

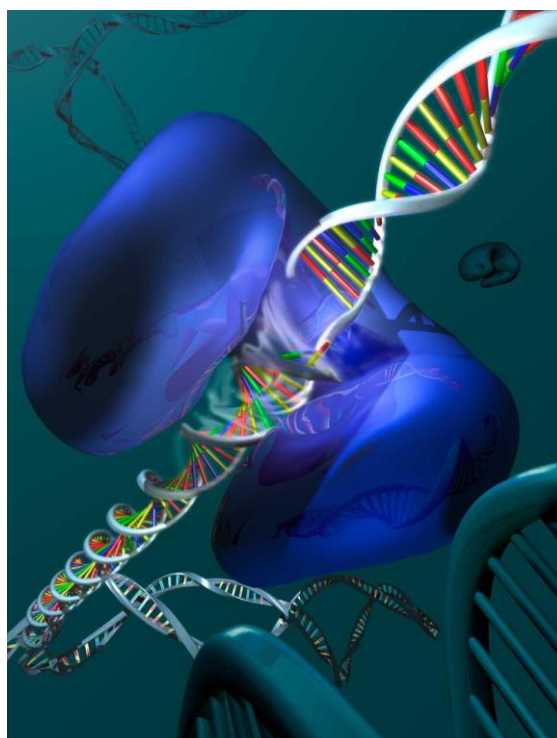


**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΑΚΡΙΔΙΝΩΝ ΜΕ  
ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΕΝΟ ΘΕΙΑΖΟΛΙΚΟ ΔΑΚΤΥΛΙΟ ΩΣ  
ΠΙΘΑΝΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΟΠΟΪΣΟΜΕΡΑΣΩΝ**



**Ηλιόπουλος-Τσούτσουβας Χρήστος**

**Φαρμακοποιός**

**Εργασία Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης**

**ΑΘΗΝΑ 2015**



Αφιερωμένο.....

...Στους γονείς μου

...Στο θείο μου, Νίκο

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και αποτελεί μια ερευνητική προσπάθεια σχεδιασμού και σύνθεσης νέων χημικών ενώσεων που ως στόχο έχουν την εκλεκτική αναστολή Τοποΐσομερασών και την εκδήλωση αντικαρκινικής δράσης. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αναμένεται να συμβάλουν στη διερεύνηση των σχέσεων δομής - δράσης των εν λόγω παραγώγων, αποτελώντας παράλληλα χρήσιμο οδηγό για την περαιτέρω ανάπτυξη νέων μορίων με βελτιωμένες ιδιότητες.

Ευχαριστώ θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή Φαρμακευτικής Χημείας κ. Ιωάννη Κ. Κωστάκη για την υπόδειξη του θέματος, την καθοδήγησή του και την ουσιαστική του συμπαράσταση καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας αυτής. Καθώς επίσης και τον Yves Rommier, M.D., Ph.D. και την ερευνητική του ομάδα για τη διεξαγωγή των βιολογικών δοκιμών ενώσεων που συντέθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας.

Ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, Καθηγητή κ. Παναγιώτη Μαράκο και Λέκτορα κ. Ιωάννη Παπαναστασίου για τις πολύτιμες συμβουλές τους και τις διορθώσεις τους.

Ευχαριστώ όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Φαρμακευτικής Χημείας. Επίσης, θερμά ευχαριστώ το Τμήμα Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών που μου έδωσε τη δυνατότητα να υλοποιήσω την παρούσα εργασία.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου για την ουσιαστική στήριξη που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, γιατί χωρίς αυτούς τίποτα δε θα ήταν εφικτό.

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Π ΜΑΡΑΚΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

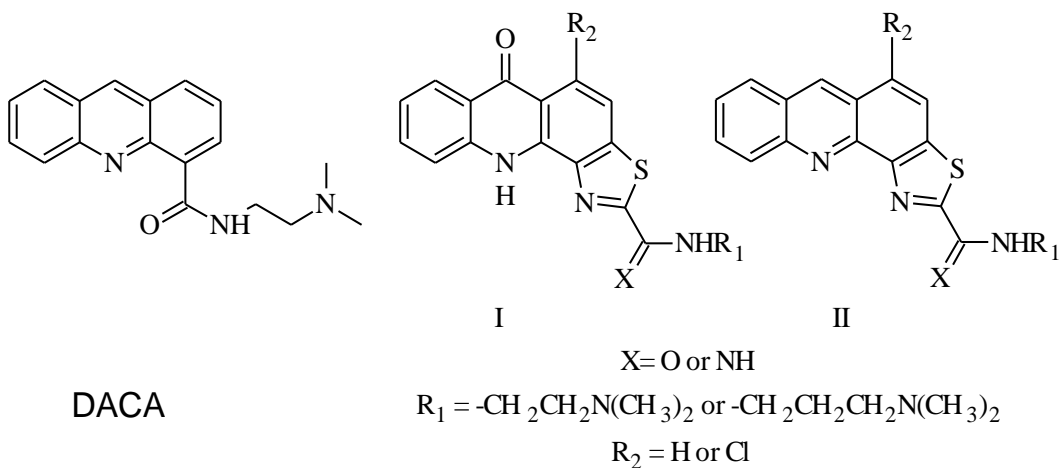
**Ι. Κ. ΚΩΣΤΑΚΗΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΕΡΓΑΣΙΑΣ)**

**Ι. ΠΑΠΑΝΑΣΤΑΣΙΟΥ, ΛΕΚΤΟΡΑΣ**

## ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΑΚΡΙΔΙΝΩΝ ΜΕ ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΕΝΟ ΘΕΙΑΖΟΛΙΚΟ ΔΑΚΤΥΛΙΟ ΩΣ ΠΙΘΑΝΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΟΠΟΪΣΟΜΕΡΑΣΩΝ

### Περίληψη

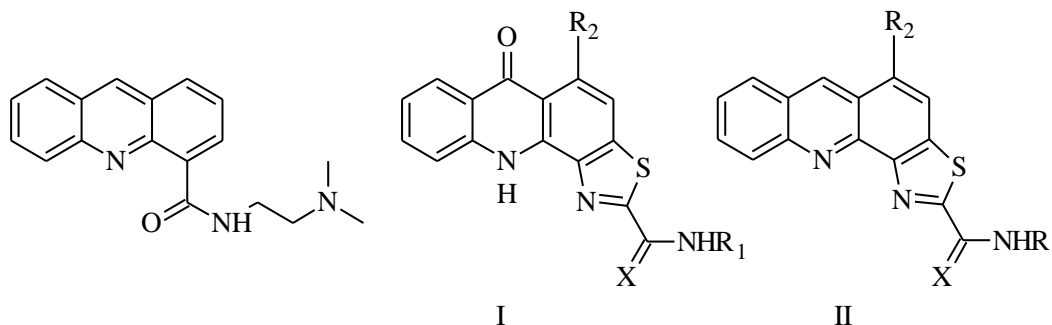
Οι Τοποΐσομεράσες είναι ένζυμα υπεύθυνα για το «ξετύλιγμα», θετικά ή αρνητικά, υπερελικωμένου DNA, που προέρχεται από το άνοιγμα της διπλής έλικας, και χωρίς αυτές το κύτταρο δεν έχει πρόσβαση στη γενετική πληροφορία, γεγονός που οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο ή απόπτωση. Για το λόγο αυτό, οι τοποΐσομεράσες φαίνεται να είναι ένας υποσχόμενος στόχος για την αντιμετώπιση όγκων και κατά τις τελευταίες δεκαετίες η έρευνα σε αυτό το πεδίο έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη αρκετών δραστικών μορίων, φυσικών ή συνθετικών, αναστολέων/δηλητηρίων των Τοποΐσομερασών I ή/και II. Πληθώρα μορίων, που βασίζονται σε έναν πολυκυκλικό επίπεδο σκελετό, ενδοπαρεμβάλλονται στο DNA και αναστέλλουν αυτά τα ένζυμα, οπότε μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως χημειοθεραπευτικοί παράγοντες σε διάφορες μορφές καρκίνου. Μεταξύ αυτών, το DACA, ένας διπλός αναστολέας των Τοποΐσομερασών I και II, έφτασε σε κλινικές δοκιμές φάσης II. Βάσει των παραπάνω, στην παρούσα εργασία, περιγράφεται ο σχεδιασμός και η σύνθεση νέων αναλόγων του DACA, με σκοπό να αξιολογηθεί η επίδραση των παρακάτω δομικών αλλαγών στην ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων και στην αναστολή των Τοποΐσομερασών I και II. Αποτελούνται από ένα χρωμοφόρο ακριδίνης ή ακριδινόνης συμπυκνωμένων με ένα θειαζολικό δακτύλιο και φέρουν μια καρβοξαμιδική αλυσίδα στο C-2, που είναι σημαντικό για την ανάπτυξη δράσης.



# DESIGN AND SYNTHESIS OF NOVEL THIAZOLO-FUSED ACRIDINES AS POTENT TOPOISOMERASE INHIBITORS

## Abstract

Topoisomerases are enzymes responsible for the unwinding of, positively or negatively, supercoiled DNA, derived from the opening of the two strands, and without them a cell cannot access its genetic information which leads to death or apoptosis. Topoisomerases seem to be a very promising target for the treatment of tumors and by the last decades a lot of work has been done to this path resulting in the development of numerous active compounds, synthetic or natural ones, inhibitors/poisons of either Topoisomerase I and/or II. Many compounds, based on a polycyclic planar framework, intercalate DNA and inhibit these enzymes, so they can be used as chemotherapeutic agents in some forms of cancer. Among them, DACA, a dual inhibitor of Topoisomerase I and II, has reached Phase II clinical trials. Prompted by the above, here, we describe the design and synthesis of some novel DACA analogues in order to evaluate the effect of this structural modification on the tumor cell growth inhibition and the inhibition of Topoisomerases I and II. They consist of a planar acridine/acridinone chromophore fused with a thiazolo ring and possess a carboxamide chain in C-2, crucial for the development of its activity.



DACA

I

II

X= O or NH

R<sub>1</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> or -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

R<sub>2</sub> = H or Cl

## Περιεχόμενα

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΟΙ ΟΡΟΙ.....	11
ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	14
Τοποΐσομεράσες .....	16
Τοποΐσομεράση I.....	21
Καταλυτικός κύκλος .....	22
Μηχανισμός τρανσεστεροποίησης και καταλυτικό κέντρο.....	23
Φυσιολογική ρύθμιση .....	25
Αλληλεπίδραση με άλλα ένζυμα.....	26
Τοποΐσομεράση II.....	26
Καταλυτικός κύκλος .....	27
Το ένζυμο ως «φυσιολογικό δηλητήριο» .....	29
Έκφραση των τοποΐσομερασών κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου .....	29
Ενώσεις που δρουν ως αναστολείς Τοποΐσομερασών .....	30
Αναστολείς τοποΐσομεράσης I .....	31
Καμπτοθεκίνες.....	31
Ινδολοκαρβαζόλια .....	33
Αναστολείς τοποΐσομεράσης II .....	34
Διπλοί αναστολείς τοποΐσομεράσης I και II.....	37
DACA {N-[2-(Dimethylamino)ethyl]acridine-4-carboxamide}.....	37
Σχεδιασμός.....	39
ΧΗΜΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	42
Συνθετική πορεία για τα παράγωγα με σκελετό θειαζολοακρινιδίνης.....	42
Τρόποι σύνθεσης θειαζολίων .....	42
Σύνθεση παραγώγων με σκελετό θειαζολοακρινιδίνης με χλώριο στη θέση 5 .....	68
Σύνθεση παραγώγων με σκελετό θειαζολοακρινιδίνης .....	69
Σύνθεση αμιδινών με σκελετό θειαζολοακρινιδίνης και χλώριο στη θέση 5 .....	76
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	81
Σύνθεση του 2-((2-νιτροφαινυλ)αμινο)βενζοϊκού οξέος (3).....	81
Σύνθεση της 4-νιτρο-9,10-διϋδροακρινιδιν-9-όνης (4) .....	81
Σύνθεση της 4-αμινο-9,10-διϋδροακρινιδιν-9-όνης (5).....	82
Σύνθεση της 4-((4-χλωρο-5H-1,2,3-διθειαζολ-5-υλιδεν)αμινο)-9,10-διϋδρο-ακρινιδιν-9-όνης (7).....	82
Σύνθεση του 6-οξο-6,11-διϋδροθειαζολο[5,4-c]ακρινιδινο-2--2-καρβονιτριλίου (8).....	82



Σύνθεση της N-[2-(διμεθυλαμινο)αιθυλ]-6-οξο-6,11-διϋδροθειαζολο[5,4-c]ακριδινο-2-καρβοξαμιδίνης (9a).....	83
Σύνθεση της N-[2-(διμεθυλαμινο)προπυλ]-6-οξο-6,11-διϋδροθειαζολο[5,4-c]ακριδινο-2-καρβοξαμιδίνης (9b) .....	83
Σύνθεση του 6-οξο-6,11-διϋδροθειαζολο[5,4-c]ακριδινο-2-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα (10) .....	84
Σύνθεση του 6-οξο-6,11-διϋδροθειαζολο[5,4-c]ακριδινο-2-καρβοξυλικού οξέος (11) .	84
Σύνθεση του N-[2-(διμεθυλαμινο)αιθυλ]-6-οξο-6,11-διϋδροθειαζολο[5,4-c]ακριδινο-2-καρβοξαμιδίου (12a).....	85
Σύνθεση του N-[3-(διμεθυλαμινο)προπυλ]-6-οξο-6,11-διϋδροθειαζολο[5,4-c]ακριδινο-2-καρβοξαμιδίου (12b) .....	85
Σύνθεση του 4-αμινο-3,5-διβρωμοβενζοϊκού αιθυλεστέρα (14) .....	86
Σύνθεση του 4-νιτρο-3,5-διβρωμοβενζοϊκού αιθυλεστέρα (15) .....	86
Σύνθεση του 4-νιτρο-3,5-διβρωμοβενζοϊκού οξέος (16) .....	86
Σύνθεση του 3,5-δισ-[[2-(μεθοξυκαρβονυλ)φαινυλ]αμινο]-4-νιτροβενζοϊκού αιθυλεστέρα (17).....	87
Σύνθεση του 3,5-διβρωμο-4-[[2-(μεθοξυκαρβονυλ)φαινυλ]αμινο]βενζοϊκού αιθυλεστέρα (18).....	87
Σύνθεση της 2,4,6-τριβρωμοανιλίνης (20).....	88
Σύνθεση του 1,3,5-τριβρωμο-2-νιτροβενζολίου (21) .....	88
Σύνθεση του 2,2',2''-[[2-(νιτροφαινυλ-1,3,5-τριαμινο)]τριβενζοϊκού τριμεθυλεστέρα (22) .....	88
Σύνθεση του N-[3,5-διβρωμο-2-νιτρο(φαινυλ)]-ανθρανλικού μεθυλεστέρα (23).....	89
Σύνθεση του 2-[[3,5-διβρωμο-4-νιτρο(φαινυλ)]αμινο]βενζοϊκού μεθυλεστέρα (24)....	89
Σύνθεση της 2,4,6-τριβρωμο-N-(4-χλωρο-5H-1,2,3-διθειαζολ-5-υλιδεν)ανιλίνης (25) .	90
Σύνθεση του 4,6-διβρωμο-1,3-βενζοθειαζολο-2-καρβονιτριλίου (26) .....	90
Σύνθεση του 6-βρωμο-4-[[2-(μεθοξυκαρβονυλ)φαινυλ]αμινο]-1,3-βενζοθειαζολο-2-καρβονιτριλίου (27).....	91
Σύνθεση του 4,6-δι-[[2-(μεθοξυκαρβονυλ)φαινυλ]αμινο]-1,3-βενζοθειαζολο-2-καρβονιτριλίου (28).....	91
Σύνθεση της 2,6-διβρωμο-4-χλωροανιλίνης (30) .....	92
Σύνθεση της 2,6-διβρωμο-4-χλωρο-N-(4-χλωρο-5H-1,2,3-διθειαζολ-5-υλιδεν)ανιλίνης (31) .....	92
Σύνθεση του 4-βρωμο-6-χλωρο-1,3-βενζοθειαζολο-2-καρβονιτριλίου (32).....	92
Σύνθεση του 6-χλωρο-4-[[2-(μεθοξυκαρβονυλ)φαινυλ]αμινο]-1,3-βενζοθειαζολο-2-καρβονιτριλίου (33).....	93

Σύνθεση του 6-χλωρο-4-{{2-(μεθοξυκαρβονυλ)φαινυλ}αμινο}-1,3-βενζοθειαζολο-2-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα (34) .....	93
Σύνθεση του 4-{{2-(μεθοξυκαρβονυλ)φαινυλ}αμινο}-1,3-βενζοθειαζολο-2-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα (35) .....	93
Σύνθεση του 4-{{2-(καρβοξυ)φαινυλ}αμινο}-1,3-βενζο[d]θειαζολο-2-καρβοξυλικού οξέος (36) .....	94
Σύνθεση του 6-χλωρο-4-{{2-(καρβοξυλ)φαινυλ}αμινο}-1,3-βενζοθειαζολο-2-καρβοξυλικού οξέος (37).....	94
Σύνθεση του 5-χλωρο-6-οξο-6,11-διϋδροθειαζολο[5,4-c]ακριδινο-2-καρβοξυλικού οξέος (38) .....	95
Σύνθεση του N-{{2-(διμεθυλαμινο)αιθυλ}-6-οξο-5-χλωρο-6,11-διϋδροθειαζολο[5,4-c]ακριδινο -2-καρβοξαμιδίου (39a) .....	95
Σύνθεση του N-{{2-(διμεθυλαμινο)προπυλ}-6-οξο-5-χλωρο-6,11-διϋδροθειαζολο[5,4-c]ακριδινο -2-καρβοξαμιδίου (39b) .....	95
Σύνθεση της (2-{{2-(υδροξυμεθυλ)-βενζοθειαζ-4-ολ}αμινο}φαινυλ)μεθανόλης (40)....	96
Σύνθεση της 4-{{2-(φορμυλφαινυλ)αμινο}-1,3-βενζοθειαζολο-2-καρβοξαλδεϋδης (41) 96	
Σύνθεση θειαζολο[5,4-c]ακριδινο-2-καρβοξαλδεϋδης (42) .....	97
Σύνθεση του θειαζολο[5,4-c]ακριδινο-2-καρβονιτριλίου (43) .....	97
Σύνθεση της N-{{2-(διμεθυλαμινο)αιθυλ}-θειαζολο[5,4-c]ακριδινο-2-καρβοξαμιδίνης (44a).....	97
Σύνθεση της N-{{3-(διμεθυλαμινο)προπυλ}-θειαζολο[5,4-c]ακριδινο-2-καρβοξαμιδίνης (44b) .....	98
Σύνθεση του θειαζολο[5,4-c]ακριδινο-2-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα (45).....	98
Σύνθεση του N-{{2-(διμεθυλαμινο)αιθυλ}-θειαζολο[5,4-c]ακριδινο-2-καρβοξαμιδίου (46a).....	98
Σύνθεση του N-{{3-(διμεθυλαμινο)προπυλ}-θειαζολο[5,4-c]ακριδινο-2-καρβοξαμιδίου (46b) .....	99
Σύνθεση του (2-{{2-(υδροξυμεθυλ)-6-χλωρο-βενζοθειαζ-4-ολ}αμινο}φαινυλ)μεθανόλης (47) .....	99
Σύνθεση της 6-χλωρο-4-{{2-(φορμυλφαινυλ)αμινο}-1,3-βενζοθειαζολο-2-καρβοξαλδεϋδης (48).....	100
Σύνθεση της 5-χλωρο-θειαζολο[5,4-c]ακριδινο-2--καρβοξαλδεϋδης (49).....	100
Σύνθεση του 5-χλωρο-θειαζολο[5,4-c]ακριδινο-2-καρβονιτριλίου (50) .....	100
Σύνθεση της N-{{2-(διμεθυλαμινο)αιθυλ}-5-χλωρο-θειαζολο[5,4-c]ακριδινο-2-καρβοξαμιδίνης (51a).....	101
Σύνθεση της N-{{3-(διμεθυλαμινο)προπυλ}-5-χλωρο-6-οξο-6,11-διϋδροθειαζολο[5,4-c]ακριδινο-2-καρβοξαμιδίνης (51b).....	101
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	102

**ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΟΙ ΟΡΟΙ**

AcOH	Acetic acid
Ar	aromatic
Arg	Αργινίνη
Asp	Ασπαραγινικό οξύ
ATP	Adenosine 5'-triphosphate
BINAP	2,2'- Bis(diphenylphosphino)- 1,1'-binaphthalene
Boc <sub>2</sub> O	Di- <i>tert</i> -butyl dicarbonate
CDKs	Cyclin dependent kinases
CPT	Καμπτοθεκίνη
dATP	Deoxy Adenosine 5'- triphosphate
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazole
(COCl) <sub>2</sub>	Oxalyl chloride
DBU	1,8- Diazabicyclo[5.4.0]undec- 7-ene
DCC	<i>N,N'</i> - Dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Διχλωρομεθάνιο
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyano- 1,4-benzoquinone
DMAP	4-dimethylaminopyridine
DMF	Διμεθυλοφορμαμίδιο
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
DNA	Δεσοξυριβοζονουκλεϊνικό οξύ
DPPF	1,1'- Bis(diphenylphosphino)fer

	rocene
dsb	double strand breaks
Et <sub>3</sub> N	Triethylamine
EtOH	Αιθανόλη
Glu	Γλουταμινικό οξύ
His	Ιστιδίνη
HMDS	Hexamethyldisiloxane
Leu	Λευκίνη
Ligand	Προσδέτης
Lys	Λυσίνη
m-CBPA	Meta-chloroperoxybenzoic acid
MeOH	Μεθανόλη
NMR	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός
PCC	Χλωροχρωμική πυριδίνη
Pd(dbA) <sub>2</sub>	Bis(dibenzylideneacetone) palladium(0)
Pd <sub>2</sub> (dbA) <sub>3</sub>	Tris(dibenzylideneacetone) dipalladium(0)
Pd(Ph <sub>3</sub> P) <sub>4</sub>	Tetrakis(triphenylphosphine) palladium(0)
PKC	Protein kinase C
PPA	Πολυφοσφορικό οξύ
PPh <sub>3</sub>	Triphenylphosphine
Ser	Serine Σερίνη
ssb	single-strand break
TFA	Τριφθοροξικό οξύ
THF	Τετραϋδροφουράνιο
Thr	Θρεονίνη

TLC	Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδος
Tyr	Τυροσίνη
χρhοs	2-Dicyclohexylphosphino- 2',4',6'- triisopropylbiphenyl
δ	χημική μετατόπιση
Σ.τ.	Σημείο τήξης

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στη σημερινή εποχή μία από τις κύριες αιτίες θανάτου παγκοσμίως είναι ο καρκίνος, τα ποσοστά θνησιμότητας από τον οποίο αυξάνονται συνεχώς τα τελευταία χρόνια. Ενδεικτικά, έχει σημειωθεί αύξηση των θανάτων, σε παγκόσμιο επίπεδο, της τάξης του 10%, με το ποσοστό επί των θανάτων που οφείλεται σε καρκίνο να φτάνει το 14%.<sup>1</sup> Ειδικότερα στην Ευρωπαϊκή Ένωση των 27, ο καρκίνος είναι η δεύτερη αιτία θανάτου μετά από τις καρδιαγγειακές παθήσεις, με 167 θανάτους ανά 100.000 πληθυσμού το 2012.<sup>2</sup> Εκτός όμως, από τα υψηλά ποσοστά θνησιμότητας από αυτή τη νόσο, υψηλά είναι και τα ποσοστά εμφάνισης νέων κρουσμάτων κάθε χρόνο.<sup>1</sup> Για παράδειγμα, στις ΗΠΑ κάθε χρόνο νοσούν περισσότεροι από 1.6 εκατομμύρια άνθρωποι.<sup>3</sup> Ο συνεχώς αυξανόμενος αριθμός περιστατικών τα τελευταία χρόνια αποδίδεται κυρίως σε δύο πιθανά αίτια: την επιμήκυνση του προσδόκιμου επιβίωσης και την έκθεση μεγάλης μερίδας του πληθυσμού σε διάφορους καρκινογόνους παράγοντες. Από τα παραπάνω, γίνεται αντιληπτή η αναγκαιότητα της αντιμετώπισης της θανατηφόρας αυτής νόσου. Αν και καταβάλλεται μεγάλη προσπάθεια από την επιστημονική κοινότητα για την αντιμετώπιση της, μια ολοκληρωμένη θεραπεία ακόμα δεν έχει βρεθεί. Αυτό οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι ο καρκίνος είναι ένα σύνολο νόσων και ότι τα χαρακτηριστικά των διαφόρων τύπων καρκίνου εμφανίζουν μεγάλη ποικιλία μεταξύ τους και από οργανισμό σε οργανισμό.

Για να γίνει κατανοητό γιατί είναι δύσκολη η αντιμετώπιση του καρκίνου θα πρέπει να γίνει αναφορά στη φυσιολογία και τη συμπεριφορά του. Ο άνθρωπος είναι ένας πολυκύτταρος οργανισμός, αποτελείται δηλαδή από έναν πολύ μεγάλο και δυναμικά σταθερό αριθμό κυττάρων με βασικά χαρακτηριστικά την κυτταρική διαίρεση και την απόλυτη εξειδίκευση ως προς μια συγκεκριμένη λειτουργία. Οι ιδιότητες αυτές ελέγχονται από ορισμένους πολύπλοκους ρυθμιστικούς μηχανισμούς, μεταβολή ή έκπτωση των οποίων μπορεί να οδηγήσει στην πρόκληση μιας μη φυσιολογικής μάζας κυττάρων, η ανάπτυξη της οποίας ξεπερνά τα όρια των φυσιολογικών ιστών και ονομάζεται νεόπλασμα. Τα νεοπλάσματα διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τα καλοήθη και τα κακοήθη. Τα καλοήθη νεοπλάσματα αποτελούν όγκους κυττάρων που εμφανίζουν μεν μια κάποια άναρχη και αυτόνομη κυτταρική διαίρεση αλλά εμφανίζουν σαφή και διακριτά όρια και ως εκ τούτου είναι δυνατόν να απομακρυνθούν επιτυχώς με χειρουργική επέμβαση. Κάποια από τα βασικά χαρακτηριστικά τους είναι ότι τα νεοπλασματικά κύτταρα μοιάζουν με το μητρικό ιστό, είναι περιγεγραμμένα και έχουν κάψα, καθώς επίσης και ότι δε δίνουν μεταστάσεις και δε διηθούν τους γύρω ιστούς. Αντιθέτως, οι κακοήθεις νεοπλασίες αναπτύσσονται ταχύτατα ενώ διαθέτουν και την ικανότητα της μετάστασης, δηλαδή της διεξόδου του όγκου σε γειτονικούς ιστούς, καθώς και της μεταφοράς του μέσω του λεμφικού ή του κυκλοφορικού συστήματος σε απομακρυσμένους ιστούς ή όργανα-στόχους, όπου και εγκαθίστανται, συνεχίζοντας τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τους και οδηγούν σε δημιουργία δευτερογενών όγκων, οι οποίοι

χαρακτηρίζονται με τον όρο καρκίνος. Έτσι λοιπόν, τα γενικότερα χαρακτηριστικά του καρκινικού φαινοτύπου συνοψίζονται στα εξής:<sup>4</sup>

- Αυτό-επάρκεια σε αυξητικά μηνύματα,
- Παράκαμψη των σημάτων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και των σημάτων διαφοροποίησης,
- Αναστολή της απόπτωσης,
- Δυνατότητα πολλαπλασιασμού χωρίς όρια,
- Επαρκής αγγειογένεση,
- Διήθηση και μετάσταση.

Η καρκινογένεση σχετίζεται με δύο κατηγορίες γονιδίων: τα ογκογονίδια<sup>5</sup> και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια<sup>6</sup>. Τα πρώτα κωδικοποιούν τη σύνθεση πρωτεϊνών, οι οποίες συμμετέχουν στην κυτταρική διαίρεση και συνεπώς υπερέκφραση των συγκεκριμένων γονιδίων πιθανόν να οδηγήσει σε δημιουργία καρκίνου. Τα δεύτερα προκαλούν την παραγωγή πρωτεϊνών που διακόπτουν την κυτταρική διαίρεση ή οδηγούν σε κυτταρική απόπτωση, με αποτέλεσμα η αναστολή αυτών των γονιδίων να αποτελεί έναυσμα καρκινογένεσης. Διάφορα είδη μεταλλάξεων σε αυτούς τους δύο τύπους γονιδίων μπορούν να επιφέρουν καρκίνο. Θεωρητικά, μία και μόνο μετάλλαξη θα αρκούσε για την πρόκληση νεοπλασίας, ωστόσο η πληθώρα επιδιορθωτικών μηχανισμών που διαθέτει ο ανθρώπινος οργανισμός καθιστά κάτι τέτοιο αδύνατο, για αυτό κι ο καρκίνος ουσιαστικά αποτελεί συνέπεια πολλαπλών μεταλλάξεων που καθίστανται αδύνατο να επιδιορθωθούν στο σύνολό τους. Από τις πιο επικίνδυνες μεταλλάξεις στο ανθρώπινο DNA είναι σε περιοχές που κωδικοποιούν τα επιδιορθωτικά ένζυμα με αποτέλεσμα από εκείνο το σημείο και έπειτα οι περαιτέρω μεταλλάξεις να μην είναι εφικτό να επιδιορθωθούν από το κύτταρο. Όλες αυτές οι μεταλλάξεις μπορεί να οφείλονται τόσο σε γενετικούς όσο και σε περιβαλλοντικούς παράγοντες π.χ. χημικά καρκινογόνα, ακτινοβολία, ογκογόνοι ιοί κ.α.

Οι διάφορες κατηγορίες καρκίνου μπορούν να ταξινομηθούν όχι μόνο βάσει της αιτιολογίας τους αλλά και ανάλογα με το είδος του ιστού στον οποίο εντοπίζονται. Έτσι, λοιπόν, διακρίνονται το καρκίνωμα και το σάρκωμα. Το καρκίνωμα αναφέρεται σε καρκίνους επιθηλιακών ιστών, οι οποίοι καλύπτουν το εξωτερικό του σώματος (δέρμα) ή/και επενδύουν τις εσωτερικές κοιλότητες των οργάνων π.χ. μαστός, αναπνευστικό, γαστρεντερικό, ουροποιητικό, γεννητικό σύστημα καθώς και ενδοκρινείς αδένες. Από την άλλη, το σάρκωμα σχετίζεται με καρκίνους που αναπτύσσονται σε συνδετικούς ιστούς, όπως οι μύες, τα αιμοφόρα αγγεία, τα οστά, οι χόνδροι και οι ινώδεις ιστοί. Οι λευχαιμίες, τα λεμφώματα και οι άλλοι καρκίνοι των αιμοποιητικών ιστών, το μελάνωμα καθώς και οι όγκοι των νευρικών ιστών, συμπεριλαμβανομένου και του εγκεφάλου ταξινομούνται ξεχωριστά.<sup>7</sup>

Οι σύγχρονες θεραπευτικές προσεγγίσεις που ακολουθούνται ενάντια στον καρκίνο εξαρτώνται από πληθώρα παραγόντων, όπως το είδος των καρκινικών κυττάρων, τον προσβληθέντα ιστό, καθώς επίσης και το στάδιο της νόσου. Έτσι, η κλινική αντιμετώπιση δεν είναι δυνατό σε καμία περίπτωση να είναι ενιαία, αλλά στοχεύει στην εκλεκτική αντιμετώπιση των καρκινικών κυττάρων συνδυάζοντας δύο ή περισσότερες μεθόδους προκειμένου να επιτευχθεί το βέλτιστο δυνατό αποτέλεσμα που σκοπό έχει την:

1. Καταστροφή ή απομάκρυνση όλων των καρκινικών κυττάρων
2. Επιβράδυνση της εξέλιξης της νόσου
3. Επιμήκυνση ή βελτίωση της ζωής του ασθενούς.

Οι κλασσικοί τρόποι αντιμετώπισης του καρκίνου συνοψίζονται στους παρακάτω:<sup>8</sup>

- Χειρουργική επέμβαση: χρησιμοποιείται για τη διάγνωση και τη θεραπεία σταθερών όγκων, είναι τοπική και είναι από τις πιο αποτελεσματικές θεραπείες, όταν οι όγκοι είναι χειρουργήσιμοι.
- Ακτινοθεραπεία: Είναι και αυτή τοπική θεραπεία και δρα ιονίζοντας το DNA των καρκινικών κυττάρων εμποδίζοντας τη διαίρεσή του και οδηγώντας το στο θάνατο.
- Χημειοθεραπεία: Είναι συστηματική θεραπεία καθώς οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες εισέρχονται στην κυκλοφορία και κατανέμονται σε όλο το σώμα. Έτσι, μπορούν και δρουν στα καρκινικά κύτταρα οπουδήποτε και αν αυτά βρίσκονται και είναι πιο αποτελεσματική σε κύτταρα που πολλαπλασιάζονται γρήγορα. Οι τρεις παραπάνω θεραπείες συχνά χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό για την καλύτερη αντιμετώπιση της νόσου.
- Ανοσοθεραπεία: Έχει ως στόχο την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος του ατόμου για τη θανάτωση των καρκινικών κυττάρων. Χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τη συμβατική χημειοθεραπεία ή με χειρουργική επέμβαση.

## Τοποΐσομεράσες

Το γενετικό υλικό είναι «πακεταρισμένο» στο εσωτερικό του πυρήνα του ευκαρυωτικού κυττάρου σε χρωμοσώματα, βρίσκεται υπό τη μορφή της διπλής έλικας και για να μπορέσει να επιτελέσει τις λειτουργίες του, όπως είναι η αντιγραφή, η μεταγραφή, το «πακετάρισμα», η επιδιόρθωση και η αναδιάταξη, θα πρέπει να «ξεπακεταριστεί» και να ξετυλιχθεί η μία έλικα από την άλλη. Αυτή η διαδικασία δε γίνεται σε όλο το μήκος του γενετικού υλικού, παρά μόνο στη συγκεκριμένη περιοχή που «χρειάζεται» το κύτταρο τη δεδομένη στιγμή για δύο, κυρίως, λόγους: α) γιατί το μέγεθος του DNA δεν του επιτρέπει να είναι στον πυρήνα στη μορφή της διπλής έλικας και β) γιατί είναι ενεργειακά κοστοβόρο. Το γεγονός αυτό δημιουργεί σημαντικά προβλήματα στο κύτταρο όταν θα πρέπει να διαχειριστεί το DNA του, ενώ προσεγγίζει τις γενετικές πληροφορίες, που βρίσκονται κωδικοποιημένες στο



γενετικό υλικό, και όταν διπλασιάζει το DNA κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης.<sup>9</sup>

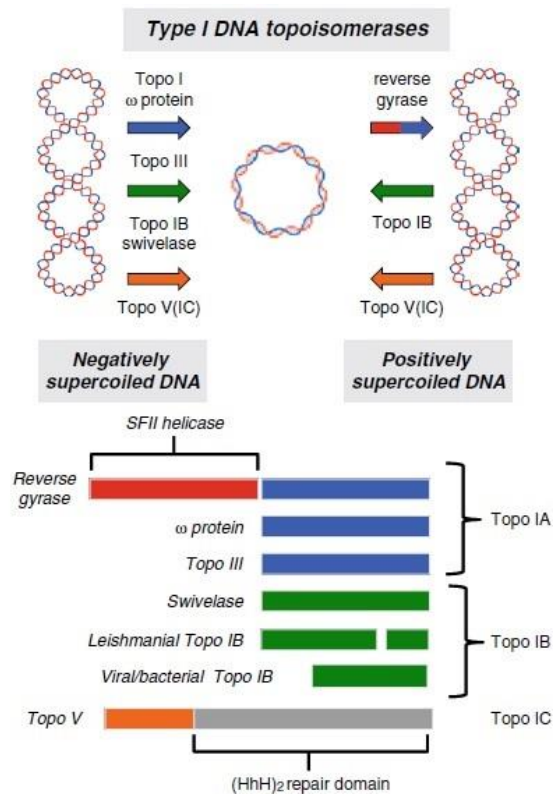
Με βάση τη δομή της διπλής έλικας του DNA το ξετύλιγμα και ο διαχωρισμός των δύο κλώνων φαίνεται δύσκολος εκ πρώτης όψεως. Το εντοπισμένο ξετύλιγμα του DNA, που συμβαίνει, προκαλεί συστροφική τάση στο υπόλοιπο μέρος του μορίου καθώς τα άκρα των κλώνων της διπλής έλικας δεν είναι ελεύθερα προς περιστροφή. Ως αποτέλεσμα, το DNA συστρέφεται γύρω από τον εαυτό του δημιουργώντας, θετικές ή αρνητικές, υπερελικώσεις. Το κύτταρο, λοιπόν, για να αποτρέψει αυτή την υπερελίκωση, που προκαλείται από τη συστροφική τάση, και για να επαναφέρει το γενετικό υλικό στην αρχική του κατάσταση έπειτα από το πέρας της διαδικασίας έχει στο οπλοστάσιό του μια σειρά από πρωτεΐνες που ονομάζονται τοποϊσομεράσες.

Η ύπαρξή τους έγινε γνωστή το 1971, από την ανακάλυψη ενός ενζύμου της *E. Coli*, που είχε την ικανότητα να μετατρέπει αρνητικώς υπερελικωμένο DNA στη χαλαρή του μορφή.<sup>10</sup> Έπειτα, ένζυμα τέτοιου είδους έχουν περιγραφεί σε πολλούς οργανισμούς, προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς. Η κύρια λειτουργία τους είναι η επίλυση τέτοιων τοπολογικών προβλημάτων, που αναφέρθηκαν παραπάνω, και προκύπτουν σε όλες τις διαδικασίες που σχετίζονται με το DNA.

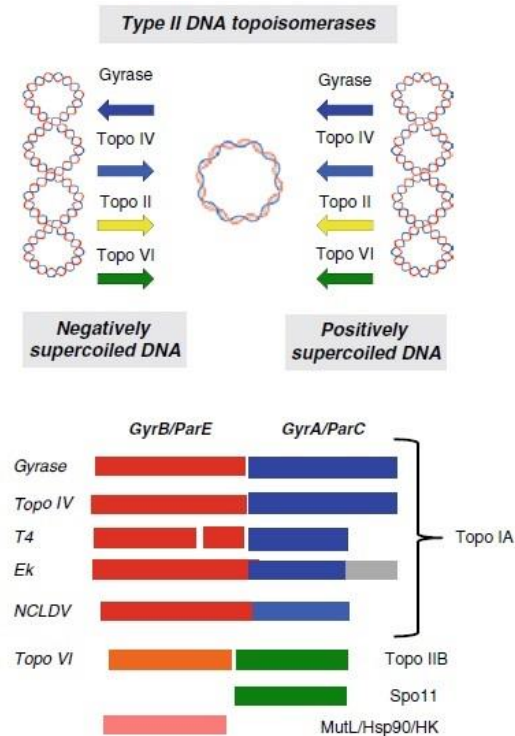
Η ονομασία τους οφείλεται στην ικανότητα τους να επιδρούν επί της τοπολογίας του DNA ή της τρισδιάστατης γεωμετρίας του, χωρίς όμως να μεταβάλλουν τη χημική δομή του. Καταλύουν, δηλαδή, αντιδράσεις ισομερίωσης του DNA μεταξύ διαφορετικών τοπολογικών μορφών του. Για να πραγματοποιηθούν αυτές οι αντιδράσεις, απαιτείται κόψιμο και επανασύνδεση των κλώνων του DNA που είναι και η βασική αντίδραση που καταλύεται από τις τοποϊσομεράσες. Προκαλούν μια παροδική αποσύζευξη στο DNA κατά τη διάρκεια της οποίας το ένζυμο παραμένει ομοιοπολικά συνδεδεμένο με αυτό μέσω ενός αμινοξέος τυροσίνης που υπάρχει στο ενεργό κέντρο του, «ξεμπερδεύουν» τους δύο κλώνους του DNA διαμέσου της παροδικής αποσύζευξης και στο τέλος επανασυνδέουν το αποσυζευγμένο DNA. Με το πέρας της διεργασίας αυτής, το αποτέλεσμα είναι ένα μόριο DNA, χημικώς αμετάβλητο αλλά με διαφορετική τοπολογία.

Μέχρι σήμερα έχει ανακαλυφθεί ένας μεγάλος αριθμός τοποϊσομερασών τόσο σε προκαρυωτικά, όσο και σε ευκαρυωτικά κύτταρα για τις οποίες έχουν γίνει προσπάθειες ονοματολογίας και κατηγοριοποίησής τους, είτε βάσει χρονολογικής ανακάλυψης (Topo I, II, III, IV, V, VI), είτε βάσει μηχανισμού δράσης (τύπος I, τύπος II, τύπος IA, τύπος IB), είτε βάσει εξελικτικής ταξινόμησης (Topo IA, Topo IB, Topo IC, Topo IIA, Topo IIB).<sup>11</sup> Οι τοποϊσομεράσες τύπου I, είναι μονομερή, δεν απαιτούν ATP, και προκαλούν μια παροδική αποσύζευξη μόνο στον έναν κλώνο του DNA. Αυτές κατηγοριοποιούνται περαιτέρω σε τύπου IA και IB. Οι πρώτες έχουν τη ικανότητα να χαλαρώνουν μόνο αρνητικώς υπερελικωμένο DNA, ενώ οι δεύτερες και αρνητικώς και θετικώς υπερελικωμένο DNA. Οι τύπου II είναι ATP εξαρτώμενες και αποσυζεύχουν παροδικά και τους δύο κλώνους του DNA.

Παρακάτω θα γίνει μια σύντομη αναφορά στις προκαρυωτικές τοποϊσομεράσες, ενώ εκτενής θα είναι εκείνη για τις ευκαρυωτικές για να κατανοηθεί η λειτουργία τους και ο λόγος για τον οποίο παρουσιάζουν τεράστιο φαρμακολογικό ενδιαφέρον ως στόχοι για την αντιμετώπιση του καρκίνου.



Σχήμα 1.1: Οικογένειες και υπο-οικογένειες των τοποϊσομερασών τύπου I: κυριότεροι τρόποι κατάλυσης και ομόλογες αλληλουχίες.<sup>12</sup>



Σχήμα 1.2: Οικογένειες και υπο-οικογένειες των τοποϊσομερασών τύπου II: κυριότεροι τρόποι κατάλυσης και ομόλογες αλληλουχίες.<sup>13</sup>

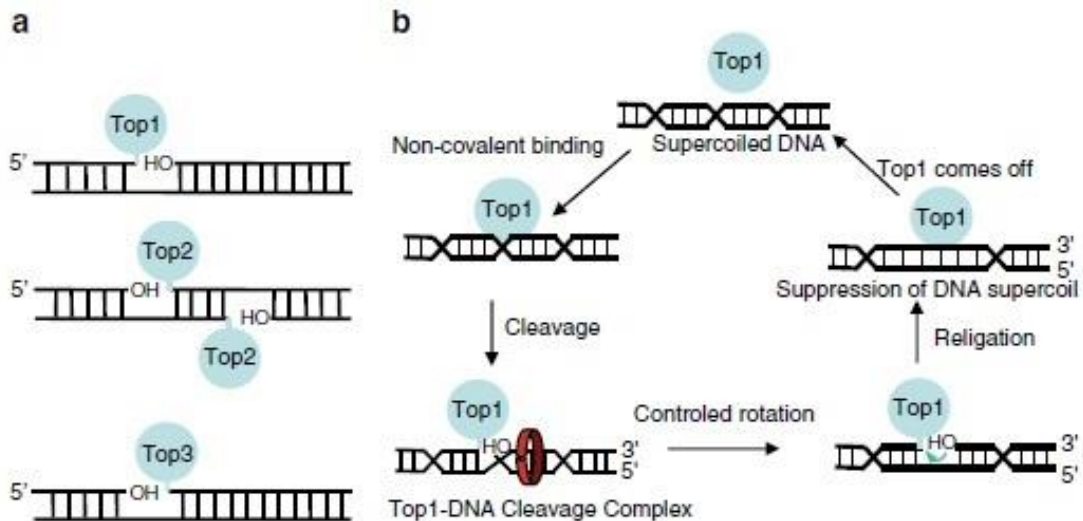
Το προκαρυωτικό DNA αν και δεν είναι πακεταρισμένο, όπως το ευκαρυωτικό, είναι κυκλικό, οπότε με τη διάνοιξη της διπλής έλικας για να γίνουν οι βάσεις προσπελάσιμες από τα απαραίτητα ένζυμα, δημιουργούνται υπερελικώσεις. Γι' αυτό και χρειάζεται τις τοποϊσομεράσες, για να το επαναφέρει στην αρχική του, «χαλαρή» κατάσταση, μετά το τέλος της κάθε διεργασίας. Στα προκαρυωτικά κύτταρα, λοιπόν, απαντώνται οι εξής τοποϊσομεράσες:

- Τοποϊσομεράση I (αρχικά ονομάστηκε πρωτεΐνη ω): Είναι ένα μονομερές μοριακού βάρους 97 kDa, κωδικοποιείται από το γονίδιο *topA* και προσδένεται εκλεκτικά σε περιοχές μονόκλωνου DNA.<sup>14-16</sup> Η σημαντικότερη λειτουργία της είναι η χαλάρωση αρνητικών υπερελικώσεων (τύπου IA) που συσσωρεύονται στο πίσω μέρος της μεταγραφικής μηχανής. Επίσης, φαίνεται πως έχει τη δυνατότητα να λειτουργήσει και ως μεταγραφικός παράγοντας<sup>17</sup> καθώς η καρβοξυ-τελική περιοχή του ενζύμου έχει περιοχές με ομόλογη αλληλουχία με τις πρωτεΐνες φερμουάρ αρκετών μεταγραφικών παραγόντων<sup>18</sup>.
- DNA γυράση: Είναι ένα τετραμερές που αποτελείται από δύο A και δύο B υπομονάδες (A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>) και η δράση της εξαρτάται από το ATP (τύπου II). Η υπομονάδα A κωδικοποιείται από το γονίδιο *gyrA*, ενώ η B από το *gyrB* και έχουν μοριακό βάρος 97 kDa και 90 kDa αντίστοιχα.<sup>19</sup> Είναι η μοναδική μεταξύ των προκαρυωτικών τοποϊσομερασών που έχει την ικανότητα αρνητικής υπερελίκωσης χαλαρωμένου DNA.
- Τοποϊσομεράση III: Είναι μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 74 kDa, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *topB*, και εμφανίζει εκτενή ομολογία αλληλουχίας με την τοποϊσομεράση I. Βέβαια, στο μηχανισμό δράσης είναι διαφορετική, καθώς είναι πιο αποτελεσματική στην αποσύνδεση, παρά στην αποσυσπείρωση μορίων DNA, που απαιτεί ένα μικρό κόψιμο σε έναν από τους δύο κλώνους. Επίσης, έχει την ικανότητα να επιμηκύνει την αλυσίδα του DNA, σε αντίθεση με την τοποϊσομεράση I.<sup>20</sup>
- Τοποϊσομεράση IV: Είναι ένα ετεροδιμερές (C<sub>2</sub>E<sub>2</sub>), που κωδικοποιείται από τα γονίδια *par C* και *par E*. Ανήκει στην ίδια κατηγορία με τη DNA γυράση, αλλά δεν έχει τη δυνατότητα να υπερελικώνει το DNA,<sup>21</sup> αφού δεν μπορεί να τυλιχθεί από αυτό. Αντιθέτως, ο κύριος ρόλος της αφορά στην αποσύζευξη του DNA μετά την αντιγραφή, ενώ νεότερες μελέτες δείχνουν ότι απομακρύνει υπερελικώσεις που εμφανίζονται στο εμπρόσθιο τμήμα της διχάλας διπλασιασμού.<sup>22</sup> Η συνδυασμένη δράση της DNA γυράσης και της της τοποϊσομεράση I και IV συμβάλλουν στη διατήρηση μιας συνολικής αρνητικώς υπερελικωμένης μορφής του βακτηριακού DNA.<sup>23</sup>
- Αντίστροφη γυράση: Είναι μία σύνθετη πρωτεΐνη που σχηματίζεται από την ένωση μιας τοποϊσομεράσης IA και μιας ATP-εξαρτώμενης SF<sub>2</sub> ελικάσης που συνεργαζόμενες προκαλούν θετική υπερελίκωση στο DNA. Βρίσκεται σε υπερθερμοφιλικά βακτήρια και πιθανολογείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία του DNA από τη διάσπαση σε υψηλές θερμοκρασίες.<sup>24</sup>
- Τοποϊσομεράση V: Έχει την ικανότητα να μετατρέπει στη χαλαρή κατάσταση είτε θετικά είτε αρνητικά υπερελικωμένο DNA και συνδέεται με αυτό στο

3'τελικό άκρο του. Εκτός από τις ιδιότητες τοποϊσομεράσης (στο αμινοτελικό άκρο, περιοχή μοριακού βάρους γύρω στα 40 kDa) έχει και δυνατότητα να επιδιορθώνει το DNA (στο καρβοξυ-τελικό άκρο, περιοχή μοριακού βάρους γύρω στα 60 kDa), που την καθιστά τη μοναδική γνωστή τοποϊσομεράση με αυτή την ικανότητα.<sup>25</sup>

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, αντίστοιχα με τους προκαρυωτικούς, υπάρχει ποικιλία τοποϊσομερασών, καθώς καθεμία επιδίδεται σε συγκεκριμένη λειτουργία. Συνοπτικά για τις ευκαρυωτικές τοποϊσομεράσες στο σύνολό τους:

- Τοποϊσομεράση I: Στον άνθρωπο το γονίδιο που κωδικοποιεί αυτή την πρωτεΐνη, με μοριακό βάρος 100 kDa, βρίσκεται στο χρωμόσωμα 20.<sup>26</sup> Βάσει μηχανισμού δράσης κατατάσσεται στις IB, διότι κατά τη διάρκεια της αποκοπής του DNA συνδέεται ομοιοπολικά με το 3' άκρο και δρα κυρίως περιστρέφοντας το DNA.
- Τοποϊσομεράση II: Είναι ένα ομοδιμερές από πανομοιότυπες υπομονάδες και στα ανθρώπινα κύτταρα βρίσκεται σε δύο ισομορφές, τη IIα και τη IIβ<sup>27</sup>, των οποίων οι υπομονάδες έχουν μοριακό βάρος 170 kDa και 180 kDa και τα γονίδια που τις κωδικοποιούν βρίσκονται στο χρωμόσωμα 17<sup>28</sup> και στο 3<sup>29</sup> αντίστοιχα.
  - Η τοποϊσομεράση IIα πιστεύεται ότι συμμετέχει σε διαδικασίες ανάπτυξης των κυττάρων όπως η αντιγραφή του DNA και δρα μέσω της απεμπλοκής διαπλεκόμενων χρωμοσωμάτων μετά τη σύνθεση του DNA προς τον κατάλληλο χρωμοσωμικό διαχωρισμό στα θυγατρικά κύτταρα.<sup>30</sup>
  - Ο φυσιολογικός ρόλος της τοποϊσομεράση IIβ δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα, αλλά φαίνεται να μην έχει σχέση με την ανάπτυξη των κυττάρων καθώς αυτή δεν μπορεί να αντικαταστήσει τη IIα όταν αυτή έχει έλλειψη σε κύτταρα. Από πειράματα που έγιναν σε ποντίκια, πιστεύεται ότι συμβάλλει στην ομαλή νευρομυϊκή ανάπτυξη.<sup>31</sup>
- Τοποϊσομεράση III: Στον άνθρωπο παρουσιάζει και αυτή δύο ισομορφές τις IIIα (κωδικοποιείται στον γενετικό τόπο 17p11.2-12) και IIIβ (κωδικοποιείται στο γονίδιο της ανοσοσφαιρίνης λ).<sup>32</sup> Παίζουν σημαντικό ρόλο κατά τη φυσιολογική εμβρυονική ανάπτυξη<sup>33</sup> και κατά τη διάρκεια της μείωσης<sup>34</sup>. Από μελέτες που έδειξαν ότι έλλειψη τοποϊσομεράσης III οδηγεί σε γενετική αστάθεια που μπορεί να αυξήσει τις πιθανότητες κακοήθους μετάλλαξης και το γονίδιο της έχει προταθεί ως ογκοκατασταλτικός παράγοντας.<sup>35</sup>



Σχήμα 1.3: α) Οι τρεις τύποι ανθρώπινων τοποϊσομερασών και ο τρόπος τμήσης του DNA για την κάθε μία β) Μηχανισμός δράσης τοποϊσομεράσης I.<sup>36</sup>

Στη συνέχεια θα αναλυθούν διεξοδικότερα η τοποϊσομεράση I καθώς και η II επειδή, όπως διαπιστώνεται από τα παραπάνω, που πιθανώς να είναι στόχοι φαρμάκων για την αντιμετώπιση νεοπλασιών.

