

1837
2017
ΧΡΟΝΙΑ



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ, ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΦΥΜΑΤΙΚΗΣ
ΔΡΑΣΗΣ ΝΕΩΝ ΑΔΑΜΑΝΤΑΝΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ
ΙΣΟΝΙΑΖΙΔΙΟΥ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ ΑΝΤΡΙΑΣ

ΧΗΜΙΚΟΥ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2017

ΑΘΗΝΑ

Επιβλέπων

Ιωάννης Παπαναστασίου, Επικ. Καθηγητής, ΕΚΠΑ

Τριμελής επιτροπή Μ.Δ.Ε.

Ανδρέας Τσοτίνης, Καθηγητής, ΕΚΠΑ

Αντώνιος Κολοκούρης, Αναπλ. Καθηγητής, ΕΚΠΑ

Ιωάννης Παπαναστασίου, Επικ. Καθηγητής, ΕΚΠΑ

*Στη λατρεμένη μου γιαγιά, Αφροδίτη,
που δεν μπόρεσε να με καμαρώσει
στο μεταπτυχιακό. 25/09/2015*

*Στους αγαπημένους μου γονείς, Κύπρο και Ελευθερία,
και τα αδέρφια μου, Χριστίνα και Γιώργο
που βρίσκονται δίπλα μου
σε κάθε μου βήμα.*

*Στους Ειρήνη, Φρόσω, Βούλα, Στεφανία, Άνθη,
Άντρια και Μαριάννα για τη συμπαράσταση
και την υπομονή τους όλο αυτό τον καιρό.*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του κ. Ιωάννη Παπαναστασίου, Επίκουρου Καθηγητή του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου προς τον επιβλέποντα μου κ. Ιωάννη Παπαναστασίου για την ανάθεση του θέματος, τη συνεχή καθοδήγηση και τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε για την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας, από την αρχή έως και το τέλος αυτής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής της παρούσας εργασίας, τον Καθηγητή κ. Ανδρέα Τσοτίνη και τον Αναπλ. Καθηγητή κ. Αντώνιο Κολοκούρη για τις συμβουλές και τις διορθώσεις τους.

Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω και προς τον Ομότιμο Καθηγητή του Τομέα της Φαρμακευτικής Χημείας, κ. Γεώργιο Β. Φώσκολο για τις πολύτιμες συμβουλές του.

Θερμές ευχαριστίες εκφράζω, επίσης, προς τον Καθηγητή της Οργανικής Χημείας κ. Θωμά Μαυρομούστακο και το συνεργάτη του, Δρ. Tahsin Kellici για την πραγματοποίηση των υπολογιστικών πειραμάτων.

Ευχαριστώ, επίσης, τη Δρ. Δήμητρα Μπενάκη για τη βοήθειά της κατά τη λήψη των φασμάτων NMR.

Θα ήθελα, ακόμη, να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Stewart T. Cole, διευθυντή του εργαστηρίου του Global Health Institute, του Πολυτεχνείου της Λωζάνης στην Ελβετία, για την ολοκλήρωση της φαρμακολογικής αξιολόγησης των ενώσεων που συντέθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας.

Τέλος, δε θα μπορούσα να παραλείψω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς τις υποψήφιες Δρ. Αγγελική Φώσκολου, Βασιλική Παρδάλη, Ερωφίλη Γιαννακοπούλου και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Μάρκο Γεωργιάδη, Όλγα Καρούτζου καθώς και τους Βιολέτα Κουρμπέλη, Βάγια Ιωαννίδου, Βαγγέλη Καρακίτσιο και Μαρία Μαντζίρη, για την όμορφη συνεργασία εντός του εργαστηρίου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	1
ABSTRACT.....	1
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Φυματίωση.....	1
1.1.1 Η νόσος φυματίωση.....	1
1.1.2 Μετάδοση του μυκοβακτηριδίου	3
1.1.3 Ανοσολογική απόκριση	3
1.1.4 Μορφές φυματίωσης.....	5
1.2 Δομικά στοιχεία του <i>Mycobacterium tuberculosis</i>.....	6
1.3 ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	10
1.3.1 Γενικά στοιχεία	10
1.3.2 Φάρμακα.....	11
1.3.3 Θεραπευτικό σχήμα.....	15
1.4 Μελέτη εισόδου και γενικής δράσης του ισονιαζιδίου στο <i>Mycobacterium tuberculosis</i>.....	16
1.4.1 Ενεργοποίηση του INH: δημιουργία του ενεργοποιημένου συμπλόκου IN-NAD	18
1.4.2 Οξειδάση NADH και ενεργοποίηση του ισονιαζιδίου από την καταλάση-υπεροξειδάση KatG.....	19
1.4.3 Ο μηχανισμός αναστολής της αναγωγής της InhA από το σύμπλοκο IN-NAD ^[57, 59]	21
1.5 Διερεύνηση του μηχανισμού ενεργοποίησης του INH από την καταλάση-υπεροξειδάση KatG, καθώς και της θέσης πρόσδεσης του INH στην KatG του <i>M.tuberculosis</i>.....	23
1.5.1 KatG σε κατάσταση ηρεμίας.....	23
1.5.2 Οι υψηλότερες οξειδωτικές καταστάσεις της καταλάσης-υπεροξειδάσης KatG ^[63]	25
1.5.3 Ενεργοποίηση του ισονιαζιδίου (INH).....	27
1.5.4 Θέση πρόσδεσης του INH στην καταλάση-υπεροξειδάση KatG	30
1.6 Σχεδιασμός των ενώσεων της παρούσας διατριβής	32
2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	36
3. ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ	54
4. ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	57
5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	63

