Inhibitor binding to active and inactive CDK2. The crystal structure of a CDK2-cyclin A/indirubin-5-sulphonate*. Structure 2001, 9, 389-397.
48. Patrice D. Smith*, Stephen J. Crocker*, Vernice Jackson-Lewis†, Kelly L. Jordan-Sciutto‡, Shawn Hayley*, Matthew P. Mount*, Michael J. O'Hare*, Steven Callaghan*, Ruth S. Slack*, Serge Przedborski†§¶, Hymie Anisman, and David S. Park. *Cyclin-dependent kinase 5 is a mediator of dopaminergic neuron loss in a mouse model of Parkinson's disease*. PNAS, 2003, vol. 100, no. 23
49. Sherr, C.J.; Roberts, J.M. *CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression*. Genes Dev. 1999 13: 1501-1512
50. Pavletich, P.N. *Mechanisms of Cyclin-dependent Kinase Regulation: Structures of Cdks, their Cyclin Activators, and Cip and INK4 Inhibitors*. J. Mol. Biol. (1999) 287, 821-828
51. Knockaert, M.; Greengard, P.; Meijer, L. *Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases*. TRENDS in Pharmacological Sciences, 2002, Vol.23 No.9
52. Nam, S.; Buettner, R.; Turkson, J.; Kim, D.; Jin Q. Cheng, J.Q.; Muehlbeyer, S.; Hippe, F.; Vatter, S.; Merz, K.H.; Eisenbrand, G.; Jove, R. *Indirubin derivatives inhibit Stat3 signaling and induce apoptosis in human cancer cells*. PNAS, 2005, vol. 102, no. 17
53. Leclerc, S.; Garnier, M.; Hoessel, R.; Marko, D.; Bibb, J.A.; Snyder, G.L.; Greengard, P.; Biernat, J.; Wu, Y.Z.; Mandelkow, E.M.; Eisenbrand, G.; Meijer, L. *Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3 beta and CDK5/p25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease. A property common to most cyclin-dependent kinase inhibitors?* J Biol Chem, 2001, 276(1):251-60

54. Hoeflich, K.; Woodgett, J.; Luo, J. *Inhibition of GSK-3 beta*. Patent Application Publication, 2001, Pub. No.: US2001/0053351 A1
55. Doble, B.W.; Woodgett, J.R. *GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase*. J Cell Sci. 2003 Apr 1;116(Pt 7):1175-86.
56. Sayas, C.L.; Ariaens, A.; Ponsioen, B.; Moolenaar, W.H. *GSK-3 Is Activated by the Tyrosine Kinase Pyk2 during LPA₁-mediated Neurite Retraction*. Molecular Biology of the Cell, 2006, Vol. 17, 1834-1844
57. Sugden, P.H.; Fuller, S.J.; Weiss, S.C.; Clerk, A. *Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) in the heart: a point of integration in hypertrophic signaling and a therapeutic target? A critical analysis*. British Journal of Pharmacology, 2008, 153, S137-S153
58. Rayasam, G.V.; Tulasi, V.K.; Sodhi, R.; Davis, J.A.; Ray, A. *Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake*. Br J Pharmacol., 2009, 156(6):885-98
59. Grimes, C.A.; Jope, R.S. *The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 in cellular signaling*. Progress in Neurobiology 65, 2001, 391-426
60. Miura, T.; Miki, T. *GSK-3 β , a Therapeutic Target for Cardiomyocyte Protection*. Circ J, 2009, 73: 1184 - 1192
61. Kressirer, C.A. *Anticancer effects and antimetastatic mechanisms of novel indirubin derivatives*. München, 2010
62. Kamran, M.Z.; Patil, P.; Gude, R.P. *Role of STAT3 in Cancer Metastasis and Translational Advances*. BioMed Research International, 2013, Article ID 421821, 15 pages
63. Aaronson, D.S.; Horvath, C.M.; *A road map for those who don't know JAK-STAT*. Science 296, 2002, (5573):1653-5.
64. Katayama, H.; Brinkley, W.; Sen, S. *The Aurora kinases: Role in cell transformation and tumorigenesis*. Cancer Metastasis ReV., 2003, 22, 451-464.
65. Druker, B. J.; Talpaz, M.; Resta, D. J.; Peng, B.; Buchdunger, E.; Ford, J. M.; Lydon, N. B.; Kantariian, H.; Capedeville, R.; Ohno Jones, S.; Sawyer, C. L. *Efficacy and safety of a specific inhibitor of Bcr-Abl tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia*. N. Engl. J.Med., 2001, 344, 1031-1037
66. Aranda, S.; Laguna, A.; de la Luna, S. *DYRK family of protein kinases: evolutionary relationships, biochemical properties, and functional roles*. FASEB J., 2011, 25(2):449-62
67. Krivogorsky, B.; Grundt, P.; Yolken, R.; Jones-Brando, L. *Inhibition of Toxoplasma gondii by Indirubin and Tryptanthrin Analogs*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2008, p. 4466-4469