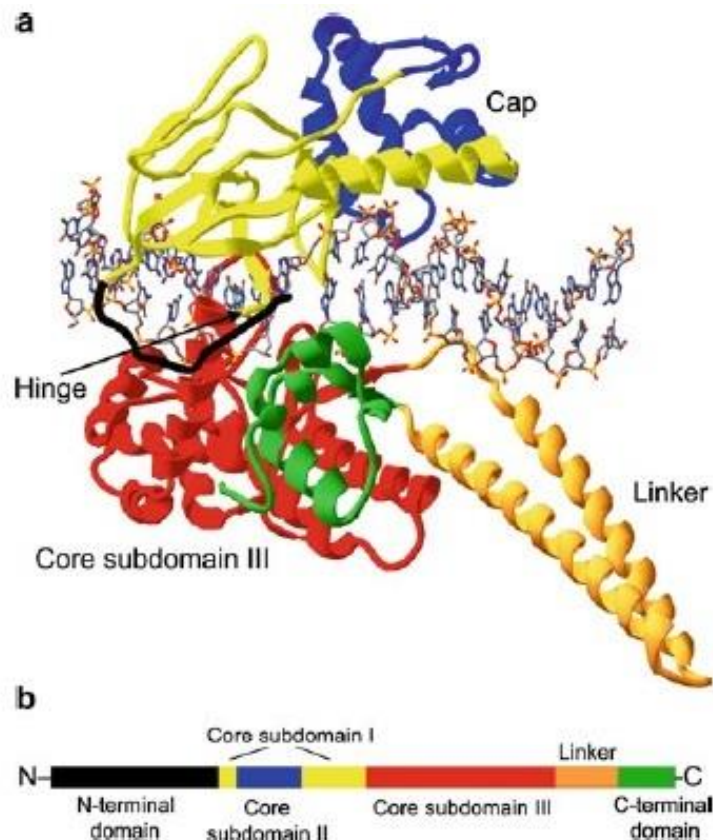
### Τοποϊσομεράση I

Η κύρια φυσιολογική λειτουργία της τοποϊσομεράσης I είναι η κατάλυση της απομάκρυνσης των θετικών υπερελικώσεων που σχηματίζονται κατά τη μετακίνηση του συμπλόκου αντιγραφής κατά μήκος του DNA. Απουσία της, το σύμπλοκο σταματάει την αντιγραφή λόγω συσσώρευσης περιστροφικών τάσεων στον κλώνο εκμαγείο του DNA.

Επιπλέον, παίζει ρόλο και στη μεταγραφή καθώς ρυθμίζει την έναρξή της με έμμεση αλληλεπίδραση με μεταγραφικούς παράγοντες. Καταστέλλει τη μεταγραφή απουσία του ενεργοποιητή στα γονίδια, ενώ την προάγει παρουσία του. Επηρεάζει τη μεταγραφή και με έναν επιπλέον τρόπο, αφού χαλαρώνει τις τάσεις στρέψης που ακολουθούν την επιμήκυνση του RNA.

Επιπροσθέτως, η τοποϊσομεράση I συμμετέχει στην συμπίκνωση του χρωμοσώματος. Έχουν ταυτοποιηθεί τέσσερις ομάδες μεταλλάξεων TRF (topo I-related function) σχετικά με πρωτεΐνες που σχετίζονται λειτουργικά με την τοποϊσομεράση I. Η πρωτεΐνη Tgf 4 παρουσιάζει ομολογία με την αμινοτελική περιοχή της τοποϊσομεράσης I. Μεταλλάξεις ακύρωσης στην Tgf 4 είναι ασύμβατες σε συνδυασμό με μεταλλάξεις της τοποϊσομεράσης I κι έχουν αποδοθεί σε ανεπάρκεια συμπίκνωσης των μιτωτικών χρωμοσωμάτων, επιμήκυνσης της μιτωτικής ατράκτου και πυρηνικού διαχωρισμού, αλλά όχι σε ανεπάρκεια αντιγραφής του DNA.<sup>37</sup>

Έχει, ακόμα, παρουσιάσει δραστικότητα πρωτεϊνικής κινάσης έναντι κάποιων παραγόντων διαμελισμού του DNA (splicing factors) που χαρακτηρίζονται από αλληλουχίες ριβονουκλεοπρωτεΐνης και επαναλήψεις αργινίνης-σερίνης, απαραίτητες για τη λειτουργία τους.<sup>38</sup>



Σχήμα 1.4: Οι κύριοι δομικοί λίθοι της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I. Οι περιοχές της πρωτεΐνης φαίνονται και στα δύο σχήματα a και b με τα ακόλουθα χρώματα: μύρο, αμινο-τελικό άκρο (1-214) κίτρινο, κύρια υπονομάδα I (215-232 και 319-433) μπλε, κύρια υπομονάδα II (233-318) κόκκινο, κύρια υπομονάδα III (434-635) πορτοκαλί, συνδέτης (636-712) πράσινο, καρβοξυ-τελικό άκρο (713-765).<sup>39</sup>

### Καταλυτικός κύκλος

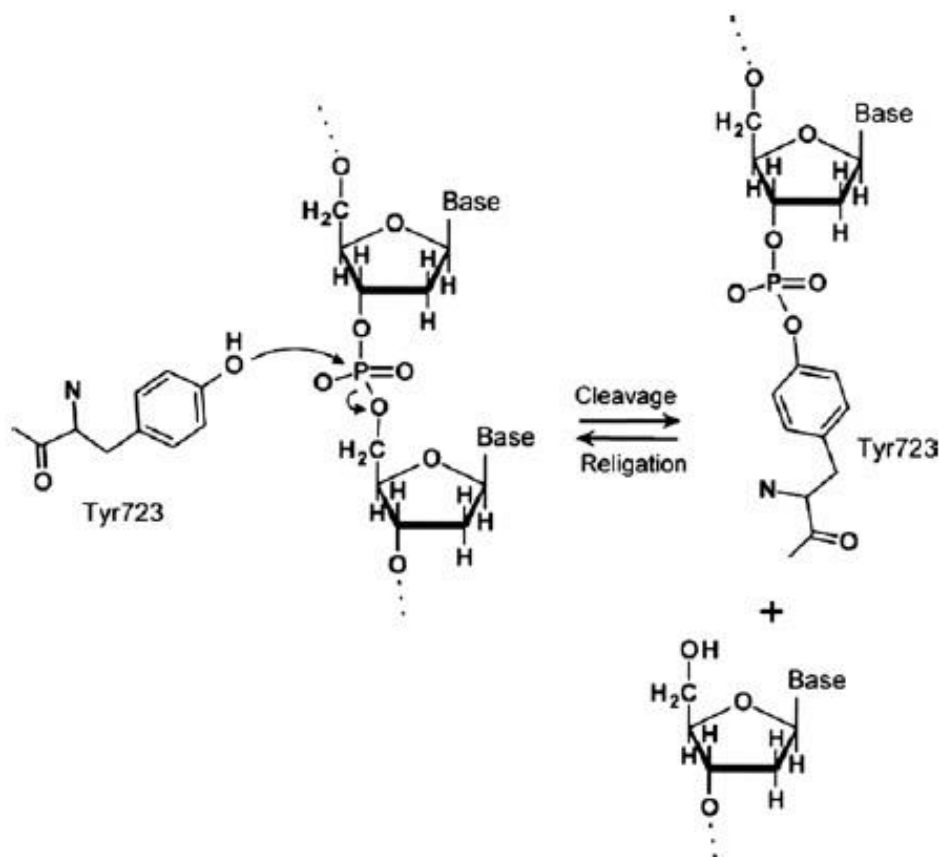
Ο καταλυτικός κύκλος της τοποϊσομεράσης I περιλαμβάνει τέσσερα διακριτά στάδια (Σχήμα 1.3):

1. Πρόσδεση του μορίου στο DNA: Η πρόσδεσή της γίνεται αποκλειστικά σε δίκλωνο DNA ή μονόκλωνο του οποίου τμήματα σχηματίζουν διπλές δομές, και η πρόσδεση αυτή φαίνεται να είναι πιο ισχυρή σε κυρτό ή υπερελικωμένο DNA.<sup>40</sup> Μεθυλίωση κυτοσίνων γύρω από τη θέση αποκοπής είναι δυνατό να αυξήσει ή να μειώσει τη δράση του ενζύμου ανάλογα με τη σχετική τοπολογία των δύο θέσεων (μεθυλιωμένης κυτοσίνης – θέσης αποκοπής).<sup>41</sup>
2. Διάσπαση του DNA: Η διάσπαση του ενός κλώνου του DNA γίνεται μέσω ομοιοπολικής σύνδεσης του ενζύμου με το 5' άκρο του κομμένου DNA και οδηγεί στο σχηματισμό του συμπλόκου διάσπασης. Το κόψιμο του κλώνου γίνεται μέσω μιας τρανσεστεροποίησης κατά την οποία η υδροξυλομάδα της Tyr<sup>723</sup> (ενεργό κέντρο) συνδέεται με την 3' φωσφορική ομάδα του φωσφοδιεστερικού δεσμού, ελευθερώνοντας την 5' υδροξυλομάδα και δημιουργώντας έτσι ένα σπάσιμο στον κλώνο.<sup>42-43</sup> Η διάσπαση του DNA από την τοποϊσομεράση I απαιτεί την αλληλεπίδραση της τόσο με τον κομμένο όσο και με τον άθικτο κλώνο του DNA.<sup>44</sup>

3. Περιστροφή του αποσυζευγμένου κλώνου: Από κρυσταλλογραφικά δεδομένα έχει εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η τοποϊσομεράση I περικυκλώνει το DNA και γεφυρώνει την απόσταση στο σημείο διάσπασης σχηματίζοντας ομοιοπολική και μη-ομοιοπολική σύνδεση και με τα δυο άκρα του σπασμένου DNA<sup>44</sup>. Ο ανέπαφος κλώνος παραμένει σταθερός, ενώ ο αποσυζευγμένος κλώνος υπόκειται σε περιστροφή, μεταβάλλοντας τον αριθμό των συνδέσεων κατά έναν, με αποτέλεσμα τη χαλάρωση του. Ο τρόπος αυτός αποσυσπείρωσης δίνει στην τοποϊσομεράση I τη ικανότητα γρήγορης και άμεσης απομάκρυνσης των υπερελικώσεων που προκαλούνται κατά την αντιγραφή ή τη μεταγραφή του DNA.<sup>45</sup>
4. Επανασύνδεση του DNA: Η επανασύνδεση είναι μια ακόμα αντίδραση τρανσεστεροποίησης κατά την οποία η 5' υδροξυλομάδα του σπασμένου κλώνου λειτουργεί ως πυρηνόφιλο υπόστρωμα που χτυπάει τον φωσφοτυροσινικό δεσμό και επανασυνδέει το σπασμένο DNA. Ο μηχανισμός απελευθέρωσης μπορεί να προκαλείται ακόμη και από άγνωστους κυτταρικούς παράγοντες για την απελευθέρωση της τοποϊσομεράσης I από τα σύμπλοκα διάσπασης. Ένας διαφορετικός τρόπος με τον οποίο θα ήταν εφικτό να απελευθερωθεί η τοποϊσομεράση I είναι μέσω μιας ενδογενούς φωσφοδιεστεράσης που θα δημιουργούσε μια 3' υδροξυλομάδα και η οποία θα μπορούσε να λειτουργήσει ως υπόστρωμα για την DNA πολυμεράση, καθώς κάτι τέτοιο έχει παρατηρηθεί στη ζύμη και σε εκχυλίσματα ανθρώπινων κυττάρων.<sup>46</sup> Ακόμα ένας τρόπος επανένωσης, προκύπτει με την παρουσία ενός εξωγενούς κλώνου DNA που φέρει στο 5' άκρο μια υδροξυλομάδα. Η ύπαρξή του έχει ως αποτέλεσμα ανταλλαγή των κλώνων και ανασυνδυασμό.<sup>47</sup> Τέτοιες αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα σε περιπτώσεις που η επανασύνδεση του φυσιολογικού κλώνου είναι βλαπτική. Αυτή η αδυναμία επανασύνδεσης μετατρέπει το σύμπλοκο διάσπασης της τοποϊσομεράσης I σε σύμπλοκο “αυτοκαταστροφής”. Αυτό συμβαίνει πιθανώς, όταν το σύμπλοκο αντιγραφής συγκρούεται με ένα σύμπλοκο διάσπασης της τοποϊσομεράσης I που έχει παγιδευτεί από αναστολείς τοποϊσομερασών, όπως η καμπτοθεκίνη<sup>48</sup> ή όταν το σύμπλοκο διάσπασης σχηματίζεται σε περιοχές DNA με λανθασμένα ζεύγη βάσεων, χάσματα ή σπασίματα<sup>49</sup>.

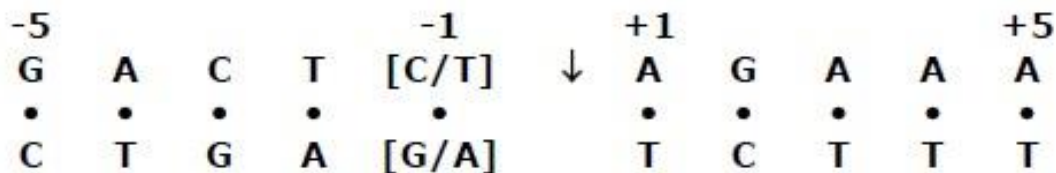
### Μηχανισμός τρανσεστεροποίησης και καταλυτικό κέντρο

Η μελέτη συμπλόκων τοποϊσομεράσης I με μικρα κομμάτια δίκλωνου DNA οδηγεί στη διαφώτιση του μηχανισμού της αντίδρασης τρανσεστεροποίησης η οποία είναι και η βασική αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο. Η πυρηνόφιλη προσβολή στην οποία υπόκειται ο φωσφοδιεστερικός δεσμός είτε από την Tyr<sup>723</sup> (Σχήμα 1.5) είτε από το 5'-OH υποβοηθείται από την αλληλεπίδραση του διασπώμενου φωσφοδιεστερικού δεσμού με τις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων Arg<sup>488</sup>, Arg<sup>590</sup>, Lys<sup>532</sup> και οδηγούν στο σχηματισμό ενός μεταβατικής συμπλόκου, το οποίο σταθεροποιείται από δεσμούς υδρογόνου της His<sup>632</sup> με το ένα αγεφύρωτο οξυγόνο.<sup>50</sup>



Σχήμα 1.5: Μηχανισμός δράσης κατάλυσης από τοποϊσομεράση I.<sup>51</sup>

Από έρευνες έχει βρεθεί ότι η τοποϊσομεράση I συνδέεται με δυο δίκλινα μόρια DNA, 22 βάσεων το καθένα με κεντρική αλληλουχία είναι<sup>52-53</sup>:



Στις δομές C<sup>-1</sup> και T<sup>-1</sup>, το O-2 της πυριμιδίνης συνδέεται μέσω δεσμού υδρογόνου με την ε-αμινομάδα της Lys<sup>532</sup> που είναι συνδεδεμένη με δεσμό υδρογόνου με ένα αγεφύρωτο φωσφορικό οξύ. Η παραπάνω αλληλεπίδραση είναι απαραίτητη για να συνδεθεί η τοποϊσομεράση I με το DNA. Διαπιστώθηκε στη δομή C<sup>-1</sup> η ύπαρξη ενός μορίου νερού κοντά στο φωσφορικό δεσμό και στα αμινοξέα του ενεργού κέντρο, γεγονός που οδήγησε στο να προταθεί ένας θεωρητικός μηχανισμός στον οποίο το μόριο νερού ενεργοποιεί την Tyr<sup>723</sup>. Πιθανώς σχηματίζει δεσμό υδρογόνου από την Arg<sup>590</sup> και το υδροξύλιο της Tyr<sup>723</sup> και ο ρόλος του είναι η αποπρωτονίωση της ενεργής Tyr<sup>723</sup>, όπως δημοσιεύτηκε σε μια μελέτη<sup>54</sup> και έπειτα εντοπίστηκαν αρκετοί δεσμοί υδρογόνου στους οποίους συμμετέχει το νερό και έχουν βασικό ρόλο στην συγγένεια και την ειδικότητα. Η αποπρωτονίωση της OH ομάδας της Tyr<sup>723</sup> που συμβαίνει σε φυσιολογικό pH διαμεσολαβείται από την ύπαρξη της



γουανιδίνης του γειτονικού αμινοξέος Arg<sup>590</sup>. Ένα από τα αγεφύρωτα οξυγόνα αλληλεπιδρά με την Arg<sup>488</sup> και είτε από τη Lys<sup>532</sup> στη δομή C<sup>-1</sup> είτε από την Arg<sup>590</sup> στη δομή T<sup>-1</sup>, αντίστοιχα. Το θετικά φορτισμένο ιμιδαζόλιο της His<sup>632</sup> που όπως αναφέρθηκε σταθεροποιεί την ενδιάμεση κατάσταση, θα μπορούσε επίσης να σχετίζεται και με την πρωτονίωση του αποχωρούντος 5'-OH, ώστε να σχηματισθεί ελεύθερη 5'-OH.

### Φυσιολογική ρύθμιση

Η ρύθμιση της τοποϊσομεράσης I γίνεται σε μεταγραφικό, μεταφραστικό και μετα-μεταφραστικό επίπεδο. Οι μηχανισμοί της ρύθμισης της τοποϊσομεράσης I είναι κρίσιμοι για την κατανόηση της δραστηριότητας του ενζύμου *in vivo* υπό διάφορες φυσιολογικές συνθήκες.

- Ρύθμιση σε επίπεδο γονιδίου: Η περιοχή του υποκινητή της τοποϊσομεράσης I δε διαθέτει τις αλληλουχίες ρύθμισης TATA και CCAAT. Αντίθετα, έχει θέσεις πρόσδεσης για αρκετούς μεταγραφικούς παράγοντες, όπως ο Sp1, ο οκταμερής μεταγραφικός παράγοντας, το στοιχείο απόκρισης camp, τον NF-kB και μέλη των πρωτεϊνών στροφής/έλικας/στροφής και φερμουάρ-λευκίνης.<sup>55</sup> Κάτω από διαφορετικές φυσιολογικές συνθήκες η ανθρώπινη τοποϊσομεράση I πιθανώς ρυθμίζεται από ένα πολύπλοκο δίκτυο αρνητικών και θετικών μεταγραφικών παραγόντων.<sup>56</sup> Το επίπεδο της μεταγραφής της τοποϊσομεράσης I αυξάνει κατά τη διάρκεια του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και μετά από μόλυνση από αδενοϊό.<sup>57</sup>
- Ρύθμιση μέσω φωσφορυλίωσης: Η φωσφορυλίωση και η αποφωσφορυλίωση είναι βασικός μηχανισμός ρύθμισης της τοποϊσομεράσης I. *In vitro*, φωσφορυλίωση τυροσίνης απενεργοποιεί την τοποϊσομεράση I<sup>58</sup>, ενώ φωσφορυλίωση αμινοξέων σερίνης ενισχύει τη δράση της<sup>59</sup>. Επίσης, αποφωσφορυλίωση από την αλκαλική φωσφατάση αναστέλλει την αποσυσπειρωτική ικανότητάς της και την ευαισθησία της στην καμπτοθεκίνη.<sup>51</sup> Φωσφορυλίωση της τοποϊσομεράσης I παρατηρήθηκε *in vivo* σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές.<sup>60</sup> Η καζεϊνική κινάση II και η PKC εμφανίζονται να ρυθμίζουν τη φωσφορυλίωση της τοποϊσομεράσης I σε διάφορα συστήματα και να αποτελούν φυσιολογικούς ρυθμιστές της κάτω από διαφορετικά εξωτερικά ερεθίσματα.<sup>59</sup> Η φωσφορυλίωση μπορεί να ρυθμίσει τη δράση της τοποϊσομεράσης I, να σταθεροποιήσει τα σύμπλοκα διάσπασης του ενζύμου και να επηρεάσει την αποκατάσταση της τοποϊσομεράσης I για την αλληλεπίδραση της με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες. Το επίπεδο της φωσφορυλίωσης της τοποϊσομεράσης I μπορεί επίσης να καθορίσει και την ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων στις καμπτοθεκίνες.<sup>61</sup>
- Ρύθμιση μέσω πολυ(αδενοσινω-διφωσφοριβοζυλίωσης): Η πολυ(ADP-ριβοζυλίωση) μειώνει την καταλυτική δράση της τοποϊσομεράσης I *in vitro*<sup>62</sup> και αναστέλλει τη δράση της σε πυρηνικά εκχυλίσματα από ζύμη<sup>63</sup>. Συνεπώς, αναστολείς της πολυ(ADP-ριβοζυλίωσης) αυξάνουν τα επίπεδα των

σπασιμάτων του DNA και την κυτταροτοξικότητα σε απόκριση προς τις καμπτοθεκίνες.<sup>64</sup>

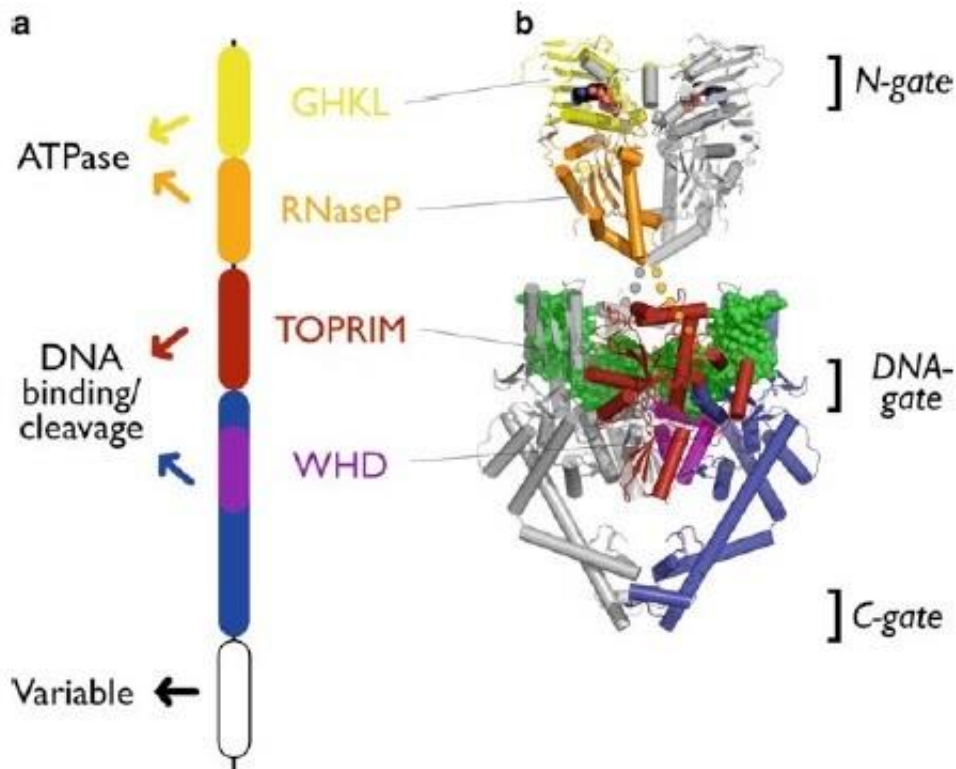
### Αλληλεπίδραση με άλλα ένζυμα

Η αλληλεπίδραση της τοποϊσομεράσης I με άλλες πρωτεΐνες επηρεάζει την δραστηριότητα του ενζύμου, την ενδοκυτταρική κατανομή του και την σταθερότητά του. Επίσης, η σύνδεση της τοποϊσομεράσης I με άλλες πρωτεΐνες μπορεί να μεταβάλλει τη δράση αυτών. Για παράδειγμα, η σύνδεση της τοποϊσομεράσης I με μεταγραφικούς παράγοντες ρυθμίζει την έναρξη της μεταγραφής. Η τοποϊσομεράση I συνδέεται με συστατικά της χρωματίνης όπως οι HMG πρωτεΐνες και με την νουκλεολίνη, πρωτεΐνη των νουκλεολίων, απουσία νουκλεϊκών οξέων, αλληλεπίδραση ιδιαίτερος ενδιαφέροντα αφού η τοποϊσομεράση I έχει βρεθεί ότι συνδέεται και με την RNA πολυμεράση I.<sup>65</sup> Η τοποϊσομεράση I, επίσης, συνανασκοκαταβυθίζεται με την p53 και *in vitro* πειράματα δείχνουν ότι η p53 αυξάνει την καταλυτική δραστηριότητα της, ενώ αυξάνει τη θερμική σταθερότητα της, προστατεύοντας την από θερμική αποδιάταξη. Για αυτό η p53 διαμεσολαβούμενη απόκριση σε καταστροφή του DNA μπορεί τουλάχιστον μερικώς να εμπλέξει και την ενεργοποίηση της τοποϊσομεράσης I.<sup>66</sup> Επίσης, η πρωτεΐνη Hsp70 συνδέεται με την τοποϊσομεράση I και μπορεί να δρα ως πρωτεΐνη συνοδός.<sup>67</sup> Επιπλέον, η τοποϊσομεράση I συνδέεται με το μεγάλο T-αντιγόνο.<sup>68</sup> Τέλος, σύνδεση της τοποϊσομεράσης I έχει παρατηρηθεί και με την ουβικινομή σε κύτταρα στα οποία χορηγείται καμπτοθεκίνη, ανεξάρτητα από την αντιγραφή του DNA.<sup>69</sup>

### Τοποϊσομεράση II

Σε αυτό το σημείο, οι δύο ισομορφές της τοποϊσομεράσης II, δε θα εξεταστούν ξεχωριστά καθώς εμφανίζουν μεγάλες δομικές ομοιότητες, αλλά γενικά σαν οικογένεια ενζύμων. Η τοποϊσομεράση II, όπως προαναφέρθηκε, είναι ένα ομοδιμερές ένζυμο και κάθε μονομερές του μπορεί να χωριστεί σε τρεις διακριτές περιοχές<sup>70-73</sup> (Σχήμα 1.6):

1. Το αμινο-τελικό άκρο το οποίο περιλαμβάνει περίπου τα 660 πρώτα αμινοξέα και περιέχονται αλληλουχίες πρόσδεσης με το ATP.<sup>70,71,74</sup>
2. Την κεντρική περιοχή του ενζύμου που αποτελείται από περίπου 540 αμινοξέα και περιλαμβάνει το ενεργό κέντρο του ενζύμου με την Tyr723 που σχηματίζει τον ομοιοπολικό δεσμό με το DNA κατά τη κοπή του<sup>70,71,74,75</sup> και
3. Το καρβοξυ-τελικό άκρο το οποίο ποικίλει από είδος σε είδος, είναι φορτισμένο σε φυσιολογικό pH<sup>76-78</sup> και περιέχει αλληλουχίες πυρηνικού εντοπισμού, καθώς και περιοχές που φωσφορυλιώνονται *in vivo*<sup>79,80</sup>.



Σχήμα 1.6: Δομή και οργάνωση τοποϊσομεράσης II.<sup>81</sup>

### Καταλυτικός κύκλος

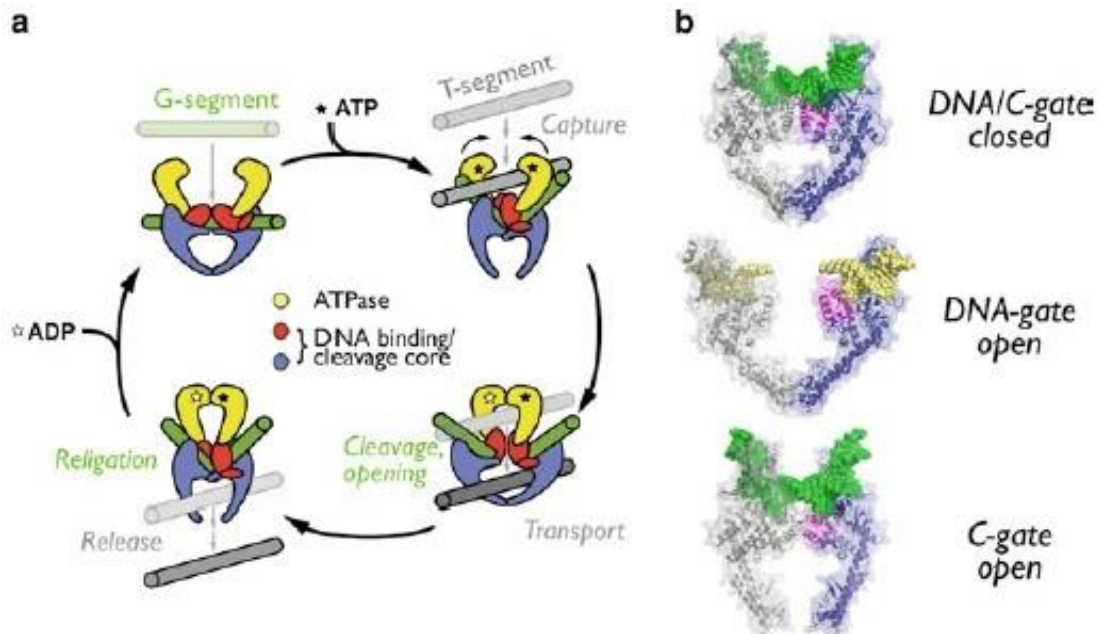
Η τοποϊσομεράση II είναι σε θέση να αποσυσπειρώσει θετικές ή και αρνητικές υπερελικώσεις από το γενετικό υλικό, ως αποτέλεσμα του μηχανισμού περιστροφής της διπλής έλικας του DNA, καθώς και να επιλύσει ενδομοριακούς κόμπους και διαμοριακά συμπλέγματα. Μέσα από μελέτες έγινε εφικτό να γίνει διαχωρισμός του μηχανισμού της περιστροφής της διπλής έλικας σε διακριτά βήματα,<sup>82-84</sup> τα οποία αναλύονται στη συνέχεια (Σχήμα 1.7):

1. Πρόσδεση στο DNA: Ο καταλυτικός κύκλος της τοποϊσομεράσης II ξεκινάει με τη σύνδεσή της με το υπόστρωμα (DNA). Αυτή η αλληλεπίδραση τοποϊσομεράσης II – DNA δεν απαιτεί κάποιον συμπαράγοντα, αν και η ενεργοποίηση της πρόσδεσης έχει αναφερθεί ότι γίνεται παρουσία δισθενών κατιόντων,<sup>85-86</sup> και διέπεται από δύο ιδιότητες της διπλής έλικας: την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων και την τοπολογική δομή. Η εξειδίκευση της τοποϊσομεράσης II καθορίζεται από την πρωτοταγή δομή του DNA, καθώς αυτή συνδέεται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεϊκών οξέων, οι οποίες καθορίζουν θέσεις αναγνώρισης από ένζυμα τα οποία θα διασπάσουν το DNA.<sup>86-88</sup> Σε αντίθεση με την εξειδίκευση που αναφέρθηκε παραπάνω, τα επίπεδα σύνδεσης της τοποϊσομεράσης II με το DNA και ακολούθως η καταλυτική της δράση φαίνεται να ρυθμίζεται από την κατάσταση της διπλής έλικας. Το ένζυμο μπορεί να διακρίνει δομές της και να αντιδρά προνομιακά (όπως προσδιορίζεται από τα επίπεδα πρόσδεσης και διάσπασης) με θετικά ή αρνητικά υπερελικωμένα τμήματα σε σχέση με άλλα χαλαρά.<sup>84,89,90</sup> Με αυτό τον τρόπο παρέχεται ένα απλός μηχανισμός κατά τον οποίο η τοποϊσομεράση II μπορεί να αλληλεπιδρά ισχυρά με το υπερελικωμένο υπόστρωμα και να

ελευθερώνει το χαλαρό μόριο. Η ικανότητά της αυτή προέρχεται κατά πάσα πιθανότητα από την αναγνώριση σημείων της έλικας που αλληλοκαλύπτονται,<sup>90-91</sup> είτε ενδομοριακά, είτε διαμοριακά, χωρίς όμως να είναι γνωστός ο μηχανισμός με τον οποίο γίνεται αυτό. Ωστόσο, φαίνεται ότι το ένζυμο πιθανώς συνδέει τα δύο τμήματα σε διαδοχική σειρά. Τέλος, η αναγνώριση της τοπολογικής κατάστασης του DNA πιθανώς να ρυθμίζεται από την κατάσταση φωσφορυλίωσης της τοποϊσομεράσης II. Ενώ η σύνδεση με το υπερελιγμένο DNA δεν επηρεάζεται από την κατάσταση φωσφορυλίωσης,<sup>92-93</sup> η σύνδεση με χαλαρό DNA διεγείρεται από κινάση καζεΐνης<sup>93</sup>.

2. Προ-μεταφοράς διάσπαση του DNA: Παρουσία ενός δισθενούς κατιόντος η τοποϊσομεράση II κόβει το DNA κάνοντας δύο τομές στους κλώνους (από μία στον καθένα) της διπλής έλικας<sup>94-95</sup> και στην καθεμία αφήνει μία προεξοχή στο 5' άκρο μεγέθους 4 βάσεων<sup>96-98</sup>. Κατά την τομή η τοποϊσομεράση II σχηματίζει ομοιοπολικούς δεσμούς μεταξύ του ενεργού της κέντρο στην περιοχή της τυροσίνης και στα καινούρια 5' άκρα του DNA. Όπως συμβαίνει και με την πρόσδεση του ενζύμου στο DNA, έτσι και κατά τη διάρκεια αυτού του βήματος η ακολουθία των βάσεων της αλληλουχίας δεν είναι συγκεκριμένη και η τοποϊσομεράση II κόβει διαφορετικές αλληλουχίες, καθώς ο βαθμός αναγνώρισης είναι χαμηλός.<sup>94,97</sup> Επιπλέον, είναι σε θέση να κόβει φουρκέτες,<sup>99</sup> Z-μορφή του DNA<sup>100</sup> και τετραμερή του<sup>101</sup>.
3. Μεταφορά της έλικας: Στο σημείο αυτό μετά τη σύνδεση της με το ATP, η τοποϊσομεράση υφίσταται μια αλλαγή στη διαμόρφωσή της η οποία προκαλεί την περιστροφή της διπλής έλικας και το «ξετύλιγμα».<sup>89,102</sup> Η φύση αυτής της αλλαγής δεν έχει ακόμα προσδιοριστεί σε ευκαρυωτικά κύτταρα, παρά μόνο υποτεθεί από μελέτες σε γυράση που έχει παρεμφερή δράση με την τοποϊσομεράση II. Το ATP είναι απαραίτητο για την αλλαγή αυτή στη δομή,<sup>89</sup> αλλά αν και το ένζυμο εμφανίζει υψηλή συγγένεια με το δακτύλιο αδενοσίνης του ATP, δεν ισχύει το ίδιο και για το 2'-υδροξύλιο, καθώς ακόμα και το dATP είναι δυνατό να προκαλέσει περιστροφή<sup>84</sup>.
4. Μετά-μεταφοράς επανασύνδεση του DNA: Μετά τη μετατόπιση το ένζυμο σχηματίζει ένα σύμπλοκο παρόμοιας μορφής με αυτό του βήματος 2, το οποίο όμως είναι πιο σταθερό λόγω της παρουσίας του ATP.<sup>84,103</sup>
5. Υδρόλυση του ATP: Η τοποϊσομεράση II υδρολύει το ATP, το οποίο προκαλεί το άνοιγμα του σφιγκτήρα του ενζύμου και επιτρέπει την απελευθέρωση της διπλής έλικας. Αν και η υδρόλυση του ATP διεγείρεται σημαντικά από τη σύνδεση του ενζύμου με το DNA, η τοποϊσομεράση II φαίνεται πως είναι ικανή να υδρολύει ATP και απουσία DNA.<sup>84,89</sup> Τέλος, η φωσφορυλίωσή της (είτε από κινάση καζεΐνης, είτε από την PKC) αυξάνει την ταχύτητα υδρόλυσης του ATP 2-3 φορές, που φαίνεται να είναι η κύρια μηχανιστική βάση για την ενίσχυση της συνολικής καταλυτικής δραστηριότητας της τοποϊσομεράσης II.<sup>92,104</sup>
6. Ανακύκλωση του ενζύμου: Ανάλογα με τις συνθήκες, η τοποϊσομεράση II μπορεί είτε να παραμείνει συνδεδεμένη στο αρχικό της υπόστρωμα και να

ξεκινήσει άλλον ένα καταλυτικό κύκλο, είτε να αποσπαστεί από αυτό και να ξεκινήσει την κατάλυση σε ένα νέο υπόστρωμα DNA.<sup>89</sup>



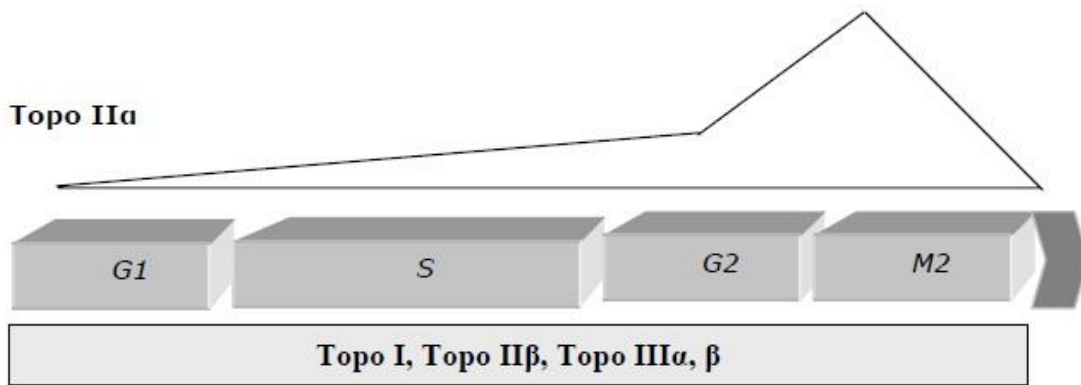
Σχήμα 1.7: Σχηματική αναπαράσταση μηχανισμού κατάλυσης τοποϊσομεράσης II. a) Γενικό σχήμα που δείχνει τα κύρια βήματα, b) Σύγκριση των τριών διαμορφώσεων κατά τη διάρκεια του καταλυτικού κύκλου.<sup>105</sup>

### Το ένζυμο ως «φυσιολογικό δηλητήριο»

Το σύμπλοκο που σχηματίζεται μεταξύ τοποϊσομεράσης και διπλής έλικας για την τομή των κλώνων και το περαιτέρω «ξεμπερδεμα» του DNA κόβει τη διπλή έλικα,<sup>84,89</sup> αλλά επειδή αυτές οι τομές είναι βραχύβιες και σε χαμηλές συγκεντρώσεις δεν αποτελούν πρόβλημα για το κύτταρο. Βέβαια, αποτελεί έναν εγγενή υποψήφιο κίνδυνο για το κύτταρο, καθώς σε συνθήκες που αυτό το σύμπλοκο σταθεροποιείται και η συγκέντρωσή του αυξάνεται, παρατηρούνται μεταλλάξεις και χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Επιπλέον, η δυνητική τοξικότητα της τοποϊσομεράσης II αυξάνεται σημαντικά καθώς άλλα ένζυμα που αλληλεπιδρούν με το DNA όπως πολυμεράσες και ελικάσες συγκρούονται με το σύμπλοκο και αναστέλλεται η δράση τους.<sup>106</sup>

### Έκφραση των τοποϊσομερασών κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου

Στα επίπεδα της τοποϊσομεράσης IIα συμβαίνουν διακυμάνσεις ανάλογα με την φάση του κυτταρικού κύκλου (υψηλότερα στα καρκινικά από ότι στα φυσιολογικά κύτταρα) σε αντίθεση με τις τοποϊσομεράσες I και IIβ, οι συγκέντρωση των οποίων δεν παρουσιάζει σημαντική μεταβολή. Για το λόγο αυτό, η τοποϊσομεράση II έγινε ο κύριος στόχος για έναν μεγάλο αριθμό αντικαρκινικών φαρμάκων, τα οποία θεωρητικά είναι πιο θανατηφόρα για κύτταρα με αυξημένα επίπεδα τοποϊσομεράσης II και αντιγραφής του DNA. Τα επίπεδα του mRNA της τοποϊσομεράσης IIα αρχικά αυξάνονται μερικώς στην όψιμη S και στην συνέχεια κατακόρυφα στη G<sub>2</sub>/M φάση σε σχέση με τη G<sub>1</sub> φάση<sup>107</sup> (Σχήμα 1.8).



Σχήμα 1.8: Συγκέντρωση των ενζύμων κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου.

Η αύξηση, αυτή, στη συγκέντρωση υποδεικνύει ότι η τοποϊσομεράση ΙΙα είναι απαραίτητη κυρίως κατά τη διάρκεια των τελικών φάσεων της αντιγραφής του DNA προκειμένου να διευκολύνει την απεμπλοκή των χρωμοσωμάτων, την συμπύκνωση τους και τον μιτωτικό διαχωρισμό. Έχει αναφερθεί πως φάρμακα που αναστέλλουν την τοποϊσομεράση ΙΙ επάγουν πολυπλοειδία, δείχνοντας με αυτόν τον τρόπο έμμεσα ότι το ένζυμο είναι απαραίτητο για το διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων.<sup>108</sup>

### Ενώσεις που δρουν ως αναστολείς Τοποϊσομερασών

Ένας μεγάλος αριθμός φαρμάκων που γενικά αναφέρονται ως αναστολείς τοποϊσομερασών, αλληλεπιδρούν με αυτές και επηρεάζουν την ενζυμική τους ενεργότητα. Συλλογικά αποτελούν μια σημαντική κατηγορία αντικαρκινικών ενώσεων, και έναν από τους ακρογωνιαίους λίθους της τρέχουσας αντιμετώπισης του καρκίνου. Σε υψηλές συγκεντρώσεις έχουν την ικανότητα να συνδέονται με το DNA ή την πρωτεΐνη μέσω σχηματισμού τριμερούς συμπλόκου ένζυμο-DNA-φάρμακο, αν και αυτό πιθανώς δεν είναι ο πρωταρχικός/μοναδικός μηχανισμός της κλινικής δραστηριότητας για την πλειονότητα των φαρμάκων αυτών. Πιο σημαντική μπορεί να θεωρηθεί η επακόλουθη αναστολή κάποιας από τις παρακάτω διεργασίες<sup>48</sup>:

- Διάσπαση του DNA
- Περιστροφή των κλώνων (για την τοποϊσομεράση ΙΙ) ή
- Επανασύνδεση του DNA.

Η κατηγοριοποίηση των ενώσεων που έχουν δράση επί των τοποϊσομερασών μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους. Αρχικά, θα πρέπει να γίνει διάκριση ανάλογα με το σε ποια τοποϊσομεράση επιδρούν διαχωρίζοντάς τις ενώσεις έτσι σε: αναστολείς τοποϊσομεράσης Ι, αναστολείς τοποϊσομεράσης ΙΙ και διπλούς αναστολείς τοποϊσομεράσης Ι/ΙΙ. Στη συνέχεια μπορούν να καταταχθούν σε δύο κατηγορίες τα μέλη των οποίων αναστέλλουν αμφότερα τη χαλάρωση του DNA και ειδικότερα:<sup>109</sup>

1. Δηλητήρια τοποϊσομεράσης: Νεκρώνουν τα κύτταρα μέσω παγίδευσης του συμπλόκου διάσπασης, εμποδίζοντας έτσι τη διαδικασία να συνεχιστεί.

2. Αναστολείς τοποϊσομεράσης: Αναστέλλουν την καταλυτική δράση του ενζύμου οδηγώντας τα κύτταρα σε νέκρωση.

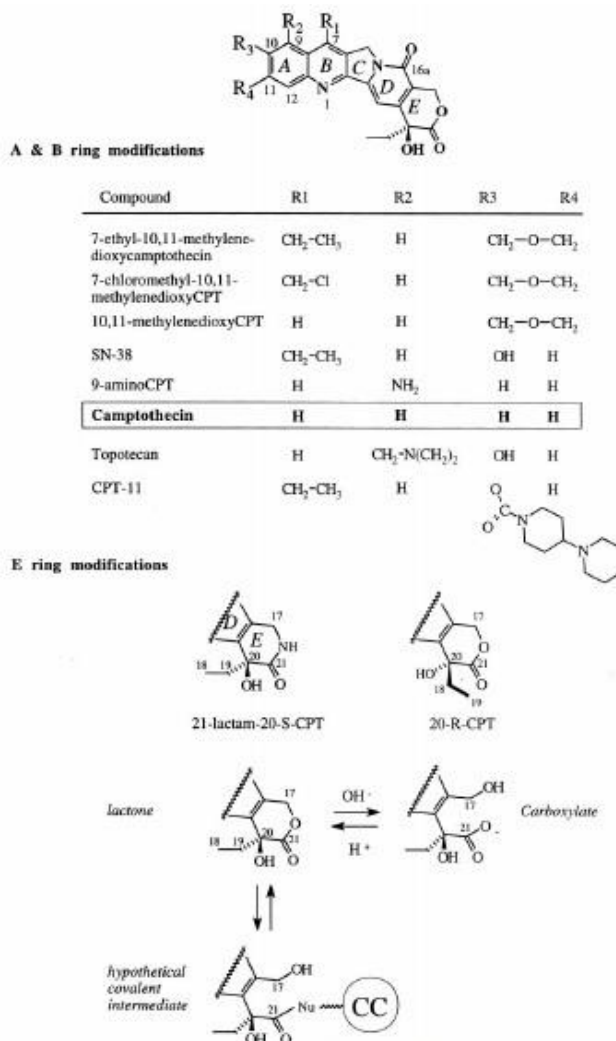
Η ευαισθησία των κυττάρων στα δηλητήρια τοποϊσομεράσης αυξάνεται με την υπερέκφραση του ενζύμου, ενώ μείωση της δραστηριότητας της πρωτεΐνης στα κύτταρα είναι η συνηθέστερη αιτία ανάπτυξης αντοχής. Αντίθετα, οι αναστολείς τοποϊσομεράσης θα πρέπει να είναι πιο ισχυροί σε κύτταρα που οι συγκεντρώσεις του ενζύμου είναι μικρές.<sup>106</sup>

Η μεγαλύτερη κατηγορία τέτοιων φαρμάκων είναι οι παράγοντες ενδοπαρεμβολής. Ενδοπαρεμβολή περιγράφεται ως η αναστρέψιμη δέσμευση μορίων στο DNA και περιλαμβάνει την εισαγωγή τους μεταξύ των ζευγών βάσεων.<sup>110</sup> Αυτό είναι πλέον κατανοητό ότι είναι ο κύριος τρόπος δέσμευσης με το DNA μορίων που είναι επίπεδα, πολυαρωματικά και έχουν επαρκώς μεγάλη επιφάνεια για να κάνουν ενδοπαρεμβολή, οδηγούμενα πρωτίστως από ηλεκτροστατικές επιδράσεις και λιγότερο από την εντροπία. Οι παράγοντες ενδοπαρεμβολής μπορούν να χαλαρώσουν τη διπλή έλικα και να διαταράξουν τη δομή του DNA στις θέσεις που αυτό κόβεται από τις τοποϊσομεράσες. Πιστεύεται ότι εμποδίζουν τη συρραφή των κομμένων άκρων των κλώνων κατά το στάδιο της επανασύνδεσης, οδηγώντας σε συσσώρευση τομών και σε αύξηση του συμπλόκου διάσπασης.<sup>109</sup>

## Αναστολείς τοποϊσομεράσης I

### Καμπτοθεκίνες

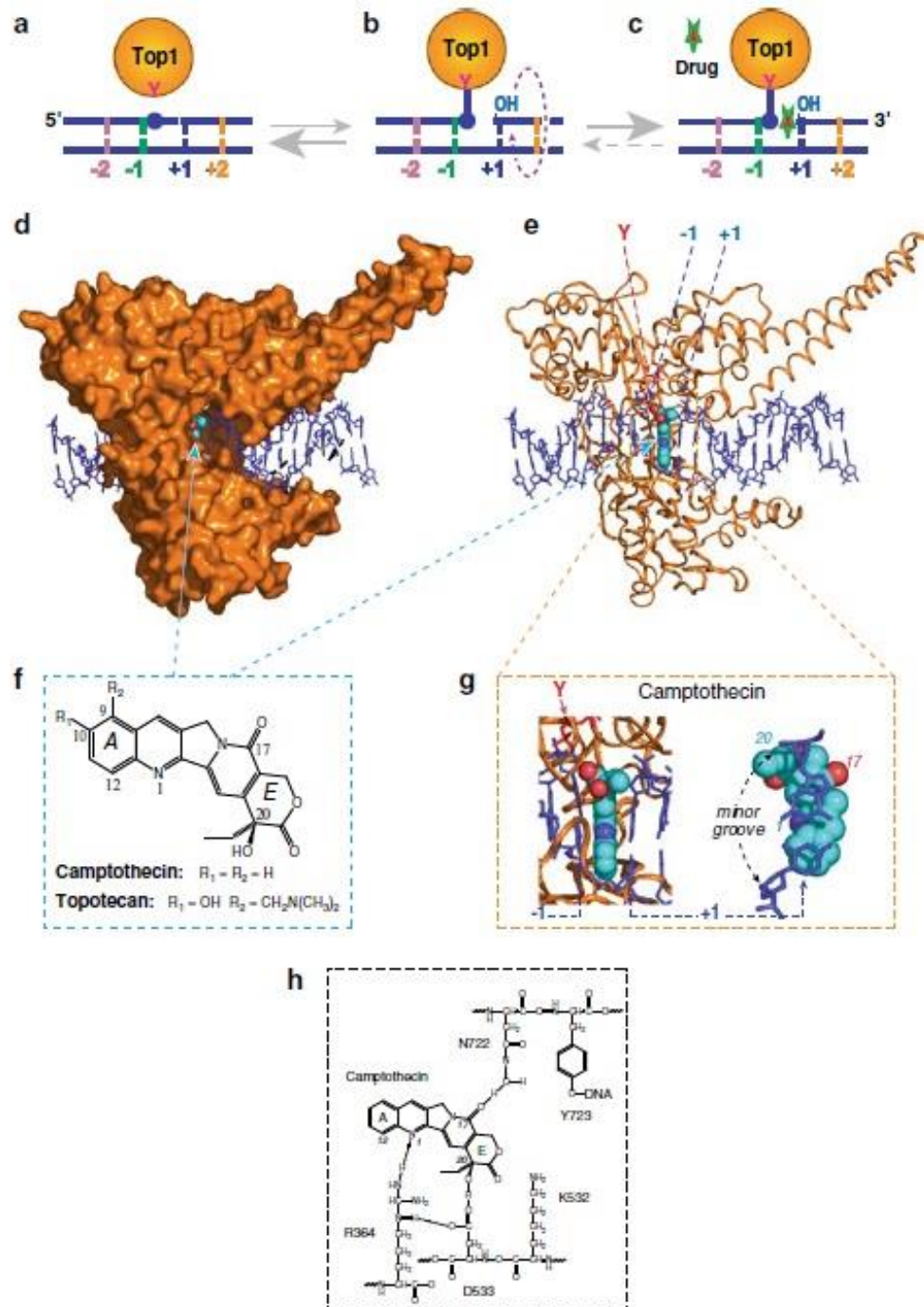
Η καμπτοθεκίνη είναι ένα φυσικό αλκαλοϊδές, που αρχικά απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε από το κινέζικο δέντρο *Camptotheca acuminata*,<sup>111</sup> με αντικαρκινική δράση. Δυσκολίες που εμφανίστηκαν στην κλινική πράξη, κυρίως προβλήματα διαλυτότητας και σταθερότητας, οδήγησαν στην ανάπτυξη αναλόγων της που εμπίπτουν πλέον σε μια ευρύτερη κατηγορία, τις καμπτοθεκίνες (Σχήμα 1.9). Τα προβλήματα είχαν να κάνουν με τον λακτονικό δακτύλιο E, που όμως είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη της δράσης, αλλά διάνοιξη του, η οποία συμβαίνει σε φυσιολογικό pH οδηγεί στο αδρανές καρβοξυλικό άλας.<sup>112</sup> Αντικατάστασή της λακτονικής ομάδας του δακτυλίου (πχ. από λακτάμες ή ιμινολακτόνες) οδηγεί σε αδρανή παράγωγα, ενώ απαραίτητη είναι και η διαμόρφωση του C-20 (S). Έγιναν προσπάθειες να αυξηθούν η υδατοδιαλυτότητα και η βιοδιαθεσιμότητα και έπειτα από μελέτες QSAR διαπιστώθηκε ότι θέσεις διαθέσιμες για υποκατάσταση χωρίς μείωση της δραστηριότητας ήταν η 7- και η 9-<sup>112</sup> καθώς και οι 10- και 11-. Έτσι αναπτύχθηκαν τα ανάλογα ιρινοτεκάνη, τοποτεκάνη κτλ.