5.1 Χημεία	63
1-Τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκανομεθανόλη (2) ^[151]	63
1-Τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκανοκαρβαξαλδεΐδη (3) ^[152,153]	64
N'-(1-(Τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκανο)μεθυλενο)-4-πυριδινοκαρβοϋδραζίδιο (4).....	64
1-Τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκανοαιθανόλη (6)	65
1-Τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκανοακεταλδεΐδη (7).....	66
N'-((1-Τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκανο)αιθυλιδενο)-4-πυριδινοκαρβοϋδραζίδιο (8)	66
1-Τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκανοκαρβονυλοχλωρίδιο (9).....	67
1-Τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκανοκαρβοξυλικός αιθυλεστέρας (10)	67
1-(1-Τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκυλο)κυκλοπεντανόλη (11).....	68
1-(1-Κυκλοπεντενυλο)τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκάνιο (12) ^[155]	68
1-Κυκλοπεντυλοτρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκάνιο (13)	69
3-Κυκλοπεντυλο-1-τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκανοκαρβοξυλικό οξύ (14)	69
3-Κυκλοπεντυλο-1-τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκανομεθανόλη (15).....	70
3-Κυκλοπεντυλο-1-τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκανοκαρβοξαλδεΐδη (16).....	71
N'-(3-κυκλοπεντυλο-1-τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκανο)μεθυλενο)-4-πυριδινοκαρβοϋδραζίδιο (17)	72
3-Βρωμο-1-τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκανοκαρβοξυλικό οξύ (18) ^[158]	73
3-Φαινυλο-1-τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκανοκαρβοξυλικό οξύ (19) ^[158]	73
3-Φαινυλο-1-τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκανομεθανόλη (20).....	74
3-Φαινυλο-1-τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκανοκαρβοξαλδεΐδη (21).....	74
N'-((3-φαινυλο-1-τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκανο)μεθυλενο)-4-πυριδινοκαρβοϋδραζίδιο (22)	75
1-(4-Μεθυλοφαινυλο)τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκάνιο (24).....	76
4-(1-Τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκυλο)βενζοϊκό οξύ (25)	76
4-(1-Τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκυλο)βενζολομεθανόλη (26)	77
4-(1-Τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκυλο)βενζολοκαρβοξαλδεΐδη (27) ^[159]	78
N'-(4-(Τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκ-1-υλο)βενζυλιδενο)-4-πυριδινοκαρβοϋδραζίδιο (28).....	78
Σπειρο[οξιρανο-2(2')-τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκάνιο] (30) ^[161]	79
2-Τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκανοκαρβοξαλδεΐδη (31) ^[162,163]	80
N'-(1-(Τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκανο)μεθυλενο)-4-πυριδινοκαρβοϋδραζίδιο (32).....	80
2-(π-Βρωμοφαινυλο)-2-τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκανόλη (33) ^[164]	81
4-(2-Τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκυλο)βρωμοβενζόλιο (34)	82
4-(2-Τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκυλο)βενζολοκαρβοξαλδεΐδη (36).....	83