68. Grant, K.M.; Dunion, M.H.; Yardley, V.; Skaltsounis, A.L.; Marko, D.; Eisenbrand, G.; Croft, S.L.; Meijer, L.; Mottram, J.C.; *Inhibitors of Leishmania Mexicana CRK3 Cyclin-Dependent Kinase: Chemical Library Screen and Antileishmanial Activity*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, 48(8):3033
69. Kosmopoulou, M.N.; Leonidas, D.D.; Chrysina, E.D.; Eisenbrand, G.; Oikonomakos, N.G. *Indirubin-3'-Aminoxy-Acetate Inhibits Glycogen Phosphorylase by Binding at the Inhibitor and the Allosteric Site. Broad Specificities of the Two Sites*. *Letters in Drug Design and Discovery*, 2005, vol. 2, no. 5, pp. 377-390
70. Meijer, L.; Shearer, J.; Bettayeb, K.; Ferandin, Y. *Diversity of the intracellular mechanisms underlying the anti-tumor properties of indirubins*. *International Congress Series 1304*, 2007, 60-74
71. Rossi, A.; Pergola, C.; Cuzzocrea, S.; Sautebin, L. *The Role of 5-Lipoxygenase and Leukotrienes in Shock and Ischemia-Reperfusion Injury*. *The Scientific World JOURNAL*, 2007, 7, 56-74
72. PoECKel, D.; Funk, C.D. *The 5-lipoxygenase/leukotriene pathway in preclinical models of cardiovascular disease*. *Cardiovascular Research*, 2010, 86, 243-253
73. Okamoto, H.; Hammarberg, T.; Zhang, Y.Y.; Persson, B.; Watanabe, T.; Samuelsson, B.; Radmark, O. *Mutation analysis of the human 5-lipoxygenase C-terminus: Support for a stabilizing C-terminal loop*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1749, 2005, 123- 131
74. Gilbert, N.C.; Bartlett, S.G.; Waight, M.T.; Neau, D.B.; Boeglin, W.E.; Brash, A.R.; Newcomer, M.E. *The structure of human 5-lipoxygenase*. *Science*, 2011, 331(6014): 217-219
75. Reem Kayyali†§, John B. Porter†, Zu Dong Liu¶, Nathan A. Davies, Jonathan H. Nugent**, Chris E. Cooper, and Robert C. Hider. *Structure-Function Investigation of the Interaction of 1- and 2-Substituted 3-Hydroxypyridin-4-ones with 5-Lipoxygenase and Ribonucleotide Reductase*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, Vol. 276, No. 52, Issue of December 28, pp. 48814-48822
76. Rossi, A.; Pergola, C.; Koeberle, A.; Hoffmann, M.; Dehm, F.; Bramanti, P.; Cuzzocrea, S.; Werz, O.; Sautebin, L. *The 5-lipoxygenase inhibitor, zileuton, suppresses prostaglandin biosynthesis by inhibition of arachidonic acid release in macrophages*. *British Journal of Pharmacology*, 2010, 161 555-570
77. Ανδρεάδου, Ι.; Λάζαρη, Α.; Ζησόπουλος, Ν.; Μπιπλή, Σ.Ι.; Ζύγα, Α.; Σκαλτσούνης, Α.Α.; Κρεμαστινός, Δ.Θ.; Αναστασίου-Νάνα, Μ.; Ηλιοδρομίτης,

- E.K. Η GSK-3β ως μοριακός στόχος για τη μείωση της έκτασης του εμφράγματος του μυοκαρδίου: μελέτη της αναστολής της κατά την επαναιμάτωση *in vivo*. Πτυχιακή Εργασία Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ, 2012
78. Clark, R.J.; Cooksey, C.J. Bromoindirubins: the synthesis and properties of minor components of Tyrian purple and the composition of the colorant from *NuceZh Zapillus*. *JSDC*, 1997, Vo. 113
79. da Silva, J.F.M.; Garden, S.J.; Pinto, A.C.; *The Chemistry of Isatins: a Review from 1975 to 1999*. *J. Braz. Chem. Soc.*, 2001, Vol. 12, No. 3, 273-324
80. Choi, S.J.; Lee, J.E.; Jeong, S.Y.; Im, I.; Lee, E.J.; Lee, S.K.; Kwon, S.M.; Ahn, S.G.; Yoon, J.H.; Han, S.Y.; Kim, J.I.; Kim, Y.C. *5,5'-Substituted Indirubin-3'-oxime derivatives as potent cyclin-dependent kinase inhibitors with anticancer activity*. *J. Med. Chem.*, 2010, 53, 3696-3706
81. Koeberle, A.; Haberl, E.M.; Rossi, A.; Pergola, C.; Dehma, F.; Northoff, H.; Troschuetz, R.; Sautebin, L.; Werz, O. *Discovery of benzo[g]indol-3-carboxylates as potent inhibitors of microsomal prostaglandin E₂ synthase-1*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17, 2009, 7924-7932
82. Zheng, J.; Xiao, G.; Guo, J.; Zheng, Y.; Gao, H.; Zhao, S.; Zhang, K.; Sun, P. *Exploring QSARs for 5-Lipoxygenase (5-LO) Inhibitory Activity of 2-Substituted 5-Hydroxyindole-3-Carboxylates by CoMFA and CoMSIA*. *Chem Biol Drug Des*, 2011, 78: 314-321
83. Pergola, C.; Gaboriaud-Kolar, N.; Jestäd, N.; König, S.; Kritsanida, M.; Schaible, A.M.; Li, H.; Garscha, U.; Weinigel, C.; Barz, D.; Albring, K.F.; Huber, O.; Skaltsounis, A.L.; Werz, O. *Indirubin core structure of glycogen synthase kinase-3 inhibitors as novel chemotype for intervention with 5-lipoxygenase*. *J Med Chem.*, 2014, 8:57(9):3715-23.