Σχήμα 1.9: Τα μόρια που ανήκουν στην κατηγορία των καμπτοθεκινών καθώς και ο προτεινόμενος μηχανισμός διάνοιξης λακτονικού δακτυλίου E.<sup>113</sup>

Σύμφωνα με τον προτεινόμενο μηχανισμό δράσης, τα μόρια αυτής της κατηγορίας σταθεροποιούν το σύμπλοκο διάσπασης τοποϊσομεράση I – DNA και παρεμποδίζουν την επανένωση των τμημένων μερών (Σχήμα 1.10). Με αυτόν τον τρόπο οι καμπτοθεκίνες αναστέλλουν την επαναφορά του DNA στη χαλαρή μορφή και επάγουν σύμπλοκα διάσπασης.<sup>114</sup> Δε δρουν μέσω ενδοπαρεμβολής, αλλά στοχεύουν κατευθείαν την τοποϊσομεράση I και αυτό φάνηκε σε πειράματα που έγιναν σε κύτταρα ζύμης. Απουσία τοποϊσομεράσης I (σε κύτταρα που είχε διαγραφεί το γονίδιο της) οι καμπτοθεκίνες ήταν αδρανείς, ενώ σε κύτταρα που υπερεκφραζόταν το γονίδιο ήταν αρκετά δραστικές.<sup>115</sup>

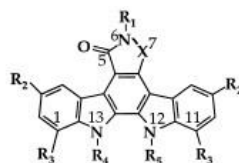




Σχήμα 1.10: Ο προτεινόμενος μηχανισμός δράσης των καμπτοθεκινών.<sup>116</sup>

### Ινδολοκαρβαζόλια

Τα ινδολοκαρβαζόλια (Σχήμα 1.11) αναπτύχθηκαν μέσω συνεχούς screening αντιβιοτικών και από *in vitro* δοκιμές αναστολής τοποϊσομεράσης I συνθετικών αναλόγων τους. Μεταξύ των πολυάριθμων ενώσεων που συντέθηκαν το NB-506, το οποίο είναι ένα παράγωγο των ED-110 και BE-13793C, είναι αναστολέας της τοποϊσομεράσης I με αξιοσημείωτη αντικαρκινική δράση σε μεταμοσχευμένους σε ποντίκια όγκους. Φαίνεται πως δρα επί της τοποϊσομεράσης I καθώς επιλεγμένες σειρές με αντοχή στο NB-506 παρουσιάζουν αντοχή μόνο στις καμπτοθεκίνες που σχετίζεται με την απουσία του ενζύμου.<sup>117</sup>



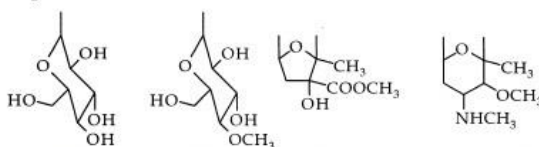
Compounds	X	R1	R2	R3	R4	R5	top1	Interc
NB-506	CO	NHCHO	H	OH	A	H	+++	++
ED-110	CO	H	H	OH	A	H	++	++
BE-13793C	CO	H	H	OH	H	H	+	-
Rebeccamycin	CO	H	H	Cl	B	H	+	+
KT6006	CH <sub>2</sub>	H	OH	H	C		+++	+
K252a	CH <sub>2</sub>	H	H	H	C		-	-
Staurosporine	CH <sub>2</sub>	H	H	H	D		-	-
7-Hydroxy-Staurosporine (UCN-01)	CHOH	H	H	H	D		-	-

A = D-glucose

B =

C =

D =

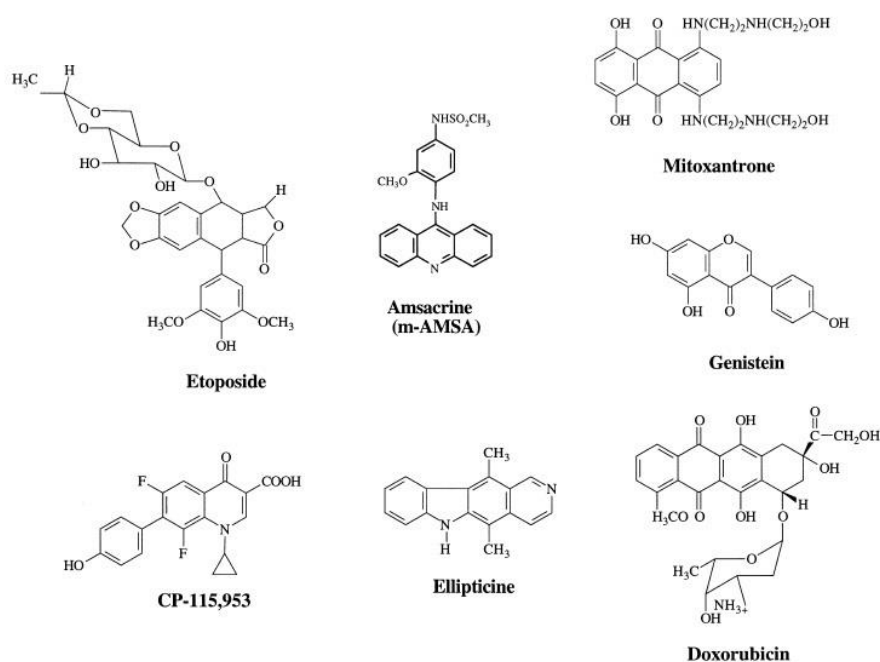


Σχήμα 1.11: Ενώσεις που ανήκουν στην κατηγορία των Ινδολοκαρβαζολίων.<sup>117</sup>

Μελέτες δομής δράσης έφεραν στην επιφάνεια τα φαρμακοφόρα των μορίων αυτών. Παρουσία σακχάρου στη θέση 13 αυξάνει σημαντικά την αναστολή της τοποϊσομεράσης I καθώς και την ενδοπαρεμβολή στο DNA, αν και τα ινδολοκαρβαζόλια δεν είναι απαραίτητο να ενδοπαρεμβληθούν, για να αναπτύξουν την ανασταλτική επί του ενζύμου δράση τους. Τέλος, η θέση διάσπασης που συνδέονται τα ινδολοκαρβαζόλια διαφέρει από αυτή των καμπτοθεκινών.<sup>117</sup>

## Αναστολείς τοποϊσομεράσης II

Τα φάρμακα που είναι δηλητήρια της τοποϊσομεράσης II (Σχήμα 1.12), ενώ περιλαμβάνουν ποικιλία διαφορετικών δομικών χαρακτηριστικών, όλα έχουν ως κοινό την ύπαρξη ενός πολυκυκλικού αρωματικού πυρήνα που πιστεύεται ότι αλληλεπιδρά με το DNA στο τριμερές σύμπλοκο ένζυμο-φάρμακο-DNA, σταθεροποιώντας και αυξάνοντας έτσι τη συγκέντρωσή του συμπλόκου διάσπασης του DNA.<sup>118</sup>



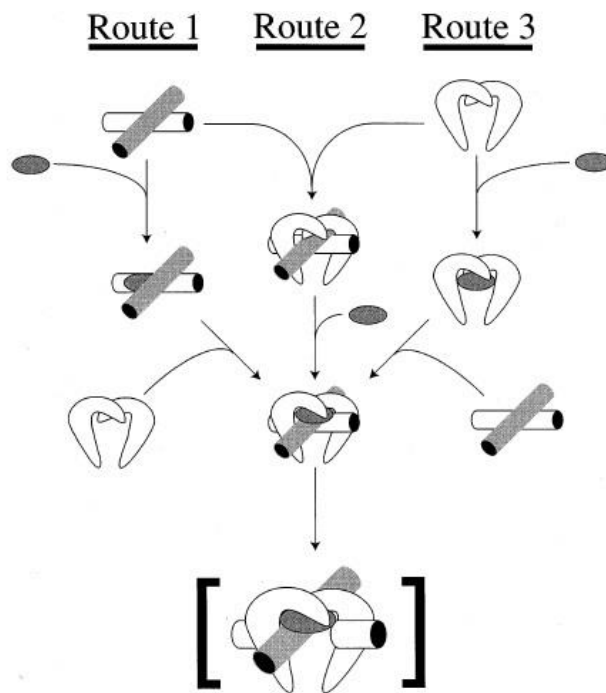
Σχήμα 1.12: Ενώσεις που επιδρούν επί της τοποϊσομεράσης II.<sup>118</sup>

Φαίνεται να υπάρχουν δύο διακριτοί μηχανισμοί δράσης των ενώσεων αυτών έπειτα από την αλληλεπίδραση με την τοποϊσομεράση II.<sup>107</sup>

1. Κάποια φάρμακα όπως η ετοποσίδη (ανήκει στην κατηγορία των επιποδοφυλλοτοξινών) αναστέλλουν ισχυρά την ικανότητα του ενζύμου να επανασυνδέει τα τμημένα κομμάτια του DNA, ενώ
2. Άλλες ενώσεις, όπως οι κινολόνες, δεν επιδρούν επί της επανασύνδεσης, αλλά ενισχύουν την ικανότητα του συμπλόκου να προκαλεί τμήσεις στη ραχοκοκαλιά της διπλής έλικας.

Για να ασκήσουν τα φάρμακα τη δράση τους πρέπει να σχηματιστεί ένα τριμερές σύμπλοκο μεταξύ φαρμάκου-DNA-ενζύμου. Υπάρχουν τρεις πιθανοί τρόποι να γίνει αυτό<sup>107</sup> (Σχήμα 1.13):

1. Το φάρμακο να εισέλθει στο σύμπλοκο από την αρχή μέσω ενδοπαρεμβολής στη διπλή έλικα.
2. Το φάρμακο να εισέλθει στο ήδη σχηματισμένο σύμπλοκο DNA-ενζύμου, όπου πιθανώς έχει ελάχιστες ανεξάρτητες αλληλεπιδράσεις ξεχωριστά με το DNA ή το ένζυμο και
3. Το φάρμακο αρχικά να συνδεθεί με το ένζυμο και στη συνέχεια να εισέλθει η διπλή έλικα.



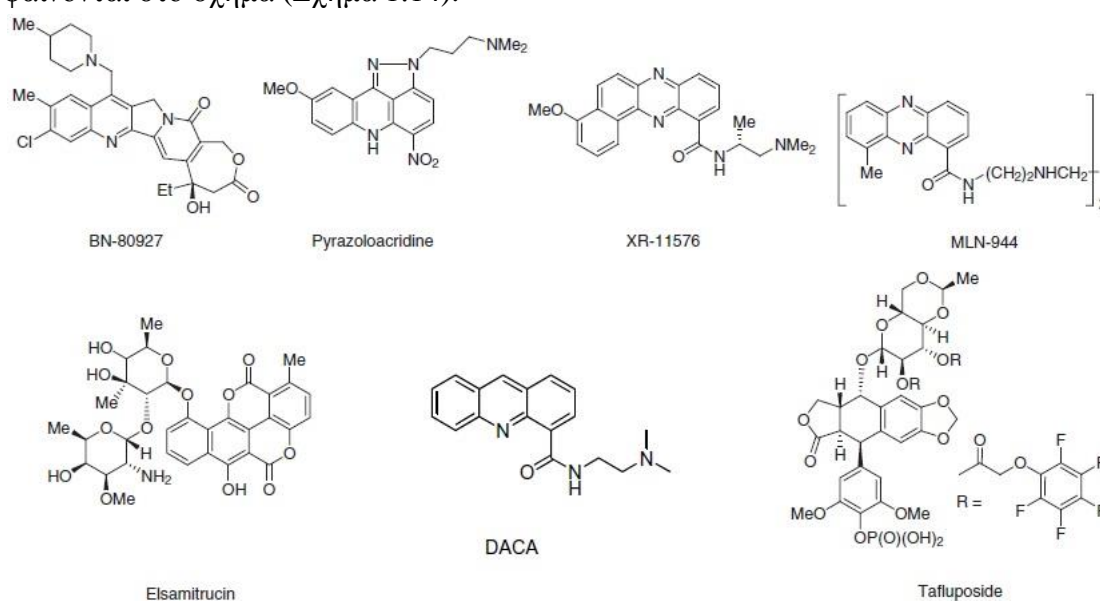
Σχήμα 1.13: Πιθανοί τρόποι σχηματισμού τριμερούς συμπλόκου φαρμάκου-ενζύμου-DNA.<sup>107</sup>

Στην κατηγορία αυτή, των αναστολέων της Τοποϊσομεράσης II, ανήκουν οι ανθρακυκλίνες, που είναι παράλληλα και παράγοντες ενδοπαρεμβολής στο DNA, ο μετέπειτα απόγονός τους, οι ανθρακινόνες, οι επιποδοφυλλοτοξίνες, παράγωγα ακριδίνης και ενώσεις ποικίλης δομής.<sup>118</sup>

Έχει συντεθεί ή ανακαλυφθεί πληθώρα παραγώγων ακριδίνης που να επιδεικνύουν αντικαρκινική δράση και σε πολλά εξ αυτών η δράση οφείλεται σε αναστολή ενός ή και των δύο τοποϊσομερασών. Το amsacrine, μία 9-ανιλνοακριδίνη, είναι ένας σχετικά ασθενής προσδέτης του DNA, μέσω αναστρέψιμης ενδοπαρεμβολής του χρωμοφόρου της ακριδίνης. Ήταν ένα από τα πρώτα φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν για να δείξουν ότι η τοποϊσομεράση II είναι στόχος των παραγόντων ενδοπαρεμβολής. Ο μηχανισμός δράσης του εμπίπτει στην κατηγορία 1, ίδιος με αυτόν της ετοποσίδης. Έχει αποδειχθεί ότι εισέρχεται στη διπλή έλικα με τον πυρήνα της ανιλίνης να βρίσκεται στην μικρή αύλακα (minor groove) και τον υποκαταστάτη της θέσης 10 να απομακρύνεται εφαπτομενικά από τη διπλή έλικα.<sup>119</sup> Είναι μοναδικό σε σχέση με τα άλλα δηλητήρια της τοποϊσομεράσης II καθώς η ικανότητά του να παγιδεύει τόσο την ισομορφή IIα όσο και τη IIβ μειώνεται μόνο ελάχιστα σε κύτταρα που δεν υπάρχει ATP. Αυτό υπονοεί ότι προάγει κυρίως τη διάσπαση της έλικας πριν την περιστροφή των κλώνων, πριν δηλαδή συνδεθεί το ATP με την τοποϊσομεράση II και αλλάξει τη στερεοδιάταξή της για να φέρει κοντά τους δύο κλώνους, ενώ τα άλλα δηλητήρια του ενζύμου σταθεροποιούν το σύμπλοκο κυρίως μετά την πρόσδεση του ATP. Ήταν από τους πρώτους συνθετικούς αναστολείς της τοποϊσομεράσης II που έφτασαν σε κλινικές δοκιμές<sup>120</sup> και στόχευαν κυρίως την οξεία μυελογενή λευχαιμία<sup>121</sup>.

## Διπλοί αναστολείς τοποϊσομεράσης I και II

Υπάρχουν και ενώσεις που στοχεύουν και τις δύο τοποϊσομεράσες ανεξάρτητα και χωρίς εκλεκτικότητα. Οι ενώσεις αυτής της κατηγορίας (Σχήμα 1.14) παρουσιάζουν σημαντικό ενδιαφέρον, καθώς οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου που εκφράζεται το κάθε ένζυμο διαφέρουν μεταξύ τους. Πιο συγκεκριμένα, η τοποϊσομεράση I παραμένει σε σχεδόν σταθερή συγκέντρωση καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, ενώ αντίθετα η II μεταβάλλεται με τα υψηλότερα επίπεδα να παρατηρούνται κατά τη διάρκεια της φάσης S.<sup>107</sup> Κύτταρα που έχουν αναπτύξει αντίσταση σε αναστολείς της τοποϊσομεράσης I συχνά εμφανίζουν αύξηση των επιπέδων της τοποϊσομεράσης II και αντίστροφα, καθώς όπως φαίνεται αρκεί να υπάρχει το ένα ένζυμο σε αφθονία εντός του κυττάρου, για να εξασφαλιστεί η κυτταρική διαίρεση και ο πολλαπλασιασμός.<sup>122</sup> Συνεπώς, ενώσεις που έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν και τα δύο ένζυμα μπορεί να φανούν χρήσιμες και στην αντιμετώπιση καρκινικών κυττάρων που έχουν αναπτύξει τέτοιου είδους αντοχή σε ήδη υπάρχοντες αναστολείς μιας εκ των δύο τοποϊσομερασών. Από τους σημαντικότερους εκπροσώπους της κατηγορίας αυτής είναι οι παρακάτω που φαίνονται στο σχήμα (Σχήμα 1.14).



Σχήμα 1.14: Κυριότεροι εκπρόσωποι των μικτών αναστολέων τοποϊσομερασών I/II.

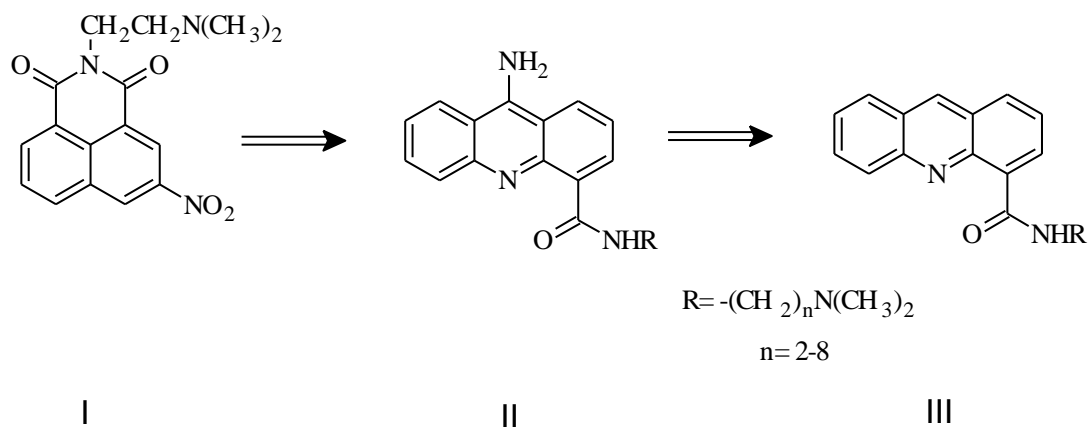
### DACA N-[2-(Dimethylamino)ethyl]acridine-4-carboxamide

Στην τελευταία κατηγορία βρίσκεται το DACA, το οποίο έφτασε σε κλινικές δοκιμές φάσης II για:

- μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα<sup>123</sup>
- προχωρημένο καρκίνο των οσθικών<sup>124</sup> και
- υποτροπιάζων πολύμορφο γλοιοβλάστωμα<sup>125</sup>.

Αρχικά, σχεδιάστηκε ως παράγοντας ενδοπαρεμβολής<sup>126,127</sup> που μετέπειτα ανακαλύφθηκε ότι έχει δράση και επί των τοποϊσομερασών<sup>128</sup>. Τα βασικά σημεία στο σχεδιασμό του ήταν η ύπαρξη ενός αρωματικού πολυκυκλικού πυρήνα, που έχει την ικανότητα να δρα ως δέκτης μεταφοράς φορτίου από τα νουκλεϊκά οξέα, και μιας

κατιονικής πλευρικής αλυσίδας.<sup>126,127</sup> Η ύπαρξη του πολυκυκλικού πυρήνα από μόνη της δεν είναι αρκετή για την ανάπτυξη δράσης, παρά μόνο για την ικανότητα ενδοπαρεμβολής, καθώς είναι απαραίτητη η ύπαρξη και άλλων χαρακτηριστικών.



Σχήμα 1.15: Σχεδιασμός DACA.

Από το μόριο I (mitonafide) (Σχήμα 1.15) που παρουσιάζει σημαντική αντικαρκινική δράση τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* ως παράγοντας ενδοπαρεμβολής σχεδιάστηκαν τα καρβοξαμίδια της 9-αμινοακριδίνης (II) τα οποία είχαν την ικανότητα να ενδοπαρεμβάλλονται και εμφάνισαν και ικανοποιητική αντικαρκινική δράση. Αυξήθηκε το μέγεθος του χρωμοφόρου από δύο σε τρεις δακτυλίους και παρέμεινε η πλευρική καρβοξαμιδική αλυσίδα με μεγαλύτερη βέβαια ευκινησία. Στη συνέχεια, αναπτύχθηκαν τα καρβοξαμίδια χωρίς την αμινομάδα της θέσης 9 όπου μειώνεται η ηλεκτρονιακή πυκνότητα του πολυκυκλικού συστήματος.

Η πλευρική αλυσίδα είναι απαραίτητο να βρίσκεται σε αυτή τη θέση κοντά στο ακριδινικό άζωτο, καθώς ενώσεις με την αλυσίδα στις θέσεις 1-3 του σκελετού δεν παρουσίασαν κυτταροστατική δράση. Το μέγεθος της αλυσίδας παίζει επίσης ρόλο στη δραστηριότητα του μορίου, με τα σημαντικότερα παράγωγα να είναι αυτά με αλυσίδα μήκους 2-4 ατόμων άνθρακα και από εκεί και έπειτα η δράση φθίνει σημαντικά. Επιπλέον, δοκιμάστηκε η εισαγωγή κυκλικών αλειφατικών ή αρωματικών τμημάτων (πιπεριδίνη, *N*-μεθυλο-πιπεραζίνη, μορφολίνη και 2-πυριδίνη) στο ακραίο άζωτο της πλευρικής αλυσίδας που όμως και αυτά με τη σειρά τους εξαφάνισαν τη δραστηριότητα του μορίου. Τέλος, εκτός από την αλυσίδα, προστέθηκαν και άλλοι υποκαταστάτες (-Cl, -OCH<sub>3</sub>, -CH<sub>3</sub>) σε διάφορες θέσεις του μορίου που μείωναν τη δραστηριότητα σε κάποιες κυτταρικές σειρές ενώ σε άλλες την άυξαναν, ειδικά το χλώριο και το μεθύλιο.<sup>126,127</sup>

Έπειτα από τη διαπίστωση ότι το DACA πέρα από παράγοντας ενδοπαρεμβολής ασκεί δράση κυρίως επί των τοποϊσομερασών, ξεκίνησε να μελετάται ο τρόπος αναστολής του ενζύμου και η συγγένειά του ως προς τις τοποϊσομεράσες I και II.<sup>129</sup> Από πειράματα εξήχθηκε το συμπέρασμα ότι συνδέεται σε διαφορετικές θέσεις από την καμπθοεκίνη, διότι παρουσίαζε δραστηριότητα σε κυτταρικές σειρές ανθεκτικές σε αυτή, καθώς επίσης και ότι η ύπαρξη ατόμου χλωρίου στο μόριο του DACA (Cl-DACA) αυξάνει τη συγγένεια και την πρόσδεση

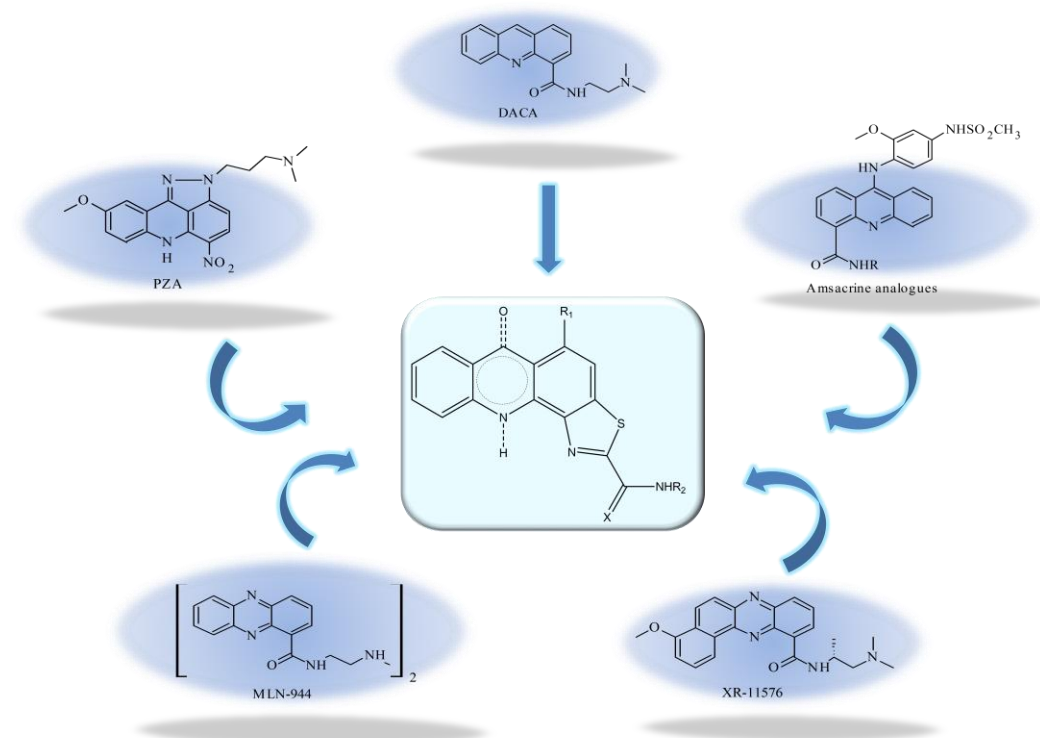
με την τοποϊσομεράση I έναντι της II.<sup>128</sup> Ένα άλλο ενδιαφέρον στοιχείο είναι ότι σε κύτταρα της ανθεκτικής σειράς λευχαιμίας Jurkat, στην οποία η ετοποσίδη, το amsacrine και η doxorubicin δεν εμφανίζουν δραστηριότητα, και στην οποία δεν εκφράζεται η Ρ-γλυκοπρωτεΐνη, το DACA είναι μερικώς δραστικό ενώ το CI-DACA είναι αρκετά δραστικό.<sup>128</sup>

Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι η πλευρική αλυσίδα του DACA σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το N-7 της γουανίνης και σταθεροποιεί το μόριο εντός της μεγάλης αύλακας (major groove) του DNA.<sup>130</sup>

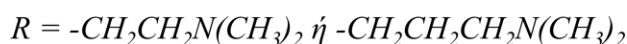
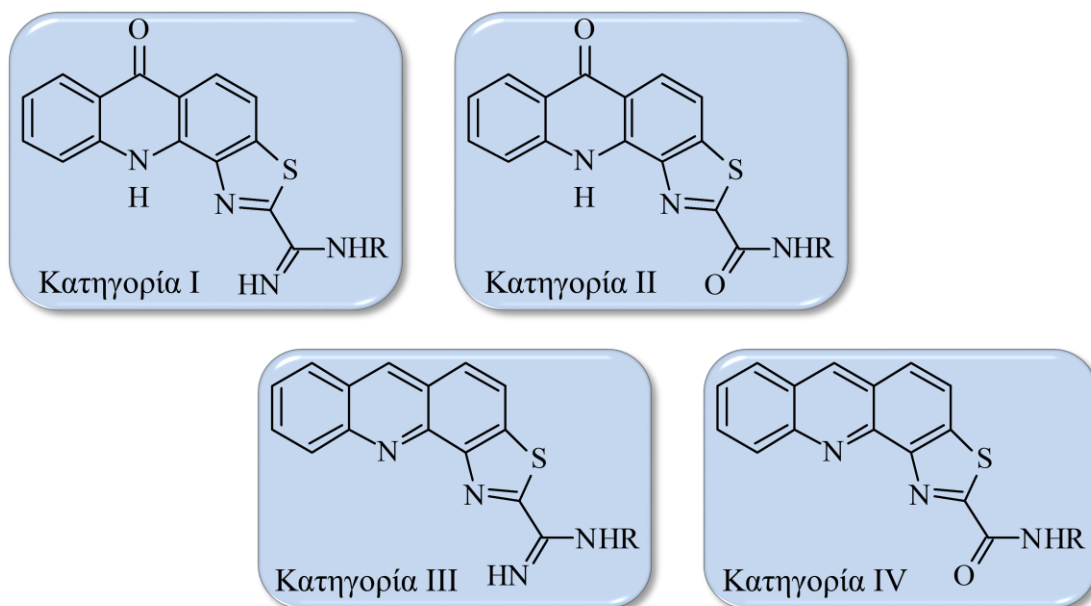
## Σχεδιασμός

Λαμβάνοντας υπ' όψιν όλα τα παραπάνω, θεωρήθηκε ενδιαφέρουσα η σύνθεση παραγών θειαζολοακριδινόνης και θειαζολοακριδίνης του σχήματος 1.16 ως πιθανών αναστολέων τοποϊσομερασών.

Τα προς σύνθεση μόρια αποτελούνται από έναν επίπεδο τετρακυκλικό σκελετό, ο οποίος φέρει μια πλευρική αλειφατική αλυσίδα με αμινικό άκρο. Τα χαρακτηριστικά αυτά απαντώνται και σε διάφορα άλλα μόρια που ανήκουν στην κατηγορία των ακριδινών και έχουν ανασταλτική επί τοποϊσομερασών δράση. Εν παραδείγματι, το PZA βασίζεται σε σκελετό ακριδίνης συμπυκνωμένης με ένα δακτύλιο πυραζολίου, ενώ το DACA είναι μια ακριδίνη με μια καρβοξαμιδική αλειφατική αλυσίδα στη θέση 4. Αντίστοιχα, το XR-11576 έχει ένα φαινύλιο συμπυκνωμένο στο φαιναζινικό σκελετό, ενώ το amsacrine και τα ανάλογά του φέρουν μια ανιλίνη στη θέση 9.



Σχήμα 1.16: Αναστολείς Τοποϊσομερασών βασισμένοι σε πολυκυκλικό αρωματικό σκελετό.



Σχήμα 1.17: Γενικοί τύποι I, II, III και IV μορίων που συντίθενται στην παρούσα εργασία.

Τα παράγωγα μπορούν να διακριθούν σε τέσσερις γενικές κατηγορίες των τύπων I, II, III και IV (Σχήμα 1.17). Πιο συγκεκριμένα, τα μόρια της κατηγορίας I διαθέτουν έναν σκελετό ακριδινόνης που στη c πλευρά του φέρει ένα συμπυκνωμένο θειαζόλιο. Στη θέση 2 του θειαζολίου υπάρχει μια καρβοξαμιδινική αλυσίδα, μήκους 2 ή 3 ατόμων άνθρακα, τα μόρια της κατηγορίας II διαθέτουν τα ίδια χαρακτηριστικά με τη διαφορά ότι η αλυσίδα είναι καρβοξαμιδική. Τα μόρια των κατηγοριών III και IV διαθέτουν τα ίδια χαρακτηριστικά με αυτά της I και της II αντίστοιχα, με σκελετό όμως ακριδίνης.

Για την περαιτέρω ανάλυση των χαρακτηριστικών είναι σκόπιμο να αναφερθεί ότι η πλευρική αλυσίδα, δε βρίσκεται στη θέση 4, όπως στο DACA αλλά στη θέση 2 του συμπυκνωμένου σκελετού δίπλα στο θειαζολικό άζωτο. Με τη διαφοροποίηση αυτή, η πλευρική αλυσίδα μετατίθεται στο χώρο λίγο μακρύτερα από τον αρωματικό πυρήνα σε σχέση με τα προαναφερθέντα μόρια. Εκτός από παράγωγα καρβοξαμιδίου έχουν σχεδιαστεί και παράγωγα καρβοξαμιδίνης καθώς έτσι προστίθεται μία ομάδα (=NH) που προσδίδει στα παράγωγα αυτά διαφορετικά χαρακτηριστικά. Υπάρχει ένας επιπλέον δότης δεσμού υδρογόνου σε σχέση με το καρβονύλιο του καρβοξαμιδίου και επίσης αλλάζει η βασικότητα της πλευρικής αυτής αλυσίδας, ώστε να μελετηθεί η επίηριά τους στην ανάπτυξη δράσης.

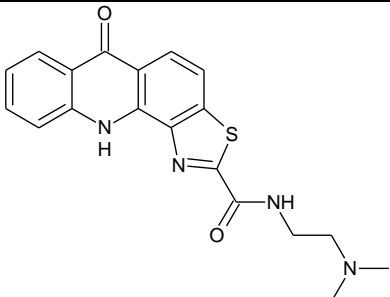
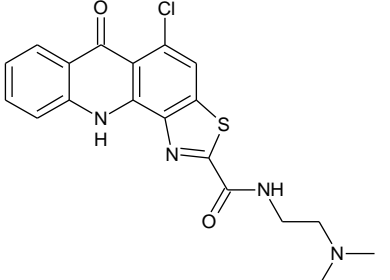
Είναι γνωστό από βιβλιογραφικά δεδομένα, αλλά και με βάση την εμπειρία από τα συντιθέντα μόρια του εργαστηρίου, ότι τα παράγωγα με σκελετό ακριδινόνης εμφανίζουν προβλήματα διαλυτότητας, που συνεπάγεται και προβλήματα στη βιοδιαθεσιμότητα. Για το λόγο αυτό έγιναν προσπάθειες να αυξηθεί η λιποφιλία των μορίων με σκοπό να αυξηθεί η διαλυτότητα τους συνεπώς και η δράση τους. Ένας



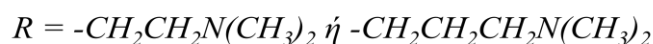
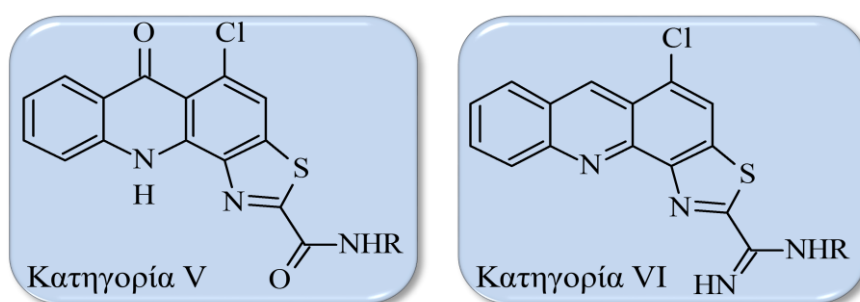
τρόπος που μπορεί να γίνει αυτό είναι η προσθήκη ενός αλογόνου στο σκελετό του μορίου.

Από τα αλογόνα φάνηκε ενδιαφέρουσα η εισαγωγή ενός ατόμου χλωρίου, καθώς όπως προαναφέρθηκε, από μόρια ανάλογα του DACA, αυτά που διέθεταν χλώριο στο σκελετό τους εμφάνιζαν μεγάλο εύρους κυτταροτοξική δράση και σε ορισμένες περιπτώσεις καλύτερη από αυτή του ίδιου του DACA.

Όπως φαίνεται και από τα υπολογιστικά δεδομένα του πίνακα 1.1 ο συντελεστής λιποφιλίας logP αυξάνεται σημαντικά με την προσθήκη ενός ατόμου χλωρίου στη θέση 5 του σκελετού.

A/A	Calculated logP	
	ChemDraw Ultra	ACD/ChemSketch
	2.68	2.35±1.36
	3.24	3.25±1.39

Πίνακας 1.1: logP ενός παραγώγου καθώς και ενός με χλώριο.



Σχήμα 1.18: Γενικοί τύποι V και VI μορίων που συντίθενται στην παρούσα εργασία.

Έτσι θεωρήθηκε σκόπιμη η σύνθεση παραγώγων που φέρουν ένα χλώριο στη θέση 5 για να μελετηθεί κατά πόσο αυτό επηρεάζει τη δράση. Από τα παράγωγα με σκελετό ακριδινόνης επιλέχθηκε να συντεθούν τα χλωριωμένα ανάλογα των αμιδίων, ενώ από αυτά με σκελετό ακριδίνης οι αμιδίνες.

## ΧΗΜΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

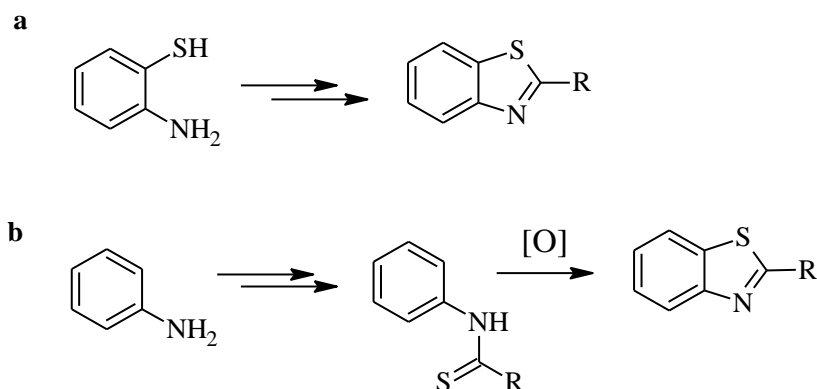
### Συνθετική πορεία για τα παράγωγα με σκελετό θειαζολοακρινιδίνης

Για τη σύνθεση των μορίων των κατηγοριών I και II (Σχήμα 1.17), απαραίτητο δομικό ενδιάμεσο είναι το 6-οξο-6,11-διϋδροθειαζολο[5,4-c]ακρινινο-2-καρβονιτρίλιο (II) (Σχήμα 2.2), από το οποίο με την επίδραση κατάλληλης αμίνης και υδρόλυση της παραγόμενης αμιδίνης θα σχηματιστούν τα επιθυμητά μόρια.

#### Τρόποι σύνθεσης θειαζολίων

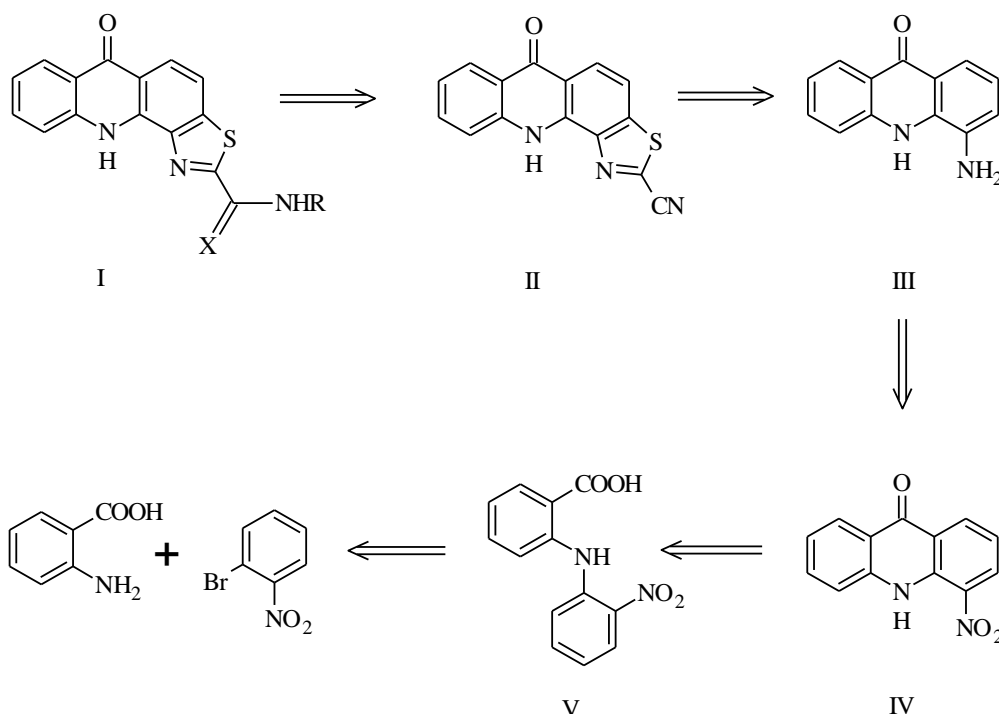
Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί αρκετοί τρόποι παρασκευής βενζοθειαζολίων, καθότι ο δακτύλιος αυτός παρουσιάζει αξιοσημείωτο ενδιαφέρον τόσο από χημικής, όσο και από βιολογικής πλευράς.

Ειδικότερα, είναι δυνατό να παραληφθούν είτε μέσω των αντίστοιχων 2-αμινοϋποκατεστημένων θειοφαινολών, είτε διαμέσου οξειδωτικής κύκλωσης των αντίστοιχων θειοανιιδίων (Σχήμα 2.1).<sup>131</sup>



Σχήμα 2.1: Τρόποι σύνθεσης θειαζολίων: α) μέσω 2-αμινοϋποκατεστημένων θειοφαινολών και β) μέσω οξειδωτικής κύκλωσης θειοανιιδίων

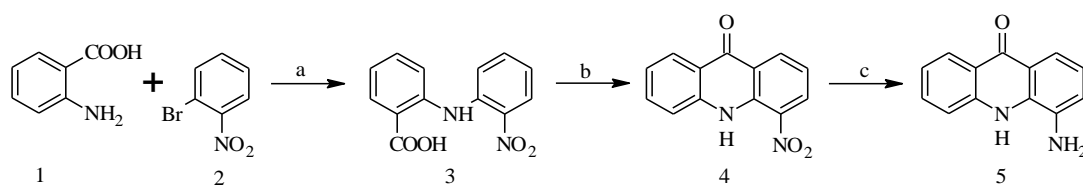
Η πρώτη μέθοδος σύνθεσης ενώ παρουσιάζει ευκολία στο τελευταίο βήμα της, που είναι η συμπύκνωση προς τον θειαζολικό σκελετό καθώς αυτός προκύπτει από πυρηνόφιλη προσβολή σε μια καρβονυλομάδα των ατόμων του θείου και του αζώτου, είναι αρκετά απαιτητική μέχρις εκεί καθώς: α) είναι δύσκολη η εισαγωγή θειοφαινολικής ομάδας και β) θα πρέπει να συνυπάρχουν οι δύο αυτές, ιδιαιτέρως δραστικές, ομάδες καθ' όλη τη διάρκεια της συνθετικής πορείας. Αντίθετα, η δεύτερη περίπτωση απαιτεί μόνο την ύπαρξη μια αμινομάδας και σχηματισμό του αντίστοιχου θειαμιδίου, το οποίο θα κυκλώσει προς θειαζόλιο, όπου το περιοριστικό βήμα σε θεωρητικό επίπεδο είναι η οξειδωτική κύκλωση, η οποία μπορεί να επιτευχθεί με αρκετούς τρόπους.



Σχήμα 2.2: Ρετροσυνθετική πορεία σύνθεσης των μορίων της κατηγορίας I

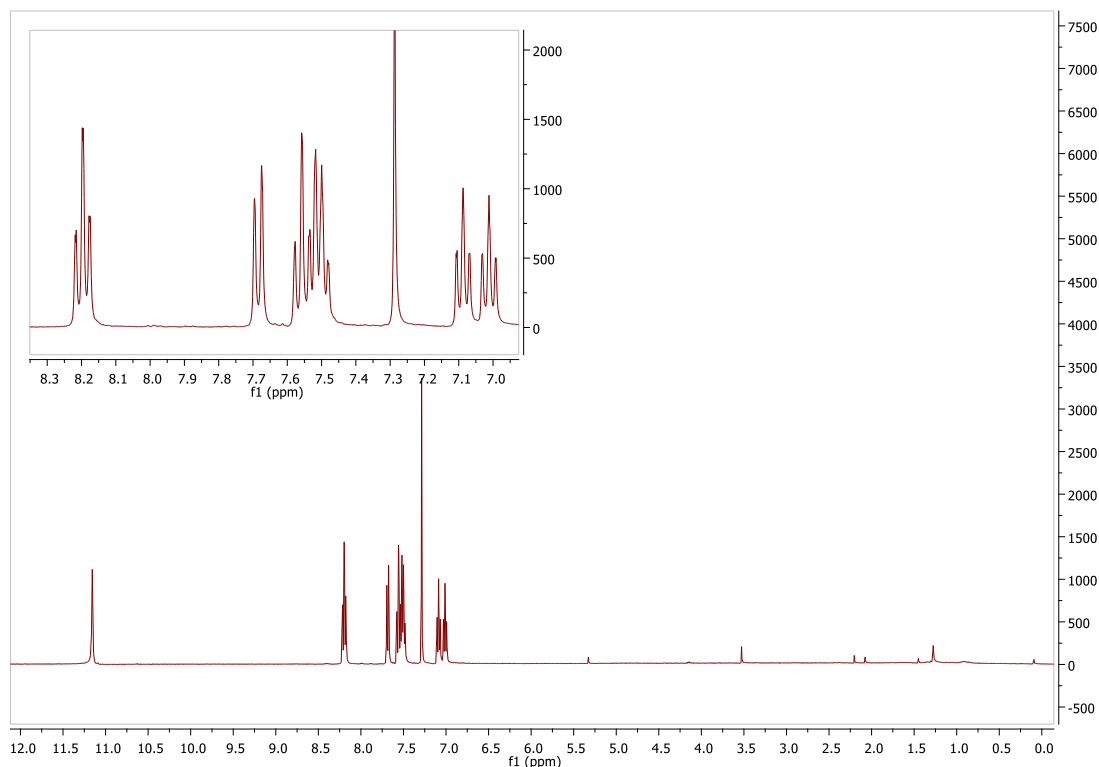
Για αυτό το λόγο επιλέχθηκε η σύνθεση να γίνει μέσω του δεύτερου τρόπου οπότε προτείνεται το παραπάνω ρετροσυνθετικό σχήμα. Το νιτρίλιο II μπορεί να προκύψει από την 4-αμινο-9,10-διϋδροακρινιδιν-9-όνη (III) η οποία σχηματίζεται από την αναγωγή του αντίστοιχου νιτροπαραγώγου (IV). Αυτό με τη σειρά του μπορεί να παραχθεί από την ενδομοριακή κύκλωση του 2-[(2-νιτροφαινυλ)αμινο]βενζοϊκού οξέος (V), προϊόν της σύζευξης του ανθρανιλικού οξέος με το 1-βρωμο-2-νιτροβενζόλιο (Σχήμα 2.2).

Η σύζευξη των παραπάνω, εμπορικά διαθέσιμων, πρώτων υλών, περιγράφεται βιβλιογραφικά<sup>132</sup>, εντός 1-πεντανόλης παρουσία στοιχειακού χαλκού με τη χρήση ανθρακικού καλίου ως βάση. Η απόδοση της συγκεκριμένης αντίδρασης είναι ικανοποιητική, όμως η κατεργασία της είναι πολύπλοκη. Πρόκειται για μια τυπική σύζευξη Ullmann, η οποία γενικότερα απαιτεί ενώσεις του χαλκού ως καταλύτες, βάση και, συνήθως, έναν πολικό διαλύτη. Γι αυτό το λόγο, η ίδια αντίδραση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιου (DMF) ως διαλύτη και η απόδοση της ήταν εφάμιλλη με αυτή εντός 1-πεντανόλης με ευκολότερη όμως κατεργασία (Σχήμα 2.3).



Σχήμα 2.3: a)  $K_2CO_3$ , Cu, άνυδρο DMF,  $130^\circ C$  b) π.  $H_2SO_4$ ,  $80^\circ C$  c)  $HCOONH_4$ , Pd-C, THF/MeOH 2:1, θ.π.

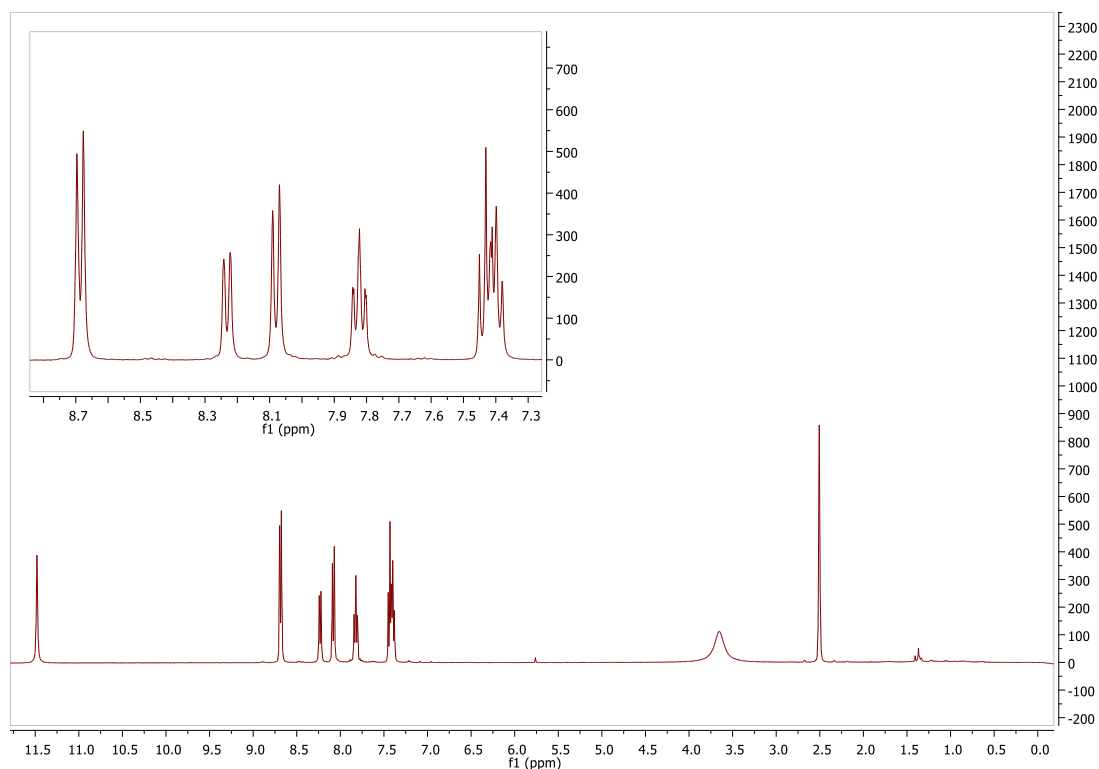
Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του παραγώγου **3** φαίνεται η ύπαρξη 8 αρωματικών πρωτονίων καθώς και μία απλή κορυφή που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της αμινομάδας στα 11.2 ppm (Εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του 2-((2-νιτροφαινυλ)αμινο)βενζοϊκού οξέος (**3**) σε  $\text{CDCl}_3$ .

Το επόμενο στάδιο της συνθετικής πορείας αφορά την ενδομοριακή κύκλωση του οξέος **3** προς την ακριδινόνη **4** μέσω αντίδρασης αρωματικής ηλεκτρονιόφιλης υποκατάστασης. Η αντίδραση αυτή επιχειρήθηκε με διάφορα οξέα κατά Lewis, όπως οξυχλωριούχος φωσφόρος (με ενδιάμεσο σχηματισμό του χλωριδίου του οξέος), συνδυασμό τριφθοροξικού οξέος/τριφθοροξικού ανυδρίτη και πυκνό θειικό οξύ. Με οξυχλωριούχο φωσφόρο ήταν ανεπιτυχής, ενώ με τριφθοροξικό οξύ η απόδοση δεν ήταν ικανοποιητική. Αντίθετα, η αντίδραση με επίδραση πυκνού θειικού οξέος είχε απόδοση της τάξης του 80% (Σχήμα 2.2).

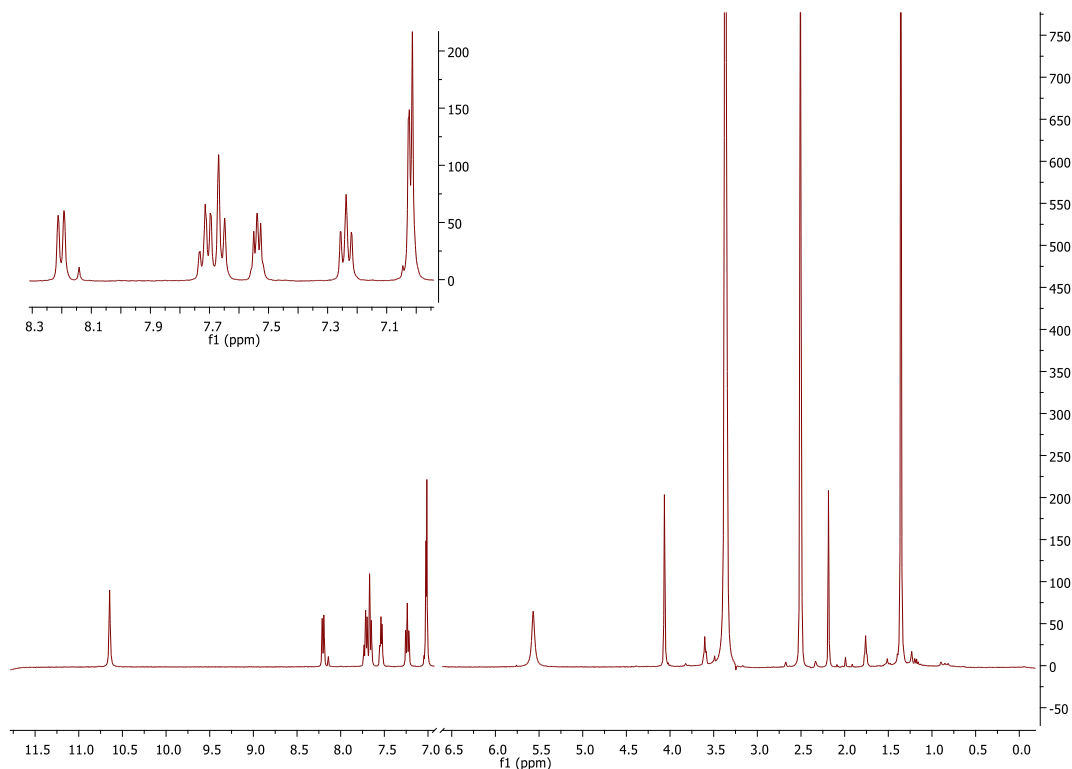
Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ακριδινόνης **4** φαίνεται χαρακτηριστικά η εξαφάνιση μιας αρωματικής κορυφής λόγω της ενδομοριακής κύκλωσης (Εικόνα 2.2).



Εικόνα 2.2: Φάσμα  $^1\text{H}$  – NMR της 4-νιτρο-9,10-διϋδροακρινιδιν-9-όνης (**4**) σε  $\text{DMSO-}d_6$ .