N' -(4-(Τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκ-2-υλ)βενζυλιδενο)-4-πυριδινοκαρβοϋδραζίδιο (37)	83
1-Τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκανοκαρβοϋδραζίδιο (38)	84
N' -((E)-πυριδιν-4-υλμεθυλενο)-1-τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκανοκαρβοϋδραζίδιο (39)	85
N' -(πυριδιν-3-υλμεθυλενο)-1-τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκανοκαρβοϋδραζίδιο (40)	85
2-Τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκυλιδενοξικός αιθυλεστέρας (41)	86
Σπειρο(πυραζολιδινο-3,2'-τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκαν)-5-όνη (42)	86
Τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκ-2-υλιδενοξικό οξύ (43) ^[168]	87
Τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκ-2-υλιδενακετοϋδραζίδιο (44)	87
N' -(πυριδιν-4-υλομεθυλενο)τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκ-2-υλιδεν)ακετοϋδραζίδιο (45)	88
1,3-Τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκανοδικαρβοξυλικό οξύ (47) ^[170,171]	89
1,3-Τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκανοδιμεθανόλη (48)	89
1,3-Τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκανοδικαρβοξαλδεϋδη (49)	90
$N^2, N^{2'}$ -(1,3-Τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκανοδιμεθυλενο)δισ(4-πυριδινοκαρβοϋδραζίδιο) (50)	90
1,3-Τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκανοδικαρβοξυλικός διαιθυλεστέρας (52)	91
1,3-Τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκανοδικαρβοϋδραζίδιο (53)	92
(E) $N^2, N^{2'}$ -δι(4-πυριδινομεθυλενο)-1,3-τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκανοδικαρβοϋδραζίδιο (54)	92
5.2 Φαρμακολογικές δοκιμασίες	93
6. ΑΝΤΙΠΡΟΣΩΠΕΥΤΙΚΑ ΦΑΣΜΑΤΑ NMR	94
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	104

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σχεδιασμός, σύνθεση και μελέτη νέων αδαμαντανικών παραγώγων του ισονιαζιδίου με αντιφυματική δράση

Στην παρούσα εργασία περιγράφεται ο σχεδιασμός, η σύνθεση και η αποτίμηση της *in vitro* αντιφυματικής δράσης νέων αδαμαντανικών υδραζονών του ισονιαζιδίου. Οι αδαμαντανικές υδραζόνες προέκυψαν από τη σύζευξη των αντίστοιχων 1-, 2- και 1,3-αδαμαντανικών υποκατεστημένων ή μη αλδεϋδών και του ισονιαζιδίου. Επιπλέον, συντέθηκαν και οι ισομερείς τους υδραζόνες, οι οποίες προέκυψαν από τη σύζευξη των αντίστοιχων 1-αδαμαντανοκαρβοϋδραζιδίων και του 1,3-αδαμαντανοδικαρβοϋδραζιδίου με την ισονικοτινική αλδεϋδη. Επίσης, από τα φάσματα NMR των προηγούμενων ενώσεων και με τη βοήθεια μελετών μοριακών προσομοιώσεων πραγματοποιήθηκε και ο προσδιορισμός των διαμορφομερών τους. Οι νέες αδαμαντανικές υδραζόνες εξετάστηκαν ως προς τη δράση τους έναντι του *Mycobacterium tuberculosis* και από το φαρμακολογικό έλεγχο προέκυψε ότι οι αδαμαντανικές υδραζόνες του ισονικοτινικού υδραζιδίου παρουσιάζουν την ίδια τάξη δραστηριότητας με το ισονιαζίδιο.

ABSTRACT

Design, synthesis and antitubercular activity of new Isoniazid adamantane derivatives

In the context of the present MSc dissertation, a series of new adamantane hydrazone derivatives of Isoniazid were designed, synthesized and studied with respect to their antitubercular potential. The new compounds were formed by coupling the corresponding 1-, 2- and 1,3-substituted or unsubstituted adamantane aldehydes with Isoniazid. Moreover, the isomeric hydrazones were prepared by coupling the corresponding 1-adamantanecarbohydrazides and 1,3-adamantanedicarbohydrazide with isonicotinic aldehyde. The NMR and molecular mechanics data obtained, led to the elucidation of the mixture of conformational conformers of the hydrazones. The pharmacological evaluation of the new adamantane hydrazones against *Mycobacterium tuberculosis* showed that the new adamantane hydrazones are equipotent to Isoniazid.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Φυματίωση