Το επόμενο βήμα στη συνθετική πορεία είναι η αναγωγή της νιτρομάδας, η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορους τρόπους. Αρχικά, δοκιμάστηκε κλασσική αναγωγή με υδρογόνωση υπό πίεση 50 psi και καταλύτη Pd-C σε απόλυτη EtOH, η οποία, όμως, δεν πραγματοποιήθηκε, ενώ υδρογόνωση υπό ατμοσφαιρική πίεση σε διαλύτη THF με καταλύτη Ni δεν είχε επαναληψιμότητα. Η αντίδραση με ένυδρο  $\text{SnCl}_2$  σε ακετόνη ή πυκνό υδροχλωρικό οξύ που δοκιμάστηκε στη συνέχεια, αν και είχε επαναληψιμότητα και παραλήφθηκε το αντίστοιχο άμινο παράγωγο **5** χαρακτηριζόταν από δύο μειονεκτήματα: α) δύσκολη κατεργασία και β) χαμηλή απόδοση της τάξης του 40%. Τελικά, η συγκεκριμένη αναγωγή πραγματοποιήθηκε σε υψηλή απόδοση (95%) με τη χρήση μυρμιγκικού αμμωνίου με καταλύτη Pd-C σε μίγμα THF/MeOH (Σχήμα 2.2). Κατά την αντίδραση αυτή, το άλας του μυρμιγκικού αμμωνίου όταν έρθει σε επαφή με τον καταλύτη διασπάται σε  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$  και  $\text{H}_2$ , το οποίο είναι και το αναγωγικό μέσο.<sup>133</sup>

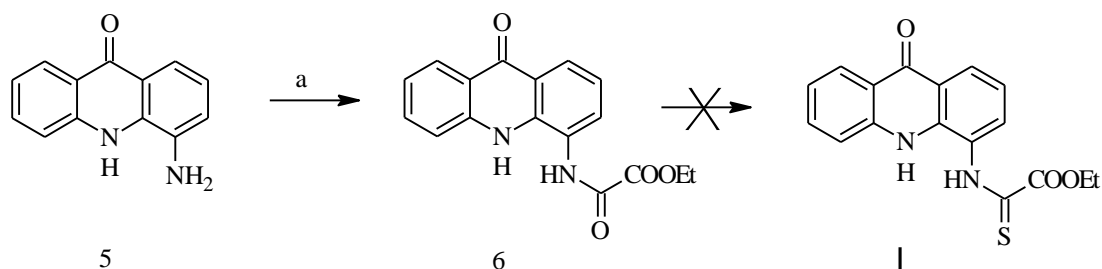
Στο φάσμα  $^1\text{H}$ -NMR της ένωσης **5** είναι εμφανής η ύπαρξη της αμινομάδας στα 5.5 ppm περίπου ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται και θωράκιση των πρωτονίων του δακτυλίου που αυτή βρίσκεται (Εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3: Φάσμα <sup>1</sup>H – NMR της 4-αμινο-9,10-διϋδροακριν-9-όνης (5) σε DMSO-d<sub>6</sub>.

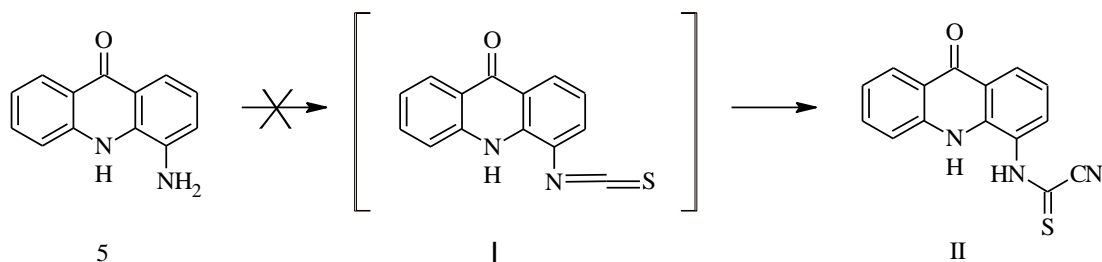
Το επόμενο στάδιο της συνθετικής πορείας αφορά την σύνθεση του θειαζολικού σκελετού δια μέσου της 4-αμινο-9,10-διϋδροακριν-9-όνης (5). Η ενεργοποιημένη ομάδα του θειανιιδίου, απαραίτητη για την σύνθεση του θειαζολικού πυρήνα, είναι δυνατό να προκύψει είτε από μετατροπή ενός ανιιδίου, είτε από έναν ισοθειοκυανικού εστέρα.

Αρχικά επιλέχθηκε ο πρώτος τρόπος. Έτσι, λοιπόν, με επίδραση χλωριδίου του οξαλικού αιθυλεστέρα επί της 4-αμινο-9,10-διϋδροακριν-9-όνης (5) λαμβάνεται ο αντίστοιχος εστέρας 6 από τον οποίο επιχειρήθηκε να παρασκευαστεί το αντίστοιχο θειοανιιδίο I. Η μετατροπή, όμως, του καρβονυλίου του αμιδίου σε θειοκαρβονύλιο δεν πραγματοποιήθηκε, αν και δοκιμάστηκαν διάφοροι τρόποι, μεταξύ αυτών α) απευθείας μετατροπή του με το αντιδραστήριο Lawesson, και β) επίδραση NaHS στο ενδιάμεσο χλωρίδιο που παρασκευάζεται με τριφαινυλοφωσφίνη σε τετραχλωράνθρακα (Σχήμα 2.4).



Σχήμα 2.4: α)  $ClCOOEt$ ,  $Et_3N$ ,  $CH_2Cl_2$ , θ.π.

Για το λόγο αυτό αποφασίστηκε να τροποποιηθεί η συνθετική πορεία και να επιχειρηθεί η σύνθεση του επιθυμητού θειοπαραγώγου μέσω του αντίστοιχου ισοθειοκυανικού εστέρα. Η αντίδραση αυτή επιχειρήθηκε ακολουθώντας μία καλώς περιγεγραμμένη πειραματική διαδικασία από τη βιβλιογραφία, κατά την οποία με επίδραση διθειάνθρακα παρουσία  $BoC_2O$ ,  $Et_3N$  και DMAP επί της ακρινιδίνης **5** λαμβάνεται ο αντίστοιχος, ισοθειοκυανικός εστέρας I, από τον οποίο με επίδραση κυανιούχου νατρίου λαμβάνεται το επιθυμητό θειοπαραγώγο II (Σχήμα 2.5).<sup>134</sup>

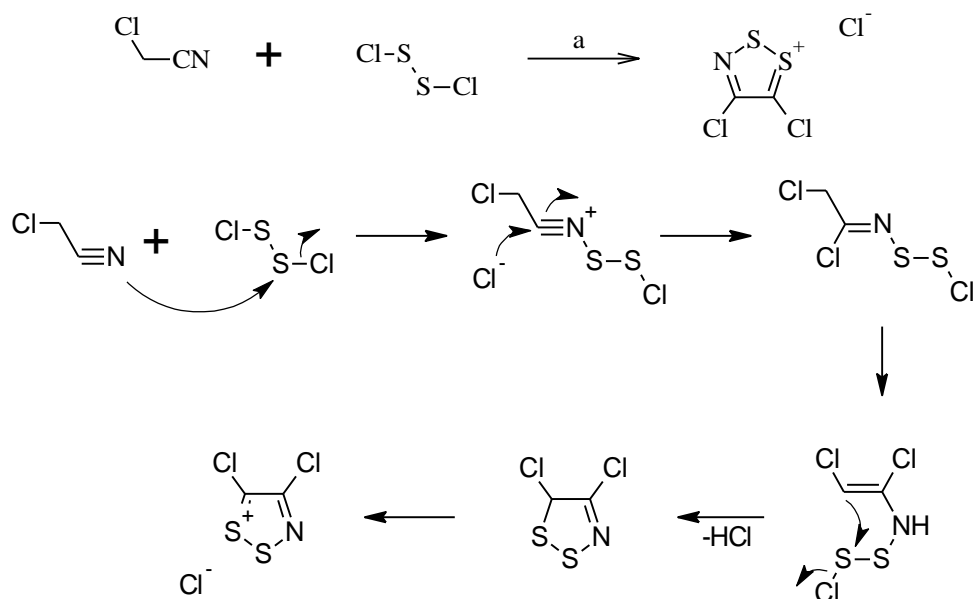


Σχήμα 2.5: Αντιδράσεις παρασκευής θειοισοκυανικού εστέρα.

Η αντίδραση αυτή εκτελέστηκε σε διάφορες συνθήκες χωρίς όμως αποτέλεσμα, πιθανώς λόγω της ιδιαίτερης αστάθειας του ενδιάμεσου I.

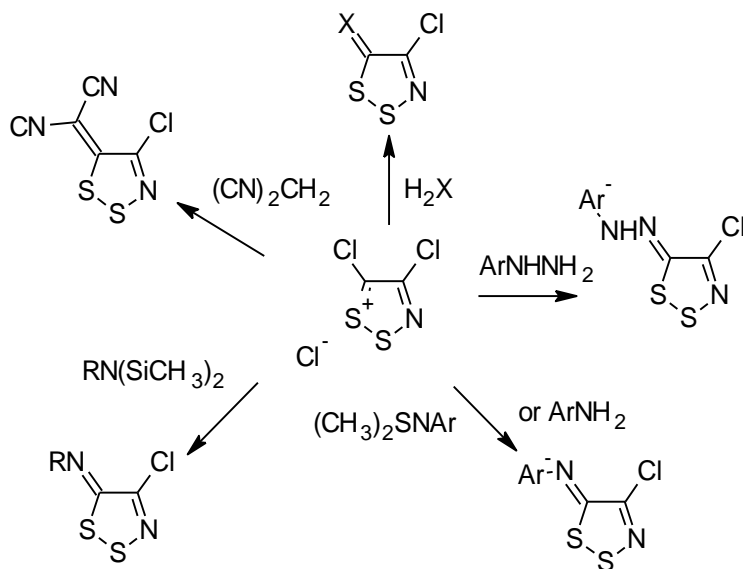
Με δεδομένη την αποτυχία προσθήκης του ατόμου του θείου και παρασκευής του αντίστοιχου θειοανιιδίου μέσω αμιδικού δεσμού θεωρήθηκε ότι ρόλο δότη θείου θα μπορούσε να έχει ένας πενταμελής διθειαζολικός δακτύλιος που περιλαμβάνεται στο αλάτι του Appel και είναι εύκολο να συνδεθεί με την αμινομάδα της ακρινιδίνης **5**.

Το άλας του Appel είναι το χλωριούχο 4,5-διχλωρο-1,2,3-διθειαζόλιο και παρασκευάζεται<sup>135</sup> με προσθήκη ισομοριακών ποσοτήτων χλωροακετονιτριλίου και διχλωροδισουλφιδίου, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και σε απόδοση έως και 85% με τον προτεινόμενο μηχανισμό της αντίδρασης να παρουσιάζεται παρακάτω (Σχήμα 2.6).



Σχήμα 2.6: Προτεινόμενος μηχανισμός σύνθεσης του Appel's Salt.

Αυτός ο πενταμελής διθειαζολικός δακτύλιος παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον για τη συνθετική χημεία, καθώς η θέση 5 είναι ιδιαίτερα ενεργοποιημένη για πυρηνόφιλη υποκατάσταση.<sup>136</sup> Συνεπώς, από το μόριο αυτό μπορεί να προκύψει μια μεγάλη ποικιλία παραγώγων ανάλογα με τα αντιδραστήρια και τις συνθήκες τις αντίδρασης (Σχήμα 2.7).

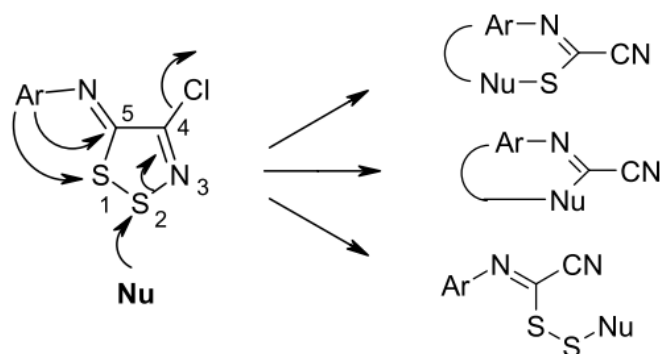


Σχήμα 2.7: Ποικιλία αντιδράσεων άλατος Appel με πυρηνόφιλα κέντρα.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η αντίδραση του άλατος του Appel με ανιλίνες κατά την οποία παρασκευάζονται σταθερά 5-(N-αρυλαμινο)-4-χλωρο-5H-1,2,3-διθειαζόλια, από τα οποία με πυρηνόφιλη προσβολή στα άτομα του θείου ή τον άνθρακα της θέσης 5 λαμβάνεται μια μεγάλη ποικιλία προϊόντων (Σχήμα 2.8), ένα

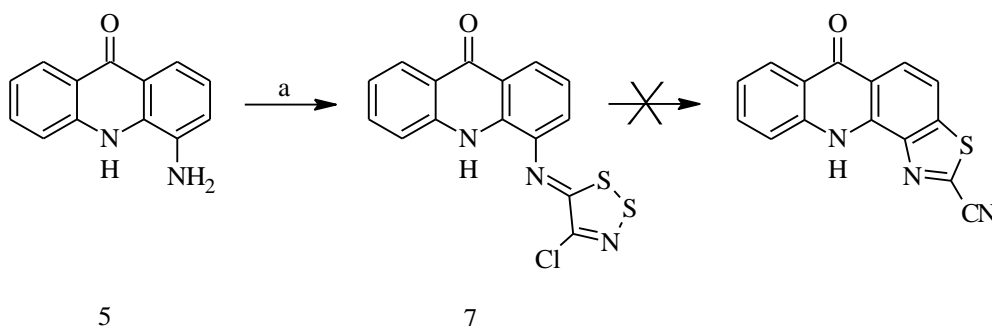


από τα οποία είναι οι συμπυκνωμένοι θειαζολικοί δακτύλιοι. Η συγκεκριμένη αντίδραση ευνοείται σε δακτυλίους με μεγάλη ηλεκτρονιακή πυκνότητα.



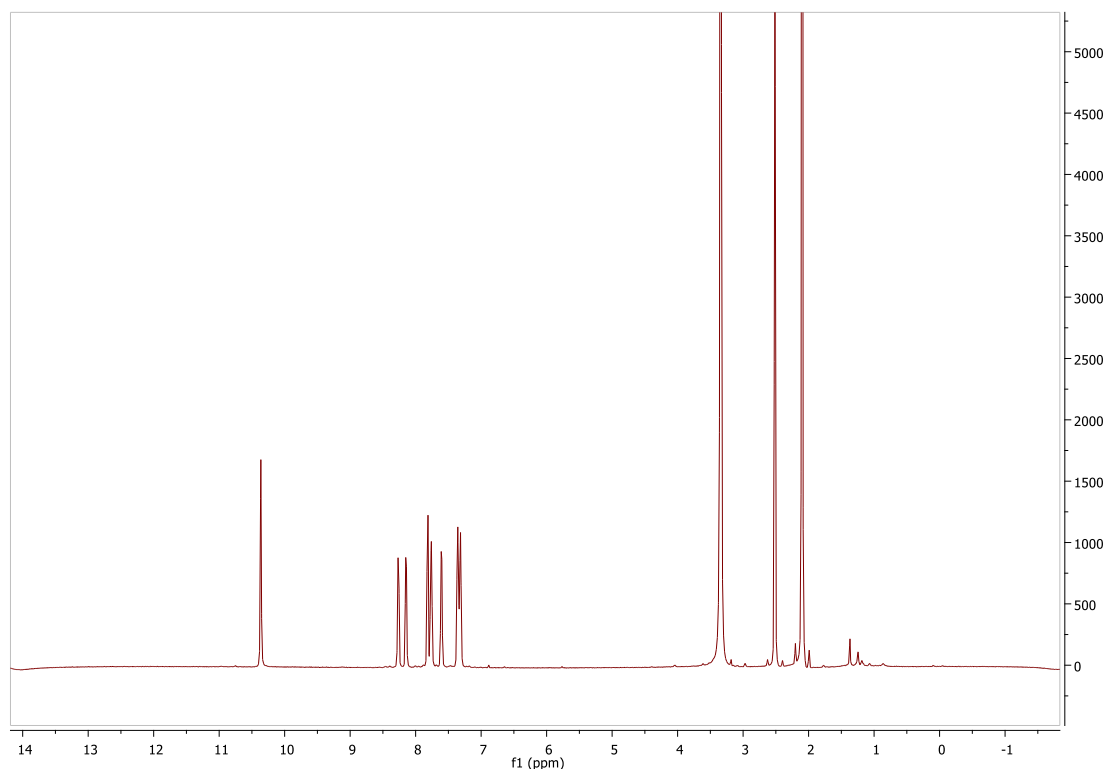
Σχήμα 2.8: Προϊόντα από τη διάνοιξη του πενταμελούς δακτυλίου έπειτα από αλληλεπίδραση με ένα πυρηνόφιλο κέντρο.

Αρχικά λοιπόν, με επίδραση άλατος του Appel επί της ακρινιδίνης **5** παρελήφθει το παράγωγο **7** από το οποίο επιχειρήθηκε η σύνθεση του επιθυμητού θειάζολο παραγώγου. Η αντίδραση αυτή δοκιμάστηκε με θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία, εντός πυριδίνης, σε κλασικές συνθήκες θέρμανσης καθώς και με την χρήση μικροκυμματικής ακτινοβολίας χωρίς όμως αποτέλεσμα (Σχήμα 2.9).



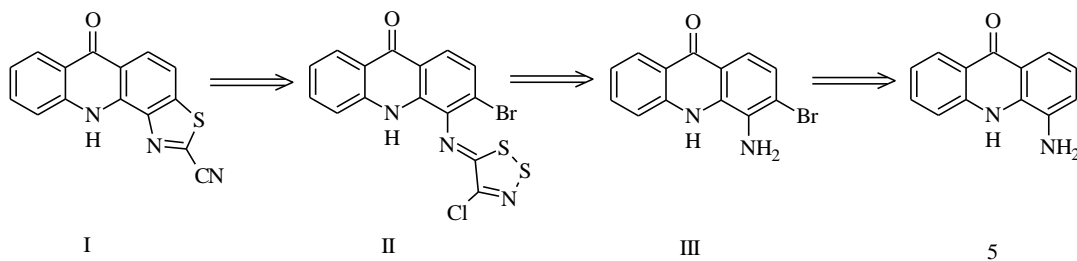
Σχήμα 2.9: α) άλας του Appel, πυριδίνη,  $CH_2Cl_2$ , θ.π.

Στο φάσμα  $^1H-NMR$  της ένωσης **7** φαίνεται η εξαφάνιση των πρωτονίων της αμινομάδας από τα 5.5 ppm περίπου (Εικόνα 2.4).



Εικόνα 2.4: Φάσμα  $^1\text{H}$  – NMR της 4-(4-χλωρο-5H-1,2,3-διθειαζολ-5-υλιδεν]αμινο-9,10-διϋδροακρινιδιν-9-όνης (**7**) σε  $\text{DMSO}-d_6$ .

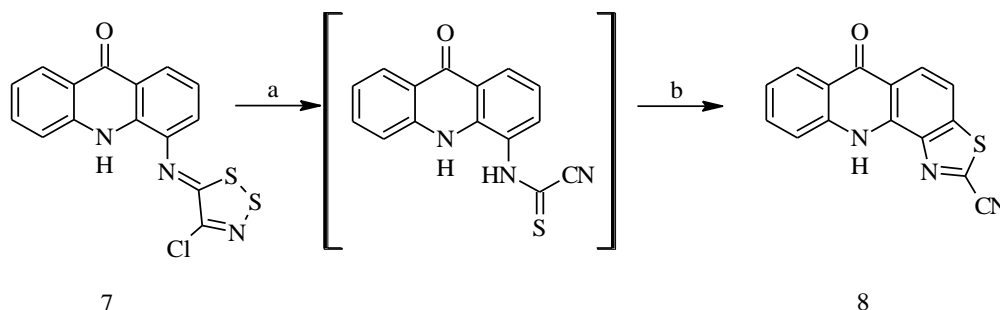
Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι η σύνθεση υποκατεστημένων βενζοθειαζολίων με επίδραση άλατος του *Appel* και ενδομοριακή κύκλωση του ενδιαμέσου παρουσιάζει μεγαλύτερη εκλεκτικότητα και υψηλότερες αποδόσεις στις *O*-βρώμο υποκατεστημένες ανιλίνες. Η αντίδραση συνήθως γίνεται με ήπια θέρμανση σε συσκευή μικροκυμάτων παρουσία ιωδιούχου χαλκού και η κατεργασία της είναι ιδιαίτερα απλή.<sup>137</sup> Για τον λόγο αυτό, παρόλο που η θέση βρωμίωσης επί της 4-αμινο-9,10-διϋδροακρινιδιν-9-όνης (**5**) ήταν δύσκολο να ελεγχθεί, λόγω της ύπαρξης περισσότερων του ενός υποκαταστατών που κατευθύνουν σε διαφορετικές θέσεις, η βρωμίωση δοκιμάστηκε με  $\text{Br}_2$  σε οξικό οξύ χωρίς όμως αποτελέσματα καθώς παρελήφθη πολύπλοκο μίγμα προϊόντων (Σχήμα 2.10).



Σχήμα 2.10: Ρετροσυνθετική πορεία για τη σύνθεση του νιτριλίου *I* μέσω του βρωμιδίου *III*.

Τελικά, γνωρίζοντας, όπως έχει ήδη αναφερθεί, ότι με ενδομοριακή οξειδωτική κύκλωση των θειοανιλιδίων μπορεί να συντεθούν συμπυκνωμένα

θειαζόλια (Σχήμα 2.1) και σε συνδυασμό με το γεγονός ότι κατά την διάνοιξη των 5-(*N*-αρυλαμινο)-4-χλωρο-5*H*-1,2,3-διθειαζολίων λαμβάνονται θειοκαρβόνυλο παράγωγα (Σχήμα 2.8), αποφασίστηκε να ακολουθηθεί η πορεία του σχήματος 2.11.

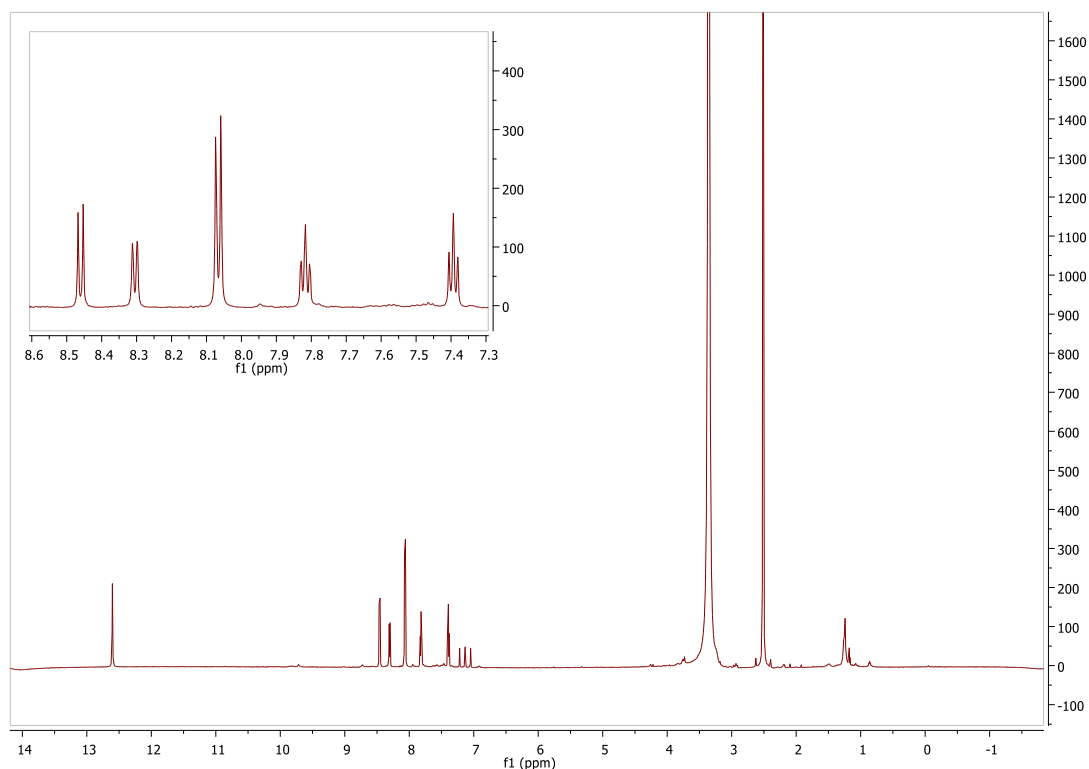


Σχήμα 2.11: a)  $PPh_3$ ,  $DMSO$ ,  $\theta.π.$ : b)  $PdCl_2$ ,  $DMSO$ ,  $110^\circ C$ .

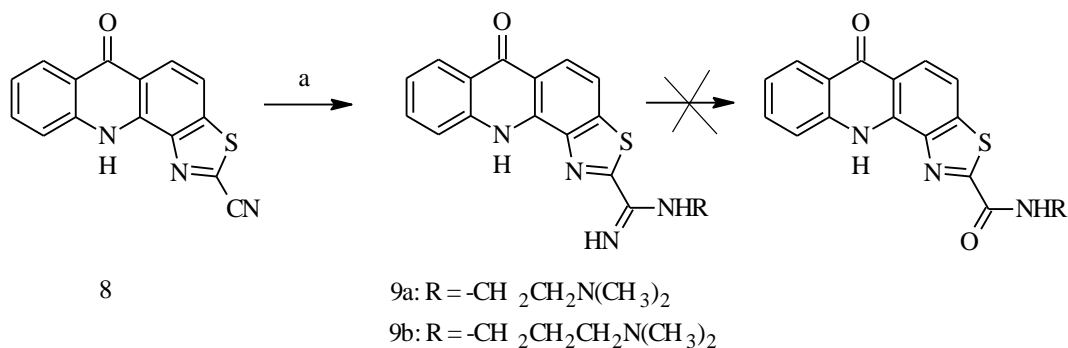
Η διάνοιξη του διθειαζολικού δακτυλίου βιβλιογραφικά περιγράφεται με επίδραση τριφαινυλοφωσφίνης<sup>138</sup>,  $DBU$ <sup>139</sup> καθώς και οξειδωτικά με *m*-χλωρούπερβενζοϊκό οξύ ( $mCPBA$ )<sup>140</sup>. Η αντίδραση με  $mCPBA$  είναι γνωστό ότι χαρακτηρίζεται από μικρές αποδόσεις ενώ ταυτόχρονα λαμβάνονται αρκετά παραπροϊόντα. Έτσι λοιπόν, η διάνοιξη του δακτυλίου επιχειρήθηκε μόνο με επίδραση τριφαινυλοφωσφίνης και  $DBU$ .

Κατά την επίδραση  $DBU$  στην ακριδινόνη **7** παρελήφθη πολύπλοκο μίγμα προϊόντων, ενώ κατά την επίδραση τριφαινυλοφωσφίνης παρουσία 1 σταγόνας νερού παρελήφθη το ενδιάμεσο θειοκαρβόνυλο παράγωγο, ο καθαρισμός του οποίου δεν κατέστη δυνατός, από το σχηματιζόμενο τριφαινυλοφωσφονοξείδιο, με τις συνήθεις χρωματογραφικές τεχνικές. Για το λόγο αυτό, η αντίδραση προς σχηματισμό του επιθυμητού θειαζολίου έγινε σε ένα στάδιο, χωρίς την απομόνωση του ενδιαμέσου, με προσθήκη  $PdCl_2$  και θέρμανση στους  $110^\circ C$ , όπου και παραλήφθηκε το επιθυμητό 6-οξο-6,11-διϋδροθειαζολο[5,4-*c*]ακριδινο-2-καρβονιτρίλιο (**8**) (Σχήμα 2.11).<sup>141</sup>

Στο φάσμα  $^1H-NMR$  του νιτριλίου **8** φαίνεται χαρακτηριστικά η ύπαρξη μόνο 6 αρωματικών πρωτονίων λόγω της κύκλωσης προς το θειαζόλιο (Εικόνα 2.5).

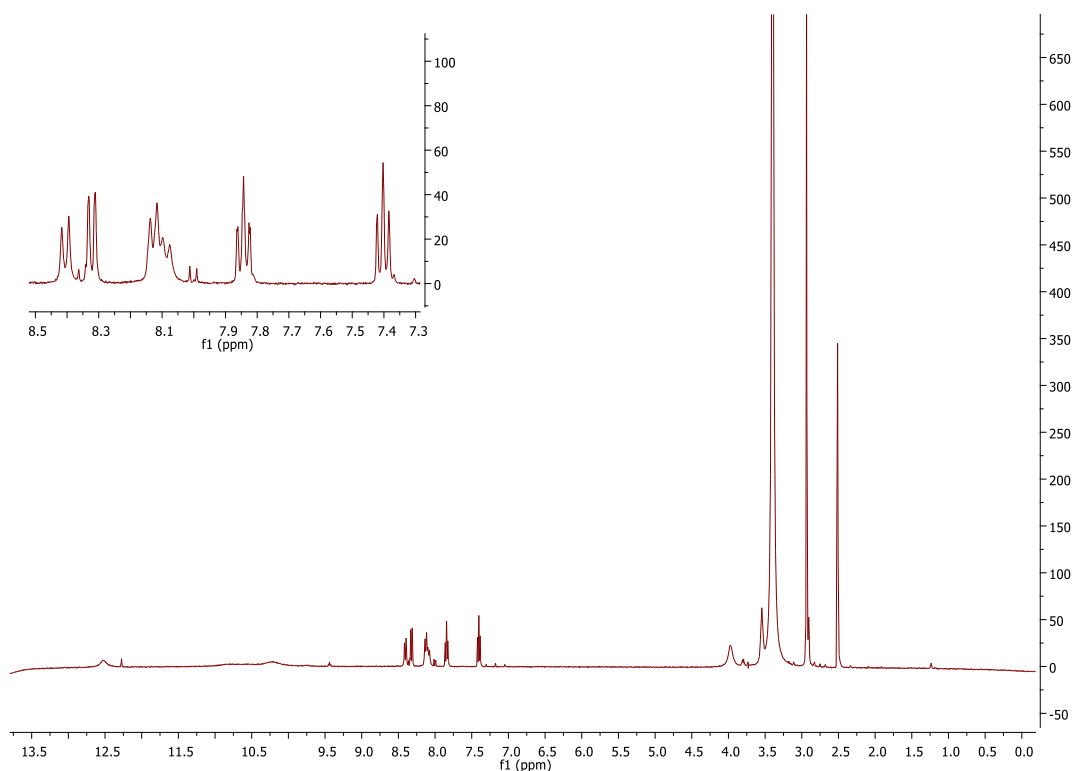


Εικόνα 2.5: Φάσμα  $^1\text{H}$  – NMR του 6-οξο-6,11-διϋδροθειαζολο[5,4-*c*]ακριδινο-2-καρβονιτριλίου (**8**)  $\text{DMSO-}d_6$ .



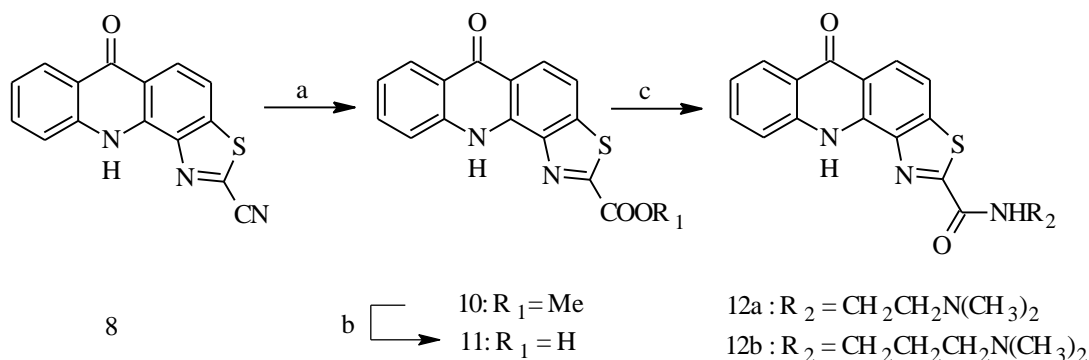
Σχήμα 2.12: a) κατάλληλη αμίνη,  $110^\circ\text{C}$ .

Τελικά, οι επιθυμητές αμιδίνες **9a-b** παρασκευάστηκαν μετά από βρασμό του νιτριλίου **8** εντός της κατάλληλης αμίνης, αφού με βρασμό μίγματος του νιτριλίου **8** και της κατάλληλης αμίνης εντός THF, σε ελαιόλουτρο αλλά και σε συσκευή μικροκυμάτων, δεν παρελήφθη προϊόν (Σχήμα 2.12). Ενδεικτικά, στο φάσμα  $^1\text{H}$ -NMR της αμιδίνης **9a** φαίνεται η ύπαρξη πλέον στο μόριο των πρωτονίων της αλειφατικής αλυσίδας καθώς και των δύο ευκίνητων πρωτονίων του αμιδινικού δεσμού (Εικόνα 2.6).



Εικόνα 2.6: Φάσμα  $^1\text{H}$  – NMR της αμιδίνης **9a** σε  $\text{DMSO}-d_6$ .

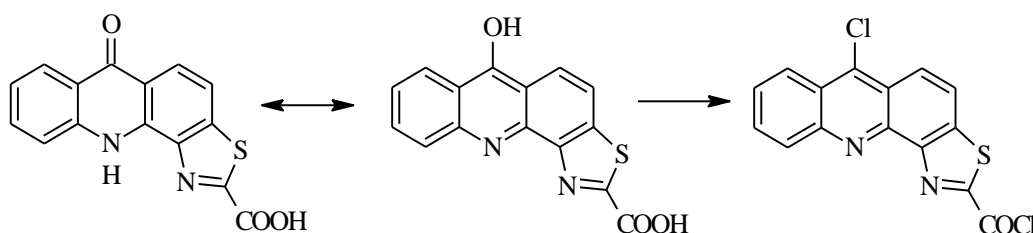
Η σύνθεση των αντίστοιχων αμιδίων της κατηγορίας επιχειρήθηκε να γίνει με βρασμό εντός μίγματος πυκνού  $\text{HCl}/\text{THF}$  (Σχήμα 2.12) χωρίς όμως επιτυχία λόγω της ιδιαίτερης σταθερότητας των μορίων. Τελικά η σύνθεση των επιθυμητών αμιδίων έγινε σύμφωνα με το σχήμα 2.13 μέσω του αντίστοιχου οξέος.



Σχήμα 2.13: a) αέριο  $\text{HCl}$ ,  $\text{MeOH}$ ,  $\theta.π.$  b)  $\text{υδ. KOH}$ ,  $\text{THF}$ ,  $\theta.π.$  c)  $(\text{COCl})_2$ ,  $\text{DMF}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$  σε  $\theta.π.$ , κατάλληλη αμίνη,  $\theta.π.$

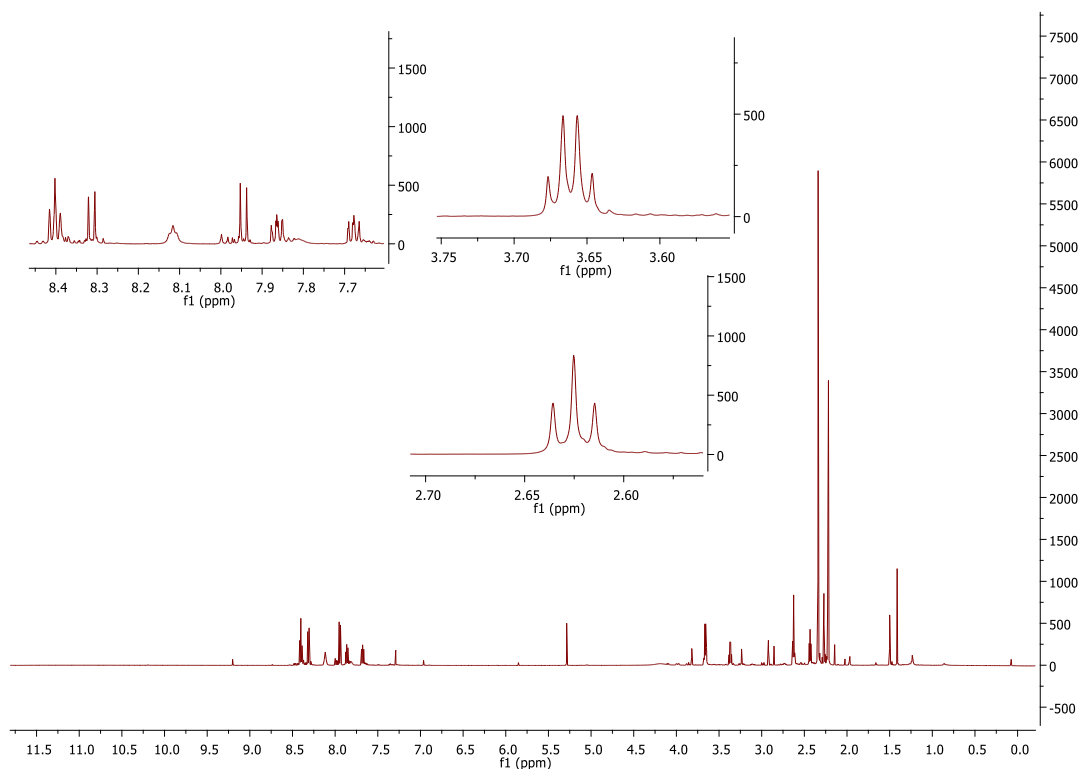
Αρχικά λοιπόν, με κατεργασία του νιτριλίου **8** με κορεσμένο διάλυμα μεθανολικού υδροχλωρίου, στους  $0^\circ\text{C}$ , λαμβάνεται ο ενδιάμεσος ιμινοεστέρας από τον οποίο απευθείας, με προσθήκη νερού, παρασκευάζεται ο μεθυλεστέρας **10** (Σχήμα 2.13). Ακολούθως, με υδρόλυση, με υδατικό διάλυμα  $\text{KOH}$  σε  $\text{THF}$ , παρασκευάζεται το οξύ **11**. Η σύνθεση των επιθυμητών αμιδίων επιχειρήθηκε με ενεργοποίηση του οξέος με  $\text{CDI}$  και  $\text{DCC}/\text{DMAP}$  χωρίς όμως αποτέλεσμα. Για τον λόγο αυτό αποφασίστηκε η σύνθεση των επιθυμητών αμιδίων να γίνει μέσω του

αντίστοιχου χλωριδίου. Είναι όμως γνωστό ότι στο σκελετό της ακριδινόνης, με επίδραση οξυχλωριούχου φωσφόρου ή θειονυλοχλωριδίου, σχηματίζεται και το 9-χλωρο παράγωγο λόγω της ταυτομέρειας του ενολικού καρβονλίου, καθιστώντας έτσι και τις δύο τις θέσεις διαθέσιμες για πυρηνόφιλη προσβολή από την αμίνη. Αντίστοιχα και στο οξύ **11** θα σχηματιζόταν το χλωρίδιο στη θέση 6 εκτός από την καρβοξυλική ομάδα (Σχήμα 2.14). Συνεπώς, ο σχηματισμός του ενδιάμεσου χλωριδίου έγινε με ήπιο τρόπο, δηλαδή με επίδραση ισομοριακής ποσότητας οξάλυλο διχλωριδίου και DMF σε  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  σε θερμοκρασία δωματίου, από το οποίο ακολούθως παρασκευάστηκαν τα επιθυμητά αμίδια **12a-b** με επίδραση διμοριακής ποσότητας αμίνης (Σχήμα 2.13).<sup>142</sup>



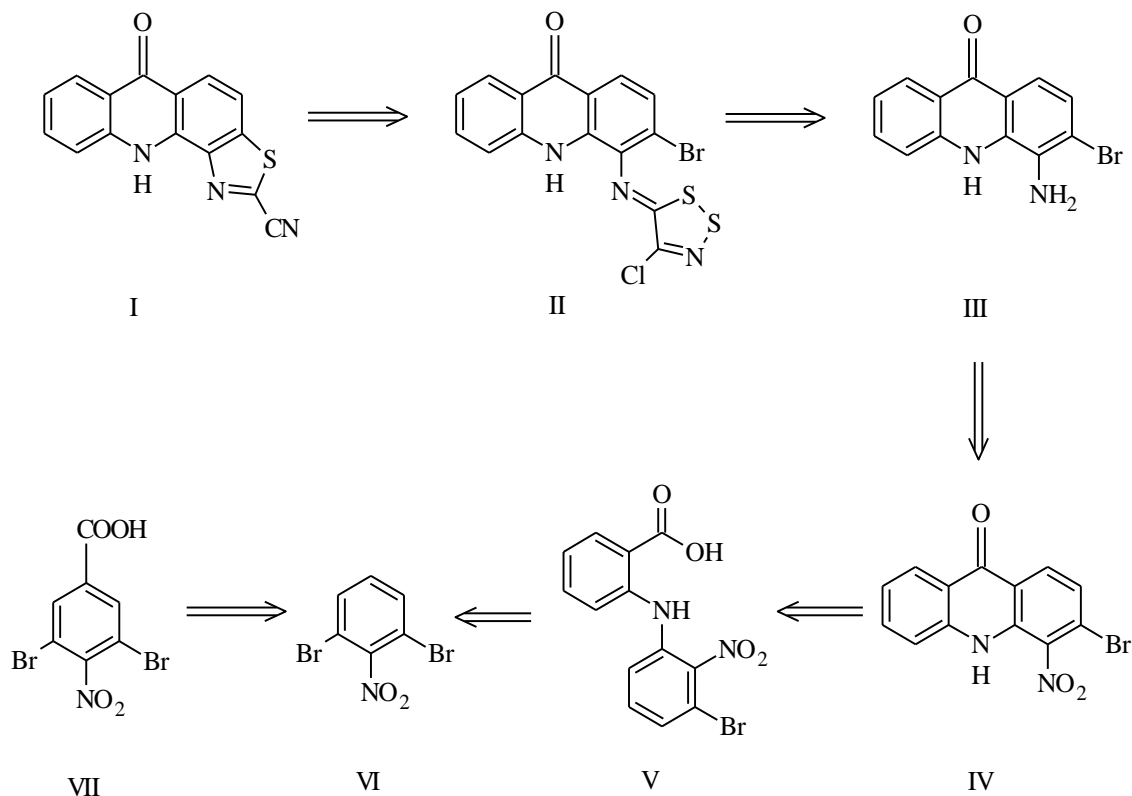
Σχήμα 2.14: Δομές συντονισμού της ακριδινόνης **11**.

Ενδεικτικά, στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του αμιδίου **12a** παρατηρείται η ύπαρξη των πρωτονίων της αλειφατικής αλυσίδας καθώς και, ένα μόνο πλέον, ευκίνητο πρωτόνιο του αμιδικού δεσμού (Εικόνα 2.7).



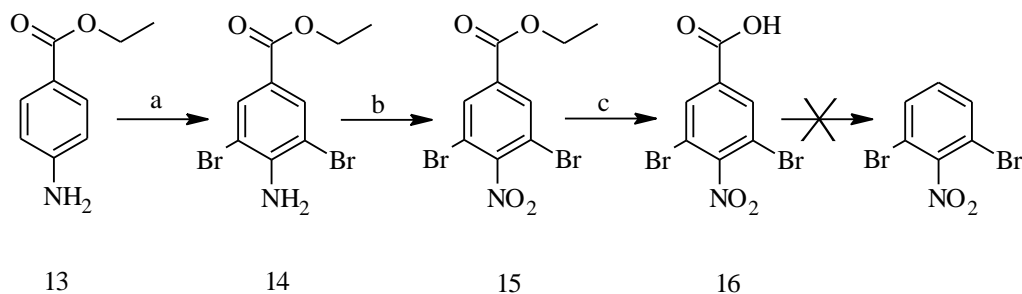
Εικόνα 2.7: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του αμιδίου **12a** σε  $\text{CDCl}_3$ .

Η συνολική απόδοση της προαναφερθείσας συνθετικής πορείας είναι ιδιαίτερα χαμηλή, της τάξης του 2-4%, εξαιτίας κυρίως της χαμηλής απόδοσης σχηματισμού του θειαζολικού δακτυλίου. Επειδή το νιτρίλιο **8**, ουσιαστικά αποτελεί την πρώτη ύλη για την σύνθεση του συνόλου των ενώσεων, κρίθηκε σκόπιμο να αναπτυχθεί μια νέα πορεία σύνθεσης με καλύτερη απόδοση, ευκολότερη κατεργασία καθώς επίσης και δυνατότητας να χρησιμοποιηθούν μεγάλες ποσότητες. Αφού, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η βρωμίωση της 4-αμινο-9,10-διϋδροακρινιδιν-9-όνης (**5**) δεν ήταν δυνατό να πραγματοποιηθεί, το βρώμιο στη θέση 3 θα έπρεπε να προστεθεί σε προγενέστερο στάδιο της συνθετικής πορείας (Σχήμα 2.15).



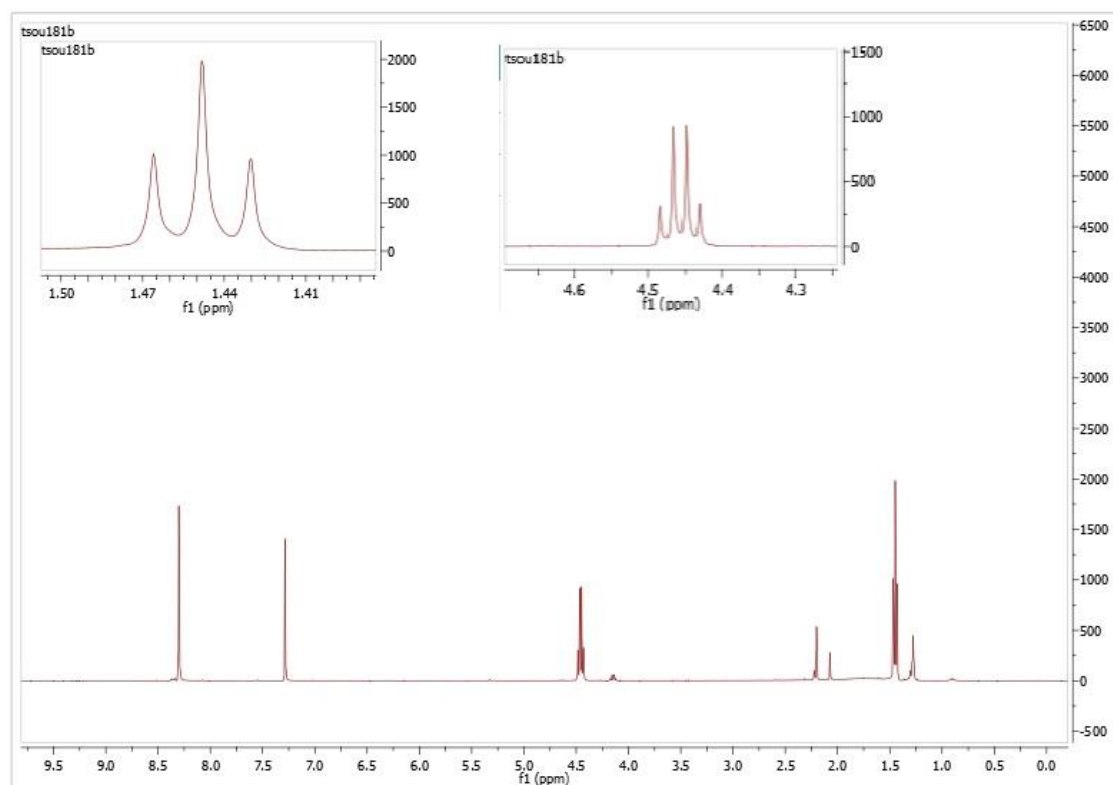
Σχήμα 2.15: Εναλλακτική ρετροσυνθετική πορεία

Από το παραπάνω ρετροσυνθετικό σχήμα γίνεται αντιληπτό ότι ο δομικός λίθος για την σύνθεση της 4-αμινο-3-βρωμο-9,10-διϋδροακρινιδιν-9-όνης (**III**) είναι το 1,3-διβρωμο-2-νιτροβενζόλιο (**VI**) το οποίο θα μπορούσε να συντεθεί μετά από αποκαρβοξυλίωση του οξέος **VII**. Έτσι λοιπόν, με βρωμίωση της βενζοϊκής (**13**) προς το διβρωμοπαράγωγο **14**, ακολουθούμενη από οξείδωση της αμινομάδας με επίδραση  $\text{H}_2\text{O}_2$  και πυκνού  $\text{H}_2\text{SO}_4$  λαμβάνεται ο εστέρας **15**, από τον οποίο μετά από σαπωνοποίηση παρασκευάστηκε το οξύ **16** (Σχήμα 2.16).



Σχήμα 2.16: a) NBS, AcOH b)  $H_2O_2, \pi, H_2SO_4, AcOH$ , βρασμός c) NaOH 40%, MeOH, θ.π..

Στο φάσμα  $^1H$ -NMR του παραγώγου **15** παρατηρείται η ύπαρξη του αιθυλεστέρα καθώς και μια μονή κορυφή την περιοχή των αρωματικών που αντιστοιχεί στα πρωτόνια 2 και 6.

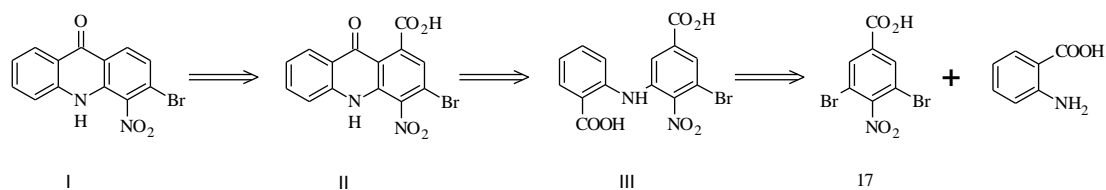


Εικόνα 2.8: Φάσμα  $^1H$  – NMR 3,5-διβρωμο-4-νιτροβενζοϊκού αιθυλεστέρα (**15**) σε  $CDCl_3$ .

Το επόμενο στάδιο της συνθετικής πορείας αφορά την αποκαρβοξυλίωση του οξέος **16** προς το επιθυμητό 1,3-διβρωμο-2-νιτροβενζόλιο, δυστυχώς όμως η συγκεκριμένη αντίδραση δεν πραγματοποιήθηκε παρότι δοκιμάστηκε πληθώρα συνθηκών και αντιδράσεων (θειικό οξύ 70%,  $Cu_2O$ -κινολίνη, DDQ). Αφού η αποκαρβοξυλίωση του οξέος **16** δεν ήταν εφικτή θεωρήθηκε ότι το επιθυμητό βρωμίδιο I θα μπορούσε να συντεθεί μετά από αποκαρβοξυλίωση του 3-βρωμο-4-νιτρο-9-οξο-9,10διϋδροακριδινο-1-καρβοξυλικού οξέος II, η σύνθεση του οποίου

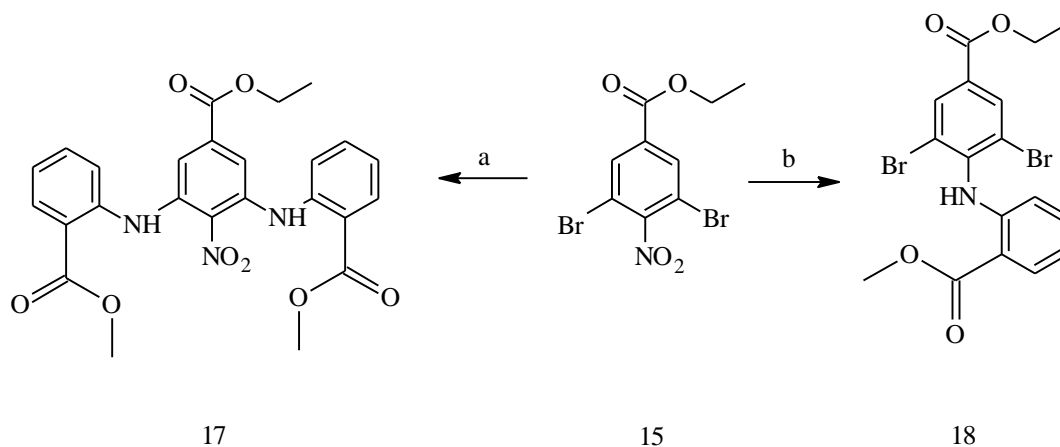


είναι εφικτή μετά από σύζευξη του εστέρα **16** με τον ανθρανιλικό μεθυλεστέρα και ενδομοριακή κύκλωση του ενδιάμεσου οξέος III (Σχήμα 2.17).



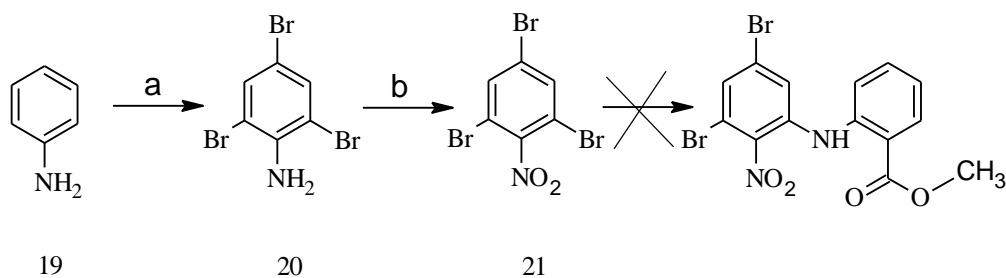
Σχήμα 2.17: Εναλλακτική ρετροσυνθετική πορεία της 3-βρωμο-4-νιτρο-9-οξο-9,10-διϋδροακρινιδιν-9-όνης.

Έτσι, επιχειρήθηκε σύζευξη του εστέρα **17** με ανθρανιλικό μεθυλεστέρα με συνθήκες κλασσικής αρωματικής πυρηνόφιλης υποκατάστασης αλλά και με αμίνωση κατά Buchwald-Hartwig με χρήση καταλυτών παλλαδίου. Στην πρώτη περίπτωση ο ανθρανιλικός μεθυλεστέρας έκανε αρωματική πυρηνόφιλη υποκατάσταση στον άνθρακα που φέρει την νιτρομάδα (παράγωγο **18**), ενώ στη δεύτερη λαμβάνεται το διϋποκατεστημένο προϊόν **17** (Σχήμα 2.18), πιθανώς λόγω της ιδιαίτερης ενεργοποίησης του δακτυλίου του παραγώγου **15**.



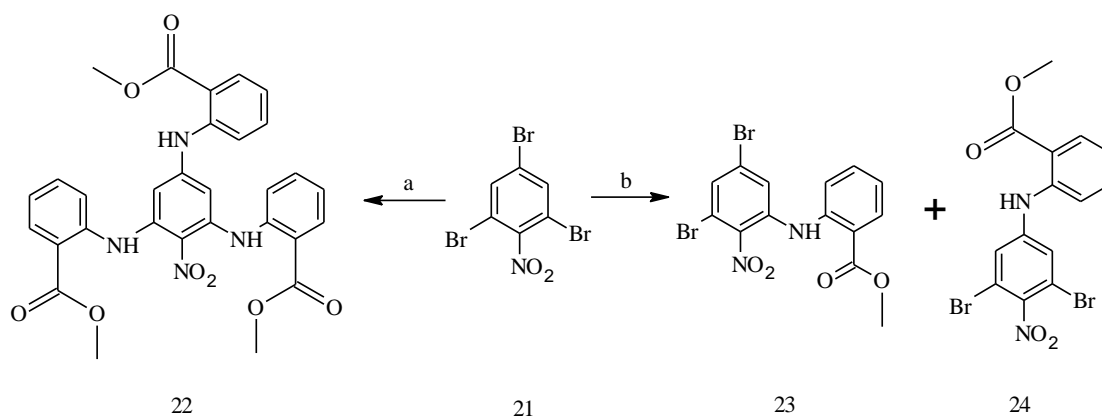
Σχήμα 2.18: a)  $Pd(dbA)_2$ , *xphos*,  $Cs_2CO_3$ , τολουόλιο, βρασμός b)  $NaH$ , THF, βρασμός.

Για το λόγο αυτό, θεωρήθηκε ότι η αντικατάσταση της αιθοξυκαρβονυλομάδας στο παράγωγο **15**, από το άτομο του βρωμίου, θα μπορούσε να μειώσει την ενεργότητα του δακτυλίου ενώ ταυτόχρονα θα είναι εφικτή και η αναγωγική απομάκρυνση του. Έτσι λοιπόν, με βρωμίωση της ανιλίνης **19** με επίδραση τριμοριακής ποσότητας NBS και στη συνέχεια οξείδωση της αμινομάδας του τριβρωμοπαραγώγου **20** με  $H_2O_2$ , λαμβάνεται νιτροπαραγόγο **21** (Σχήμα 2.19).



Σχήμα 2.19: a) NBS, AcOH, θ.π.: b) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, π. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, AcOH, βρασμός

Ακολούθως επιχειρήθηκε η αντίδραση αρωματικής πυρηνόφιλης υποκατάστασης του ανθρανιλικού μεθυλεστέρα επί του βρωμοπαραγώγου **21**, όμως και σε αυτή την περίπτωση ο έλεγχος της αντίδρασης ήταν ιδιαίτερα δύσκολος. Με συνθήκες κλασσικής αρωματικής πυρηνόφιλης υποκατάστασης και με την χρήση ήπιας βάσης δεν λαμβάνεται κανένα προϊόν, ενώ με την χρήση πιο ισχυρής βάσεως λαμβάνεται ένα πολύπλοκο μίγμα προϊόντων με διάφορες βαθμίδες υποκατάστασης. Αντίθετα, με τη χρήση καταλυτών παλλαδίου (αμίνωση κατά Buchwald-Hartwig) και πιο συγκεκριμένα, με χρήση συστήματος Pd(dbA)<sub>2</sub>/xphos ή Pd<sub>2</sub>(dbA)<sub>3</sub>/xphos λαμβάνεται το τριϋποκατεστημένο παράγωγο **22** ενώ κατά την χρήση (Ph<sub>3</sub>P)<sub>4</sub>Pd λαμβάνεται ο επιθυμητός εστέρας **23** σε μίγμα με το ισομερές θέσεως **24** και σε αναλογία 1 προς 3 αντίστοιχα Σχήμα 2.20).

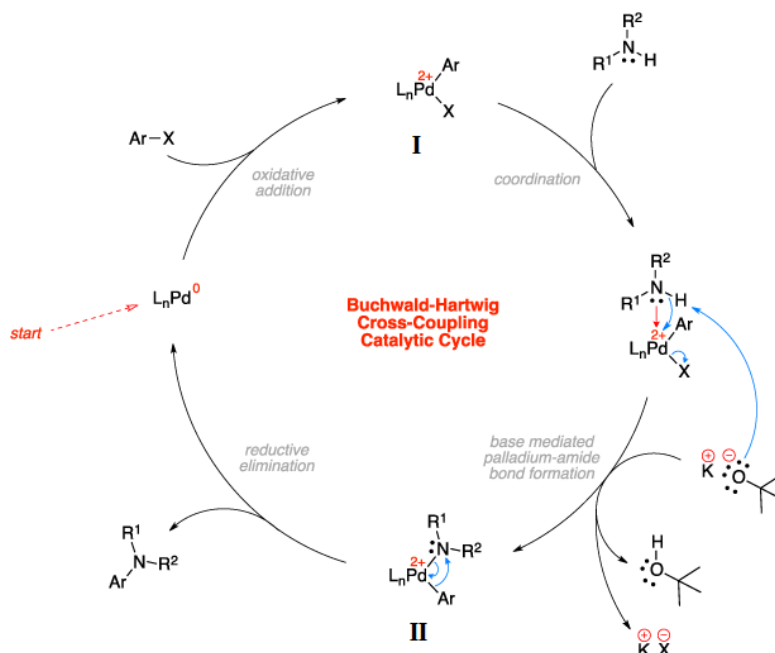


Σχήμα 2.20: a) προϊόν με Pd(dbA)<sub>2</sub> και Pd<sub>2</sub>(dbA)<sub>3</sub> με xphos, b) προϊόντα με (Ph<sub>3</sub>P)<sub>4</sub>Pd.

Δυστυχώς, η απόδοση της συγκεκριμένης αντίδρασης είναι μικρή καθώς, λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης λαμβάνεται σε μεγαλύτερη αναλογία το παραυποκατεστημένο παράγωγο **24** (καταλύτης (Ph<sub>3</sub>P)<sub>4</sub>Pd). Εξάλλου, με την χρήση άλλων καταλυτών ή ligand λαμβάνεται το τριϋποκατεστημένο παράγωγο **22** πιθανώς λόγω του γεγονότος ότι ο δακτύλιος του 1,3,5-τριβρωμο-2-νιτροβενζολίου είναι ιδιαίτερα φτωχός σε ηλεκτρόνια. Για τον λόγο αυτό θεωρήθηκε ότι η αμίνωση Buchwald-Hartwig θα έπρεπε να πραγματοποιηθεί σε δακτύλιο με μεγαλύτερη ηλεκτρονιακή πυκνότητα. Η χρήση της αμίνης **20** ενδεχομένως να δημιουργούσε προβλήματα ανταγωνισμού με την φτωχότερη σε ηλεκτρόνια αμινομάδα του ανθρανιλικού

μεθυλεστέρα και για το λόγο αυτό θεωρήθηκε ότι καταλληλότερο υπόστρωμα για την ανωτέρω αντίδραση θα ήταν το κατάλληλα υποκατεστημένο βρωμοβενζοθειαζόλιο.

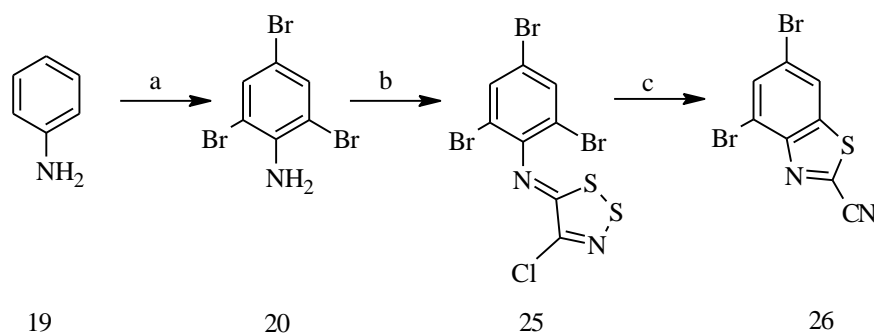
Η αντίδραση Buchwald-Hartwig<sup>143,144</sup> χρησιμοποιείται συνήθως για τη σύνθεση διαρυλαμινών. Έχει αναφερθεί πληθώρα περιπτώσεων που είναι εφικτή η υποκατάσταση από αρωματική αμινομάδα φτωχή σε ηλεκτρόνια σε αρωματικό πυρήνα πλούσιο σε ηλεκτρόνια με τη χρήση διαφόρων καταλυτών παλλαδίου, καθώς επίσης και εκλεκτικότητα ως προς δύο διαφορετικές θέσεις σύζευξης.<sup>145</sup>



Εικόνα 2.9: Μηχανισμός και καταλυτικός κύκλος της αντίδρασης Buchwald-Hartwig.

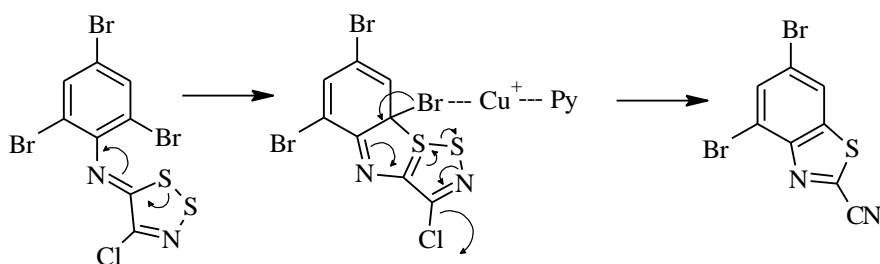
Όπως φαίνεται στο διάγραμμα του μηχανισμού (Εικόνα 2.9) στο πρώτο στάδιο του καταλυτικού κύκλου γίνεται οξειδωτική προσθήκη του αρυλαλογονιδίου στο σύμπλοκο παλλαδίου για το σχηματισμό του οργανοπαλλαδιακού ενδιάμεσου I. Το στάδιο αυτό είναι το περιοριστικό βήμα για τη εξέλιξη του οξειδοαναγωγικού κύκλου και η δραστηκότητα των αλογόνων ακολουθεί ως εξής:  $I > Br > Cl$ .<sup>146</sup> Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη της αρυλαμίνης επί του ενδιάμεσου I και αποπρωτονίωση της από μια κατάλληλη βάση για το σχηματισμό του οργανοπαλλαδιακού ενδιάμεσου II. Στη διάρκεια του τελευταίου σταδίου του κύκλου γίνεται αναγωγική απόσπαση του επιθυμητού προϊόντος από τον ενδιάμεσο II και ο καταλύτης αναγεννάται.

Συνεπώς, με επίδραση άλατος του Appel επί της 2,4,6-τριβρωμοανιλίνης (**20**) και θέρμανση με την βοήθεια μικροκυμματικής ακτινοβολίας του ενδιάμεσου παραγώγου **25**,<sup>136</sup> παρουσία ιωδιούχου χαλκού, λαμβάνεται το βενζοθειαζόλιο **26** (Σχήμα 2.21).



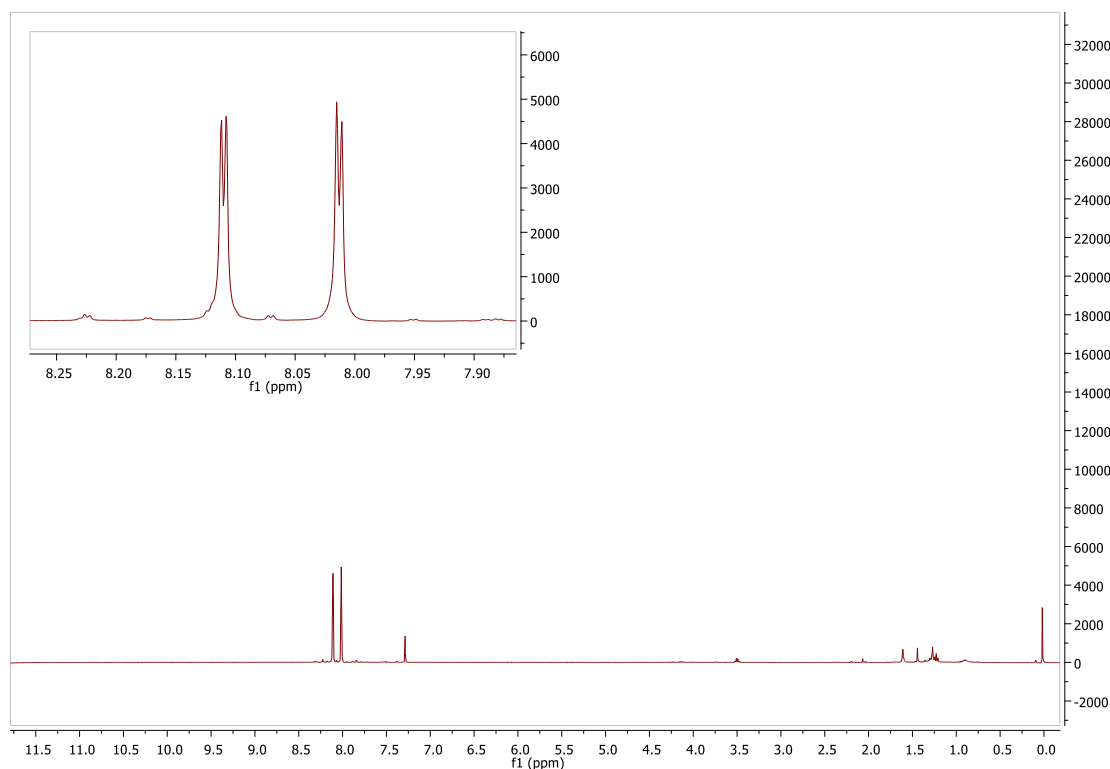
Σχήμα 2.21: a) NBS, AcOH, θ.π. b) άλας του Appel, πυριδίνη, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, θ.π. c) CuI, πυριδίνη, 120°C, MW.

Ο προτεινόμενος μηχανισμός της αντίδρασης φαίνεται στο σχήμα 2.22, όπου λόγω της συμπλοκοποίησης του βρωμίου με τον μονοσθενή χαλκό παρουσία πυριδίνης, πολώνεται ο δεσμός μεταξύ βρωμίου και άνθρακα. Έτσι, η αντίδραση της κύκλωσης κατευθύνεται εκλεκτικά στη θέση αυτή, ενώ ταυτόχρονα γίνεται και σε μεγαλύτερη απόδοση.<sup>138</sup>



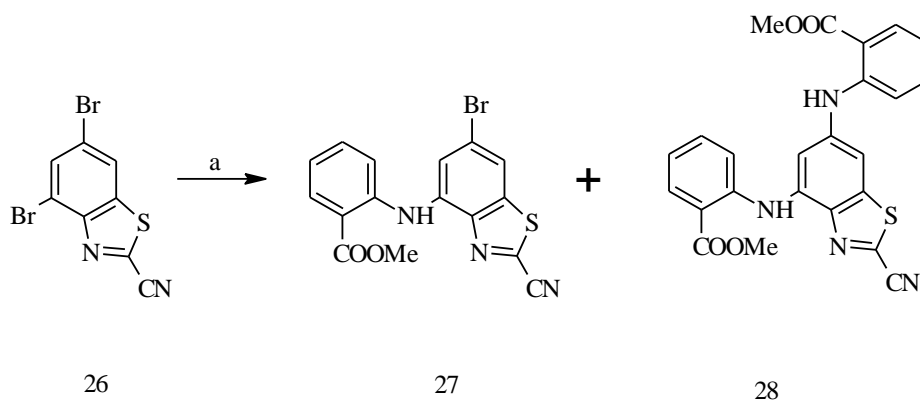
Σχήμα 2.22: Προτεινόμενος μηχανισμός παρασκευής θειαζολίου.

Στο φάσμα <sup>1</sup>H – NMR του θειαζολίου **26** είναι ξεκάθαρες οι δύο διπλές κορυφές με μέτα-σχάση στην περιοχή των αρωματικών που αντιστοιχούν στα πρωτόνια 5 και 7.



Εικόνα 2.10: Φάσμα  $^1\text{H}$  – NMR του 4,6-διβρωμο-1,3-βενζοθειαζολο-2-καρβονιτριλίου (**26**) σε  $\text{CDCl}_3$

Το επόμενο στάδιο της πορείας αφορά την επίδραση ανθρανιλικού μεθυλεστέρα επί του νιτριλίου **26** με συνθήκες αμίνωσης κατά Buchwald-Hartwig (Σχήμα 2.23).



Σχήμα 2.23: Προϊόντα με  $\text{Pd}(\text{dbA})_2$  και *xphos*.

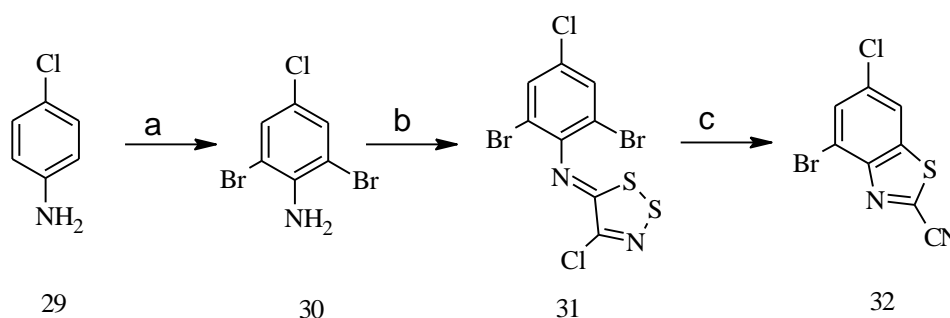
Η συγκεκριμένη αντίδραση δοκιμάστηκε με διάφορους καταλύτες παλλαδίου, προσδέματα (ligands) και βάσεις, όμως σε όλες τις δοκιμές παρελήφθη ως κύριο προϊόν το διϋποκατεστημένο παράγωγο **28** (Πίνακας 2.1) σε μίγμα με το επιθυμητό μονοϋποκατεστημένο παράγωγο **27** (Σχήμα 2.23). Βέλτιστες συνθήκες αποδείχτηκαν η χρήση  $\text{Pd}(\text{dbA})_2$  ως καταλύτη, *xphos* ως ligand και  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ , κατά τις οποίες το επιθυμητό παράγωγο **27** λαμβάνεται σε συνολική απόδοση της τάξεως του 20% και σε αναλογία 1/3 ως προς το διϋποκατεστημένο παράγωγο **28**.

Καταλύτης	Ligand	Βάση	Απόδοση	Αναλογία 27/28
Pd(dbA) <sub>2</sub>	xphos	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	20%	1/3
Pd(dbA) <sub>2</sub>	BINAP	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	10%	1/5
Pd(dbA) <sub>2</sub>	DPPF	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-	-
Pd(dbA) <sub>2</sub>	xphos	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	20%	1/3
Pd(dbA) <sub>2</sub>	xphos	LiHMDS	-	-
Pd(dbA) <sub>2</sub>	xphos	CsF	10%	1/5
Pd(Ph <sub>3</sub> P) <sub>4</sub>	-	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-	-

Πίνακας 2.1: Αποδόσεις της αντίδρασης με διάφορους καταλύτες παλλαδίου, ligands και βάσεις.

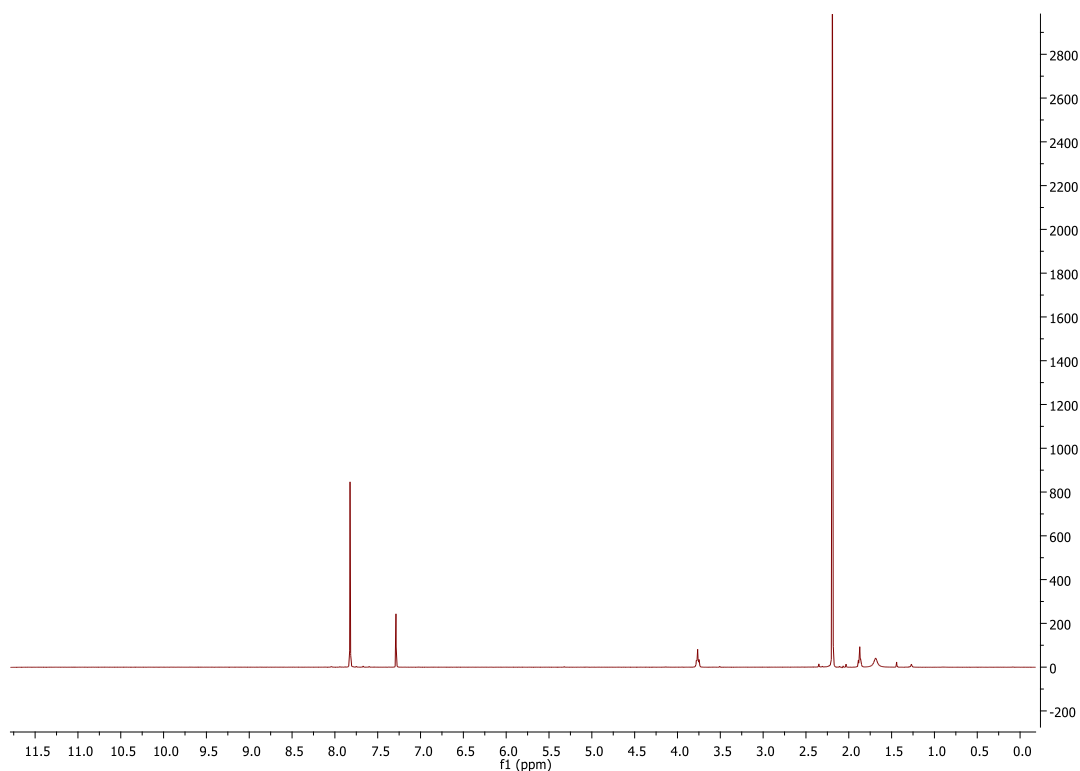
Γνωρίζοντας ότι σε αντιδράσεις αμίνωσης με χρήση καταλυτών παλλαδίου (Buchwald-Hartwig aminations) το βρώμιο είναι καλύτερη αποχωρούσα ομάδα σε σχέση με το χλώριο αποφασίστηκε να επαναληφθεί η παραπάνω πορεία με αντικατάσταση του βρωμίου στη θέση 6 του βενζοθειαζολίου **20** με άτομο χλωρίου, όπως φαίνεται στο σχήμα 2.24. Με τον τρόπο αυτό επιχειρείται να αυξηθεί η αναλογία του μονοϋποκατεστημένου παραγώγου σε σχέση με το διϋποκατεστημένο, παρότι είναι γνωστό ότι η αναγωγική αφαλογόνωση αρωματικών παραγώγων παρουσιάζει γενικά καλύτερες αποδόσεις σε βρωμοπαράγωγα σε σχέση με τα χλωροπαράγωγα.

Συνεπώς, από την 4-χλωροανιλίνη (**29**) με βρωμίωση παρελήφθη η 2,6-διβρωμο-4-χλωροανιλίνη (**30**) από την οποία με επίδραση άλατος του Appel και ενδομοριακή κύκλωση του ενδιάμεσου παραγώγου **31** λαμβάνεται το βενζοθειαζόλιο **32** (Σχήμα 2.24).<sup>136,138</sup>

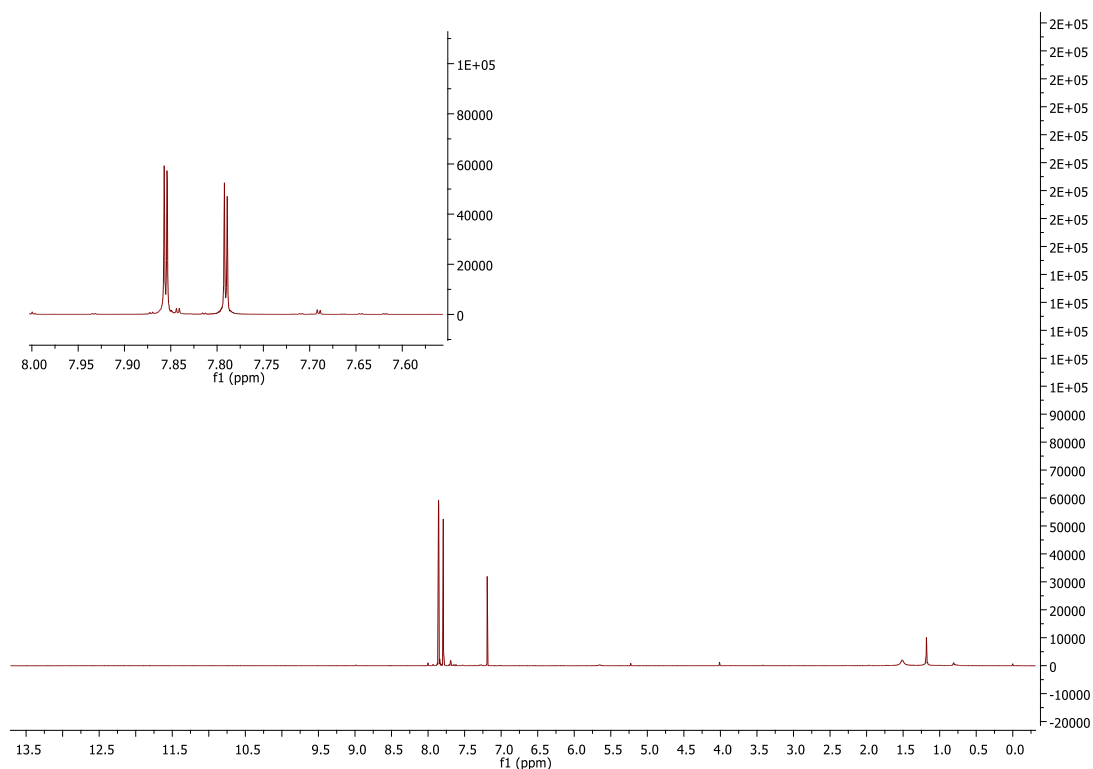


Σχήμα 2.24: a) NBS, AcOH, θ.π. b) άλας του Appel, πυριδίνη, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, θ.π. c) CuI, πυριδίνη, 120°C, MW

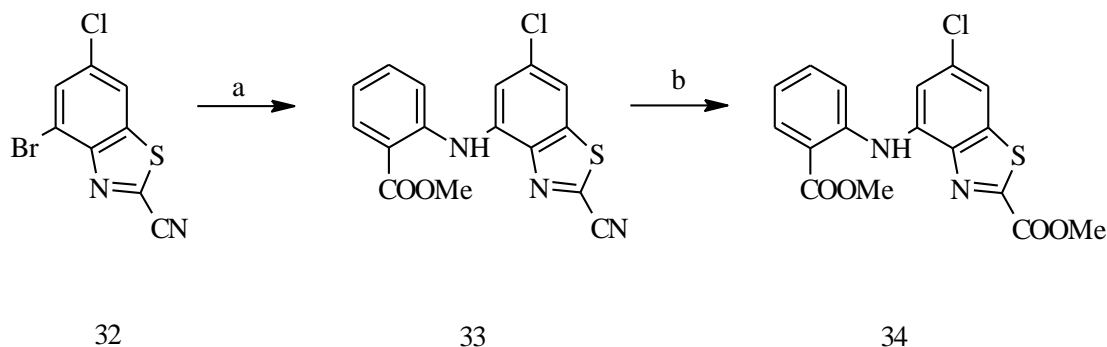
Στο φάσμα <sup>1</sup>H – NMR της ανιλίνης **30** (Εικόνα 2.11) παρατηρείται μόνο μια απλή κορυφή στα 7.8 ppm που αντιστοιχεί στα αρωματικά πρωτόνια H-3 και H-5, σε αντίθεση με το φάσμα <sup>1</sup>H – NMR του θειαζολίου **32** (Εικόνα 2.12) όπου πλέον παρατηρούνται δύο διπλές κορυφές με μικρή σύζευξη καθώς τα αρωματικά πρωτόνια H-5 και H-7 δεν είναι πλέον ισοδύναμα.



Εικόνα 2.11: Φάσμα  $^1\text{H}$  – NMR της 2,6-διβρωμο-4-χλωροανιλίνης (**30**) σε  $\text{CDCl}_3$ .



Εικόνα 2.12: Φάσμα  $^1\text{H}$  – NMR του 4-βρωμο-6-χλωρο-1,3-βενζοθειαζολο-2-καρβονιτριλίου (**32**) σε  $\text{CDCl}_3$ .



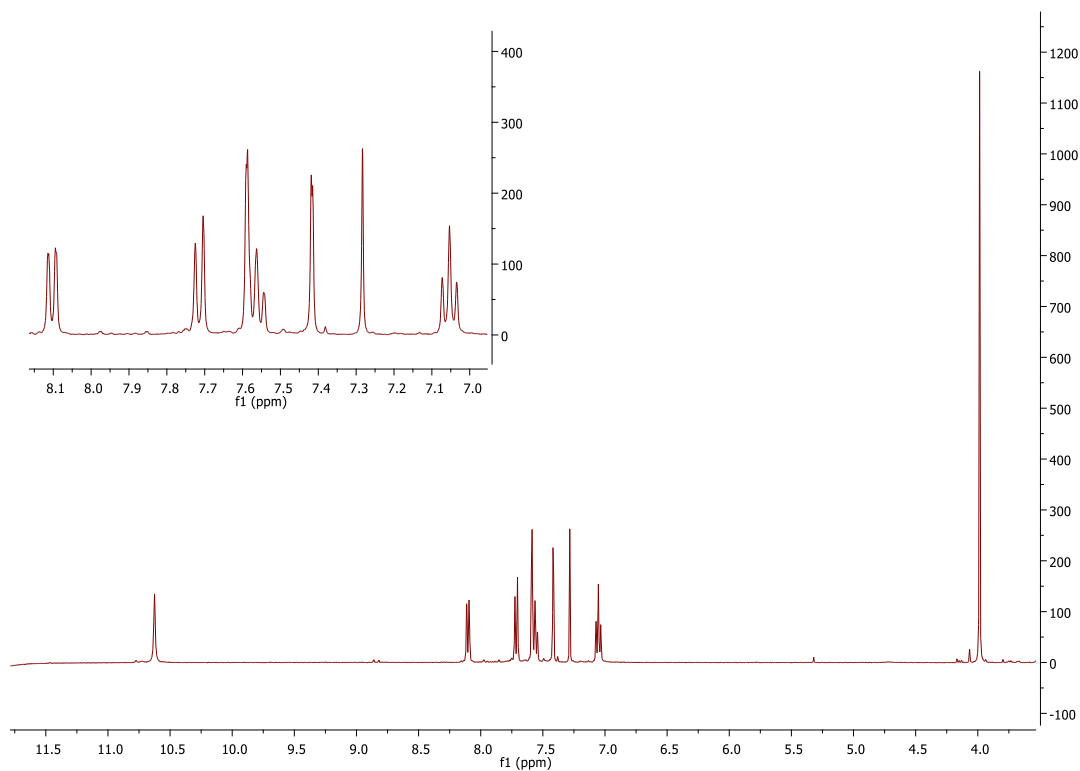
Σχήμα 2.25: a) ανθρανιλικός μεθυλεστέρας,  $Cs_2CO_3$ ,  $Pd(dbA)_2$ , *xphos*, τολουόλιο, βρασμός, b) i)  $MeONa$ ,  $THF$  ii)  $HCl$  20%, θ.π.

Εν συνεχεία, με αμίνωση κατά Buchwald-Hartwig και επίδραση ανθρανιλικού μεθυλεστέρα λαμβάνεται αποκλειστικά το μονοϋποκατεστημένο παράγωγο **33**.<sup>148</sup> Στο φάσμα  $^1H - NMR$  της ένωσης **33** (Εικόνα 2.13) φαίνεται η ύπαρξη πλέον 6 αρωματικών πρωτονίων, δύο απλών κορυφών, δύο διπλών και δύο τριπλών καθώς και η αμινομάδα στα 9.5 ppm καθώς επίσης και το μεθύλιο του εστέρα στα 3.9 ppm.

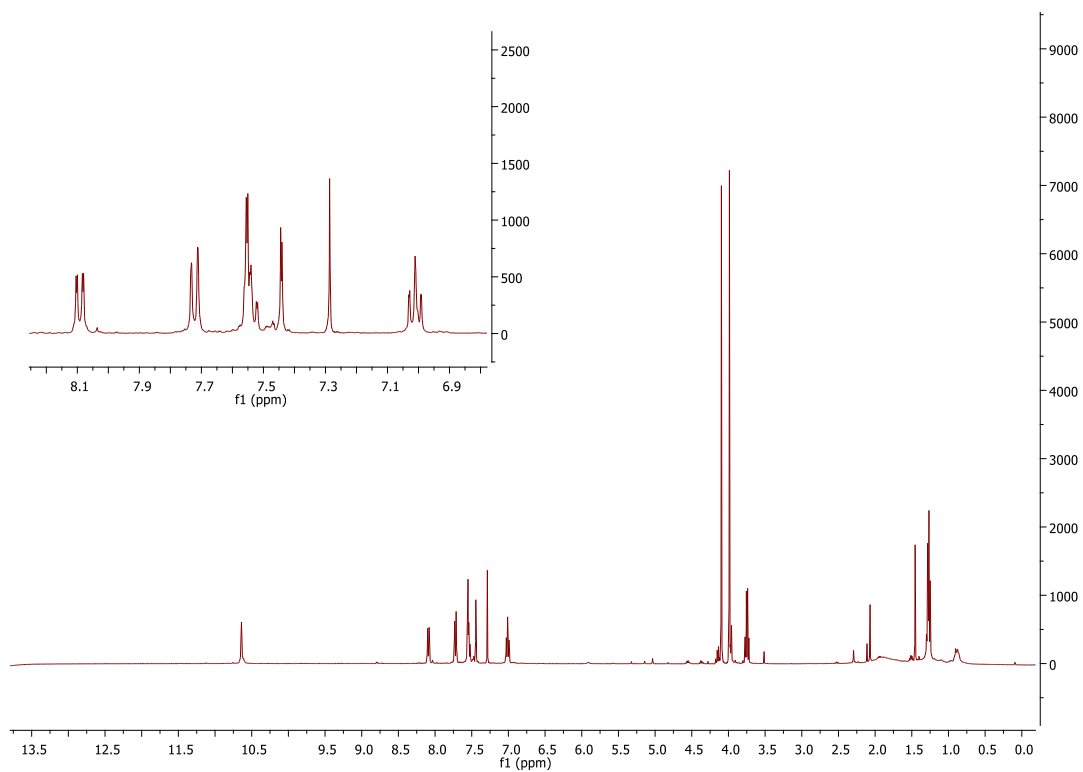
Αξίζει να αναφερθεί ότι η σύζευξη αυτή παρουσιάζει μια πολύ καλή απόδοση, της τάξεως του 90-95%, παρουσιάζει πολύ καλή επαναληψιμότητα και είναι εφικτή σε ποσότητες της τάξεως των γραμμαρίων. Επίσης, είναι ιδιαίτερα σημαντικό το γεγονός ότι πραγματοποιείται με την χρήση διαφόρων καταλυτών παλλαδίου χωρίς να επηρεάζεται ιδιαίτερα η συνολική της απόδοση.

Στην συνέχεια της συνθετικής πορείας θα πρέπει αφενός μεν να υδρολυθεί ο εστέρας, έτσι ώστε να είναι εφικτή η ενδομοριακή κύκλωση προς τον δακτύλιο της ακριδινόνης και αφετέρου να απομακρυνθεί με αναγωγική αφαιολόγηση το άτομο του χλωρίου. Επειδή η ομάδα του νιτριλίου είναι ιδιαίτερα ενεργοποιημένη και υδρολύεται εύκολα προς το αντίστοιχο οξύ ή το αντίστοιχο πρωτοταγές αμίδιο, ενώ ταυτόχρονα υπό αναγωγικές συνθήκες μετατρέπεται στην αντίστοιχη πρωτοταγή αμίνη θεωρήθηκε ότι πρώτα θα πρέπει να «καμουφλαριστεί» με τη μορφή εστέρα και στην συνέχεια να γίνει η αναγωγική αφαιολόγηση. Έτσι, με επίδραση μεθόξυ νατρίου επί του νιτριλίου **33** και κατεργασία του ενδιάμεσου ιμινοεστέρα με διάλυμα  $HCl$  20% λαμβάνεται ο διεστέρας **34** (Σχήμα 2.25). Στο φάσμα  $^1H - NMR$  του διεστέρα **34** παρατηρείται μία νέα απλή κορυφή, στα 4 ppm περίπου που αντιστοιχεί στο μεθύλιο του νέου εστέρα (Εικόνα 2.14).

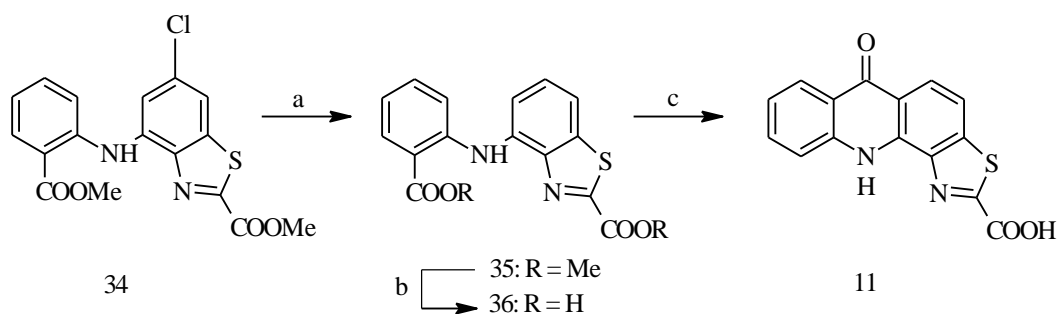




Εικόνα 2.13: Φάσμα  $^1\text{H}$  – NMR της ένωσης 33 σε  $\text{CDCl}_3$ .

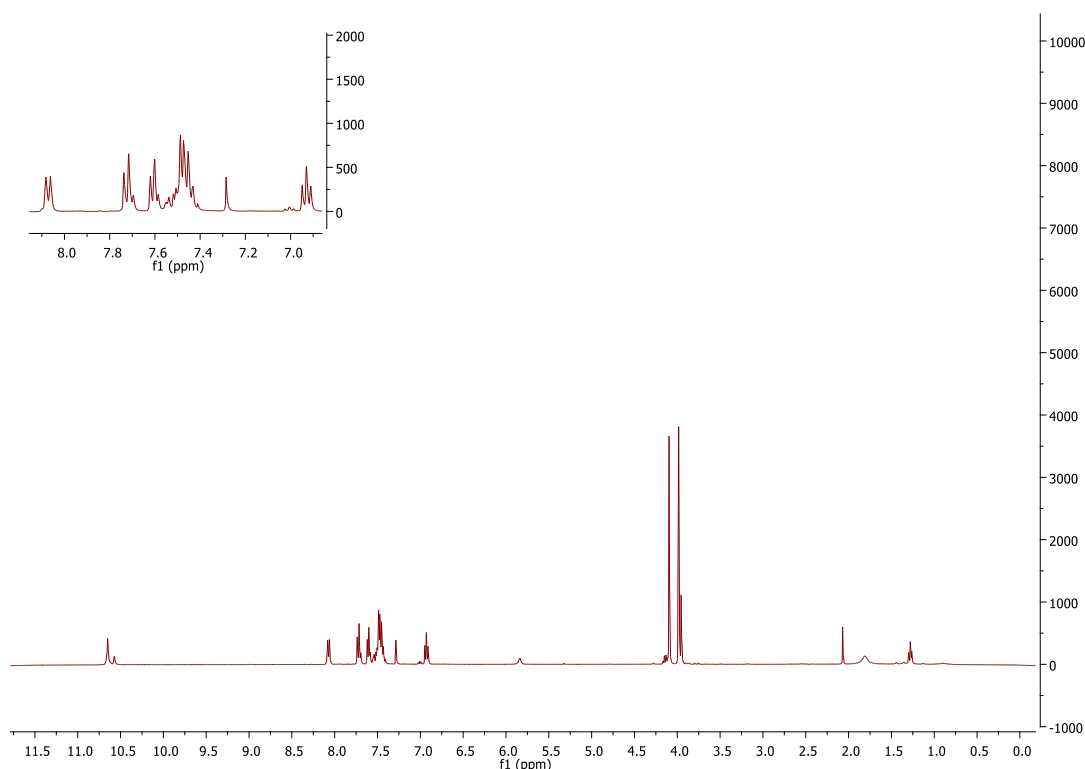


Εικόνα 2.14: Φάσμα  $^1\text{H}$  – NMR του διεστέρα 34 σε  $\text{CDCl}_3$ .



Σχήμα 2.26: a)  $\text{HCOONH}_4$ , Pd-C,  $\text{Et}_3\text{N}$ , MeOH/THF,  $105^\circ\text{C}$ , MW, b) KOH, THF, MeOH, βρασμός, c) PPA,  $100^\circ\text{C}$ .

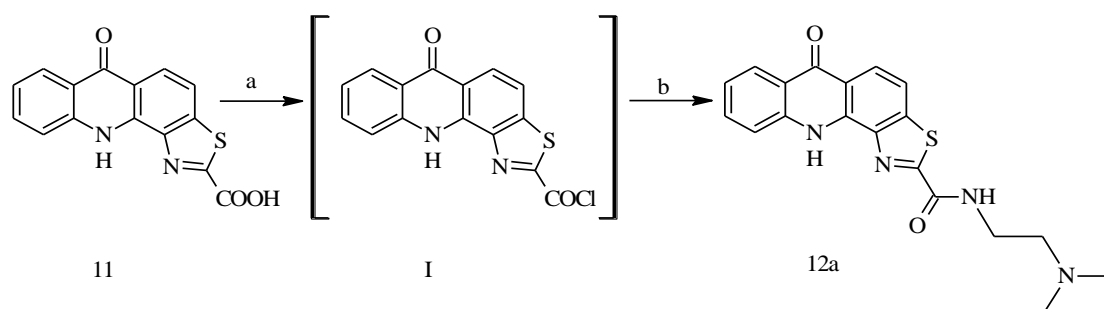
Η αφαλογώνωση, αρχικά, επιχειρήθηκε με κλασική υδρογόνωση, παρουσία καταλύτη Pd-C και βάσης  $\text{Et}_3\text{N}$ , σε θερμοκρασία δωματίου στα 50 psi χωρίς αποτέλεσμα, ενώ όταν η θερμοκρασία αυξήθηκε στους  $45^\circ\text{C}$  σχηματιζόταν προϊόν με πολύ αργό ρυθμό και η αντίδραση σταμάτησε στο 55% έπειτα από 3 ημέρες. Για να αυξηθεί η ταχύτητα της αντίδρασης επιστρατεύθηκε η συσκευή μικροκυμάτων και ως δότης υδρογόνου χρησιμοποιήθηκε μυρμιγκικό αμμώνιο σε μίγμα MeOH/THF στους  $105^\circ\text{C}$  με Pd-C και  $\text{Et}_3\text{N}$  σε 40 λεπτά.



Εικόνα 2.15: Φάσμα  $^1\text{H}$ -NMR του διεστέρα **35** σε  $\text{CDCl}_3$ .

Στο φάσμα  $^1\text{H}$ -NMR του διεστέρα **35** γίνεται αντιληπτή η εξαφάνιση των δύο μονών κορυφών που αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-5 και H-7 του βενζοθειαζολίου και η εμφάνιση στη θέση τους δύο διπλών και μιας τριπλής κορυφής των πρωτονίων H-5, H-7 και H-6 αντίστοιχα (Εικόνα 2.15)

Ακολουθώς, ο διεστέρας **35** υδρολύεται προς το διοξύ **36**, με υδατικό διάλυμα KOH σε THF, το οποίο υφιστάμενο ενδομοριακή κύκλωση εντός πολυφωσφορικού οξέος έδωσε τη θειαζολοακρινιδόνη **11** (Σχήμα 2.26). Η αντίδραση αυτή δοκιμάστηκε, αρχικά, να πραγματοποιηθεί και εντός μίγματος τριφθοροξικού οξέος/τριφθοροξικού ανυδρίτη χωρίς όμως επιτυχία. Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι ομάδες όπως καρβοξυλικό οξύ και νιτρίλιο στη θέση 2 θειαζολίου δεν είναι σταθερά και υπό ισχυρά όξινες συνθήκες παρουσία νερού αποκαρβοξυλιώνονται. Για το λόγο η ανωτέρω κύκλωση πραγματοποιήθηκε εν θερμώ εντός PPA, ενός σχετικά ήπιου οξέος, και όχι εντός πυκνού H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ενός πολύ ισχυρού οξέος γνωστού για την χρήση του σε αντιδράσεις αποκαρβοξυλίωσης.



Σχήμα 2.27: a)  $(COCl)_2$ , DMF,  $CH_2Cl_2$ ,  $0^\circ C$  σε θ.π.: b) *N,N*-διμεθυλαμινοαιθυλαμίνη, θ.π.

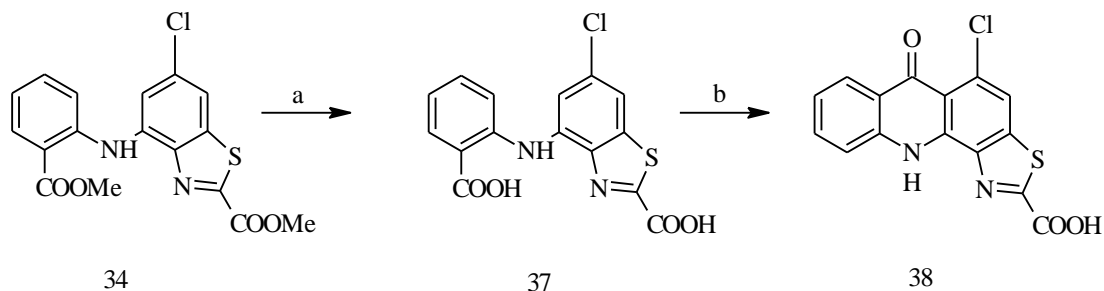
Η τελική σύνθεση του αμιδίου **12a** έγινε από το οξύ **11** (Σχήμα 2.27) με τον τρόπο που έχει αναφερθεί παραπάνω με οξάλυλο διχλωρίδιο και την κατάλληλη αμίνη (Σχήμα 2.13).

Συγκρίνοντας τους δύο τρόπους σύνθεσης των αμιδίων είναι φανερό ότι ο δεύτερος τρόπος που αναπτύχθηκε υπερτερεί σημαντικά έναντι του πρώτου καθώς ενώ αποτελείται από ένα επιπλέον στάδιο σε σχέση με τον πρώτο, η συνολική του απόδοση ανεβαίνει από το 4% στο 26%. Αυτό οφείλεται κυρίως στην αντίδραση σχηματισμού του θειαζολικού πυρήνα η οποία εκτοξεύεται από το 15% στο 80%, και δευτερευόντως στην αύξηση της απόδοσης και των υπολοίπων σταδίων. Ο νέα συνθετική πορεία που αναπτύχθηκε υπερτερεί σε σχέση με την αρχική στα εξής:

1. Συνολική απόδοση η οποία αυξήθηκε κατακόρυφα
2. Κατεργασία του κάθε σταδίου ξεχωριστά καθώς στα περισσότερα στάδια για τον καθαρισμό του προϊόντος αρκεί μόνο ανακρυστάλλωση
3. Δυνατότητα να πραγματοποιηθούν οι αντιδράσεις σε μεγάλες ποσότητες
4. Δυνατότητα μελλοντικής εισαγωγής ποικιλίας υποκαταστατών στη θέση 5 του τελικού σκελετού για εξαγωγή συμπερασμάτων σχέσεων δομής - δράσης.

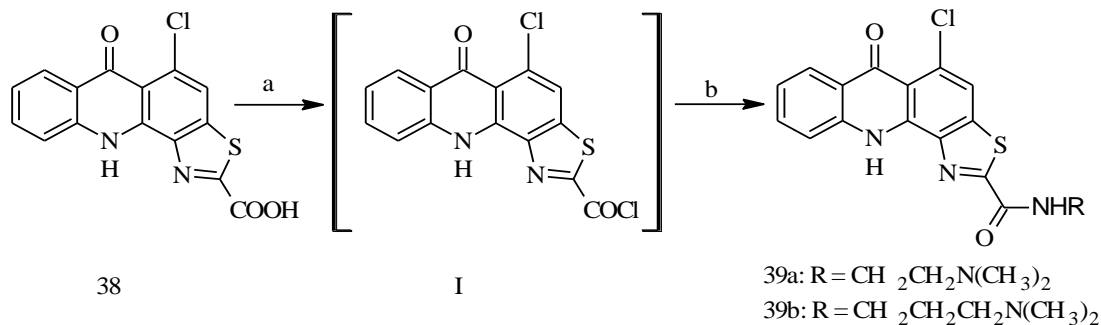
## Σύνθεση παραγώγων με σκελετό θειαζολοακριδινόνης με χλώριο στη θέση 5

Το δομικό ενδιάμεσο για τη παρασκευή των παραγώγων της κατηγορίας V (Σχήμα 1.18) είναι το 6-οξο-5-χλωρο-6,11-διϋδροθειαζολο[5,4-c]ακριδινο-2-καρβοξυλικό οξύ το οποίο θα μπορούσε να παρασκευαστεί από τον διεστέρα **34**.



Σχήμα 2.28: a) KOH, THF, MeOH, θ.π. b) PPA, 100°C.

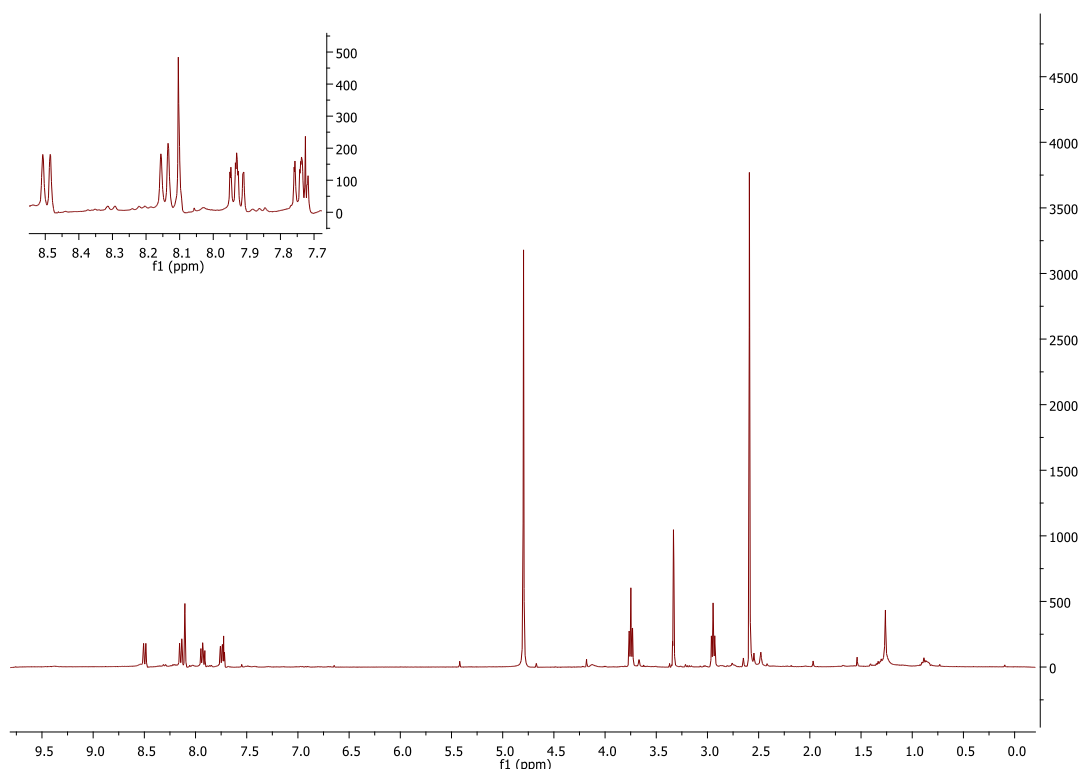
Αρχικά έγινε υδρόλυση του διεστέρα **34** προς το διοξύ **37** με διάλυμα καυστικού καλίου και στη συνέχεια ενδομοριακή κύκλωση με PPA για το σχηματισμό της ακριδινόνης **38** (Σχήμα 2.28), ο τρόπος δηλαδή που ακολουθήθηκε και για την παρασκευή του οξέος **11** με κατά τη βελτιωμένη συνθετική πορεία (Σχήμα 2.26).



Σχήμα 2.29: a) (COCl)<sub>2</sub>, DMF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C σε θ.π. b) κατάλληλη αμίνη, θ.π.

Τα τελικά επιθυμητά αμίδια παρασκευάστηκαν με ανάλογο τρόπο με τα αμίδια **12a** και **12b**. Έτσι, με επίδραση οξαλλοχλωριδίου παρουσία καταλυτικής ποσότητας διμεθυλοφορμαμίδιου παρασκευάζεται το ενδιάμεσο ασταθές χλωρίδιο I από το οποίο με επίδραση της κατάλληλης αμίνης συντίθενται τα επιθυμητά αμίδια **39a** και **39b** (Σχήμα 2.30).

Παρακάτω στο φάσμα <sup>1</sup>H – NMR του **39a** παρατηρούνται τα 5 αρωματικά πρωτόνια του σκελετού καθώς επίσης και τα αλειφατικά πρωτόνια της πλευρικής αλυσίδας στα 3.6, 2.9 και 2.6 ppm (Εικόνα 2.16).



Εικόνα 2.16: Φάσμα  $^1\text{H}$  – NMR του καρβοξαμιδίου **39a** σε  $\text{CDCl}_3$ .