1.1.1 Η νόσος φυματίωση

Η φυματίωση (tuberculosis ή TB) είναι μια χρόνια λοιμώδης νόσος που ονομάστηκε «φθίσις» από τον Ιπποκράτη (από το ρήμα «φθίνω» = ελαττώνομαι συνέχεια, αργοσβήνω) ^[1]. Το αίτιο της νόσου είναι η προσβολή από βακτήρια του γένους των μυκοβακτηριδίων (mycobacteria). Η προσβολή προκαλείται κυρίως από το *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) που απομονώθηκε το 1882 από τον Robert Koch, γι' αυτό και συχνά αποκαλείται «βάκιλος του Koch» ^[2] και, πιο σπάνια, από άλλα είδη του συμπλέγματος που περιλαμβάνουν τα *Mycobacterium bovis* και *Mycobacterium africanum* ^[3].

Η φυματίωση μεταδίδεται από άνθρωπο σε άνθρωπο με μολυσμένα σταγονίδια, μέσω της αναπνευστικής οδού. Σε σπάνιες περιπτώσεις η λοίμωξη μπορεί να προέλθει από είσοδο του μικροβίου από την πεπτική οδό ή από δερματικό τραύμα ^[4]. Ο άνθρωπος αποτελεί τη μόνη φυσική δεξαμενή της νόσου, αν και η φυματίωση μπορεί να εμφανιστεί και σε άλλα θηλαστικά. Όταν τα άτομα με ενεργή πνευμονική φυματίωση βήχουν, φτερνίζονται, μιλούν, τραγουδούν, ή φτύνουν, αποβάλλουν μολυσματικά σταγονίδια με διάμετρο από 0,5 ως 5 μm ^[5]. Η φυματίωση αποτελεί μια αρχαία νόσο, η οποία μαστίζει το ανθρώπινο είδος καθόλη τη διάρκεια της γνωστής ιστορίας και ανθρώπινης προϊστορίας. Εξελίχθηκε σε τεράστιες επιδημίες, οι οποίες αργότερα υποχώρησαν. Η φυματίωση, όπως και άλλες μολυσματικές ασθένειες, εκδηλώνεται εντός ενός χρονοδιαγράμματος που προκαλεί τις αποδεκτές εξηγήσεις για κύκλο επιδημίας. Το *Mycobacterium tuberculosis* μπορεί να έχει σκοτώσει τους περισσότερους ανθρώπους από κάθε άλλη μικροβιολογική παθογένεια ^[2].

Όπως αναφέρθηκε, η φυματίωση αποτελεί μια εξαιρετική απειλή για τον άνθρωπο αφού μπορεί να αποβεί θανατηφόρος, ενώ παράλληλα η θεραπευτική της αντιμετώπιση είναι μια πολύπλοκη διαδικασία. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (Π.Ο.Υ) αναφέρει ότι το 1/3 του πληθυσμού της γης έχει μολυνθεί από το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης ^[6,7]. Περίπου 1,5 εκατομμύριο άνθρωποι απεβίωσαν εξαιτίας της ασθένειας το 2013, ενώ από την ίδια αιτία το 2015 εκτιμήθηκαν 1,8 εκατομμύρια θάνατοι ^[8]. Το πρόβλημα της φυματίωσης αφορά κατά κύριο λόγο στις αναπτυσσόμενες χώρες, αφού σ' αυτές εμφανίζεται το 95% των θανάτων από φυματίωση, παγκοσμίως. Πολλοί είναι οι λόγοι που σχετίζονται με την υψηλή επικράτηση της νόσου σε αυτές τις χώρες με περιορισμένους πόρους, όπως είναι: η έλλειψη πολιτικής υποστήριξης, ο ανεπαρκής έλεγχος της νόσου, οι φυλετικές διαφορές και η κοινωνική αστάθεια ^[7]. Ένας στους τέσσερις θανάτους που σχετίζονται με HIV/AIDS οφείλεται στη

φυματίωση^[9] και σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ. τετρακόσιες χιλιάδες άνθρωποι έχασαν τη ζωή τους το 2015 ως αποτέλεσμα της συνύπαρξης αυτών των δύο ασθενειών. Παρόλο που ο αριθμός των θανάτων εξαιτίας της φυματίωσης μειώθηκε κατά 22% μεταξύ των ετών 2000 και 2015, η φυματίωση παρέμεινε μία από τις 10 κορυφαίες αιτίες θανάτου παγκοσμίως για το 2015^[8]. Η δυσκολία ταυτόχρονης αντιμετώπισης του ιού HIV και της φυματίωσης σε συνδυασμό με την ανάπτυξη των πολυφαρμακοανθεκτικών στελεχών του *Mycobacterium tuberculosis* καθιστά όλο και περισσότερο επιτακτική την ανάγκη αντιμετώπισης της φυματίωσης στις αναπτυσσόμενες χώρες^[9].

Η φυματίωση είναι χρόνια νόσος, που συναντάται σε δύο καταστάσεις, την ενεργό ή τη λανθάνουσα κατάσταση. Ως λανθάνουσα φυματίωση (ΛΦ) ορίζεται η κατάσταση εμμένουσας ανοσιακής απάντησης στη διέγερση από αντιγόνα *M.tuberculosis*, χωρίς την παρουσία ενεργού νόσου. Στην κατάσταση αυτή, οι βάκιλοι βρίσκονται σε μια δυναμική ισορροπία με το ανοσοποιητικό, έχοντας ως αποτέλεσμα τη μη εκδήλωση της νόσου, με τους βάκιλους να διατηρούνται βιώσιμοι. Η ΛΦ μπορεί να εξελιχθεί σε ενεργή νόσο σε περιπτώσεις κάμψης του ανοσοποιητικού, ενώ πολλές φορές οι βάκιλοι παραμένουν σε λανθάνουσα κατάσταση στον οργανισμό, μετά από θεραπεία της ενεργούς φυματίωσης^[10].

Τα συμπτώματα της νόσου είναι συνήθως βαθμιαία κατά την έναρξή της και η διάρκειά τους κυμαίνεται από εβδομάδες έως μήνες^[3]. Στα πρώιμα στάδια της νόσου δεν παρατηρούνται συμπτώματα και η διάγνωση είναι δυνατή μόνο με ακτινογραφία θώρακος^[11]. Σε μεταγενέστερα στάδια, χαρακτηριστικά αποτελούν η εμφάνιση πυρετού, νυχτερινής εφίδρωσης και απώλειας βάρους, ενώ ο συνεχής, παραγωγικός ή μη βήχας είναι το πιο συχνά αναφερόμενο σύμπτωμα^[3,12]. Με την εξέλιξη της νόσου παρατηρούνται αιμοπτύσεις, χαμηλή αρτηριακή πίεση, δύσπνοια, κυάνωση και εξασθένηση του οργανισμού.

Η φυματίωση καταστρέφει συγκεκριμένα τους υγιείς ιστούς, οι οποίοι μετατρέπονται σε φυμάτια^[11]. Το φυμάτιο αποτελεί ένα κοκκίωμα, το οποίο απαρτίζεται από λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, γιγαντοκύτταρα (Langerhans), ινοβλάστες και τριχοειδή και η παρουσία του είναι χαρακτηριστικό της ύπαρξης της νόσου^[13]. Η ανεξέλεγκτη αύξηση του μυκοβακτηριδίου στον άνθρωπο-ξενιστή, λόγω της συνήθους θέσης της μόλυνσης στο αναπνευστικό, σχετίζεται με εκτεταμένη βλάβη των πνευμόνων, ακολουθούμενη από ασφυξία, λόγω ανεπαρκούς οξυγόνωσης και εν κατακλείδι το θάνατο. Αυτή η ανοξία προκαλεί την εξάλειψη των παρεγχυματικών κυττάρων του πνεύμονα που εμπλέκονται στην πρόσληψη οξυγόνου, καθώς και απόφραξη της διόδου των βρογχιολίων από κοκκιωματώδεις αυξήσεις και από την απελευθέρωση αίματος κατά τη ρήξη των κοκκιωμάτων στον παρακείμενο πνευμονικό ιστό^[1]. Επιπλέον, το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης μπορεί να προκαλέσει σοβαρές λοιμώξεις της ουρογεννητικής οδού, του σκελετού και των μηνίγγων^[14].