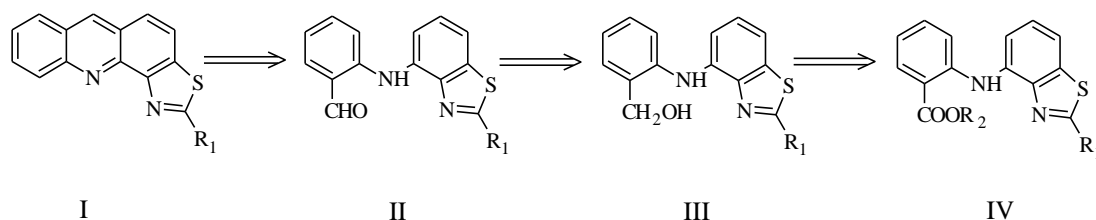
Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι οι πειραματικές παρατηρήσεις όσον αφορά την διαλυτότητα των νέων ενώσεων συμφωνούν με τα βιβλιογραφικά δεδομένα ανάλογων ενώσεων. Πράγματι, οι θειαζολοακριδινόνες που φέρουν υποκαταστάτη χλωρίου παρουσιάζουν αρκετά καλύτερη διαλυτότητα σε σχέση με τα αντίστοιχα παράγωγα που δεν φέρουν τον υποκαταστάτη χλωρίου. Οι παρατηρήσεις αυτές συμφωνούν και με τις υπολογιστικές τιμές  $\text{pK}_a$  που έχουν παρουσιαστεί στον σχεδιασμό των νέων ενώσεων και φαίνονται ενδεικτικά στο σχήμα 1.18.

## Σύνθεση παραγώγων με σκελετό θειαζολοακριδίνης

Θεωρητικά, τα παράγωγα των κατηγοριών III και IV (Σχήμα 1.17) που φέρουν τον σκελετό της ακριδίνης θα μπορούσαν να συντεθούν από τα παράγωγα του γενικού τύπου I και II (Σχήμα 1.17). Ο τρόπος αυτός προϋποθέτει συνήθως την αναγωγή του καρβονυλίου της ακριδινόνης και στη συνέχεια την οξείδωση προς το αντίστοιχο παράγωγο της ακριδίνης. Η μέθοδος αυτή εκτός του ότι βιβλιογραφικά παρουσιάζει μειωμένες αποδόσεις ταυτόχρονα προϋποθέτει την εκλεκτική αναγωγή του ακριδινικού καρβονυλίου παρουσία άλλων αναγόμενων ομάδων όπως του αμιδίου. Πρέπει, επίσης, να αναφερθεί ότι ακόμα και ο σκελετός του θειαζολίου υπό συγκεκριμένες προϋποθέσεις ανάγεται.

Με βάση λοιπόν τα προαναφερθέντα θεωρήθηκε ότι η σύνθεση των παραγώγων της κατηγορίας III και IV (Σχήμα 1.17) μπορεί να γίνει με πορεία

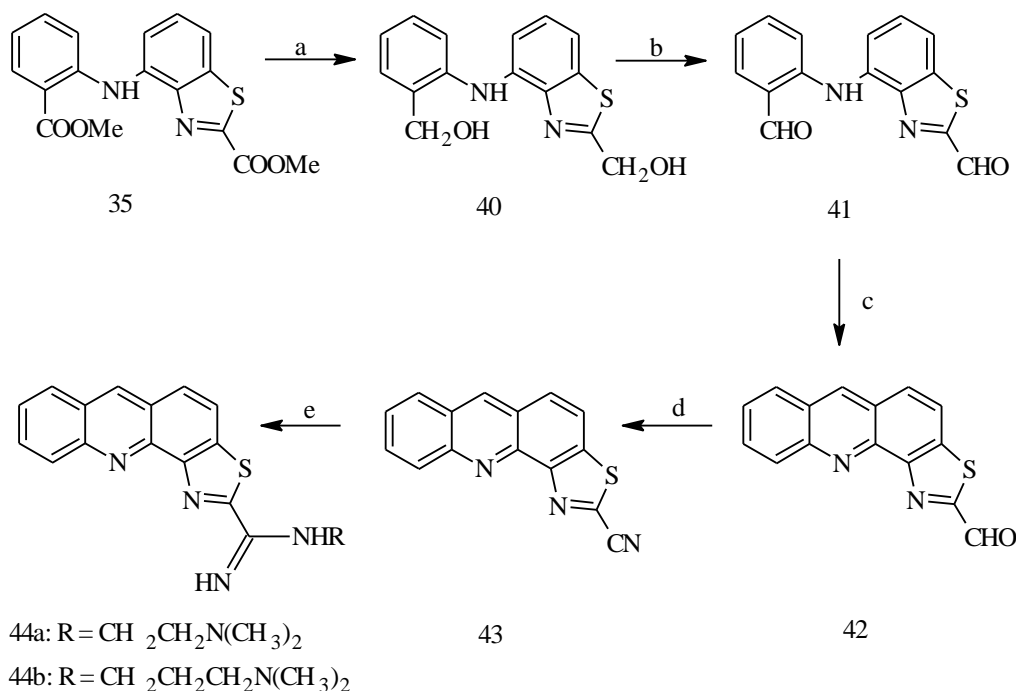
ανάλογη αυτών της I και II (Σχήμα 1.17), δηλαδή μέσω ενδομοριακής κύκλωσης ενός μορίου που φέρει την κατάλληλη ομάδα. Οι ακριδίνες προέρχονται με αυτόν τον τρόπο από τις αντίστοιχες αλδεύδες έπειτα από κατεργασία σε όξινες συνθήκες.



Σχήμα 2.30: Πετροσυνθετική πορεία σύνθεσης παραγώγων κατηγορίας II.

Η παραλαβή της αλδεύδης II από την οποία θα προκύψει η ακριδίνη I μπορεί να πραγματοποιηθεί με οξείδωση της αντίστοιχης αλκοόλης III. Αυτή με τη σειρά της είναι δυνατό να παραλφθεί από αναγωγή μιας καρβοξυλικής ομάδας, του παραγώγου IV, είτε εστέρα, είτε οξέος (Σχήμα 2.30).

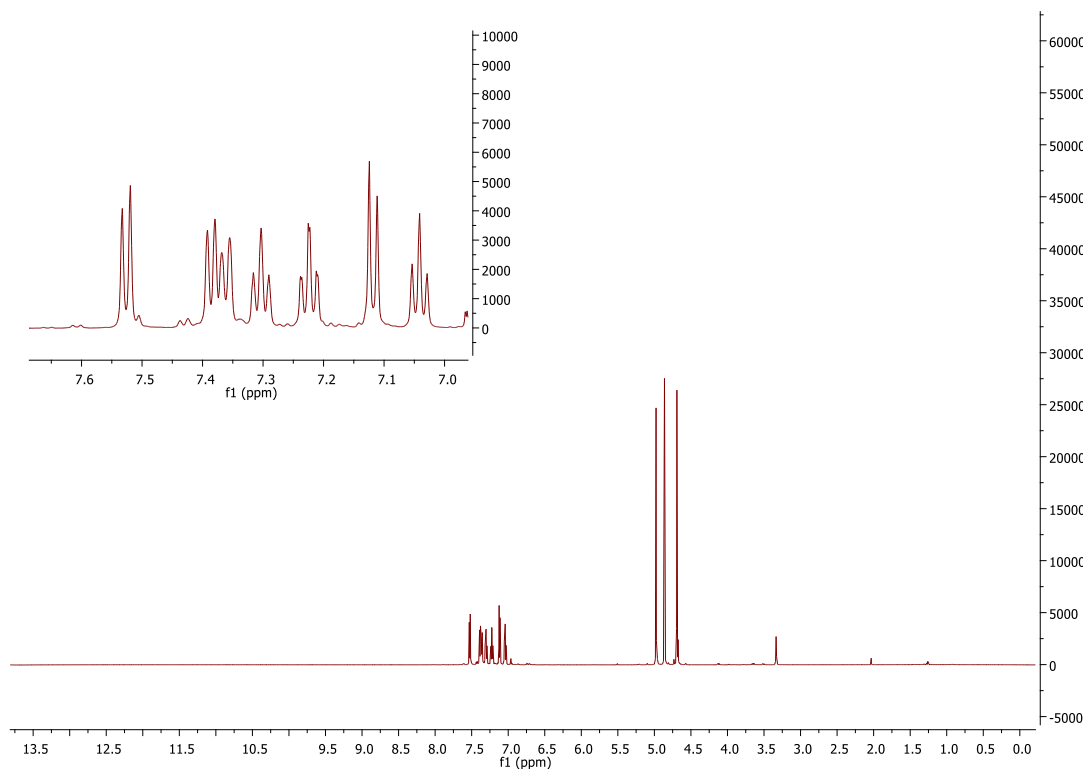
Η αναγωγή καρβοξυλικών οξέων προς αλκοόλες πραγματοποιείται συνήθως με χρήση ισχυρών αναγωγικών, όπως  $\text{LiAlH}_4$ , παρουσία των οποίων, όμως, υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα ότι υπάρχει πιθανότητα διάνοιξης και αποθείωσης του θειαζολικού δακτυλίου. Αντίστοιχα, η αναγωγή εστέρων προς αλκοόλες μπορεί να γίνει σε με πιο ήπια αναγωγικά μέσα, όπως  $\text{NaBH}_4$ , τα οποία δεν επηρεάζουν τον θειαζολικό δακτύλιο.<sup>147</sup> Κατάλληλη εστερική ομάδα που μπορεί να υποστεί αναγωγή υπάρχει στο παράγωγο **35** από το οποίο μπορεί να γίνει και η σχετική σύνθεση (Σχήμα 2.31).



Σχήμα 2.31: a)  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{MeOH}$ ,  $\text{THF}$ , βρασμός b)  $\text{PCC}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , θ.π. c)  $\text{CF}_3\text{COOH}$ , θ.π. d)  $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$ ,  $\text{NaN}_3$ ,  $\text{MeCN}$ , θ.π. e) κατάλληλη αμίνη,  $110^\circ\text{C}$ .

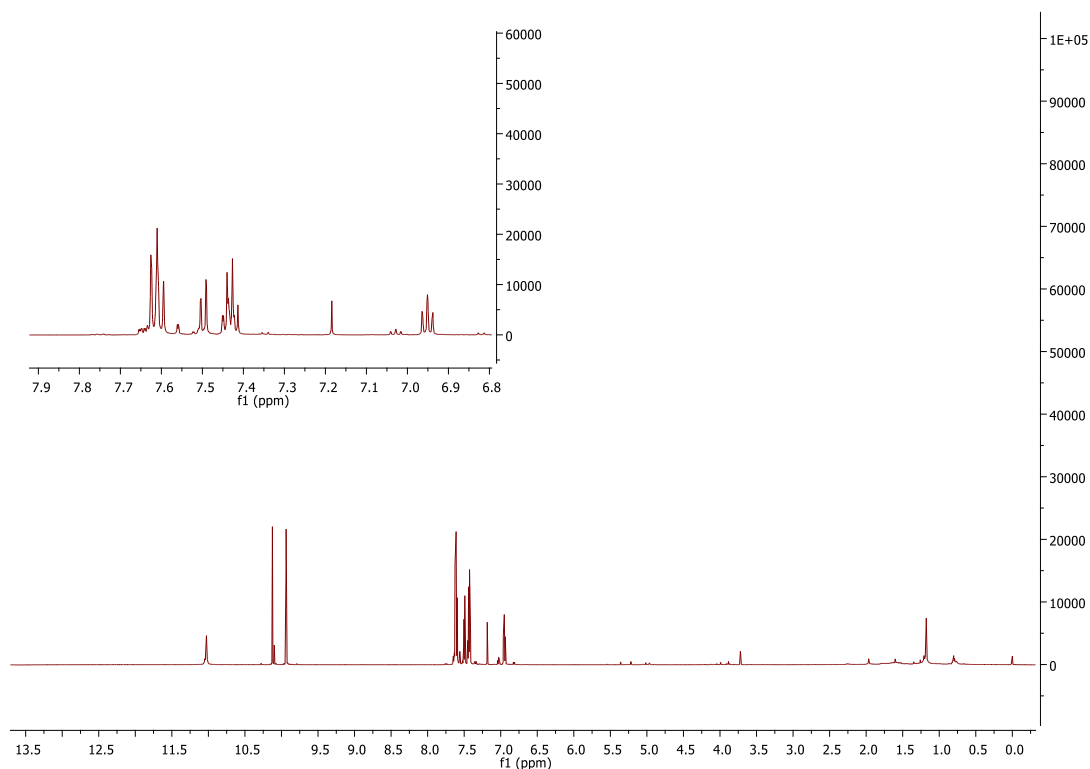
Από τον διεστέρα **34** με αναγωγή χρησιμοποιώντας  $\text{NaBH}_4$  σε THF και προσθήκη στάγδην μεθανόλης<sup>148</sup> παρελήφθη η διαλκοόλη **40**, από την οποία με οξείδωση με  $\text{PCC}$ <sup>149</sup> σχηματίστηκε η διαλδεΰδη **41** (Σχήμα 2.31).

Στο φάσμα  $^1\text{H}$  – NMR του **40** είναι ξεκάθαρη η ύπαρξη δύο μεθυλενίων που βρίσκονται μεταξύ αρωματικού πυρήνα και υδροξυλίου στα 5 και 5,2 ppm (Εικόνα 2.17).



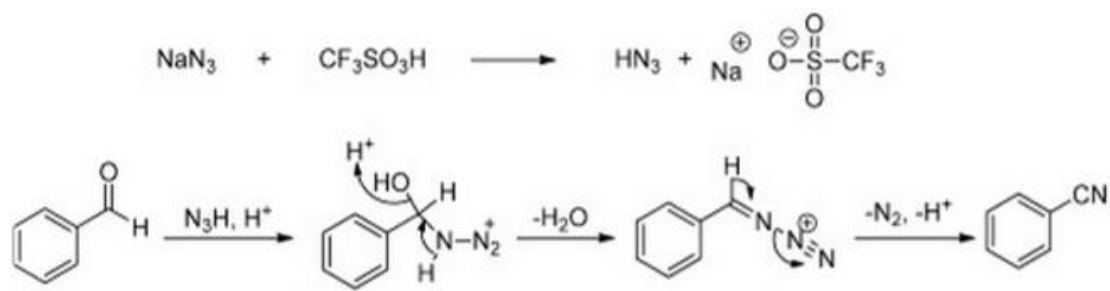
Εικόνα 2.17: Φάσμα  $^1\text{H}$  – NMR της διαλκοόλης **40** σε  $\text{MeOD-d}_4$ .

Αντίθετα, σε αυτό της αλδεΰδης **41** οι δύο απλές αυτές κορυφές εξαφανίζονται από την οξείδωσή τους και εμφανίζονται δύο κορυφές στα 10 και 11 ppm που αντιστοιχούν στα πρωτόνια της κάθε αλδεΰδης (Εικόνα 2.18).



Εικόνα 2.18: Φάσμα  $^1\text{H}$  – NMR της αλδεΐδης **41** σε  $\text{CDCl}_3$ .

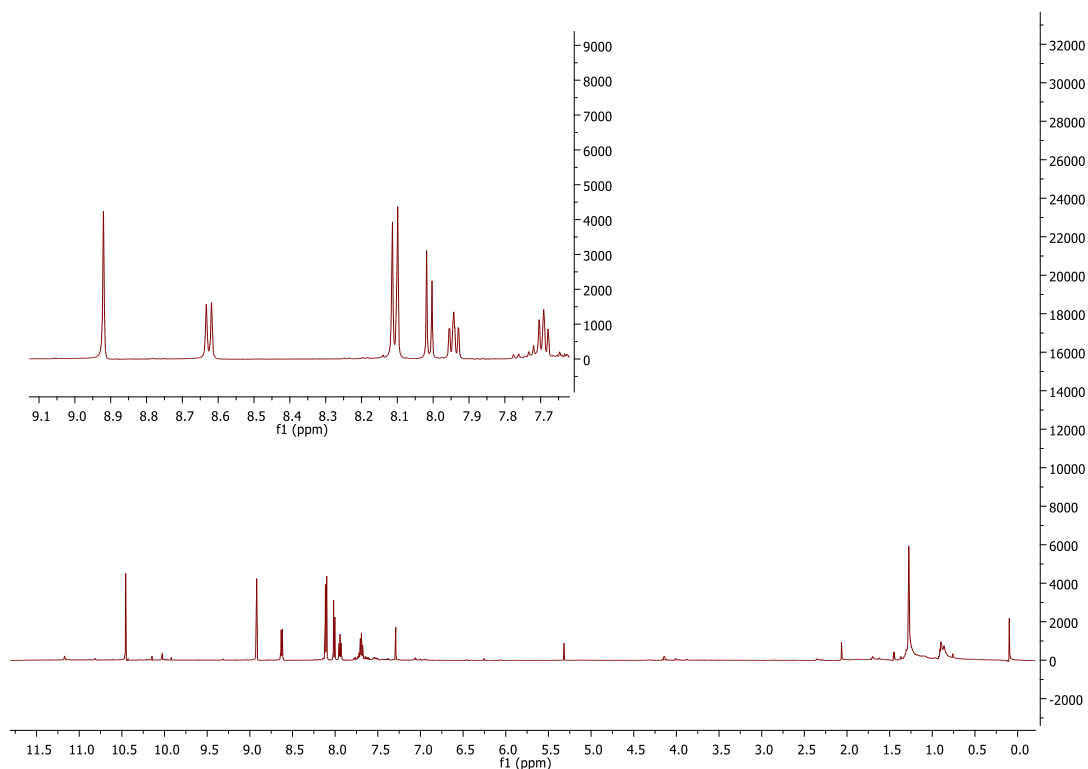
Στη συνέχεια, από την διαλδεΐδη **41** με ενδομοριακή κύκλωση παρουσία τριφθοροξικού οξέος σε θερμοκρασία δωματίου λαμβάνεται η αλδεΐδη **42**,<sup>127</sup> από την οποία με επίδραση νατραζιδίου και τριφθορομεθανοσουλφονικού οξέος λαμβάνεται το νιτρίλιο **43** ιο (Σχήμα 2.31).<sup>150</sup> Ο προτεινόμενος μηχανισμός της αντίδρασης, που είναι μια παραλλαγή της αντίδρασης Schmidt, φαίνεται στο παρακάτω σχήμα 2.32.



Σχήμα 2.32: Προτεινόμενος μηχανισμός της αντίδρασης μετασχηματισμού της αλδεΐδης σε νιτρίλιο.

Το τριφθορομεθανοσουλφονικό οξύ απελευθερώνει  $\text{HN}_3$ , το οποίο κάνει πυρηνόφιλη προσβολή στον άνθρακα της αρωματικής αλδεΐδης και το παραγόμενο μόριο μετά από αφυδάτωση και αποβολή αέριου αζώτου μετατρέπεται στο νιτρίλιο<sup>150</sup> (Σχήμα 2.32).

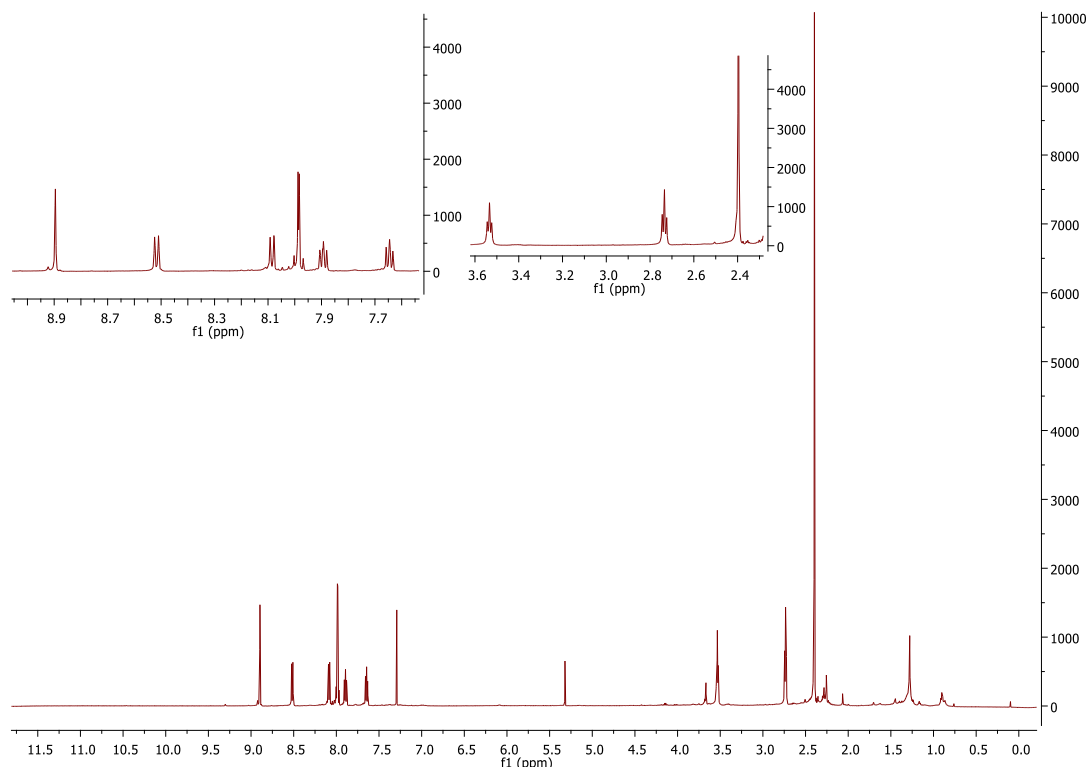




Εικόνα 2.19: Φάσμα  $^1\text{H}$  – NMR της ακρινίνης **42** σε  $\text{CDCl}_3$ .

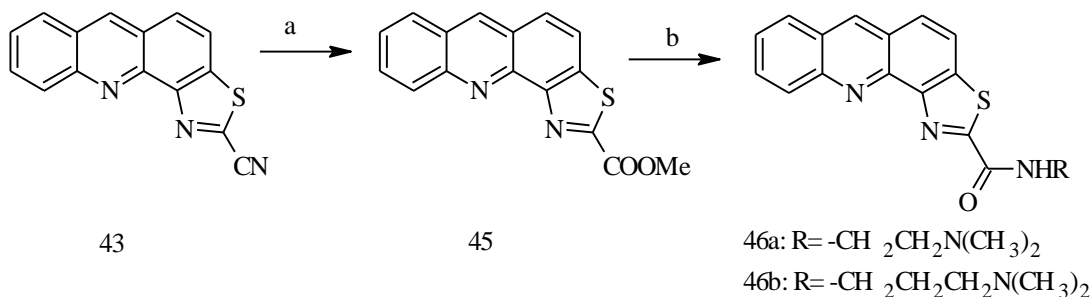
Όπως φαίνεται στο παραπάνω φάσμα  $^1\text{H}$  – NMR εξαφανίζεται μία κορυφή από την αρωματική περιοχή καθώς επίσης και μία από τις δύο αλδεϋδες, το οποίο συνηγορεί στην επιτυχία της ενδομοριακής κύκλωσης προς την ακρινίνη **42** (Εικόνα 2.19).

Με προσθήκη του νιτριλίου **43** σε διάλυμα της εκάστοτε αμίνης και θέρμανση στους  $110^\circ\text{C}$  παράγονται οι αμιδίνες **44a-b** (Σχήμα 2.31), όπως έγινε και με τα αντίστοιχα μόρια με σκελετό ακρινινόνης. Ενδεικτικά, στο φάσμα  $^1\text{H}$  – NMR της αμιδίνης **44a** φαίνεται η ύπαρξη των αλειφατικών πρωτονίων της αλυσίδας στα 3.6, 3.0 και 2.4 ppm (Εικόνα 2.20).



Εικόνα 2.20: Φάσμα  $^1\text{H}$  – NMR της αμιδίνης **44a** σε  $\text{CDCl}_3$ .

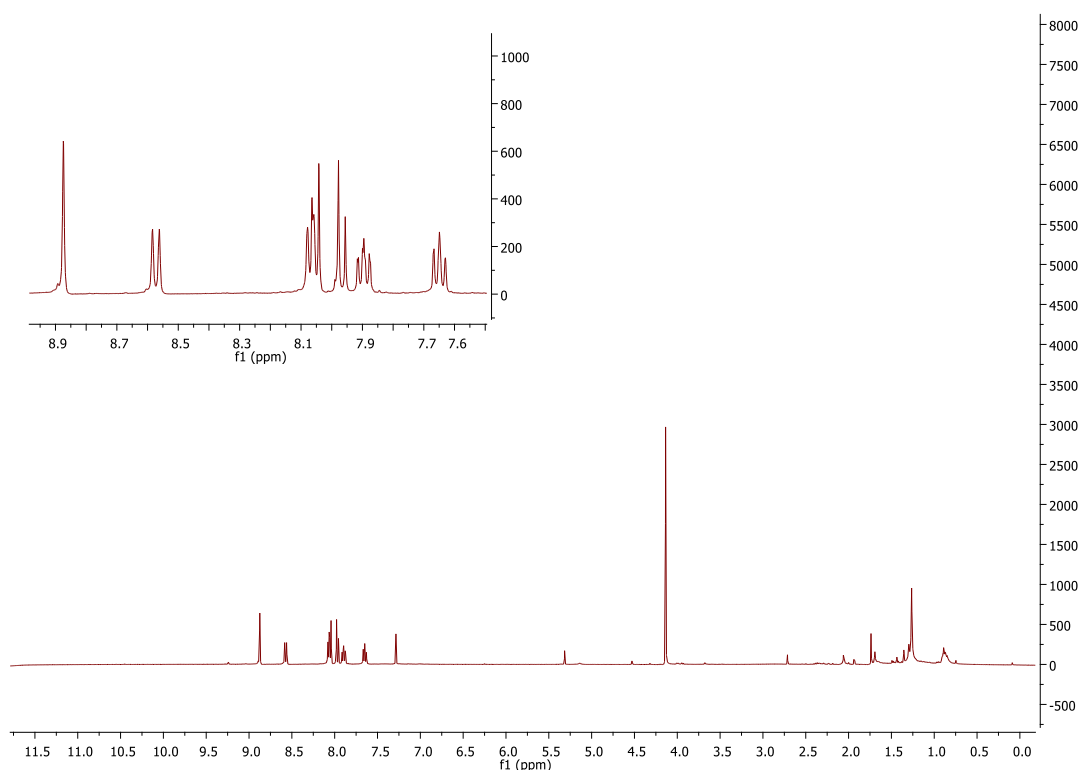
Το επόμενο στάδιο της συνθετικής πορείας αφορά στη σύνθεση των αντίστοιχων αμιδίων για το σχηματισμό των οποίων δε δοκιμάστηκε η απευθείας υδρόλυση των αμιδινών καθώς στα μόρια της κατηγορίας I αυτή δεν ήταν εφικτή. Οπότε είναι απαραίτητη η οξείδωση της αλδεΐδης στη θέση 2 της θειαζολοακρινίνης (παράγωγο **42**) προς το αντίστοιχο οξύ για να γίνει η αμιδοποίηση με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για την σύνθεση των αμιδίων που φέρουν τον σκελετό της ακρινίνης. Η οξείδωση αυτή επιχειρήθηκε με πολλούς τρόπους όπως με οξείδωση Jones, με Oxone σε διαλύτη DMF<sup>151</sup> και με  $\text{KMnO}_4$  προσροφημένο ή όχι σε διοξείδιο του πυριτίου ( $\text{SiO}_2$ ) αλλά μόνο στην πρώτη περίπτωση παρελήφθη το προϊόν και σε απόδοση ιδιαίτερα χαμηλή.



Σχήμα 2.33: a) αέριο  $\text{HCl}$ ,  $\text{MeOH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\theta.π.$  b) κατάλληλη αμίνη,  $\text{MeOH}$ ,  $105^\circ\text{C}$ , MW.

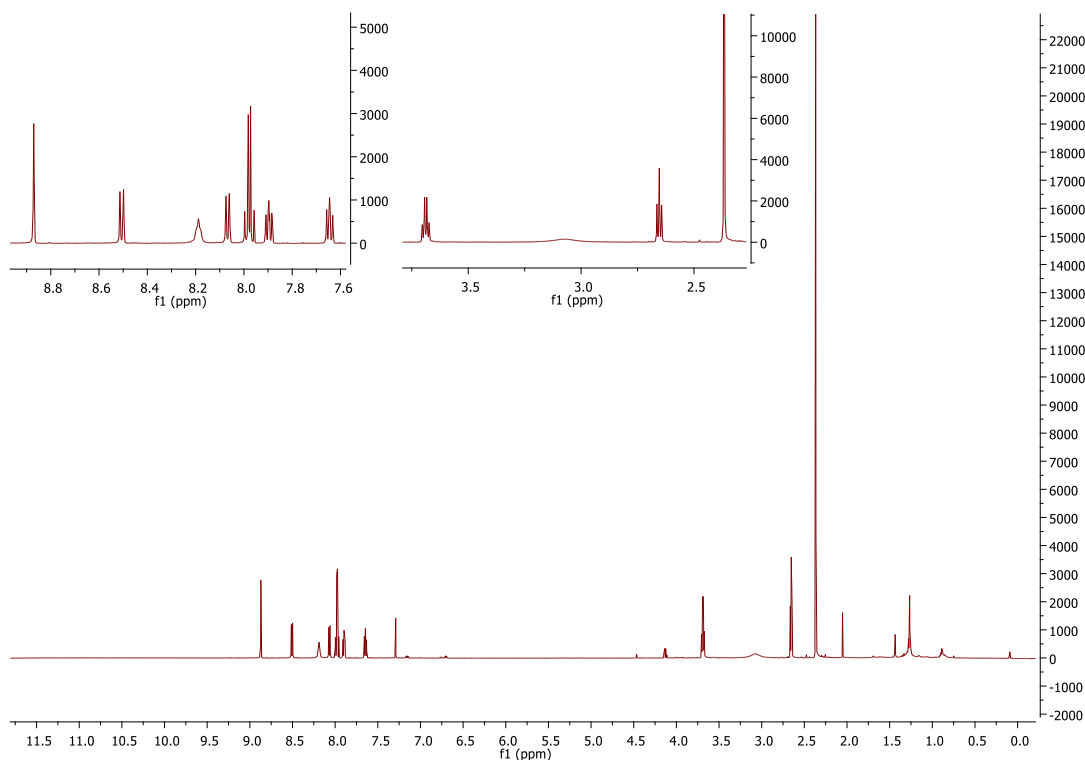
Για τον λόγο αυτό αποφασίστηκε η σύνθεση του επιθυμητού οξέος να γίνει μέσω της υδρόλυσης του νιτριλίου **43** οπότε και ακολουθήθηκε μια εναλλακτική

πορεία με την παρασκευή του μεθυλεστέρα **45** με τον προαναφερθέντα τρόπο με κορεσμένο διάλυμα MeOH με αέριο HCl. Στη συνέχεια, η αμιδοποίηση δεν έγινε όπως στην περίπτωση των αμιδίων της κατηγορίας I, μέσω του ενδιάμεσου χλωριδίου, με οξάλυλο διχλωρίδιο και DMF σε CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> και προσθήκη της κατάλληλης αμίνης, αλλά με απευθείας πυρηνόφιλη προσβολή της αμίνης επί του μεθυλεστέρα σε συσκευή μικροκυμάτων προς τον σχηματισμό των αμιδίων **46a-b** (Σχήμα 2.33).



Εικόνα 2.21: Φάσμα <sup>1</sup>H – NMR της θειαζολοακρινίνης **45** σε CDCl<sub>3</sub>.

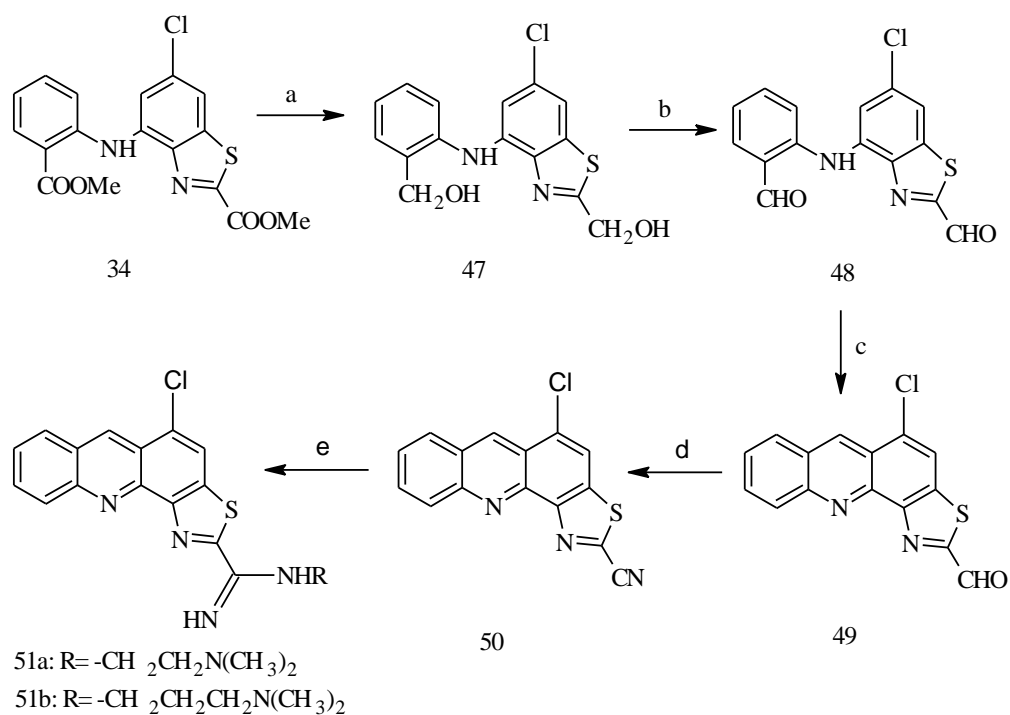
Στο φάσμα <sup>1</sup>H – NMR του παραγώγου **45** φαίνεται η ύπαρξη ενός μεθυλεστέρα στα 4.3 ppm (Εικόνα 2.25), ενώ σε αυτό του **46a** τα πρωτόνια της αλειφατικής αλυσίδας (Εικόνα 2.26).



Εικόνα 2.22: Φάσμα  $^1\text{H}$  – NMR του αμιδίου **46a** σε  $\text{CDCl}_3$ .

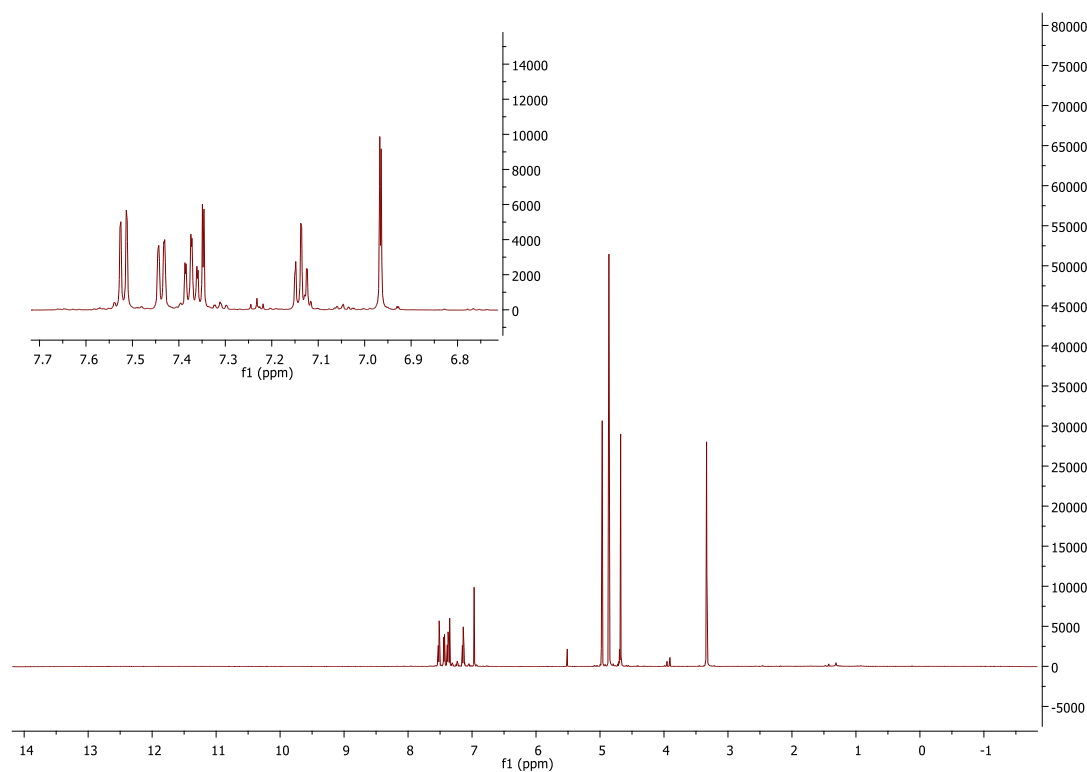
## Σύνθεση αμιδινών με σκελετό θειαζολοακριδίνης και χλώριο στη θέση 5

Για τα μόρια γενικής κατηγορίας IV (Σχήμα 1.18) ακολουθήθηκε η ίδια πορεία όπως περιγράφηκε προηγουμένως μέχρι το σχηματισμό των αμιδινών **51a-b** (Σχήμα 2.34). Δηλαδή, αναγωγή των εστέρων με  $\text{NaBH}_4$ , οξείδωση των αλκοολών με PCC και ενδομοριακή κύκλωσή τους προς την ακριδίνη **49**. Στη συνέχεια, μετατροπή της καρβοξυαλδεΐδης σε νιτρίλιο, με  $\text{NaN}_3$  και τριφθορομεθανοσουλφονικό οξύ, και πυρηνόφιλη προσβολή σε αυτό από την κατάλληλη αμίνη.



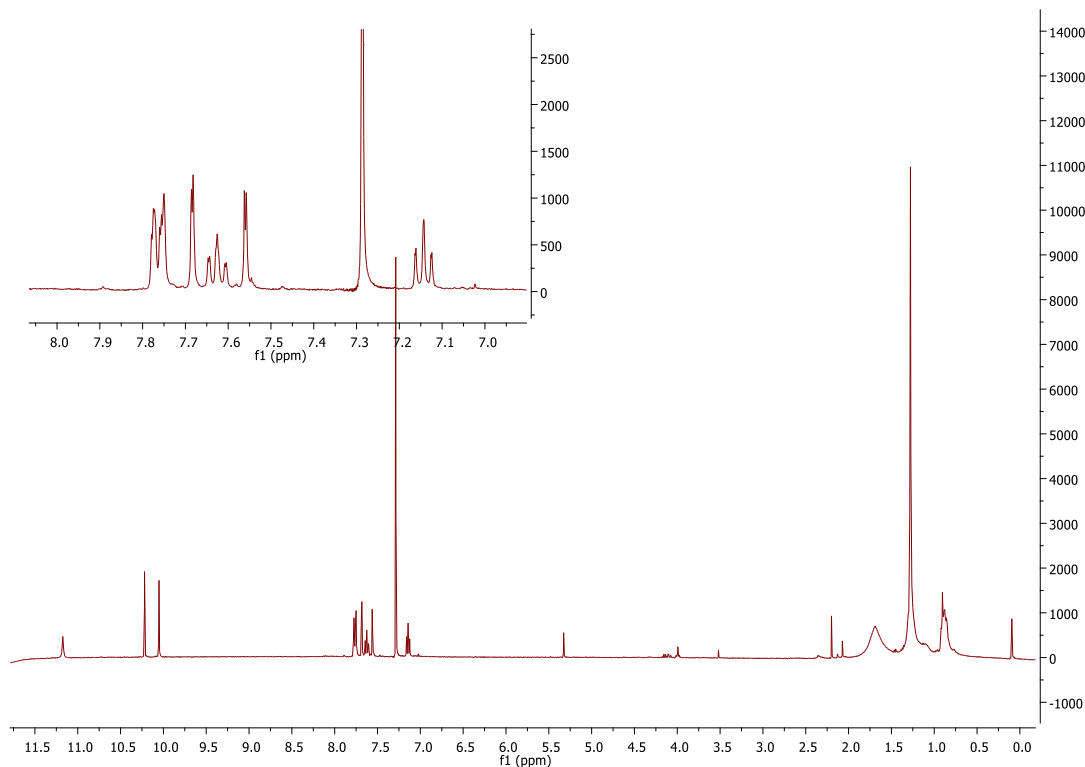
Σχήμα 2.34: a) NaBH<sub>4</sub>, MeOH, THF, βρασμός b) PCC, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, θ.π. c) CF<sub>3</sub>COOH, θ.π. d) CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H, NaN<sub>3</sub>, MeCN, θ.π.: e) κατάλληλη αμίνη, 110°C.

Στο φάσμα <sup>1</sup>H – NMR της αλκοόλης **47** τα πρωτόνια των δύο εστέρων αντικαθίστανται από δύο βενζυλικά μεθυλένια που συντονίζονται στα 4.4 και 4.9 ppm (Εικόνα 2.23) και δηλώνουν την επιτυχημένη αναγωγή



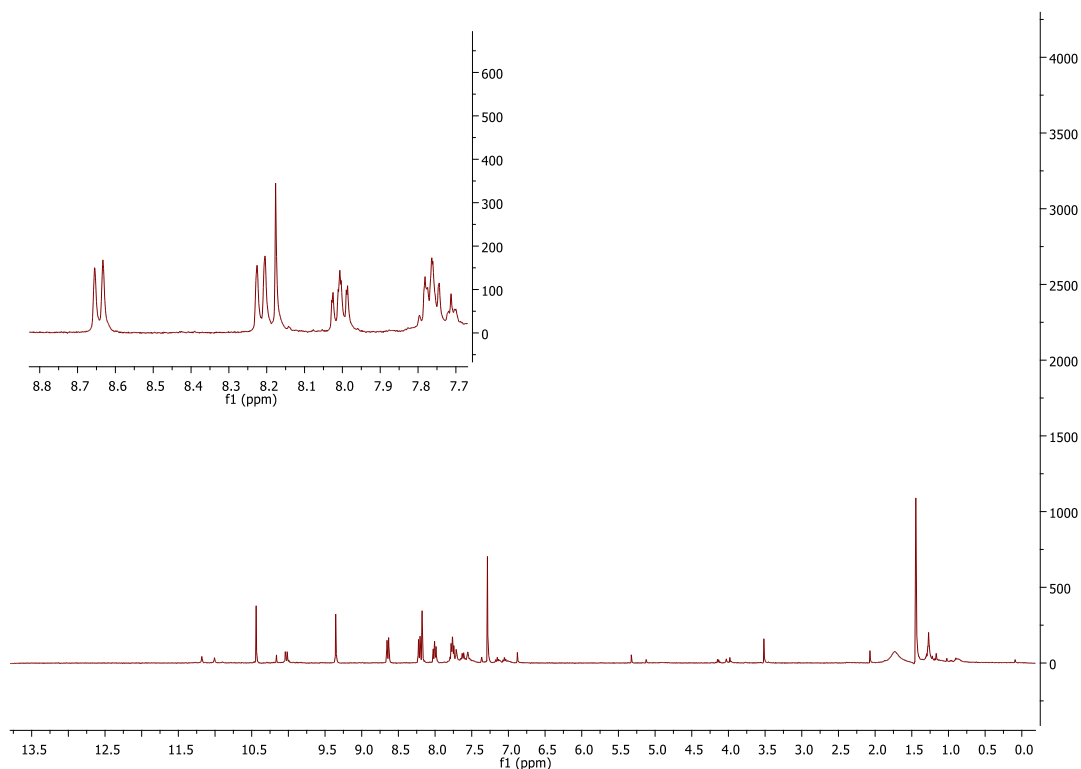
Εικόνα 2.23: Φάσμα <sup>1</sup>H – NMR της διαλκοόλης **47** σε MeOD-d<sub>4</sub>.

. Η μετατροπή τους στο επόμενο φάσμα  $^1\text{H}$  – NMR (Εικόνα 2.24), της ένωσης **48**, σε δύο μονές κορυφές στα 10.0 και 10.3 ppm οφείλεται στην οξείδωση των αλκοολών σε αλδεΐδες.



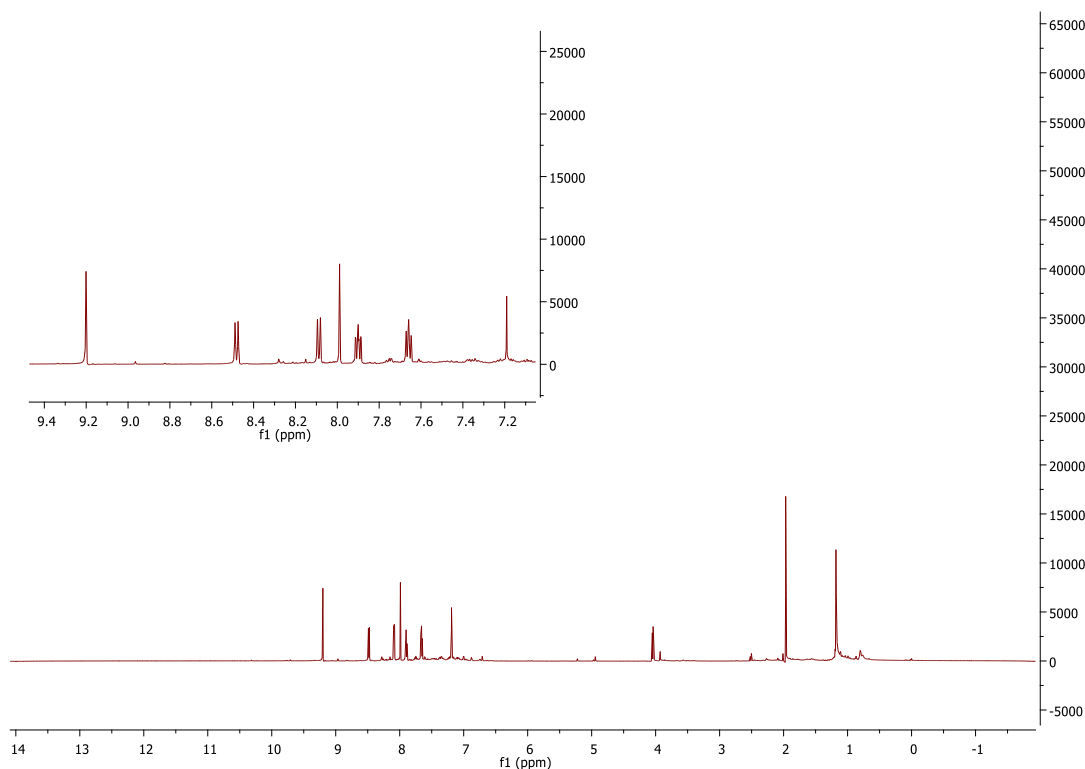
Εικόνα 2.24: Φάσμα  $^1\text{H}$  – NMR της αλδεΐδης **48** σε  $\text{CDCl}_3$ .

Η παρουσία μιας εκ των δύο αυτών κορυφών και η αλλαγή των αρωματικών κορυφών στο φάσμα  $^1\text{H}$  – NMR της ένωσης **49** (Εικόνα 2.25) οφείλεται στην ενδομοριακή κύκλωση του **48** προς ακριδίνη.

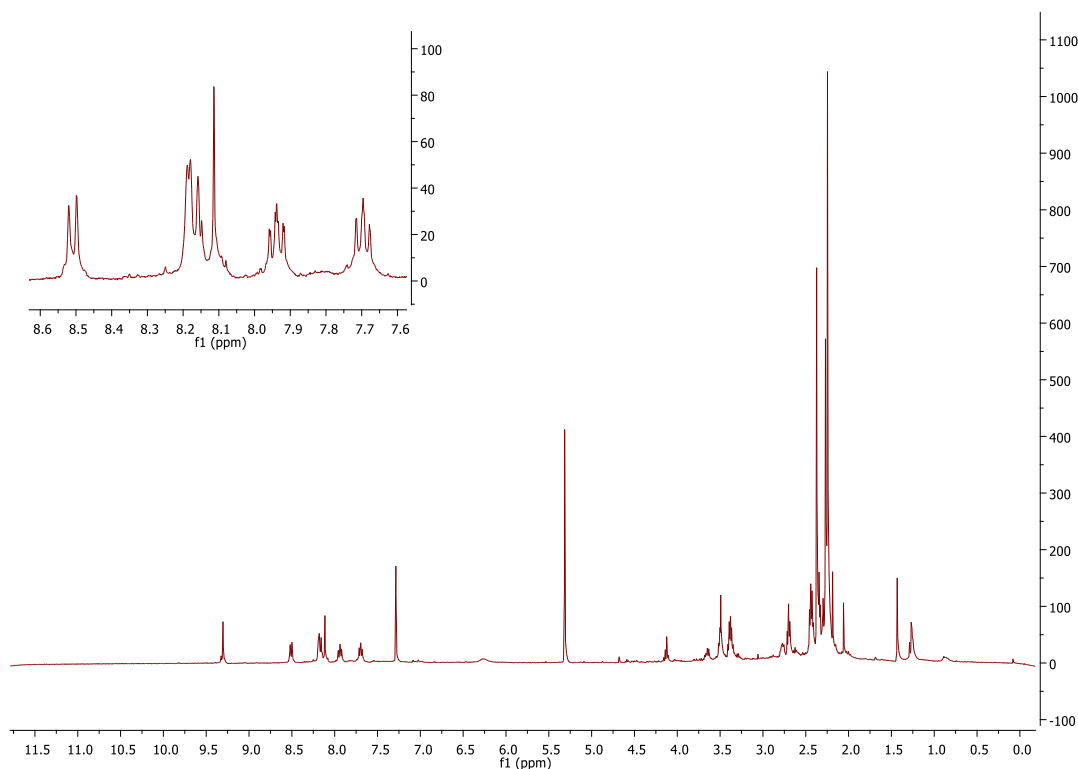


Εικόνα 2.25: Φάσμα  $^1\text{H}$  – NMR της ακριδίνης **49** σε  $\text{CDCl}_3$ .

Στο φάσμα  $^1\text{H}$  – NMR της ένωσης **50** (Εικόνα 2.26) φαίνεται ξεκάθαρα η απουσία της μονής κορυφής που αντιστοιχούσε στην αλδεΐδη, ενώ στο φάσμα  $^1\text{H}$  – NMR της αμιδίνης **51a** τα πρωτόνια της αλειφατικής αλυσίδας (Εικόνα 2.27).



Εικόνα 2.26: Φάσμα  $^1\text{H}$  – NMR της αμιδίνης **50** σε  $\text{CDCl}_3$ .



Εικόνα 2.27: Φάσμα  $^1\text{H}$  – NMR της αμιδίνης **51a** σε  $\text{CDCl}_3$

Συνολικά στην παρούσα διπλωματική εργασία συντέθηκαν 42 νέα μόρια, εκ των οποίων τα 12 ελέγχονται για την ανασταλτική τους δράση επί των ενζύμων Τοποϊσομεράση I και II καθώς και για την κυτταροστατική τους δράση σε κυτταρικές καρκινικές σειρές, ενώ τα υπόλοιπα 30 είναι δομικά ενδιάμεσα τους.

Επιπλέον, αναπτύχθηκαν 3 διαφορετικές πορείες για την παρασκευή των ανωτέρω παραγώγων, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για τη μελλοντική σύνθεση μιας μεγάλης ποικιλίας μορίων, ώστε να εξαχθούν περαιτέρω σχέσεις δομής – δράσης.

Η φαρμακολογική αξιολόγησή τους γίνεται από την ερευνητική ομάδα του Yves Pommier, M.D., Ph.D. (Center for Cancer Research, National Cancer Institute, Bethesda, USA).



## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Τα σημεία τήξεως λήφθηκαν σε συσκευή Büchi και δεν είναι διορθωμένα. Οι χρωματογραφίες στήλης πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση Silica gel (0.060-0.200 mm, 60 Å και 40-60 μm, 60Å) και Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Brockmann III. Η παρακολούθηση των αντιδράσεων έγινε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας σε πλάκες Silica gel 60F<sub>254</sub> και Aluminum oxideF<sub>254</sub>. Τα φάσματα <sup>1</sup>H-NMR και δύο διαστάσεων λήφθηκαν σε φασματοσκόπιο Bruker Avance 400 στα 400 MHz και Bruker Avance III 600 στα 600 MHz, ενώ τα φάσματα <sup>13</sup>C-NMR λήφθηκαν σε φασματοσκόπιο Bruker AC 200 στα 50 MHz και Bruker Avance III 600 στα 151 MHz. Ως διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl<sub>3</sub>), διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO-*d*<sub>6</sub>) και μεθανόλη (MeOD-*d*<sub>4</sub>).

### Σύνθεση του 2-((2-νιτροφαινυλ)αμινο)βενζοϊκού οξέος (3)

Μίγμα των 2-νιτροβρωμοβενζόλιο (2) (550 mg, 2.72 mmol), ανθρανιλικό οξύ (1) (372 mg, 2.72 mmol), ανθρακικό κάλιο (750 mg, 5.44 mmol) και στοιχειακός χαλκός (18 mg, 0.27 mmol) σε άνυδρο διμεθυλοφορμαμίδιο (10 mL) θερμαίνεται στους 135 °C για 4 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης το διμεθυλοφορμαμίδιο απομακρύνεται υπό κενό και στο ελαιώδες υπόλειμμα προστίθεται νερό (100 ml). Το υδατικό διάλυμα οξινίζεται με υδροχλώριο έως όξινου pH και το στερεό διηθείται υπό κενό για να παραληφθούν 540 mg του παραγώγου 3 (78%)

Σ.τ.: 217-219 °C (EtOAc); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz) δ (ppm): 11.2 (s, D<sub>2</sub>O exch., 1H, NH), 8.19 (td, *J* = 8.1, 1.3 Hz, 1H, H-5'), 7.68 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-3'), 7.58 – 7.47 (m, 4H, H-4', H-6', H-5, H-4), 7.08 (t, *J* = 8.2 Hz 1H, H-6), 7.01 (t, *J* = 7.9 Hz 1H, H-4); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 151 MHz) δ (ppm): 178.51 (C=O), 149.29 (C-2), 146.38 (C-1'), 136.22 (C-5'), 132.01 (C-2'), 131.51 (C-4), 127.58 (C-6), 126.70 (C-3'), 116.15 (C-5), 115.15 (C-4'), 114.62 (C-3), 113.60 (C-1), 113.40 (C-6').