1.1.2 Μετάδοση του μυκοβακτηριδίου

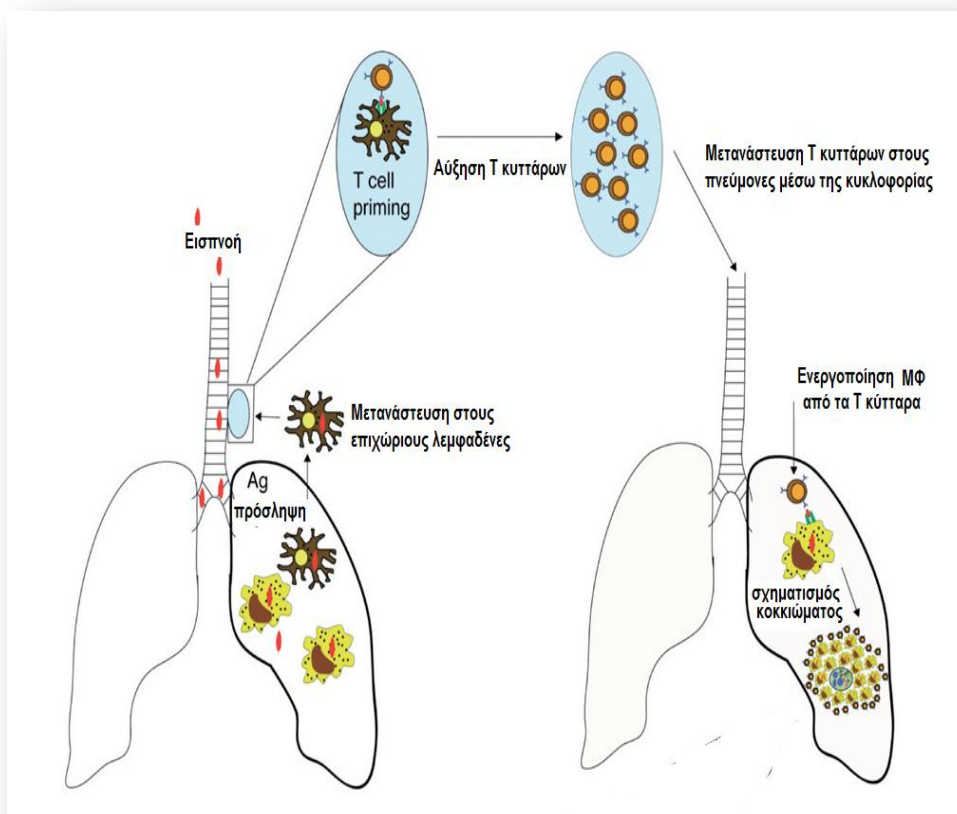
Η κύρια πηγή μόλυνσης είναι ο άνθρωπος που πάσχει από πνευμονική φυματίωση. Ένας ασθενής είναι μολυσματικός, όταν οι ιστοπαθολογικές πνευμονικές βλάβες επικοινωνούν με τον αέρα και όταν τα εκπνεόμενα μυκοβακτηρίδια (Mtb) διασπείρονται μέσα σε ένα αόρατο νέφος σταγονιδίων. Τα σταγονίδια που περιέχουν τα MB εξατμίζονται και εγκαταλείπουν στον αέρα αιωρούμενα σωματίδια (droplet nucleus) που περιέχουν τα Mtb. Ένα μικρό σωματίδιο που περιέχει ένα Mtb είναι πιο επικίνδυνο από μεγαλύτερα σωματίδια που περιέχουν περισσότερα Mtb, διότι τα τελευταία επικάθονται στο τραχειοβρογχικό δένδρο και αποβάλλονται. Αντίθετα, τα μικρά σωματίδια φθάνουν στις κυψελίδες και ως εκ τούτου έχουν περισσότερες πιθανότητες να προκαλέσουν τη νόσο ^[13]. Η φυματίωση είναι δυνατόν να μεταδοθεί και έμμεσα από μολυσμένες τροφές, κυρίως από μη παστεριωμένο γάλα φυματικής αγελάδας. Ωστόσο, αντικείμενα και σκόνη μολυσμένα με Mtb είναι λιγότερο επικίνδυνα, για το λόγο ότι τα Mtb χάνουν αρκετή από τη λοιμογόνο δύναμή τους εξαιτίας της έκθεσής τους στο φως ^[13]. Ο βήχας είναι ο πιο αποδοτικός μηχανισμός παραγωγής σταγονιδίων. Ο αριθμός των σταγονιδίων που εκπέμπονται κατά τη διάρκεια πεντάλεπτης ομιλίας είναι ίσος με αυτόν που παράγεται, αν το άτομο βήξει μία και μόνο φορά. Σταγονίδια παράγονται, επίσης, με το φτάρνισμα, αλλά αυτά έχουν μεγαλύτερη διάμετρο και πιθανότατα να είναι λιγότερο μολυσματικά ^[13].