### Σύνθεση της 4-νιτρο-9,10-διϋδροακριδιν-9-όνης (4)

Σε πυκνό θειικό οξύ 98% (10mL) προστίθεται το παράγωγο 3 (520 mg, 2.02 mmol) υπό ψύξη και το μίγμα θερμαίνεται στους 80 °C για μία ώρα. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα αφού έρθει σε θερμοκρασία δωματίου αποχύνεται σε πάγο και προστίθεται νερό (80 mL). Το στερεό που σχηματίζεται διηθείται και ξηραίνεται σε ξηραντήρα κενού για να παραληφθούν 388 mg της ακριδίνης 4 (81%).

Σ.τ.: 193-197°C (THF); <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz) δ (ppm): 11.48 (s, D<sub>2</sub>O exch., 1H, NH), 8.69 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-1), 8.23 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-3), 8.08 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-2), 7.82 (td, *J* = 8.1, 1.3 Hz, 1H, H-6), 7.41 (m, 2H, H-5, H-8); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 50 MHz) δ (ppm): 176.87 (C-10), 142.20 (C-10a), 141.50 (C-1), 138.51 (C-4a), 136.48 (C-4), 134.68 (C-6), 132.10 (C-3), 126.27 (C-9), 123.08 (C-9a), 122.16 (C-7), 120.80 (C-8a), 118.66 (C-5), 118.24 (C-2).

### Σύνθεση της 4-αμινο-9,10-διϋδροακριδιν-9-όνης (5)

Σε μίγμα άνυδρων τετραυδροφουρανίου (10 mL) και μεθανόλης (10 mL) προστίθενται το νιτροπαράγωγο **4** (480 mg, 2.00 mmol), παλλάδιο επί άνθρακα 10% (50 mg) και μυρμικικό αμμώνιο (630 mg, 10.00 mmol). Το μίγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης το μίγμα διηθείται υπό κελίτη, το διχλωρομεθάνιο συμπυκνώνεται υπό κενό και το στερεό υπόλειμμα καθαρίζεται περαιτέρω με χρωματογραφία στήλης (silica gel) με κινητή φάση κυκλοεξάνιο/οξικό αιθυλεστέρα 1:1 για να παραληφθούν 386 mg του παραγώγου **5** (92%).

Σ.τ.: 220-222°C (THF); <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz) δ (ppm): 10.26 (s, D<sub>2</sub>O exch., 1H, NH), 7.87 (dd, *J* = 1H), 7.47 (dt, 8.2, 1.5 Hz, 1H, H-6), 7.24 (dd, *J* = 7.6, 1.2 Hz, 1H, H-1), 7.16 (dt, 8.1, 1.6 Hz, 1H, H-7), 7.03 (dd, *J* = 7.9, 1.6 Hz, 1H, H-5), 6.93 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-2), 6.68 (dd, *J* = 7.7, 1.2 Hz, 1H, H-3), 6.07 (s, D<sub>2</sub>O exch., 2H, NH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 50 MHz) δ (ppm): 176.75 (C-9), 142.20 (C-10a), 135.31 (C-4), 134.68 (C-6), 133.13 (C-4a), 126.27 (C-8), 124.53 (C-3), 122.58 (C-9a), 122.16 (C-7), 120.78 (C-8a), 120.22 (C-2), 118.66 (C-5), 117.02 (C-1).

### Σύνθεση της 4-((4-χλωρο-5H-1,2,3-διθειαζολ-5-υλιδεν)αμινο)-9,10-διϋδροακριδιν-9-όνης (7)

Σε διάλυμα του παραγώγου **5** (420 mg, 2.00 mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (100 mL) προστίθεται αλάτι του Appel (440 mg, 2.12 mmol) και το μίγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Στη συνέχεια προστίθεται πυριδίνη (340 μL, 4.24 mmol) και το μίγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες ακόμα. Μετά το πέρας της αντίδρασης το διχλωρομεθάνιο πλένεται με νερό (3x50 mL), ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θεικού νατρίου και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το ελαιώδες υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (silica gel) με βαθμιδωτή έκλυση με κυκλοεξάνιο/οξικό αιθυλεστέρα 3:1 έως οξικό αιθυλεστέρα για να παραληφθούν 324 mg του παραγώγου **7** (47%).

Σ.τ.: 241-243 °C (THF); <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600 MHz) δ (ppm): 10.35 (s, D<sub>2</sub>O exch., 1H, NH), 8.21 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H-8), 8.15 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-1), 7.82 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-6), 7.76 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-5), 7.60 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-7), 7.33 (m, 2H, H-3, H-2); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 174.93 (C-9), 165.65 (C-5'), 154.46 (C-10a), 147.05 (C-4'), 145.94 (C-4a), 138.97 (C-4), 136.09 (C-6), 130.16 (C-2), 129.22 (C-3), 126.49 (C-8), 125.57 (C-7), 122.14 (C-8a), 119.29 (C-1), 118.86 (C-9a), 118.54 (C-5).

### Σύνθεση του 6-οξο-6,11-διϋδροθειαζολο[5,4-*c*]ακριδιν-2--2-καρβονιτριλίου (8)

Σε διάλυμα του παραγώγου **7** (350 mg, 1.01 mmol) σε διμεθυλοσουλφοξείδιο προστίθεται τριφαινυλοφωσφίνη (529 mg, 2.02 mmol) και μία σταγόνα νερό και το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου, για 15 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθεται δισθενές χλωριούχο παλλάδιο (9 mg, 0.05 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται στους 90 °C για 1 ώρα, αποχύνεται σε νερό και εκυλίζεται με οξικό

αιθυλεστέρα (3x50 mL). Τα οργανικά εκχυλίσματα συνενώνονται, ξηραίνονται (άνυδρο θειικό νάτριο) και συμπυκνώνονται υπό κενό. Το ελαιώδες υπόλειμμα που λαμβάνεται καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (silica gel) με κινητή φάση που ξεκινάει από κυκλοεξάνιο και προοδευτικά τελειώνει με μίγμα κυκλοεξάνιο/οξικού αιθυλεστέρα 1:1 για να παραληφθούν 44 mg του **8** (16%)

Σ.τ.: 269-273 °C (THF); <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600 MHz) δ (ppm): 12.60 (s, D<sub>2</sub>O exch., 1H, NH), 8.46 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H-5), 8.30 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-7), 8.07 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H-4, H-5), 7.81 (t, *J* = 11.2, Hz, 1H, H-9), 7.39 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-8); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 151 MHz) δ (ppm): 176.01 (C-6), 141.29 (C-10a), 140.85 (C-11a), 140.35 (C-2), 136.10 (C-4a), 133.65 (C-5), 126.59 (C-9), 125.83 (C-11b), 122.53 (C-7), 121.78 (C-8), 118.66 (C-6a), 118.53 (C-4), 116.13 (C-5a), 114.42 (C-10), 113.32 (CN).

#### Σύνθεση της N-[2-(διμεθυλαμινο)αιθυλ]-6-οξο-6,11-διϋδροθειαζολο[5,4-*c*]ακριδινό-2-καρβοξαμιδίνης (**9a**)

Διάλυμα του παραγώγου **8** (70 mg, 0.25 mmol) σε 2-(διμεθυλαμινο)αιθυλαμίνη (1 mL) θερμαίνεται στους 110 °C για 1 ώρα. Μετά το πέρας της αντίδρασης η 2-(διμεθυλαμινο)αιθυλαμίνη εκδιώχνεται υπό κενό και το ελαιώδες υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Brockmann III) και βαθμιδωτή έκλυση με διχλωρομεθάνιο έως μίγματος διχλωρομεθανίου/μεθανόλης 20:1 για να παραληφθούν 67 mg του **9a** (76%).

Σ.τ.: 270 °C (EtOH); <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600 MHz) δ (ppm): 12.51 (s, D<sub>2</sub>O exch., 1H, NH, H-11), 10.20 (s, D<sub>2</sub>O exch., 2H, NH, ), 8.38 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-5), 8.30 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-7), 8.13 – 8.04 (m, 2H, H-4, H-5), 7.82 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-9), 7.38 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-8), 3.95 (q, *J* = 6.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.52 (q, *J* = Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.91 (s, 6H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 151 MHz) δ (ppm): 176.49 (C=O), 164.22 (C-2), 161.93 (C=NH), 148.99 (C-11b), 148.42 (C-10a), 143.89 (C-11a), 139.14 (C-5a), 131.12 (C-9), 130.13 (C-10), 127.41 (C-8), 124.59 (C-7), 124.34 (C-6a), 123.70 (C-5), 122.89 (C-3a), 120.41 (C-4), 71.39 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 45.31 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 38.64 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

#### Σύνθεση της N-[2-(διμεθυλαμινο)προπυλ]-6-οξο-6,11-διϋδροθειαζολο[5,4-*c*]ακριδινό-2-καρβοξαμιδίνης (**9b**)

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση της αμίνης **9a** με χρήση 3-(διμεθυλαμινο)-1-προπυλαμίνης. Απόδοση: (62%).

Σ.τ.: 135-138 °C (EtOH); <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600 MHz) δ (ppm): 12.51 (s, D<sub>2</sub>O exch., 1H, NH, H-11), 10.20 (s, D<sub>2</sub>O exch., 2H, NH, ), 8.38 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-5), 8.30 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-7), 8.13 – 8.04 (m, 2H, H-4, H-5), 7.82 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-9), 7.38 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-8), 3.11 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.24 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.06 (s, 6H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.61 – 1.52 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 151 MHz) δ (ppm):

176.36 (C=O), 164.14 (C-2), 161.85 (C=NH), 148.97 (C-11b), 148.39 (C-10a), 143.84 (C-11a), 139.04 (C-5a), 130.96 (C-9), 130.09 (C-10), 127.40 (C-8), 124.58 (C-7), 124.26 (C-6a), 123.63 (C-5), 122.84 (C-3a), 120.39 (C-4), 71.64 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 57.39 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 45.31 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$ ), 27.11 ( $\text{CH}_2\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ).

### Σύνθεση του 6-οξο-6,11-διϋδροθειαζολο[5,4-c]ακριδινο-2-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα (10)

Σε κορεσμένο διάλυμα άνυδρης μεθανόλης (15 mL) με αέριο υδροχλώριο προστίθεται υπό ψύξη διάλυμα του παράγωγο **8** (280 mg, 1.01 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (5 mL) και το μίγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες. Έπειτα, προστίθεται νερό (5 mL) και το μίγμα αφήνεται 1 ώρα ακόμα. Μετά το πέρας της μίας ώρας στο μίγμα προστίθεται επιπλέον νερό (40 mL) και το στερεό που σχηματίζεται διηθείται υπό κενό και ξηραίνεται σε ξηραντήρα κενού για να παραληφθούν 276 mg του παραγώγου **10** (89%).

Σ.τ.; 228-229 °C (THF);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 12.36 (s, 1H,  $\text{D}_2\text{O}$  exch., NH), 8.34 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H, H-5), 8.27 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H-7), 8.14 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H, H-10), 7.96 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H, H-4), 7.77 (t,  $J = 7.1$  Hz, 1H, H-9), 7.34 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H, H-8), 4.12 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz)  $\delta$  (ppm): 164.92 ( $\text{COOCH}_3$ ), 159.65 (C-2), 148.98 (C-11b), 148.12 (C-10a), 144.65 (C-3a ή C-11a), 142.31 (C-6), 139.56 (C-11a ή C-3a), 131.03 (C-9), 130.14 (C-10), 127.25 (C-8), 124.41 (C-7), 124.16 (C-6a), 123.49 (C-5), 122.56 (C-5a), 120.18 (C-4), 51.09 ( $\text{CH}_3$ ).

### Σύνθεση του 6-οξο-6,11-διϋδροθειαζολο[5,4-c]ακριδινο-2-καρβοξυλικού οξέος (11)

Α' τρόπος:

Σε διάλυμα του παράγωγο **10** (160 mg, 0.52 mmol) σε μίγμα τετραϋδροφουρανίου (15 mL) και μεθανόλης (10 mL) προστίθεται κορεσμένο υδατικό διάλυμα καυστικού καλίου (5 mL) και το μίγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα οξινίζεται έως pH~3 και ψύχεται. Το στερεό που σχηματίζεται διηθείται για να παραληφθούν 136 mg του οξέος **11** (87%).

Β' τρόπος:

Σε πολυφωσφορικό οξύ (10 mL) προστίθεται το παράγωγο **36** (348 mg, 1 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται στους 80°C για 3 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης προστίθεται νερό και η υδατική στοιβάδα εκχυλίζεται με μίγμα οξικού αιθυλεστέρα/τετραϋδροφουρανίου. Η οργανική φάση ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και συμπυκνώνεται για να παραληφθούν 260 mg του οξέος **11** (79%).

Σ.τ.: 270 °C (THF);  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 12.36 (s, 1H, D<sub>2</sub>O exch., NH), 8.36 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H, H-5), 8.27 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H-7), 8.14 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H, H-10), 7.96 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H, H-4), 7.77 (t,  $J = 7.1$  Hz, 1H, H-9), 7.34 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H, H-8);  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 151 MHz)  $\delta$  (ppm): 176.15 (COOH), 161.01 (C-2), 155.78, 141.99 (C-10a), 141.26, 140.42 (C-6), 136.54, 133.31 (C-9), 125.71 (C-8), 125.07 (C-10), 122.19 (C-7), 121.57 (C-6a), 118.83 (C-5), 118.16, 114.54 (C-4).

### Σύνθεση του N-[2-(διμεθυλαμινο)αιθυλ]-6-οξο-6,11-διϋδροθειαζολο[5,4-c]ακρινινο-2-καρβοξαμιδίου (12a)

Σε διάλυμα του οξέος **11** (70 mg, 0.24 mmol) άνυδρο διχλωρομεθάνιο προστίθενται οξάλυλο χλωρίδιο (23  $\mu\text{L}$ , 0.26 mmol) και διμεθυλοφορμαμίδιο (1 σταγόνα) υπό ψύξη και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες υπό ατμόσφαιρας αργού. Στη συνέχεια προστίθεται 2-(διμεθυλαμινο)αιθυλαμίνη (31.8  $\mu\text{L}$ , 0.52 mmol) υπό ψύξη και το μίγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ακόμα ώρες υπό ατμόσφαιρας αργού. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα πλένεται με νερό (2x50 mL), η οργανική στοιβάδα ξηραίνεται υπέρνω άνυδρου θεικού νατρίου και συμπυκνώνεται. Το ελαιώδες υπόλειμμα καθαρίζεται περαιτέρω με χρωματογραφία στήλης ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ , Brockmann III) με σύστημα έκλουσης που ξεκινάει από διχλωρομεθάνιο και προοδευτικά τελειώνει σε μίγμα διχλωρομεθάνιο/μεθανόλη 10:1 για να παραληφθούν 61 mg του παραγώγου **12a** (70%).

Έλαιο;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 8.39 – 8.35 (m,  $J = 7.9$  Hz, 2H, H-7, H-10), 8.28 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H, H-5), 8.09 (b, D<sub>2</sub>O exch., 1H, CONH), 7.92 (d,  $J = 9.03$  Hz, 1H, H-4), 7.83 (td,  $J = 7.5, 1.4$  Hz, 1H, H-9), 7.65 (t,  $J = 7.7, 1.1$  Hz, 1H, H-8), 3.63 (q,  $J = 6.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.60 (t,  $J = 6.3$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.31 (s, 6H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 164.12 (CONH), 159.49 (C-2), 148.98 (C-11b), 148.37 (C-10a), 143.80 (C-3a ή C-11a), 141.87 (C-6), 139.06 (C-11a ή C-3a), 130.99 (C-9), 130.05 (C-10), 127.35 (C-8), 124.51 (C-7), 124.27 (C-6a), 123.59 (C-5), 122.86 (C-5a), 120.39 (C-4), 57.97 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 45.38 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 37.64 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ).

### Σύνθεση του N-[3-(διμεθυλαμινο)προπυλ]-6-οξο-6,11-διϋδροθειαζολο[5,4-c]ακρινινο-2-καρβοξαμιδίου (12b)

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του αμιδίου **12a** με χρήση 3-διμεθυλαμινο-1-προπυλαμίνης. Απόδοση: 61%.

Έλαιο;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta$  (ppm): 8.48 (b, D<sub>2</sub>O exch., 1H, CONH), 8.35 – 8.29 (m, 2H, H-7, H-10), 8.22 (d,  $J = 9.4$  Hz, 1H, H-5), 7.87 (d,  $J = 9.3$  Hz, 1H, H-4), 7.81 (td,  $J = 7.5, 0.9$  Hz, 1H, H-9), 7.63 (td,  $J = 7.6, 1.0$  Hz, 1H, H-8), 3.61 (q,  $J = 6.4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.47 (t,  $J = 6.3$  Hz, 2H,

$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ , 2.31 (s, 6H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.89 (q, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 164.23 (CONH), 159.69 (C-2), 149.20 (C-11b), 148.54 (C-10a), 144.00 (C-3a ή C-11a), 142.19 (C-6), 139.32 (C-11a ή C-3a), 131.22 (C-9), 130.25 (C-10), 127.56 (C-8), 124.65 (C-7), 124.54 (C-6a), 123.90 (C-5), 123.09 (C-5a), 120.58 (C-4), 57.39 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 45.31 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 38.64 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 27.11 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ).

#### Σύνθεση του 4-αμινο-3,5-διβρωμοβενζοϊκού αιθυλεστέρα (14)

Σε εναιώρημα του 4-αμινοβενζοϊκού αιθυλεστέρα (330 mg, 2.00 mmol, **13**) σε παγόμορφο οξικό οξύ (20 mL) προστίθεται *N*-βρωμοηλεκτριμίδιο (1.78 g, 4.03 mmol) και το μίγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Μετά το πέρας της αντίδρασης προστίθεται στο μίγμα νερό (100 mL) και το στερεό που σχηματίζεται διηθείται υπό κενό, εκπλένεται περαιτέρω με νερό (3x 50 mL) και ξηραίνεται σε ξηραντήρα κενού για να παραληφθούν 640 mg του εστέρα **14** (99%).

Σ.τ.: 211-216 °C (EtOAc);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 7.84 (s, 2H, H-2, H-6), 4.43 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H,  $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ ), 1.42 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)  $\delta$  (ppm): 165.88 (C=O), 152.47 (C-4), 131.75 (C-2, C-6), 125.39 (C-1), 103.73 (C-3, C-5), 61.28 ( $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ ), 14.70 ( $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ ).

#### Σύνθεση του 4-νιτρο-3,5-διβρωμοβενζοϊκού αιθυλεστέρα (15)

Σε διάλυμα του παραγώγου **14** (640mg, 2.00 mmol) σε παγόμορφο οξικό οξύ (20 mL) προστίθεται υπεροξείδιο του υδρογόνου 30% (9 mL) και πυκνό θειικό οξύ 98% (0.5 mL) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία βρασμού για 2 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα αποχύνεται σε πάγο και προστίθεται νερό (50 mL) και το στερεό που σχηματίζεται διηθείται υπό κενό, εκπλένεται περαιτέρω με νερό (3 x 20 mL) και ξηραίνεται σε ξηραντήρα κενού για να παραληφθούν 630 mg του παραγώγου **15** (89%).

Σ.τ.: 180-183°C (EtOAc);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 8.28 (s, 2H, H-2, H-6), 4.43 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H,  $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ ), 1.42 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)  $\delta$  (ppm): 165.97 (C=O), 156.75 (C-4), 137.88 (C-1), 131.43 (C-2, C-6), 117.29 (C-3, C-5), 61.28 ( $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ ), 14.70 ( $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ ).

#### Σύνθεση του 4-νιτρο-3,5-διβρωμοβενζοϊκού οξέος (16)

Σε διάλυμα του εστέρα **15** (630mg, 1.78 mmol) εντός αιθανόλης 96% (20 mL) προστίθεται υδατικό διάλυμα καυστικού νατρίου 40% (5 mL) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Μετά το πέρας της αντίδρασης το διάλυμα οξινίζεται pH~3, προστίθεται νερό (100 mL) και το στερεό που

σχηματίζεται, διηθείται υπό κενό και ξηραίνεται σε ξηραντήρα κενού παρουσία P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> για να παραληφθούν 510 mg του οξέος **16** (97%).

Σ.τ.: 245-249°C (EtOAc); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ (ppm): 8.32 (s, 2H, H-2, H-6); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) δ (ppm): 167.50 (COOH), 156.63 (C-4), 142.30 (C-1), 133.32 (C-2, C-6), 119.35 (C-3, C-5).

### Σύνθεση του 3,5-δισ-[[2-(μεθοξυκαρβονυλ)φαινυλ]αμινο]-4-νιτροβενζοϊκού αιθυλεστέρα (**17**)

Σε διάλυμα του παραγώγου **16** (330 mg, 1 mmol) σε άνυδρο τολουόλιο (50 mL) προστίθεται ανθρανλικός μεθυλεστέρας (150 mg, 1 mmol), ανθρακικό κέσιο (650 mg, 2 mmol), Pd(dbA)<sub>2</sub> (30 mg, 0.05 mmol) και x-phos (10 mg, 0.025 mmol) και το μίγμα αναδεύεται για 3 ώρες σε θερμοκρασία βρασμού, υπό ατμόσφαιρα αργού. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, διηθείται υπό κενό και το διήθημα πλένεται με νερό (2 x 20 mL), ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το στερεό υπόλειμμα καθαρίζεται περαιτέρω με χρωματογραφία στήλης (silica gel) με κινητή φάση διχλωρομεθάνιο/κυκλοεξάνιο 1/1 για να παραληφθούν 390 mg του εστέρα **17** (82%).

Σ.τ.: 197-201 °C (EtOAc); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ (ppm): 9.80 (br, s, D<sub>2</sub>O exch., 2H, NH), 7.95 (dd, *J* = 7.6, 1.2 Hz, 2H, H-3', H-3''), 7.74 (s, 2H, H-2, H-6), 7.44 (td, *J* = 7.9, 0.9 Hz, 2H, H-5', H-5''), 7.22 (dd, *J* = 7.4, 1.2 Hz, 2H, H-6', H-6''), 7.05 (td, *J* = 7.9, 0.9 Hz, 2H, H-4', H-4''), 4.13 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H, COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.95 (s, 6H, COOCH<sub>3</sub>), 1.39 (t, *J* = 7.9 Hz, 3H, COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) δ (ppm): 168.79 (COOCH<sub>3</sub>), 165.88 (COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 145.26 (C-1', C-1''), 138.35 (C-1), 134.90 (C-3, C-5), 133.89 (C-5', C-5''), 131.85 (C-3', C-3''), 127.61 (C-4), 121.74 (C-4', C-4''), 121.22 (C-2, C-6), 120.55 (C-6', C-6''), 120.21 (C-2', C-2''), 61.28 (COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 52.08 (COOCH<sub>3</sub>), 14.70 (COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

### Σύνθεση του 3,5-διβρωμο-4-[[2-(μεθοξυκαρβονυλ)φαινυλ]αμινο}βενζοϊκού αιθυλεστέρα (**18**)

Σε διάλυμα του παραγώγου **16** (330 mg, 1 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (40 mL) προστίθεται ανθρανλικός μεθυλεστέρας (150 mg, 1 mmol) και λίθιο δις(τριμεθυλοσιλυλο)αμίδιο (2 mL, 2 mmol, 1M σε τετραϋδροφουρανίου) στους 0 °C υπό ατμόσφαιρα αργού και το μίγμα αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος όπου παραμένει για 2 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης στο μίγμα προστίθεται κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου (2 mL) και εκυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα/νερό. Η οργανική στιβάδα συνενώνεται, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και συμπυκνώνεται υπό ελατωμένη πίεση. Το ελλαιώδες υπόλειμμα που λαμβάνεται καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (silica gel) με κινητή φάση οξικό αιθυλεστέρα/κυκλοεξάνιο 1/10 για να παραληφθούν 280 mg του εστέρα **18** (65%).

Σ.τ.: 199-205 °C (EtOAc);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 8.13 (s, 2H, H-2, H-6), 7.93 (dd,  $J = 7.2, 0.9$  Hz, 1H, H-3'), 7.40 (td,  $J = 7.8, 1.1$  Hz, 1H, H-5'), 7.05 (dd,  $J = 7.1, 1.1$  Hz, 1H, H-6'), 4.17 (q,  $J = 6.7$  Hz, 2H,  $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ ), 3.96 (s, 3H,  $\text{COOCH}_3$ ), 1.39 (t,  $J = 7.9$  Hz, 3H,  $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz)  $\delta$  (ppm): 168.71 ( $\text{COOCH}_3$ ), 165.72 ( $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ ), 151.13 (C-4), 145.01 (C-1'), 133.87 (C-5'), 133.06 (C-2, C-6), 131.84 (C-3'), 129.35 (C-1), 122.16 (C-4'), 120.51 (C-6'), 120.09 (C-2'), 110.82 (C-3, C-5), 61.26 ( $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ ), 52.02 ( $\text{COOCH}_3$ ), 14.70 ( $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ ).

### Σύνθεση της 2,4,6-τριβρωμοανιλίνης (20)

Σε διάλυμα ανιλίνης (465 mg, 5.00 mmol, **19**) σε παγόμοφο οξικό οξύ (20 mL) προστίθεται ανιλίνη *N*-βρωμοηλεκτριμίδιο (6.68 g, 15.00 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Μετά το πέρας της αντίδρασης προστίθεται στο μίγμα νερό (100 mL) και το στερεό που σχηματίζεται διηθείται υπό κενό, πλένεται περαιτέρω με νερό (3x 50 mL) και ξηραίνεται σε ξηραντήρα κενού για να παραληφθούν 1.62 g του παραγώγου **20** (99%).

Σ.τ.: 120-122 °C (MeOH);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 7.50 (s, 2H, H-3, H-5), 4.56 (s,  $\text{D}_2\text{O}$  exch., 2H,  $\text{NH}_2$ );  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)  $\delta$  (ppm): 141.32 (C-1), 133.80 (C-3, C-5), 108.81 (C-2, C-4, C-6).

### Σύνθεση του 1,3,5-τριβρωμο-2-νιτροβενζολίου (21)

Σε οξικό οξύ (40 mL) προστίθενται το **20** (990 mg, 3.00 mmol), υπεροξείδιο του υδρογόνου 30% (12,4 mL) και πυκνό θειικό οξύ 98% (1,0 mL) και το μίγμα αφήνεται σε θερμοκρασία βρασμού για 4 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα αποχύνεται σε πάγο και προστίθεται νερό (100 mL) και το στερεό που σχηματίζεται διηθείται υπό κενό και εκπλένεται περαιτέρω με νερό (3 x 30 mL) για να παραληφθούν 970 mg του **21** (89%).

Σ.τ.: 114-117 °C (MeOH);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 7.83 (s, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)  $\delta$  (ppm): 151.72 (C-2), 133.82 (C-4, C-6), 126.76 (C-5), 122.84 (C-1, C-3).

:

### Σύνθεση του 2,2',2''-[(2-νιτροφαινυλ-1,3,5-τριαμινο)]τριβενζοϊκού τριμεθυλεστέρα (22)

Σε τολουόλιο (50 mL) προστίθενται το παράγωγο **21** (360 mg, 1 mmol), ανθρανιλικός μεθυλεστέρας (150 mg, 1 mmol), ανθρακικό κέσιο (650 mg, 2 mmol),  $\text{Pd}(\text{dba})_2$  (30 mg, 0.05 mmol) και *x*-phos (10 mg, 0.025 mmol) και το μίγμα αναδεύεται για 3 ώρες σε θερμοκρασία βρασμού, υπό ατμόσφαιρα αργού. Μετά το πέρας της αντίδρασης, αφήνεται το διάλυμα να έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και το στερεό υπόλειμμα διηθείται υπό κενό. Το διήθημα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα (50 mL) και η οργανική στοιβάδα εκπλένεται με νερό (2 x 20 mL),



ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το στερεό υπόλειμμα καθαρίζεται περαιτέρω με χρωματογραφία στήλης (silica gel) με κινητή φάση κυκλοεξάνιο για να ληφθούν 410 mg του παραγώγου **22** (71%).

Σ.τ.: 212-218 °C (EtOAc);  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 10.94 (s,  $\text{D}_2\text{O}$  exch., 2H, NH), 9.48 (s,  $\text{D}_2\text{O}$  exch., 1H, NH), 8.01 (d,  $J = 7.6$  Hz, 2H, H-3, H-3'), 7.95 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H, H-3''), 7.49 – 7.29 (m, 3H, H-4, H-4', H-4''), 6.97 (t,  $J = 7.9$  Hz, 2H, H-5, H-5'), 6.87 (t,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H-5''), 6.79 (s, 2H, H-4''', H-6'''), 3.95 (s, 6H,  $\text{COOCH}_3$ ), 3.88 (s, 3H,  $\text{COOCH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 168.98 ( $\text{COOCH}_3$ ), 168.58 ( $\text{COOCH}_3$ ), 149.16, 145.37 (C-anthranilate), 145.07 (C-anthranilate), 143.02, 142.63 (C-anthranilate), 134.07 (C-anthranilate), 133.69 (C-anthranilate), 131.89 (C-anthranilate), 123.13 (C-2'''), 121.59 (C-anthranilate), 121.38 (C-anthranilate), 120.74 (C-anthranilate), 120.35 (C-anthranilate), 120.35 (C-anthranilate), 120.10 (C-anthranilate), 119.91 (C-anthranilate), 119.52 (C-anthranilate), 104.20 (C-4''', C-6'''), 52.18 ( $\text{COOCH}_3$ ), 51.97 ( $\text{COOCH}_3$ ).

### Σύνθεση του N-[3,5-διβρωμο-2-νιτρο(φαινυλ)]-ανθρανιλικού μεθυλεστέρα (**23**)

Σε τολουόλιο (50 mL) προστίθενται το **21** (360 mg, 1 mmol), ανθρανιλικός μεθυλεστέρας (150 mg, 1 mmol), ανθρακικό καΐσιο (650 mg, 2 mmol), τετράκις τριφαινυλοφώσφινοπαλλάδιο (30 mg, 0.03 mmol) και το μίγμα αφήνεται για 3 ώρες σε θερμοκρασία βρασμού. Μετά το πέρας της αντίδρασης, αφήνεται το διάλυμα να έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και το στερεό υπόλειμμα διηθείται υπό κενό. Το διήθημα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα (50 mL) και η οργανική στοιβάδα εκπλένεται με νερό (2 x 20 mL), ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το στερεό υπόλειμμα καθαρίζεται περαιτέρω με χρωματογραφία στήλης (silica gel) με κινητή φάση κυκλοεξάνιο για να ληφθούν 110 mg του **23** (25%).

Σ.τ.: 187-191 °C (EtOAc);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 8.61 (br,  $\text{D}_2\text{O}$  exch., 1H, NH), 7.94 (dd,  $J = 7.2, 1.1$  Hz, 1H, H-6), 7.60 (s,  $J = 0.9$  Hz 1H, H-4'), 7.51 (s,  $J = 0.9$  Hz, 1H, H-6'), 7.42 (td,  $J = 7.8, 1.2$  Hz, 1H, H-4), 7.17 (dd,  $J = 7.1, 1.2$  Hz, 1H, H-6), 7.04 (td,  $J = 7.9, 0.9$  Hz, 1H, H-5), 3.96 (s, 3H,  $\text{COOCH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz)  $\delta$  (ppm): 168.79 ( $\text{COOCH}_3$ ), 145.26 (C-2), 138.86 (C-1'), 136.67 (C-2'), 133.89 (C-4), 131.85 (C-6), 128.11 (C-5'), 124.66 (C-6'), 123.64 (C-4'), 121.74 (C-4), 120.55 (C-3), 120.21 (C-1), 118.63 (C-4'), 52.08 ( $\text{COOCH}_3$ ).

### Σύνθεση του 2-[[3,5-διβρωμο-4-νιτρο(φαινυλ)]αμινο]βενζοϊκού μεθυλεστέρα (**24**)

Σε διάλυμα του παραγώγου **21** (360 mg, 1 mmol) σε άνυδρο τολουόλιο (50 mL) προστίθεται ανθρανιλικός μεθυλεστέρας (150 mg, 1 mmol), ανθρακικό κέσιο (650 mg, 2 mmol) και τετράκις τριφαινυλοφώσφινοπαλλάδιο (30 mg, 0.03 mmol) και το μίγμα αναδεύεται για 3 ώρες σε θερμοκρασία βρασμού, υπό ατμόσφαιρα αργού. Μετά το πέρας της αντίδρασης, αφήνεται το μίγμα να έρθει σε θερμοκρασία

περιβάλλοντος και το στερεό υπόλειμμα διηθείται υπό κενό. Το διήθημα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα (50 mL) και η οργανική στοιβάδα εκπλένεται με νερό (2 x 20 mL), ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το στερεό υπόλειμμα καθαρίζεται περεταίρω με χρωματογραφία στήλης (silica gel) με κινητή φάση κυκλοεξάνιο για να ληφθούν 310 mg του **24** (72%).

Σ.τ.: 182-188 °C(EtOAc);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 8.22 (b,  $\text{D}_2\text{O}$  exch., 1H, NH), 7.93 (dd,  $J = 7.2, 1.1$  Hz, 1H, H-6), 7.49 (s, 2H, H-2', H-6'), 7.42 (td,  $J = 7.9, 0.9$  Hz, 1H, H-4), 7.19 (dd,  $J = 7.3, 0.9$  Hz, 1H, H-3), 7.03 (td,  $J = 7.8, 1.1$  Hz, 1H, H-5), 3.94 (s, 3H,  $\text{COOCH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz)  $\delta$  (ppm): 168.79 ( $\text{COOCH}_3$ ), 148.11 (C-1'), 145.26 (C-2), 143.39 (C-4'), 133.97 (C-4), 131.97 (C-6), 125.76 (C-3', C-5'), 122.72 (C-2', C-6'), 120.98 (C-4), 119.91 (C-3), 119.52 (C-1), 52.08 ( $\text{COOCH}_3$ ).

### Σύνθεση της 2,4,6-τριβρωμο-N-(4-χλωρο-5H-1,2,3-διθειαζολ-5-υλιδεν)ανιλίνης (25)

Σε διάλυμα του παραγώγου **20** (630 mg, 1.76 mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (100 mL) προστίθεται το αλάτι του Appel (370 mg, 1.77 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Στη συνέχεια προστίθεται πυριδίνη (284  $\mu\text{L}$ , 3.55 mmol) και το μίγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες ακόμα. Μετά το πέρας της αντίδρασης το διχλωρομεθάνιο πλένεται με νερό (3x50 mL), ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το ελαιώδες υπόλειμμα διαχωρίζεται με χρωματογραφία στήλης (silica gel) με κινητή φάση κυκλοεξάνιο για να παραληφθούν 665 mg του **25** (81%).

Σ.τ.: 178 °C (EtOAc);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 7.29 (s, 2H, H-3, H-5);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)  $\delta$  (ppm): 162.78, 158.66, 144.50, 135.11, 119.65, 117.90.

### Σύνθεση του 4,6-διβρωμο-1,3-βενζοθειαζολο-2-καρβονιτριλίου (26)

Σε γυάλινο σωλήνα προστίθεται το παράγωγο **25** (655 mg, 1.43 mmol) και  $\text{CuI}$  (540 mg, 2.86 mmol) σε άνυδρη πυριδίνη (10 mL), ο σωλήνας σφραγίζεται και τοποθετείται στην συσκευή μικροκυμάτων (Start E, Milestone). Χρησιμοποιείται ακτινοβολία 200 W, η θερμοκρασία αυξάνεται από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος στους 120°C και το μίγμα της αντίδρασης παραμένει στη θερμοκρασία αυτή για 15 λεπτά. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα συμπυκνώνεται υπό πίεση και το υπόλειμμα που λαμβάνεται κατεργάζεται με διχλωρομεθάνιο (50 mL), διηθείται από κελίτη υπό κενό και εκπλένεται με διάλυμα θειοθειικού νατρίου (2x20 mL). Το εκχύλισμα συμπυκνώνεται υπό πίεση, φέρεται σε χρωματογραφία στήλης και καθαρίζεται με διαλύτη έκλουσης κυκλοεξάνιο/οξικό αιθυλεστέρα 8:1 για να ληφθούν 327 mg του **26** (72%).

Σ.τ.: 181-183 °C (EtOAc);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 8.11 (d,  $J = 1.7$  Hz, 1H), 8.01 (d,  $J = 1.7$  Hz, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)  $\delta$  (ppm): 143.15, 131.95, 131.33, 130.25, 126.84, 115.27, 114.19, 106.91.

#### Σύνθεση του 6-βρωμο-4-[[2-(μεθοξυκαρβονυλ)φαινυλ]αμινο]-1,3-βενζοθειαζολο-2-καρβονιτριλίου (27)

Σε τολουόλιο προστίθενται το **26** (100 mg, 0.31 mmol), ανθρανιλικός μεθυλεστέρας (45 mg, 0.31 mmol), ανθρακικό καΐσιο (170 mg, 0.60 mmol),  $\text{Pd}(\text{dbA})_2$  (28 mg, 0.03 mmol) και *x*-phos (7 mg, 0.015 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται σε θερμοκρασία βρασμού για 3 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης το στερεό υπόλειμμα διηθείται υπό κενό και εκπλένεται με οξικό αιθυλεστέρα (2x50 mL). Το διήθημα εκπλένεται με νερό (2x50 mL) και η οργανική στοιβάδα ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και συμπυκνώνεται υπό κενό. Στο στερεό υπόλειμμα προστίθεται μεθανόλη (20 mL) και το μίγμα διηθείται υπό κενό για να παραληφθούν 25 mg του **27** (20%).

Σ.τ.: 179-185 °C (EtOAc);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta$  (ppm): 10.54 (s,  $\text{D}_2\text{O}$  exch., 1H, NH), 8.08 (dd,  $J = 8.1, 1.5$  Hz, 1H, H-3'), 7.67 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H, H-6'), 7.54 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H, H-5'), 7.51 (d,  $J = 1.6$  Hz, 1H, H-7), 7.33 (d,  $J = 1.7$  Hz, 1H, H-5), 7.03 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H, H-4'), 3.96 (s, 3H,  $\text{COOCH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz)  $\delta$  (ppm): 168.22 ( $\underline{\text{COOCH}_3}$ ), 143.36 (C-1'), 140.12 (C-6), 138.65 (C-7a), 137.18 (C-4), 136.32 (C-3a), 134.24 (C-5'), 134.09 (C-2), 132.26 (C-3'), 121.19 (C-4'), 117.33 (C-6'), 116.65 (C-2'), 113.03 (CN), 111.87 (C-5), 111.43 (C-7), 52.51 ( $\underline{\text{COOCH}_3}$ ).

#### Σύνθεση του 4,6-δι-[[2-(μεθοξυκαρβονυλ)φαινυλ]αμινο]-1,3-βενζοθειαζολο-2-καρβονιτριλίου (28)

Σε τολουόλιο προστίθενται το **26** (100 mg, 0.31 mmol), ανθρανιλικός μεθυλεστέρας (45 mg, 0.31 mmol), ανθρακικό καΐσιο (170 mg, 0.60 mmol),  $\text{Pd}(\text{dbA})_2$  (28 mg, 0.03 mmol) και *x*-phos (7 mg, 0.015 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται σε θερμοκρασία βρασμού για 3 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης το στερεό υπόλειμμα διηθείται υπό κενό και εκπλένεται με οξικό αιθυλεστέρα (2x50 mL). Το διήθημα εκπλένεται με νερό (2x50 mL) και η οργανική στοιβάδα ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και συμπυκνώνεται υπό κενό. Στο στερεό υπόλειμμα προστίθεται μεθανόλη (20 mL) και το μίγμα διηθείται υπό κενό για να παραληφθούν 105 mg του **28** (72%).

Σ.τ.: 194-198 °C (EtOAc);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta$  (ppm): 8.23 (s,  $\text{D}_2\text{O}$  exch., 1H, NH), 7.88 (d,  $J = 6.9$  Hz, 2H, H-3', H-3''), 7.71 (s, 1H, H-7), 7.56 (s, 1H, H-5), 7.37 (d,  $J = 7.0$  Hz, 2H, H-6', H-6''), 7.18 (t,  $J = 8.2$  Hz, 2H, H-5', H-5''), 7.02 (t,  $J = 8.2$  Hz, 2H, H-4', H-4''), 3.98 (s, 3H,  $\text{COOCH}_3$ ), 3.92 (s, 3H,  $\text{COOCH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz)  $\delta$  (ppm): 168.98 ( $\underline{\text{COOCH}_3}$ ), 168.58 ( $\underline{\text{COOCH}_3}$ ), 145.26 (C-1', C-1''), 139.50 (C-6), 138.78 (C-7a), 137.99 (C-4), 135.57 (C-2), 133.93 (C-5'), 133.89

(C-5''), 131.91 (C-3', C-3''), 131.21 (C-3a), 121.55 (C-4'), 121.16 (C-4''), 120.55 (C-6''), 120.21 (C-2''), 119.91 (C-6'), 119.52 (C-2'), 114.85 (CN), 110.38 (C-7), 109.77 (C-5), 52.18 (COOCH<sub>3</sub>), 51.97 (COOCH<sub>3</sub>).

### Σύνθεση της 2,6-διβρωμο-4-χλωροανιλίνης (30)

Σε παγόμορφο οξικό οξύ (50 mL) προστίθενται 4-χλωροανιλίνη (**29**) (1.28 g, 10.04 mol) και *N*-βρωμοσουκινιμίδιο (3.57 g, 20.08 mmol) και το μίγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Μετά το πέρας της αντίδρασης προστίθεται στο μίγμα νερό (200 mL) και το στερεό που σχηματίζεται διηθείται υπό κενό και εκπλένεται περαιτέρω με νερό (3x 50 mL) για να ληφθούν 2.83 g του **30** (99%).

Σ.τ.: 94-96 °C (MeOH); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ (ppm): 7.38 (s, 2H, H-3, H-5), 4.54 (s, D<sub>2</sub>O exch., 2H, NH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) δ (ppm): 141.02 (C-1), 131.29, (C-3, C-5), 122.71 (C-4), 108.45 (C-2).

### Σύνθεση της 2,6-διβρωμο-4-χλωρο-*N*-(4-χλωρο-5H-1,2,3-διθειαζολ-5-υλιδεν)ανιλίνης (31)

Σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (100 mL) προστίθενται το **30** (1.15 g, 4.03 mmol) και το αλάτι του Appel (870 mg, 4.19 mmol) και το μίγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Στη συνέχεια προστίθεται πυριδίνη (672 μL, 8.38 mmol) και το μίγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες ακόμα. Μετά το πέρας της αντίδρασης η οργανική φάση πλένεται με νερό (3x50 mL), ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το ελαιώδες υπόλειμμα διαχωρίζεται με χρωματογραφία στήλης με κινητή φάση κυκλοεξάνιο για να παραληφθούν 3.35 g του **31** (83%).

Τσίχλα; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ (ppm): 7.65 (s, 2H, H-3, H-5); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) δ (ppm): 162.78, 158.66, 144.50, 135.11, 118.45, 117.90.

### Σύνθεση του 4-βρωμο-6-χλωρο-1,3-βενζοθειαζολο-2-καρβονιτριλίου (32)

Σε γυάλινο σωλήνα προστίθεται το παράγωγο **31** (1.55 g, 4.02 mmol) και CuI (1.53 g, 8.05 mmol) σε άνυδρη πυριδίνη (10 mL), ο σωλήνας σφραγίζεται και τοποθετείται στην συσκευή μικροκυμάτων (Start E, Milestone). Χρησιμοποιείται ακτινοβολία 200 W, η θερμοκρασία αυξάνεται από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος στους 120°C και το μίγμα της αντίδρασης παραμένει στη θερμοκρασία αυτή για 15 λεπτά. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα συμπυκνώνεται υπό πίεση και το υπόλειμμα που λαμβάνεται κατεργάζεται με διχλωρομεθάνιο (50 mL), διηθείται από κελίτη υπό κενό και εκπλένεται με διάλυμα θειοθειικού νατρίου (2x20 mL). Το εκχύλισμα συμπυκνώνεται υπό πίεση, φέρεται σε χρωματογραφία στήλης και καθαρίζεται με διαλύτη έκλουσης κυκλοεξάνιο/οξικό αιθυλεστέρα 8:1 για να ληφθούν 813 mg του **32** (74%).

Σ.τ.: 142-143 °C (EtOAc);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 7.86 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H), 7.79 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)  $\delta$  (ppm): 144.25, 132.05, 131.43, 130.25, 126.84, 115.27, 114.19, 106.91.

### Σύνθεση του 6-χλωρο-4-[[2-(μεθοξυκαρβονυλ)φαινυλ]αμινο]-1,3-βενζοθειαζολο-2-καρβονιτριλίου (33)

Σε τολουόλιο προστίθενται το **32** (1.10 g, 4.02 mmol), ανθρακικό καίσιο (2.64 g, 8.10 mmol), Pd(dbA)<sub>2</sub> (140 mg, 0.24 mmol) και x-phos (60 mg, 0.13 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται στους 110°C για 3 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης το στερεό υπόλειμμα διηθείται υπό κενό και εκπλένεται με οξικό αιθυλεστέρα (2x50 mL). Το διήθημα εκπλένεται με νερό (2x50 mL) και η οργανική στοιβάδα ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θεικού νατρίου και συμπυκνώνεται υπό κενό. Στο στερεό υπόλειμμα προστίθεται μεθανόλη (20 mL) και το μίγμα διηθείται υπό κενό για να παραληφθούν 1.20 g του **33** (87%).

Σ.τ.: 210-212 °C (EtOAc);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta$  (ppm): 10.61 (s,  $\text{D}_2\text{O}$  exch., 1H, NH), 8.08 (dd,  $J = 8.0, 1.5$  Hz, 1H, H-3'), 7.69 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, H-6'), 7.57 (d,  $J = 1.6$  Hz, 1H, H-7), 7.54 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H, H-5'), 7.39 (d,  $J = 1.7$  Hz, 1H, H-5), 7.03 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H, H-4'), 3.96 (s, 3H,  $\text{COOCH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)  $\delta$  (ppm): 168.22 ( $\text{COOCH}_3$ ), 143.36 (C-1'), 142.39 (C-6), 138.78 (C-7a), 137.49 (C-4), 136.62 (C-3a), 134.24 (C-5'), 134.09 (C-2), 132.26 (C-3'), 121.19 (C-4'), 117.33 (C-6'), 116.65 (C-2'), 113.03 (CN), 111.90 (C-5), 111.51 (C-7), 52.51 ( $\text{COOCH}_3$ ).

### Σύνθεση του 6-χλωρο-4-[[2-(μεθοξυκαρβονυλ)φαινυλ]αμινο]-1,3-βενζοθειαζολο-2-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα (34)

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του **10**, με πρώτη ύλη το **33**. Απόδοση: 95%.

Σ.τ. 245-249 °C (EtOAc);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 10.62 (s,  $\text{D}_2\text{O}$  exch., 1H, NH), 8.06 (dd,  $J = 8.0, 1.6$  Hz, 1H, H-3'), 7.69 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, H-6'), 7.55 – 7.48 (m, 2H, H-5', H-7), 7.41 (d,  $J = 1.7$  Hz, 1H, H-5), 6.98 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H, H-4'), 4.07 (s, 1H,  $\text{COOCH}_3$ ), 3.96 (s, 1H, ,  $\text{COOCH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz)  $\delta$  (ppm): 168.21 ( $\text{COOCH}_3$ ), 143.36 (C-1'), 142.58 (C-6), 139.04 (C-7a), 137.53 (C-4), 136.62 (C-3a), 134.35 (C-5'), 134.17 (C-2), 132.29 (C-3'), 121.22 (C-4'), 117.32 (C-6'), 116.55 (C-2'), 113.01 (C-7), 112.70 (C-5), 54.12 ( $\text{COOCH}_3$ ), 52.49 ( $\text{COOCH}_3$ ).

### Σύνθεση του 4-[[2-(μεθοξυκαρβονυλ)φαινυλ]αμινο]-1,3-βενζοθειαζολο-2-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα (35)

Σε γυάλινο σωλήνα προστίθεται το παράγωγο **34** (200 mg, 0.58 mmol), παλλάδιο επί άνθρακα 10% (70 mg), μυρμικικό αμμώνιο (183 mg, 2.9 mmol) και τριαιθυλαμίνη (390  $\mu\text{L}$ , 2.8 mmol) σε μίγμα άνυδρη μεθανόλης (10 mL), άνυδρου

τετραϋδροφουρανίου (2 mL), ο σωλήνας σφραγίζεται και τοποθετείται στην συσκευή μικροκυμάτων (Start E, Milestone). Χρησιμοποιείται ακτινοβολία 250 W, η θερμοκρασία αυξάνεται από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος στους 105°C και το μίγμα της αντίδρασης παραμένει στη θερμοκρασία αυτή για 45 λεπτά. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα διηθείται από κελλίτη υπό κενό και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το στερεό υπόλειμμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα (100 mL) και νερό (40 mL) και η οργανική φάση ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και συμπυκνώνεται υπό κενό για να παραληφθούν 170 mg του εστέρα **35** (94%).

Σ.τ.: 256-259 °C (EtOAc): <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz) δ (ppm): 10.56 (b, D<sub>2</sub>O exch., NH), 8.05 (dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1H, H-3'), 7.67 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-6'), 7.62 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-5), 7.53 – 7.43 (m, 3H, H-6, H-7, H-5'), 6.92 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-6'), 4.07 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>) 3.96 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR CDCl<sub>3</sub>, 151 MHz) δ (ppm): 168.46 (C=O), 165.85 (C=O), 144.45 (C-1'), 144.21 (C-3a), 138.26 (C-4), 136.87 (C-7a), 134.11 (C-2), 134.08 (C-5'), 132.16 (C-3'), 129.93 (C-6), 120.12 (C-4'), 116.59 (C-6'), 115.76 (C-2'), 112.99 (C-7), 111.80 (C-5), 53.47 (COOCH<sub>3</sub>), 52.36 (COOCH<sub>3</sub>).

#### Σύνθεση του 4-{[2-(καρβοξυ)φαινυλ]αμινο}-1,3-βενζο[d]θειαζολο-2-καρβοξυλικού οξέος (**36**)

Σε μίγμα μεθανόλης (10 mL), τετραϋδροφουρανίου (5mL) προστίθενται το παράγωγο **35** (376 mg, 1 mmol) και κορεσμένο υδατικό διάλυμα καυστικού καλίου (5 mL) και το μίγμα θερμαίνεται στους 60°C για 2 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα οξινίζεται έως pH 3 και εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και συμπυκνώνεται για να παραληφθούν 293 mg του οξέος **36** (84%).

Σ.τ.: 269-275 °C (THF); <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz) δ (ppm) :10.49 (br, D<sub>2</sub>O exch., 1H, NH), 7.91 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-3'), 7.64 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-6'), 7.58 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-5), 7.53 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-7), 7.44 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, H-6, H-5'), 6.88 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-4'); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 151 MHz) δ (ppm): 168.57 (COOH), 164.41 (COOH), 158.87 (C-2), 146.52 (C-1'), 145.15 (C-3a), 137.13 (C-7a), 136.26 (C-3'), 135.97 (C-5'), 134.91 (C-4), 121.76 (C-6), 121.30 (C-4'), 120.21 (C-7), 119.25 (C-5), 119.33 (C-2'), 117.05 (C-6').

#### Σύνθεση του 6-χλωρο-4-{[2-(καρβοξυλ)φαινυλ]αμινο}-1,3-βενζοθειαζολο-2-καρβοξυλικού οξέος (**37**)

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του οξέος **36**, με πρώτη ύλη τον εστέρα **34**. Απόδοση: 85%.

Σ.τ.: 258-262 °C (THF); <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz) δ (ppm): 10.58 (s, 1H, NH), 8.01 (dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1H, H-3'), 7.75 (s, 1H, H-5), 7.69 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-6'), 7.58 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H, H-5'), 7.46 (s, 1H, H-7), 7.02 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-

4');  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 151 MHz)  $\delta$  (ppm): 168.46 (COOH), 164.28 (COOH), 159.23 (C-2), 146.35 (C-1'), 145.87 (C-3a), 141.20 (C-6), 137.41 (C-7a), 136.11 (C-3'), 135.88 (C-5'), 135.29 (C-4), 121.52 (C-4'), 119.62 (C-7), 118.39 (C-5), 117.46 (C-2'), 116.85 (C-6').

#### Σύνθεση του 5-χλωρο-6-οξο-6,11-διϋδροθειαζολο[5,4-c]ακριδιν-2-καρβοξυλικού οξέος (38)

Σε πολυφωσφορικό οξύ (10mL) προστίθεται το παράγωγο **37** (348 mg, 1 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται στους 80°C για 3 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης προστίθεται νερό και η υδατική στοιβάδα εκχυλίζεται με μίγμα οξικού αιθυλεστέρα/τετραϋδροφουρανίου. Η οργανική φάση ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και συμπυκνώνεται για να παραληφθούν 260 mg του οξέος **38** (79%).

Σ.τ.: 270 °C (THF);  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 8.24 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H, H-10), 8.15 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H, H-7), 8.05 (s, 1H, H-4), 7.77 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H, H-9), 7.36 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H, H-8);  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 151 MHz)  $\delta$  (ppm): 176.15 (COOH), 161.01 (C-2), 155.78, 141.99 (C-10a), 141.26, 140.42 (C-6), 136.54, 135.83 (C-5), 133.31 (C-9), 125.71 (C-8), 125.07 (C-10), 122.19 (C-7), 121.57 (C-6a), 118.16, 114.54 (C-4).

#### Σύνθεση του N-[2-(διμεθυλαμινο)αιθυλ]-6-οξο-5-χλωρο-6,11-διϋδροθειαζολο[5,4-c]ακριδιν-2-καρβοξαμιδίου (39a)

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση της αμίνης **12a**, με πρώτη ύλη το οξύ **38**. Απόδοση: 71%.

Έλαιο;  $^1\text{H}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 8.50 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H, H-10), 8.30 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H, H-7), 8.12 (b, D<sub>2</sub>O exch., 1H, CONH), 8.00 (s, 1H, H-4), 7.83 (td,  $J = 7.5, 1.2$  Hz, 1H, H-9), 7.66 (td,  $J = 7.6, 1.1$  Hz, 1H, H-8), 3.75 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.94 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.59 (s, 6H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>);  $^{13}\text{C}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 151 MHz)  $\delta$  (ppm): 164.14 (C-2), 159.63 (C=O), 149.11, 148.44 (C-10a), 144.00, 143.90 (C-5), 142.25 (C-6), 139.31, 131.24 (C-9), 131.05 (C-10), 127.52 (C-8), 124.61 (C-7), 124.52 (C-6a), 123.05, 121.58 (C-4), 57.82 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 45.35 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 37.57 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

#### Σύνθεση του N-[2-(διμεθυλαμινο)προπυλ]-6-οξο-5-χλωρο-6,11-διϋδροθειαζολο[5,4-c]ακριδιν-2-καρβοξαμιδίου (39b)

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση της αμίνης **12b**, με πρώτη ύλη το οξύ **38**. Απόδοση: 58%.

Έλαιο;  $^1\text{H}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 8.45 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H, H-10), 8.33 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H, H-7), 8.05 (br, D<sub>2</sub>O exch., 1H, CONH), 8.01 (s, 1H, H-4), 7.88 (td,  $J = 7.6, 1.2$  Hz, 1H, H-9), 7.71 (td,  $J = 7.7, 1.2$  Hz, 1H, H-8), 3.69 (t,  $J = 6.7$

Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.91 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.56 (s, 6H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.97-1.92 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ );  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz)  $\delta$  (ppm): 164.24 (C=O), 159.69, 149.12, 148.24 (C-10a), 144.09, 143.79 (C-5), 142.15 (C-6), 139.21, 131.14 (C-9), 131.01 (C-10), 127.42 (C-8), 124.44 (C-7), 124.31 (C-6a), 122.95, 121.48 (C-4), 57.73 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 45.33 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 37.57 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 27.41 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ).

#### Σύνθεση της (2-[[2-(υδροξυμεθυλ)-βενζοθειαζ-4-ολ]αμινο}φαινυλ)μεθανόλης (40)

Σε τρίλαιμη σφαιρική εντός της οποίας περιέχεται άνυδρο τατραϋδροφουράνιο (30 mL) προστίθενται ο εστέρας **35** (380 mg, 1.01 mmol) και νατριοβοριοϋδρίδιο (420 mg, 11.05 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται στους 65°C. Στη συνέχεια προστίθεται στάγδην άνυδρη μεθανόλη (10 mL) και το μίγμα θερμαίνεται για ακόμα 2 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης προστίθεται υδατικό διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου (590 mg, 11.13 mmol) και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση για 1 ώρα. Το μίγμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα (70 mL) και η οργανική στοιβάδα ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με κινητή φάση κυκλοεξάνιο/οξικό αιθυλεστέρα 3:1 για να παραληφθούν 236 mg του παραγώγου **40** (73%).

Σ.τ.: 198-205 °C (EtOAc);  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, MeOD)  $\delta$  (ppm): 7.53 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H-3'), 7.39 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H, H-6'), 7.36 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H-5), 7.30 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H, H-6), 7.22 (td,  $J = 7.9, 1.3$  Hz, 1H, H-5'), 7.12 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H-7), 7.04 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H, H-4'), 4.98 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 4.69 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, MeOD)  $\delta$  (ppm): 144.17, 142.36, 139.78 (C-3a), 136.93 (C-1'), 133.37, 130.50 (C-6'), 129.54 (C-5'), 126.90 (C-4'), 123.36 (C-3'), 121.05 (C-6), 112.62 (C-5), 109.54 (C-7), 63.61 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 63.03 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ).

#### Σύνθεση της 4-[[2-(φορμυλφαινυλ)αμινο]-1,3-βενζοθειαζολο-2-καρβοξαλδεϋδης (41)

Σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (100 mL) προστίθενται η αλκοόλη **40** (650 mg, 2.03 mmol) και υπό ψύξη PCC (1.75 g, 8.12 mmol) και το μίγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου υπό ατμόσφαιρας αργού για 2 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα διηθείται από κελλίτη υπό κενό και ο διαλύτης συμπυκνώνεται υπό κενό. Το στερεό υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με κινητή φάση κυκλοεξάνιο για να παραληφθούν 380 mg του παραγώγου **41** (59%).

Σ.τ.: 134-138 °C (MeOH);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta$  (ppm): 11.10 (b,  $\text{D}_2\text{O}$  exch., 1H, NH), 10.20 (s, 1H, CHO), 10.01 (s, 1H, CHO), 7.71 – 7.65 (m, 3H, H-3', H-6', H-6), 7.57 (dd,  $J = 4.2, 1.6$  Hz, 1H, H-7), 7.53 – 7.48 (m, 2H, H-5', H-6), 7.03 (td,  $J = 7.6, 0.9$  Hz, 1H, H-4');  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz)  $\delta$  (ppm): 194.48



(CHO), 185.51 (CHO), 163.77 (C-2), 146.00 (C-3a), 144.86 (C-1'), 137.97 (C-4), 137.69 (C-7a), 137.00 (C-3'), 135.59 (C-5'), 129.50 (C-6), 121.77 (C-2'), 119.53 (C-4), 115.39 (C-7), 114.84 (C-6'), 113.51 (C-5).

#### Σύνθεση θειαζολο[5,4-c]ακριδινο-2-καρβοξαλδεϋδης (42)

Σε τριφθοροξικό οξύ (5 mL) προστίθεται η αλδεϋδη **41** (320 mg, 1.01 mmol) και το μίγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης ο διαλύτης εκδιώνεται υπό κενό και το ελαιώδες υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με κινητή φάση κυκλοεξάνιο/οξικό αιθυλεστέρα 3:1 για να παραληφθούν του παραγώγου **42** (69%).

Σ.τ.: 187-190 °C (MeOH); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ (ppm): 10.43 (s, 1H, CHO), 8.89 (s, 1H, H-6), 8.60 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-10), 8.08 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H-5, H-7), 7.98 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H-4), 7.91 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-9), 7.66 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-8); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) δ (ppm): 185.45 (CHO), 164.65 (C-2), 150.71 (C-11b), 149.14 (C-10a), 144.66 (C-11a), 139.70 (C-3a), 137.43 (C-6), 131.52 (C-9), 130.31 (C-10), 129.98 (C-5), 128.30 (C-7), 127.07 (C-6a), 126.94 (C-8), 125.66 (C-5a), 119.47 (C-4).

#### Σύνθεση του θειαζολο[5,4-c]ακριδινο-2-καρβονιτριλίου (43)

Σε ακετονιτριλίο (25 mL) προστίθενται η ακριδίνη **42** (290 mg, 1.03 mmol), νατραζίδιο (67 mg, 1.03 mmol) και τριφθορομεθανοσουλφονικό οξύ (182 μL, 2.06 mmol) και το μίγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Μετά το πέρας της αντίδρασης προστίθεται οξικός αιθυλεστέρας (75 mL) και η οργανική φάση εκπλένεται με διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου (2x 40 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου, συμπυκνώνεται υπό κενό και το στερεό υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με κινητή φάση κυκλοεξάνιο/οξικό αιθυλεστέρα 5:1 για να παραληφθούν 265 mg του νιτριλίου **43** (87%).

Σ.τ.: 221-227 °C (MeOH); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ (ppm): 8.92 (s, 1H, H-6), 8.57 (d, 1H, H-10), 8.15 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H-5), 8.09 (dd, *J* = 8.3, 0.6 Hz, 1H, H-7), 7.95 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H-4), 7.93 (t, 1H, H-9), 7.68 (t, 1H, H-8); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) δ (ppm): 149.76 (C-11b), 149.37 (C-10a), 144.01 (C-11a), 138.22 (C-3a), 137.28 (C-6), 135.46 (C-2), 131.72 (C-9), 130.40 (C-10), 130.37 (C-5), 128.28 (C-7), 127.20 (C-8), 125.65 (C-5a), 118.17 (C-4), 113.12 (CN).

#### Σύνθεση της N-[2-(διμεθυλαμινο)αιθυλ]-θειαζολο[5,4-c]ακριδινο-2-καρβοξαμιδίνης (44a)

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **9a**, με πρώτη ύλη το **43**. Απόδοση: 83%.

Έλαιο:  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta$  (ppm): 8.86 (s, 1H, H-6), 8.48 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H, H-10), 8.05 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, H-7), 7.98 – 7.93 (m, 2H, H-4, H-5), 7.86 (t  $J = 7.6$  Hz, 1H, H-9), 7.61 (t  $J = 7.7$  Hz, 1H, H-8), 3.50 (t,  $J = 6.1$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.70 (t,  $J = 6.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.36 (s, 6H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ );  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz)  $\delta$  (ppm): 166.18 (C-2), 152.94 (C=NH), 149.26 (C-5a), 148.96 (C-10a), 144.35 (C-11a), 138.44 (C-3a), 137.10 (C-6), 130.87 (C-9), 130.17 (C-10), 128.24 (C-7), 127.18 (C-5), 126.70 (C-6a), 126.36 (C-8), 125.62 (C-11b), 119.72 (C-4), 70.71 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ) 59.43 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 45.75 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ).

#### Σύνθεση της N-[3-(διμεθυλαμινο)προπυλ]-θειαζολο[5,4-c]ακριδινο-2-καρβοξαμιδίνης (44b)

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **44a** με χρήση 3-διμεθυλαμινο-1-προπυλαμίνης. Απόδοση: 76%.

Έλαιο:  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 8.86 (s, 1H, H-6), 8.47 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H, H-10), 8.05 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, H-7), 7.95 (s, 2H, H-4, H-5), 7.86 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H, H-9), 7.61 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H, H-8), 3.47 (t,  $J = 6.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.35 (q,  $J = 6.4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.28 (s, 6H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.96 – 1.88 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ );  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz)  $\delta$  (ppm): 166.34 (C-2), 153.00 (C=NH), 149.21 (C-5a), 148.94 (C-10a), 144.37 (C-11a), 138.52 (C-3a), 137.11 (C-6), 130.83 (C-9), 130.17 (C-10), 128.24 (C-7), 127.14 (C-5), 126.68 (C-6a), 126.33 (C-8), 125.63 (C-11b), 119.75 (C-4), 68.12 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ) 56.38 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 45.12 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 29.82 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ).

#### Σύνθεση του θειαζολο[5,4-c]ακριδινο-2-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα (45)

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **10**, μόνο που ως πρώτη ύλη χρησιμοποιήθηκε το **43**. Απόδοση: 85%.

Σ.τ.: 212-219 °C (MeOH);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 8.85 (s, 1H, H-6), 8.55 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H, H-10), 8.04 (m,  $J = 8.6$ , 6.2 Hz, 2H, H-4, H-7), 7.94 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H, H-5), 7.87 (t,  $J = 7.5$  Hz 1H, H-9), 7.62 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H, H-8), 4.11 (s, 3H,);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)  $\delta$  (ppm): 161.38 ( $\text{COOCH}_3$ ), 157.33 (C-2), 149.03 (C-3a), 144.44 (C-10a), 139.36 (C-5a), 136.98 (C-6), 131.08 (C-9), 130.46 (C-10), 129.02 (C-7), 128.16 (C-5), 126.93 (C-6a), 126.68 (C-8), 125.52 (C-11b), 119.09 (C-4), 53.54 ( $\text{COOCH}_3$ ).

#### Σύνθεση του N-[2-(διμεθυλαμινο)αιθυλ]-θειαζολο[5,4-c]ακριδινο-2-καρβοξαμιδίου (46a)

Σε γυάλινο σωλήνα προστίθεται το παράγωγο **45** (74 mg, 0.25 mmol), N,N-διμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (140  $\mu\text{L}$ , 1.25 mmol) και άνυδρη μεθανόλη ( 12 mL), ο σωλήνας σφραγίζεται και τοποθετείται στην συσκευή μικροκυμάτων (Start E, Milestone). Χρησιμοποιείται ακτινοβολία 250 W, η θερμοκρασία αυξάνεται από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος στους 105°C και το μίγμα της αντίδρασης παραμένει στη θερμοκρασία αυτή για 17 λεπτά. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα

συμπυκνώνεται υπό κενό και το στερεό υπόλειμμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα (100 mL) και νερό (3x40 mL) και η οργανική φάση ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θεικού νατρίου και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το ελαιώδες υπόλειμμα καθαρίζεται περεταίρω με χρωματογραφία στήλης με στατική φάση alumina και κινητή που ξεκινάει από διχλωρομεθάνιο και προοδευτικά τελειώνει σε μίγμα διχλωρομεθάνιο/μεθανόλη 10:1 για να παραληφθούν 71 mg του αμιδίου **46a**. Απόδοση: 84%.

Έλαιο;.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 8.84 (s, 1H, H-6), 8.48 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H, H-10), 8.16 (b,  $\text{D}_2\text{O}$  exch., 1H, NH), 8.04 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, H-7), 7.95 (q,  $J = 8.9$  Hz, 2H, H-4, H-5), 7.89 – 7.85 (m, 1H, H-9), 7.61 (dd,  $J = 11.0, 3.9$  Hz, 1H, H-8), 3.66 (dd,  $J = 12.0, 6.1$  Hz, 2H), 2.62 (t,  $J = 6.3$  Hz, 2H), 2.34 (s, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)  $\delta$  (ppm): 163.65 (C=O), 159.99 (C-2), 149.41 (C-3a), 148.86 (C-11a), 144.34 (C-10a), 139.39 (C-5a), 137.19 (C-6), 131.12 (C-9), 129.97 (C-10), 128.24 (C-7), 127.84 (C-5), 126.79 (C-6a), 126.57 (C-8), 125.56 (C-11b), 119.62 (C-4), 58.04 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 45.41 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 37.62 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ).

#### Σύνθεση του N-[3-(διμεθυλαμινο)προπυλ]-θειαζολο[5,4-c]ακριδινο-2-καρβοξαμιδίου (46b)

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του αμιδίου **46a** με χρήση 3-διμεθυλαμινο-1-προπυλαμίνης. Απόδοση: 79%.

Έλαιο;.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 8.89 (s, 1H, H-6), 8.46 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H, H-10), 8.33 (b,  $\text{D}_2\text{O}$  exch., 1H, NH) 8.07 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, H-7), 8.02 - 7.95 (m, 2H, H-4, H-5), 7.88 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H, H-9), 7.63 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H, H-8), 3.62 (t,  $J = 6.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.51 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.34 (s, 6H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.92 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ );  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz)  $\delta$  (ppm): 163.80 (C=O), 159.97 (C-2), 149.49 (C-3a), 148.97 (C-11a), 144.50 (C-10a), 139.44 (C-5a), 137.20 (C-6), 131.10 (C-9), 130.09 (C-10), 128.31 (C-7), 127.86 (C-5), 126.86 (C-6a), 126.59 (C-8), 125.65 (C-11b), 119.72 (C-4), 57.48 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 45.43 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 38.70 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 27.33 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ).

#### Σύνθεση του (2-[[2-(υδροξυμεθυλ)-6-χλωρο-βενζοθειαζ-4-ολ]αμινο]φαινυλ)μεθανόλης (47)

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **34**, με πρώτη ύλη το παράγωγο **34**. Απόδοση: 72%.

Σ.τ.: 223-228 °C (EtOAc);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{MeOD-d}_4$ , 600 MHz)  $\delta$  (ppm): 7.50 (dd,  $J = 7.9, 0.7$  Hz, 1H, H-3'), 7.41 (dd,  $J = 7.5, 1.0$  Hz, 1H, H-6'), 7.35 (td,  $J = 7.7, 1.5$  Hz, 1H, H-5'), 7.32 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H, H-5), 7.11 (td, 1H, H-4'), 6.94 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H), 4.97 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 4.68 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{MeOD-d}_4$ , 50 MHz)  $\delta$

(ppm): 144.61, 143.19 (C-6), 142.35, 138.35 (C-3a), 136.83 (C-1'), 133.27, 130.69 (C-6'), 129.79 (C-5'), 126.90 (C-4'), 122.68 (C-3'), 111.49 (C-5), 108.73 (C-7), 63.13 (CH<sub>2</sub>OH), 62.63 (CH<sub>2</sub>OH).

#### Σύνθεση της 6-χλωρο-4-[(2-φορμυλφαινυλ)αμινο]-1,3-βενζοθειαζολο-2-καρβοξαλδεϋδης (48)

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **41**, με πρώτη ύλη το παράγωγο **47**. Απόδοση: 49%.

Σ.τ.: 129-135 °C (MeOH); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ (ppm): 11.17 (s, D<sub>2</sub>O exch., 1H, NH), 10.22 (s, 1H, CHO), 10.05 (s, 1H, CHO), 7.76 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, H-3', H-6'), 7.68 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H-4), 7.63 (td, *J* = 8.1, 0.8 Hz, 1H, H-5'), 7.56 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, H-6), 7.14 (td, *J* = 8.1, 0.8 Hz, 1H, H-4'); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 151 MHz) δ (ppm): 194.36 (CHO), 185.38 (CHO), 163.65 (C-2), 145.87 (C3-a), 144.74 (C-1'), 137.64 (C-4), 137.37 (C-7a), 136.88 (C-3'), 135.46 (C-5'), 127.37 (C-6), 121.65 (C-2'), 119.41 (C-4'), 114.27 (C-7), 114.71 (C-6'), 112.38 (C-5).

#### Σύνθεση της 5-χλωρο-θειαζολο[5,4-*c*]ακριδινο-2--καρβοξαλδεϋδης (49)

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **42**, μόνο που ως πρώτη ύλη χρησιμοποιήθηκε το **48**. Απόδοση: 55%.

Σ.τ.: 185-186 °C (MeOH); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz) δ (ppm): 10.42 (s, 1H, CHO), 9.34 (s, 1H, H-6), 8.61 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-7), 8.20 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-10), 8.16 (s, 1H, H-4), 7.99 (td, *J* = 8.2 1.6 Hz 1H, H-8), 7.74 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-9); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 150 MHz) δ (ppm): 185.16 (CHO), 164.87 (C-2), 149.91 (C-10a), 149.24 (C-11b), 143.98 (C-5), 138.63 (C-5a), 135.65 (C-6), 133.68 (C-11a), 132.44 (C-9), 130.05 (C-10), 128.85 (C-7), 127.61 (C-8), 127.05 (C-6a), 123.89 (C-3a), 119.17 (C-4).

#### Σύνθεση του 5-χλωρο-θειαζολο[5,4-*c*]ακριδινο-2-καρβονιτριλίου (50)

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **43**, με πρώτη ύλη το **49**. Απόδοση: 90%.

Σ.τ.: 179-183 °C (MeOH); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz) δ (ppm): 9.27 (s, 1H H-6), 8.55 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-7), 8.16 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-10), 8.06 (s, 1H H-4), 7.97 (td, *J* = 7.4, 0.9 Hz, 1H, H-8), 7.73 (td, *J* = 7.6, 1.3 Hz, 1H, H-9); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 150 MHz) δ (ppm): 149.39 (C-10a), 148.87 (C-11b), 143.12 (C-5), 137.11 (C-5a), 135.64 (C-2), 135.37 (C-6), 134.13 (C-11a), 132.55 (C-9), 130.06 (C-10), 128.77 (C-7), 127.81 (C-8), 127.10 (C-6a), 123.78 (C-3a), 117.77 (C-4), 112.80 (CN).

**Σύνθεση της N-[2-(διμεθυλαμινο)αιθυλ]-5-χλωρο-θειαζολο[5,4-c]ακριδινό-2-καρβοξαμιδίνης (51a)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **9a**, με πρώτη ύλη το **50**. Απόδοση: 81%.

Έλαιο;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 9.28 (s, 1H, H-6), 8.48 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H, H-7), 8.18 – 8.12 (m, 2H, H-10, NH), 8.09 (s, 1H, H-4), 7.92 (t, 1H, H-H-8), 7.68 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H-9), 3.36 (q,  $J = 6.9$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.68 (t,  $J = 6.1$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.35 (s, 6H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ );  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz)  $\delta$  (ppm): 166.54 (C-2), 153.90 (C-2), 149.07 (C-10a), 148.50 (C-11b), 143.77 (C-5), 137.37 (C-3a), 135.14 (C-6), 131.69 (C-9), 130.39 (C-11a), 129.92 (C-10), 128.75 (C-7), 126.98 (C-8), 126.65 (C-6a), 123.66 (C-5a), 119.40 (C-4), 70.94 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 58.53 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ) 45.77 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ).

**Σύνθεση της N-[3-(διμεθυλαμινο)προπυλ]-5-χλωρο-6-οξο-6,11-διϋδροθειαζολο[5,4-c]ακριδινό-2-καρβοξαμιδίνης (51b)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **51a** με χρήση 3-διμεθυλαμινο-1-προπυλαμίνης. Απόδοση: 66%.

Έλαιο;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 9.28 (s, 1H, H-6), 8.48 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H, H-7), 8.18 – 8.12 (m, 2H, H-10, NH), 8.09 (s, 1H, H-4), 7.92 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H, H-8), 7.68 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H-9), 3.36 (q,  $J = 6.9$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.68 (t,  $J = 6.1$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.35 (s, 6H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.97-1.92 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ );  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz)  $\delta$  (ppm): 166.34 (C-2), 153.90 (C-2), 149.05 (C-10a), 148.51 (C-11b), 143.79 (C-5), 137.38 (C-3a), 135.16 (C-6), 131.72 (C-9), 130.41 (C-11a), 129.96 (C-10), 128.77 (C-7), 126.98 (C-8), 126.66 (C-6a), 123.69 (C-5a), 119.42 (C-4), 70.94 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 57.48 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 45.43 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 27.33 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ).

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

1. World Health Organization; “*Latest world cancer statistics*”; **2013**.
2. European Commission; *World Cancer Day: 10 Facts on EU Action to Fight Cancer*; **2013**.
3. American Cancer Society; “*Cancer facts & figures*”; **2009**.
4. Φώσκολος Γ., Τσοτίνης Α.; *Μαθήματα Φαρμακευτικής Χημείας (I)*; Πανεπιστήμιο Αθηνών, 9-23, **2009**.
5. Semenza, G. L.; *Baffled by Bafilomycin: An Anti-cancer Agent that Induces HIF-1 $\alpha$  Expression*; *Mol. Cell*, 437-439, **2006**.
6. Heeg, S., Doebele, M., von Merder A., Opitz, O. G.; *In vitro transformation models: modeling human cancer*; *Cell Cycle*, 630-634, **2006**.
7. Damjanov I.; *Παθολογία*; Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε., 543-552, **2009**.
8. Παπαδημητρίου Ε.; *Μοριακή Φαρμακολογία*; Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε., Αθήνα, 188-197, **2010**.
9. Goodsell D. S.; *The molecular perspective: DNA topoisomerases*; *Oncologist*, 381-382, **2002**.
10. Wang J. C.; *Interaction between DNA and an Escherichia coli protein  $\omega$* ; *J. Mol. Biol.*, 523-533, **1971**.
11. Pommier Y.; *DNA topoisomerases and cancer*; Humana Press, 2, **2012**.
12. Pommier Y.; *DNA topoisomerases and cancer*; Humana Press, 15, **2012**.
13. Pommier Y.; *DNA topoisomerases and cancer*; Humana Press, 16, **2012**.
14. Tse-Dinh Y. C., Wang J. C.; *Complete nucleotide sequence of the topA gene encoding Escherichia coli DNA topoisomerase I*; *J. Mol. Biol.*, 321-331, **1986**.
15. Trucksis M., Depew R. E.; *Identification and localization of a gene that specifies production of Escherichia coli DNA topoisomerase I*; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2164-2168, **1981**.
16. Kirkegaard K., Pflugfelder G., Wang J. C.; *Cold Spring Harb. Symp; Quant. Biol.*, 411-419, **1984**.
17. Masse E., Drolet M.; *Relaxation of transcription-induced negative supercoiling is an essential function of Escherichia coli DNA topoisomerase I*; *J. Biol. Chem.*, 16654-16658, **1999**.
18. Grishin N. V.; *C-terminal domains of Escherichia coli topoisomerase I belong to the zinc-ribbon superfamily*; *J. Mol. Biol.*, 1165-1177, **2000**.
19. Levine C., Hiasa H., Marians K. J.; *DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities*; *Biochem. Biophys. Acta*, 29-43, **1998**.
20. Hiasa H., Marians K. J.; *Topoisomerase III, but not topoisomerase I, can support nascent chain elongation during theta-type DNA replication*; *J. Biol. Chem.*, 32655-32659, **1994**.

21. Peng H., Mariani K. J.; *The interaction of Escherichia coli topoisomerase IV with DNA*; J. Biol. Chem., 25286-25290, **1995**.
22. Khodrsky A. B., Peter B. J., Schmid M. B., DeRisi J., Botstein D., Brown P. O., Cozzarelli N. R.; *Analysis of topoisomerase function in bacterial replication fork movement: use of DNA microarrays*; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9419-9424, **2000**.
23. Zechiedrich E. L., Khodrsky A. B., Bachellier S., Schneider R., Chen D., Lilley D. M., Cozzarelli N. R.; *Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in Escherichia coli*; J. Biol. Chem., 8103-8113, **2000**.
24. Pommier Y.; *DNA topoisomerases and cancer*; Humana Press, **2012**
25. Pommier Y.; *DNA topoisomerases and cancer*; Humana Press, **2012**
26. Juan C., Wang J., Liu A.A., Whang-Peng J., Knutsen T., Huebner K., Croce C. M., Zhang H., Wang J. C., Liu L. F.; *Human DNA topoisomerase I is encoded by a single-copy gene that maps to chromosome region 20q12-13.2*; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 8910-8913, **1988**.
27. Drake F. H., Hofmann G. A., Bartus H. F., Mattern M. R., Crooke S. T., Mirabelli C. K.; *Biochemical and pharmacological properties of p170 and p180 forms of topoisomerase II*; Biochemistry, 8154-8160, **1989**.
28. Tsai-Pflugfelder M., Liu L. F., Liu A. A., Tewey K. M., Whang-Peng J., Knutsen T., Huebner K., Croce C. M., Wang J. C.; *Cloning and sequencing of cDNA encoding human DNA topoisomerase II and localization of the gene to chromosome region 17q21-22*; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 7177-7181, **1988**.
29. Tan K. B., Dorman T. E., Falls K. M., Chung T. D., Mirabelli C. K., Crooke S. T., Mao J.; *Topoisomerase II $\alpha$  and topoisomerase II $\beta$  genes: characterization and mapping to human chromosomes 17 and 3, respectively*; Cancer Res., 231-234, **1992**.
30. Earnshaw W. C., Halligan B., Cooke C. A., Heck M. M., Liu L. F.; *Topoisomerase II is a structural component of mitotic chromosome scaffolds*; J. Cell Biol., 1706-1715, **1985**.
31. Yang X, Li W, Prescott E. D., Burden S. J., Wang J. C.; *DNA topoisomerase II $\beta$  and neural development*; Science, 131-134, **2000**.
32. Kawasaki K., Minoshima S., Nakato E., Shibuya K., Shintani A., Schmeits J. L., Wang J., Shimizu N. J.; *One-megabase sequence analysis of the human immunoglobulin gene locus*; Genome Res., 250-261, **1997**.
33. Li W., Wang J. C.; *Mammalian DNA topoisomerase III $\alpha$  is essential in early embryogenesis*; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1010-1013, **1998**.
34. Gangloff S., de Massey B., Arthur L., Rothstein R., Fabre F.; *The essential role of yeast topoisomerase III in meiosis depends on recombination*; EMBO J., 1701-1711, **1999**.
35. Wu L., Davies S. L., North P. S., Goulaouic H., Riou J., Turley H., Gatter K. C., Hickson I. D.; *The Bloom's syndrome gene product interacts with topoisomerase III*; J. Biol. Chem., 9636-9644, **2000**.
36. Pommier Y.; *DNA topoisomerases and cancer*; Humana Press, 120, **2012**

37. Castano I. B., Brzoska P. M., Sadoff B. U., Chen H., Christman M. F.; *Mitotic chromosome condensation in the rDNA requires TRF4 and DNA topoisomerase I in Saccharomyces cerevisiae*; Genes Dev., 2564-2576, **1996**.
38. Lanza A., Tornaletti S., Rodolfo C., Scanavini M. C., Pedrini A. M.; *Human DNA topoisomerase I-mediated cleavages stimulated by ultraviolet light-induced DNA damage*; J. Biol. Chem., 6978-6986, **1996**.
39. Pommier Y.; *DNA topoisomerases and cancer*; Humana Press, 54, **2012**
40. Krogh S., Mortensen U. H., Westergaard O., Bonven B. J.; *Eukaryotic topoisomerase I-DNA interaction is stabilized by helix curvature*; Nucleic Acids Res., 1235-1241, **1991**.
41. Leteurtre F., Kohlhagen G., Fesen M. R., Tanizawa A., Kohn K.W., Pommier Y.; *Effects of DNA methylation on topoisomerase I and II cleavage activities*; J. Biol. Chem., 7893-7900, **1994**.
42. Champoux J. J.; *DNA is linked to the rat liver DNA nicking-closing enzyme by a phosphodiester bond to tyrosine*; J. Biol. Chem., 4805-4809, **1981**.
43. Lynn R. M., Bjornsti M. A., Caron P. R., Wang J. C.; *Peptide sequencing and site-directed mutagenesis identify tyrosine-723 as the active site tyrosine of Saccharomyces cerevisiae DNA topoisomerase I*; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 3559-3563, **1989**.
44. Christiansen K., Svejstrup A. B., Andersen A. H., Westergaard O.; *Eukaryotic topoisomerase I-mediated cleavage requires bipartite DNA interaction. Cleavage of DNA substrates containing strand interruptions implicates a role for topoisomerase I in illegitimate recombination*; J. Biol. Chem., 9690-9701, **1993**.
45. Stivers J., Harris T. K., Mildvan A. S.; *Vaccinia DNA Topoisomerase I: Evidence supporting a free rotation mechanism for DNA supercoil relaxation*; Biochemistry, 5212-5222, **1997**.
46. Yang S. W., Burgin A. B. Jr., Huizenga B. N., Robertson C. A., Yao K. C., Nash H. A.; *A eukaryotic enzyme that can disjoin dead-end covalent complexes between DNA and type I topoisomerases*; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 11534-11539, **1996**.
47. Shuman S.; *Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase*; J. Biol. Chem., 32678-32684, **1994**.
48. Chen A. Y., Liu L. F.; *DNA topoisomerases: essential enzymes and lethal targets*; Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 191-218, **1994**.
49. Christiansen K., Westergaard O.; *Characterization of intra- and intermolecular DNA ligation mediated by eukaryotic topoisomerase I. Role of bipartite DNA interaction in the ligation process*; J. Biol. Chem., 721-729, **1994**.
50. Been M. D., Burgess R. R., Champoux J. J.; *Nucleotide sequence preference at rat liver and wheat germ type I DNA topoisomerase breakage sites in duplex SV40 DNA*; Nucleic Acids Res., 3097-3114, **1984**.
51. Pommier Y.; *DNA topoisomerases and cancer*; Humana Press, 57, **2012**



52. Redinbo M. R., Stewart L., Kuhn P., Champoux J. J., Hol W. G. J.; *Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA*; Science, 1504-1513, **1998**.
53. Redinbo M. R., Champoux J. J., Hol W. G. J.; *Novel insights into catalytic mechanism from a crystal structure of human topoisomerase I complex with DNA*; Biochemistry; 6832-6840, **2000**.
54. Chillemi G., Castrignano T., Desideri A.; *Structure and hydration of the DNA-human topoisomerase I covalent complex*; Biophys. J., 490-500, **2001**.
55. Heiland S., Knippers R., and Kunze N.; *The promoter region of the human type-I-DNA-topoisomerase gene. Protein-binding sites and sequences involved in transcriptional regulation*; Eur. J. Biochem., 813-822, **1993**.
56. Kunze N., Yang G., Dolberg M., Sundarp R., Knippers R., Richter A.; *Structure of the human type I DNA topoisomerase gene*; J. Biol. Chem., 9610-9616, **1991**.
57. Romig H., Richter A.; *Expression of the type I DNA topoisomerase gene in adenovirus-5 infected human cells*; Nucleic Acids Res., 801-808, **1990**.
58. Tse-Dinh Y. C., Wong T. W., Goldberg A. R.; *Virus- and cell-encoded tyrosine protein kinases inactivate DNA topoisomerases in vitro*; Nature, 785-786, **1984**.
59. Pommier Y., Kerrigan D., Hartman K. D., Glazer R. I.; *Phosphorylation of mammalian DNA topoisomerase I and activation by protein kinase C*; J. Biol. Chem., 9418-9422, **1990**.
60. Cardellini E., Durban E.; *Phosphorylation of human topoisomerase I by protein kinase C in vitro and in phorbol 12-myristate 13-acetate-activated HL-60 promyelocytic leukaemia cells*; Biochem. J, 303-307, **1993**.
61. Pommier Y., Pourquier P., Fan Y., Strumberg D.; *Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme*; Biochem. Biophys. Acta, 83-105, **1998**.
62. Kasid U. N., Halligan B., Liu L. F., Dritschilo, Smulson M.; *Poly(ADP-ribose)-mediated post-translational modification of chromatin-associated human topoisomerase I. Inhibitory effects on catalytic activity*; J. Biol. Chem., 18687-18692, **1989**.
63. Park J. K., Kim W. J., Park Y. S., Choi H. S., Yu J. E., Han D. M., Park S. D.; *Inhibition of topoisomerase I by NAD and enhancement of cytotoxicity of MMS by inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase in Saccharomyces cerevisiae*; Cell Mol. Biol., 739-744, **1991**.
64. Mattern M. R., Mong S. M., Bartus H. F., Mirabelli C. K., Crooke S. T., Johnson R. K.; *Relationship between the intracellular effects of camptothecin and the inhibition of DNA topoisomerase I in cultured L1210 cells*; Cancer Res., 1793-1798, **1987**.
65. Rose K. M., Szopa J., Han F. S., Cheng Y. C., Richter A., Scheer U.; *Association of DNA topoisomerase I and RNA polymerase I: A possible role for topoisomerase I in ribosomal gene transcription*; Chromosoma, 411-416, **1988**.

66. Gobert C., Bracco L., Rossi F., Olivier M., Tazi J., Lavelle F., Larsen A. K., Riou J. F.; *Modulation of DNA topoisomerase I activity by p53*; *Biochemistry*, 5778-5786, **1997**.
67. Ciavarrà R. P., Goldman C., Wen K. K., Tedeschi B., Castora F. J.; *Heat stress induces hsc70/nuclear topoisomerase I complex formation in vivo: Evidence for hsc70-mediated, ATP-independent reactivation in vitro*; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1751-1755, **1994**.
68. Haluska P. Jr, Saleem A., Edwards T. K., Rubin E. H.; *Interaction between the N-terminus of human topoisomerase I and SV40 large T antigen*; *Nucleic Acids Res.*, 1841-1847, **1997**.
69. Shyamal D. D., Leroy F. L., Vazquez-Abad D., D'Arpa P.; *Ubiquitin-dependent Destruction of Topoisomerase I Is Stimulated by the antitumor drug camptothecin*; *J. Biol. Chem.*, 24159-24164, **1997**.
70. Berger J. M.; *Type II DNA topoisomerases*; *Curr. Opin. Struct. Biol.* 26-32, **1998**.
71. Corbett A. H., Osheroff N.; *When good enzymes go bad: conversion of topoisomerase II to a cellular toxin by antineoplastic drugs*; *Chem. Res. Toxicol.*, 585-597, **1993**.
72. Lynn R., Giaever G., Swanberg S. L., Wang J. C.; *Tandem regions of yeast DNA topoisomerase II share homology with different subunits of bacterial gyrase*; *Science*, 647-649 **1986**.
73. Wyckoff E., Natalie D., Nolan J. M., Lee M., Hsieh T.; *Structure of the Drosophila DNA topoisomerase II gene. Nucleotide sequence and homology among topoisomerases II*; *J. Mol. Biol.*, 1-13, **1989**.
74. Wang J. C.; *DNA topoisomerases*; *Annu. Rev. Biochem.*, 635-692, **1996**.
75. Worland S. T., Wang J. C.; *Inducible overexpression, purification, and active site mapping of DNA topoisomerase II from the yeast Saccharomyces cerevisiae*; *J. Biol. Chem.*, 4412-4416, **1989**.
76. Shiozaki K., Yanagida M.; *Functional dissection of the phosphorylated termini of DNA topoisomerase II*; *J. Cell Biol.*, 1023-1036, **1992**.
77. Crenshaw D. G., Hsieh T.; *Function of the hydrophilic carboxyl terminus of type II DNA topoisomerase from Drosophila melanogaster. II. In vivo studies*; *J. Biol. Chem.*, 21335-21343, **1993**.
78. Mirski S. E., Cole S. P.; *Cytoplasmic localization of a mutant M(r) 160,000 topoisomerase II alpha is associated with the loss of putative bipartite nuclear localization signals in a drug-resistant human lung cancer cell line*; *Cancer Res.*, 2129-2134, **1995**.
79. Cardenas M. E., Dang Q., Glover C. V., Gasser S. M.; *Casein kinase II phosphorylates the eukaryote-specific C-terminal domain of topoisomerase II in vivo*; *EMBO J.*, 1785-1796, **1992**.
80. Wells N. J., Addison C. M., Fry A. M., Ganapathi R., Hickson I. D.; *Serine 1524 is a major site of phosphorylation on human topoisomerase II alpha protein in vivo and is a substrate for casein kinase II in vitro*; *J. Biol. Chem.*, 29746-29751, **1994**.

81. Pommier Y.; *DNA topoisomerases and cancer*; Humana Press, 89, **2012**
82. Osheroff N., Zechiedrich E. L., Gale K. C.; *Catalytic function of DNA topoisomerase II*; *BioEssays*, 269-273, **1991**.
83. Watt P. M., Hickson I. D.; *Structure and function of type II DNA topoisomerases*; *Biochem. J.*, 681-695, **1994**.
84. Osheroff N.; *Eukaryotic topoisomerase II. Characterization of enzyme turnover*; *J. Biol. Chem.*, 9944-9950, **1986**.
85. Osheroff N.; *Role of the divalent cation in topoisomerase II mediated reactions*; *Biochemistry*, 6402-6406, **1987**.
86. Sander M., Hsieh T., Udvardy A., Schedl P.; *Sequence dependence of Drosophila topoisomerase II in plasmid relaxation and DNA binding*; *J. Mol. Biol.*, 219-229, **1987**.
87. Lee M. P., Sander M., Hsieh T.; *Nuclease protection by Drosophila DNA topoisomerase II. Enzyme/DNA contacts at the strong topoisomerase II cleavage sites*; *J. Biol. Chem.*, 21779-21787, **1989**.
88. Thomsen B., Bendixen C., Lund K., Andersen A. H., Sörensen B. S., Westergaard O.; *Characterization of the interaction between topoisomerase II and DNA by transcriptional footprinting*; *J. Mol. Biol.*, 237-244, **1990**.
89. Osheroff N., Shelton E. R., Brutlag D. L.; *DNA topoisomerase II from Drosophila melanogaster. Relaxation of supercoiled DNA*; *J. Biol. Chem.*, 9536-9543, **1983**.
90. Zechiedrich E. L., Osheroff N.; *Eukaryotic topoisomerases recognize nucleic acid topology by preferentially interacting with DNA crossovers*; *EMBO J.*, 4555-4562, 1990.
91. Roca J., Berger J. M., Wang J. C.; *On the simultaneous binding of eukaryotic DNA topoisomerase II to a pair of doublestranded DNA helices*; *J. Biol. Chem.*, 14250-14255, **1993**.
92. Corbett A. H., DeVore R. F., Osheroff N.; *Effect of casein kinase II mediated phosphorylation on the catalytic cycle of topoisomerase II. Regulation of enzyme activity by enhancement of ATP hydrolysis*; *J. Biol. Chem.*, 20513-20518, **1992**.
93. Dang Q., Alghisi G. C., Gasser S. M.; *Phosphorylation of the C-terminal domain of yeast topoisomerase II by casein kinase II affects DNA-protein interaction*; *J. Mol. Biol.*, 10-24 **1994**.
94. Rowe T. C., Chen G. L., Hsiang Y. H., Liu L. F.; *DNA damage by antitumor acridines mediated by mammalian DNA topoisomerase II*; *Cancer Res.*, 2021-2026, **1986**.
95. Andersen A. H., Christiansen K., Zechiedrich E. L., Jensen P. S., Osheroff N., Westergaard O.; *Strand specificity of the topoisomerase II mediated double-stranded DNA cleavage reaction*, *Biochemistry*; 6237-6244, **1989**.
96. Liu L. F., Rowe T. C., Yang L., Tewey K. M., Chen G. L.; *Cleavage of DNA by mammalian DNA topoisomerase II*; *J. Biol. Chem.*, 15365-15370, **1983**.

97. Sander M., Hsieh T.; *Double strand DNA cleavage by type II DNA topoisomerase from Drosophila melanogaster*; J. Biol. Chem., 8421-8428, **1983**.
98. Muller M. T., Spitzner J. R., Di Donato J. A., Mehta V. B., Tsutsui K.; *Single-strand DNA cleavages by eukaryotic topoisomerase II*; Biochemistry, 8369-8379, **1988**.
99. Froelich-Ammon S. J., Gale K. C., Osheroff N.; *Site-specific cleavage of a DNA hairpin by topoisomerase II. DNA secondary structure as a determinant of enzyme recognition/ cleavage*; J. Biol. Chem., 7719-7725, **1994**.
100. Arndt-Jovin D. J., Udvardy A., Garner M. M., Ritter S., Jovin T. M.; *Z-DNA binding and inhibition by GTP of Drosophila topoisomerase II*; Biochemistry, 4862-4872, **1993**.
101. Chung I. K., Mehta V. B., Spitzner J. R., Muller M. T.; *Eukaryotic topoisomerase II cleavage of parallel stranded DNA tetraplexes*; Nucleic Acids Res., 1973-1977, **1992**.
102. Lindsley J. E., Wang J. C.; *Proteolysis patterns of epitopically labeled yeast DNA topoisomerase II suggest an allosteric transition in the enzyme induced by ATP binding*; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 10485-10489, **1991**.
103. Robinson M. J., Osheroff N.; *Effects of antineoplastic drugs on the post-strand-passage DNA cleavage/religation equilibrium of topoisomerase II*; Biochemistry, 1807-1813, **1991**.
104. Corbett A. H., Fernald A. W., Osheroff N.; *Protein kinase C modulates the catalytic activity of topoisomerase II by enhancing the rate of ATP hydrolysis: evidence for a common mechanism of regulation by phosphorylation*; Biochemistry, 2090-2097, **1993**.
105. Pommier Y.; *DNA topoisomerases and cancer*; Humana Press, 90, **2012**
106. Fortune J. M., Osheroff N.; *Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: When enzymes stop being nice*; Prog. In Nucleic Acid Res. and Mol. Biol., 221-253, **1999**.
107. Burden D. A., Osheroff N.; *Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme*; Biochem. Biophys. Acta, 139-154, **1998**.
108. Pommier Y.; *DNA topoisomerases and cancer*; Humana Press, **2012**
109. Denny W. A.; *Deoxyribonucleic acid topoisomerase inhibitors*; 112, **2007**.
110. Lerman, L. S.; *Structural considerations in the interaction of DNA and acridines*; J. Mol. Biol., 18-30, **1961**.
111. Wall M. E.; *Camptothecin and taxol: discovery to clinic*; Med. Res. Rev., 299-314, **1998**.
112. Denny W. A.; *Deoxyribonucleic acid topoisomerase inhibitors*; 113, **2007**.
113. Denny W. A.; *Deoxyribonucleic acid topoisomerase inhibitors*; 116, **2007**.

114. Gupta M., Fujimori A., Pommier Y.; *Eukaryotic topoisomerases I*; Bioch. and Biophys. Acta, 1-14, **1995**.
115. Hsiang Y. H., Hertzberg R., Hecht S., Liu L. F.; *Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I*; J. Biol. Chem., 14873-14878, **1985**.
116. Denny W. A.; *Deoxyribonucleic acid topoisomerase inhibitors*; 114, **2007**.
117. Denny W. A.; *Deoxyribonucleic acid topoisomerase inhibitors*; 115, **2007**.
118. Denny W. A.; *Deoxyribonucleic acid topoisomerase inhibitors*, 118, **2007**.
119. Wilson W. R.; Baguley B. C.; Wakelin L. P. G., Waring M. J.; *Interaction of the antitumour drug m-AMSA (4'-(9-acridinylamino)-methanesulphon-m-anisidide) and related acridines with nucleic acids*; Mol. Pharmacol., 404-414, **1981**.
120. Grove W. R.; Fortner C. L., Wiernik P. H.; *Review of amsacrine, an investigational antineoplastic agent*; Clin. Pharm., 320-326, **1982**.
121. Steuber C. P.; Krischer J., Holbrook T., Camitta B., Land V., Sexauer C., Mahoney D., Weinstein H.; *Therapy of Refractory or Recurrent Childhood Acute Myeloid Leukemia Using Amsacrine and Etoposide with or Without Azacitidine: A Pediatric Oncology Group Randomized Phase II Study*; J. Clin. Oncol., 1521-1525, **1996**.
122. Whitacre C. M.; Zborowska E.; Gordon N. H.; Mackay W.; Berger N. A.; *Topotecan increases topoisomerase II $\alpha$  levels and sensitivity to treatment with etoposide in schedule-dependent process*; Cancer Res., 1425-1428, **1997**.
123. Dittrich C., Coudert B., Paz-Ares L., Caponigro F., Salzberg M., Gamucci T., Paoletti X., Hermans C., Lacombe D., Fumoleau P.; *Phase II study of XR 5000 (DACA), an inhibitor of topoisomerase I and II, administered as a 120-h infusion in patients with non-small cell lung cancer*; Eur. J. Cancer, 330-334, **2003**.
124. Dittrich C., Dieras V., Kerbrat P., Punt C., Sorio R., Caponigro F., Paoletti X., de Balincourt C., Lacombe D., Fumoleau P.; *Phase II study of XR5000 (DACA), an inhibitor of topoisomerase I and II, administered as a 120-h infusion in patients with advanced ovarian cancer*; Invest New Drugs, 347-352, **2003**.
125. Twelves C., Campone M., Coudert B., Van den Bent M., de Jonge M., Dittrich C., Rampling R., Sorio R., Lacombe D., de Balincourt C., Fumoleau P.; *Phase II study of XR5000 (DACA) administered as a 120-h infusion in patients with recurrent glioblastoma multiforme*; Ann. Oncol; 777-780, **2002**.
126. Atwell G. J., Cain B. F., Baguley B. C., Finlay G. J., Denny W. A.; *Potential Antitumor Agents. 43. Synthesis and Biological Activity of Dibasic 9-Aminoacridine-4-carboxamides, a New Class of Antitumor Agent*; J. Med. Chem; 1481-1485. **1984**.

127. Atwell G. J., Rewcastle G. W., Baguley B. C., Denny W. A.; *Potential Antitumor Agents. 50. In Vivo Solid-Tumor Activity of Derivatives of N-[2-(Dimethyl-1-amino)ethyl]acridine-4-carboxamide*; J. Med. Chem.; 664-669, **1987**.
128. Finlay G. J., Riou J. F., Baguley B. C.; *From Amsacrine to DACA (N-[2-(Dimethyl-1-amino)ethyl]acridine-4-carboxamide): Selectivity for Topoisomerases I and II Among Acridine Derivatives*; Eur. J. Cancer; 708-714, **1996**.
129. Spicer J. A., Gamage S. A., Atwell G. J., Finlay G. J., Baguley B. C., Denny W. A.; *Structure-Activity Relationships for Acridine-Substituted Analogues of the Mixed Topoisomerase I/II Inhibitor N-[2-(Dimethylamino)ethyl]acridine-4-carboxamide*; J. Med. Chem., 1919-1929, **1997**.
130. Todd A. K., Adams A., Thorpe J. H., Denny W. A., Wakelin L. P. G., Cardin C. J.; *Major Groove Binding and 'DNA-Induced' Fit in the Intercalation of a Derivative of the Mixed Topoisomerase I/II Poison N-(2-(Dimethylamino)ethyl)acridine-4-carboxamide (DACA) into DNA: X-ray Structure Complexed to d(CG(5-BrU)ACG)<sub>2</sub> at 1.3-Å Resolution*; J. Med. Chem., 536-540, **1999**.
131. Prajapati N. P., Vekariya R. H., Borad M. A., Patel H. D.; *Recent advances in the synthesis of 2-substituted benzothiazoles: a review* RSCAdv., 60176, **2014**.
132. Cortes Cortes E., Munoz Islas P., Martinez Garcia M., Zepeda Romero O. M.; *Synthesis and spectral properties of isomeric [(12-N-Methyl) and (10-N-Methyl)]-11-(o, and p-substituted-anilino)-5H-dibenzo[b,e][1,4]diazepines*; J. Heterocyclic Chem, 1723, **1996**.
133. Brindaban C. R., Arunkati S., Sankar K. G., Ghosh K.; *Catalytic hydrogen transfer reduction using ammonium formate – A review*; J. Indian Chem. Soc., 690-694, **1998**.
134. Munch H., Hansen S. J., Pittelkow M., Christensen B. J., Boas U.; *A new efficient synthesis of isothiocyanates from amines using di-tert-butyl dicarbonate*; Tet. Lett., 3117-3119, **2008**.
135. Koutentis A. P.; *The preparation and characterization of 5-Substituted-4-chloro-1,2,3-dithiazolium Salts and their Conversion into 4-Substituted-3-chloro-1,2,5-thiadiazoles*; Molecules, 346-359, **2005**.
136. Laborie H., Rouillard H., Deau E., Pineau P., Domon L., Chérouvrier J. R., Thiéry V.; *Highlights in 1,2,3-dithiazole chemistry*; St. Cerc. St. CICBIA, 91-102, **2010**.
137. Gupta A., Rawat S.; *Synthesis and Cyclization of Benzothiazole: Review*; J. Curr. Pharm. Res., 13-23, **2010**.
138. Koutentis A. P., Rees W. C., White J. P. A., Williams J. D.; *Conversion of a 1,2,3-dithiazole into a 3H-pyrrole-3-thione and a 3H-pyrrol-3-ylidenephosphorane*; J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 2765-2769, **1998**.

139. Michaelidoy S. S., Koutentis A.P.; *The Synthesis of 2-Cyano-cyanothioformanilides from 2-(4-Chloro-5H-1,2,3-dithiazol-5-ylideneamino)benzonitriles Using DBU*; Synthesis, 4167-4174, **2009**.
140. Besson T., Rees W. C.; *Some chemistry of 4,5-dichloro-1,2,3-dithiazolium chloride and its derivatives*; J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1659-1662, **1995**.
141. Faucourt A., Chosson E., Besson T.; *4,5-Dichloro-1,2,3-dithiazol-1-ium chloride*, e-EROS, **2009**.
142. Yang L., Wen-Xiang L., Mao-Cai Y., Yang Y., Takashi I., Mao-Sheng C.; *Synthesis and Tumor Cytotoxicity of Novel Amide Derivatives of  $\beta$ -Hederin*; Molecules, 7871-7883, **2010**.
143. Wolfe J.P., Wagaw S., Buchwald S.L.; *An Improved Catalyst System for Aromatic Carbon-Nitrogen Bond Formation: The Possible Involvement of Bis(phosphine) Palladium Complexes as Key Intermediates*; J. Am. Chem. Soc., 7215, **1996**.
144. Driver M. S., Hartwig J. F.; *A second-generation catalyst for aryl halide amination: Mixed secondary amines from aryl halides and primary amines catalyzed by (DPPF)PdCl<sub>2</sub>*; J. Am. Chem. Soc., 7217-7218, **1996**.
145. Wolfe J.P., Buchwald S.L.; *Scope and Limitations of the Pd/BINAP-Catalyzed Amination of Aryl Bromides*; J. Org. Chem., 1144, **2000**.
146. Wagaw S., Yang B. H., Buchwald S.L.; *A Palladium-Catalyzed Method for the Preparation of Indoles via the Fischer Indole Synthesis*; J. Am. Chem. Soc., 10251, **1999**.
147. Hoff S., Blok P. A.; *Reductive ring opening of thiazoles*; Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas; 18-20, **1974**.
148. da Costa J. C. S., Pais K. C., Fernandes E. L., de Oliveira P. S. M., Mendonça J. S., de Souza M. V. N., Peralta M. A., Vasconcelos T. R. A.; *Simple reduction of ethyl, isopropyl and benzyl aromatic esters to alcohols using sodium borohydride-methanol system*; ARKIVOC, 128-133, **2006**.
149. Piancatelli G., Luzzio A. F.; *"Pyridinium Chlorochromate"* *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley, **2007**.
150. Rokade V. B., Prabhu R. K.; *Chemoselective Schmidt Reaction Mediated by Triflic Acid: Selective Synthesis of Nitriles from Aldehydes*; J. Org. Chem., 5364-5370, **2012**.
151. Travis R. B., Sivakumar M., Hollist O. G., Borhan B.; *Facile Oxidation of Aldehydes to Acids and Esters with Oxone*; Org. Lett., 1031-1034, **2003**.