1.1.3 Ανοσολογική απόκριση

Επακόλουθο της προσβολής είναι η έναρξη της πρώτης γραμμής ανοσολογικής απόκρισης, στην οποία βασικό ρόλο παίζουν τα κυψελιδικά μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα. Τα μακροφάγα, τα δενδριτικά κύτταρα και τα άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος αναγνωρίζουν τις μυκοβακτηριδιακές δομές, μέσω των υποδοχέων τύπου Toll (TLR2, TLR4, TLR9). Σε αλληλεπίδραση με τους υποδοχείς TLRs, οι οδοί σηματοδότησης ενεργοποιούνται και οδηγούν στην παραγωγή των προφλεγμονωδών κυτοκινών, όπως οι TNF, IL-1B, IL-12, και το μονοξείδιο του αζώτου. Η φαγοκυττάρωση του παθογόνου από τα μακροφάγα αποτελεί ένα ουσιαστικό χαρακτηριστικό της ανοσολογικής απόκρισης. Τα βακτήρια στη συνέχεια καταστρέφονται, μέσω της σύντηξης φαγοσώματος-λυσosώματος, όμως το *M.tuberculosis* μπορεί να ανατρέψει αυτή τη διαδικασία και να αποφύγει την καταστροφή ^[3].

Η ανοσολογική απόκριση πρώτης γραμμής, με τη μεσολάβηση μακροφάγων, μπορεί να έχει τρία σημαντικά αποτελέσματα: νέκρωση των κυττάρων, απόπτωση ή επιβίωση των μολυσμένων μακροφάγων. Στην περίπτωση που το κύτταρο υφίσταται νέκρωση, τα μυκοβακτηρίδια απελευθερώνονται και μπορούν να μολύνουν νέα μακροφάγα ή να

διασπαρούν, ενώ στα κύτταρα που υφίστανται απόπτωση η μεμβράνη δεν έχει παραβιαστεί και έτσι τα βακτήρια παραμένουν εγκλωβισμένα εντός του κυττάρου, όπου και καταστρέφονται από τα μακροφάγα. Απ' την άλλη, η επιβίωση των μολυσμένων μακροφάγων επιτρέπει στα μυκοβακτηρίδια να διατηρούνται και ακόμη και να πολλαπλασιάζονται πριν από την προσαρμοστική ανοσοαπόκριση, η οποία ενεργοποιείται από τα ειδικά T-κύτταρα, σε τοπικούς λεμφαδένες, 2-3 εβδομάδες μετά την πρωτογενή μόλυνση ^[3].



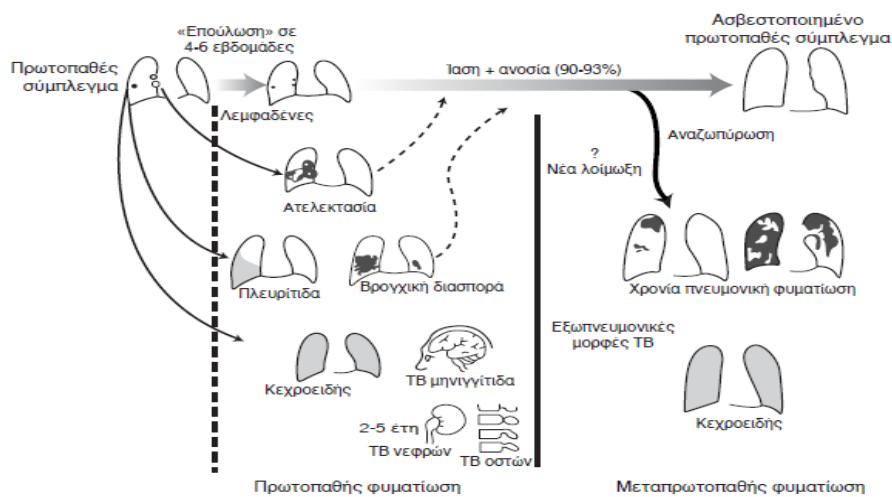
Εικόνα 1. Στάδια της μόλυνσης από το *M. tuberculosis* ^[15].

Τα δενδριτικά κύτταρα είναι ένας άλλος σημαντικός μεσολαβητής μεταξύ της πρώτης και δεύτερης γραμμής ανοσοαπόκρισης, τα οποία εκτός από την φαγοκυττάρωση, έχουν και τη λειτουργία των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, αφού, μεταναστεύοντας σε περιφερειακούς λεμφαδένες, αποκαλύπτουν τα ζωντανά μυκοβακτηρίδια στα T-κύτταρα. Μετά την παρουσία του αντιγόνου στους λεμφαδένες, τα CD4 T-κύτταρα ενεργοποιούνται, και μεταναστεύουν στους πνεύμονες για να εμποδίσουν τη μυκοβακτηριδιακή προοδευτική ανάπτυξη. Η IFN- γ , που παράγεται από τα ενεργοποιημένα T-κύτταρα, έχει σημαντικό ρόλο στην προστασία έναντι της φυματίωσης, καθώς είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση των μακροφάγων και την ενδοκυτταρική θανάτωση του μυκοβακτηριδίου ^[3,13]. Επίσης,

ενεργοποιούνται τα CD8 λεμφοκύτταρα, τα οποία καταστρέφουν τα μυκοβακτηρίδια με την παραγωγή μορίων, όπως οι περφορίνες. Οι διάφοροι αυτοί μεσολαβητές, που παράγονται, δεν καταστρέφουν μόνο τα μυκοβακτηρίδια, αλλά και συμβάλλουν στην παραγωγή των φυματίων, τα οποία αποτελούν άλλη μία σημαντική εκδήλωση της κυτταρικής ανοσίας ^[13].

1.1.4 Μορφές φυματίωσης

Διακρίνονται πολλές μορφές φυματίωσης, ανάλογα με τον ιστό που προσβάλλουν. Η φυματίωση που προσβάλλει άλλα όργανα του οργανισμού, εκτός από τα αναπνευστικά, ονομάζεται «εξωπνευμονική φυματίωση» και αφορά στο 15-20% των ενεργών περιπτώσεων. Η εξωπνευμονική φυματίωση εμφανίζεται συχνότερα σε άτομα που βρίσκονται σε ανοσοκαταστολή, καιώς και σε μικρά παιδιά. Τα σημεία που προσβάλλονται πιο συχνά από εξωπνευμονική φυματίωση είναι ο υπεζωκότας (φυματιώδης πλευρίτιδα), το κεντρικό νευρικό σύστημα (φυματιώδης μηνιγγίτιδα), το λεμφικό σύστημα (χοιράδωση του λαιμού) και το δέρμα (δερματική φυματίωση) ^[3,12,13]. Η εξωπνευμονική φυματίωση εμφανίζεται, επίσης, μεταξύ άλλων στο ουρογεννητικό σύστημα (φυματίωση ουρογεννητικού), στο γαστρεντερικό σύστημα ^[13], στο περικάρδιο της καρδιάς (φυματιώδης περικαρδίτιδα) και στα οστά και τις αρθρώσεις (νόσος του Rott ή φυματιώδης σπονδυλίτιδα). Όταν λάβει χώρα διασπορά στα οστά, τότε είναι γνωστή ως «φυματίωση των οστών», που είναι μια μορφή οστεομυελίτιδας. Μια δυνητικά πιο σοβαρή, εκτεταμένη μορφή φυματίωσης ονομάζεται «διάχυτη» φυματίωση και είναι κοινώς γνωστή ως κεγχροειδής φυματίωση ^[3,16].



Εικόνα 2. Η εξέλιξη της φυματίωσης ^[13]

1.2 Δομικά στοιχεία του *Mycobacterium tuberculosis*.

Το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης είναι ένας μικρός, αερόβιος, ακίνητος βάκιλος της κατηγορίας των μυκοβακτηριδίων. Χαρακτηρίζεται ως οξεάντοχο, έχει την ικανότητα να διαιρείται κάθε 16-20 ώρες και να επιβιώνει σε εξαιρετικά εχθρικά περιβάλλοντα ^[17]. Το παθογόνο είναι ανθεκτικό και μπορεί να εισέλθει σε μια αδρανή ή λανθάνουσα κατάσταση, η οποία χαρακτηρίζεται από περιορισμένη ανάπτυξη και μεταβολισμό και κυρίως από φαινοτυπική αντοχή στα συνηθισμένα φάρμακα, που του επιτρέπει να παραμένει επ' αόριστον στο ανθρώπινο σώμα ^[6].

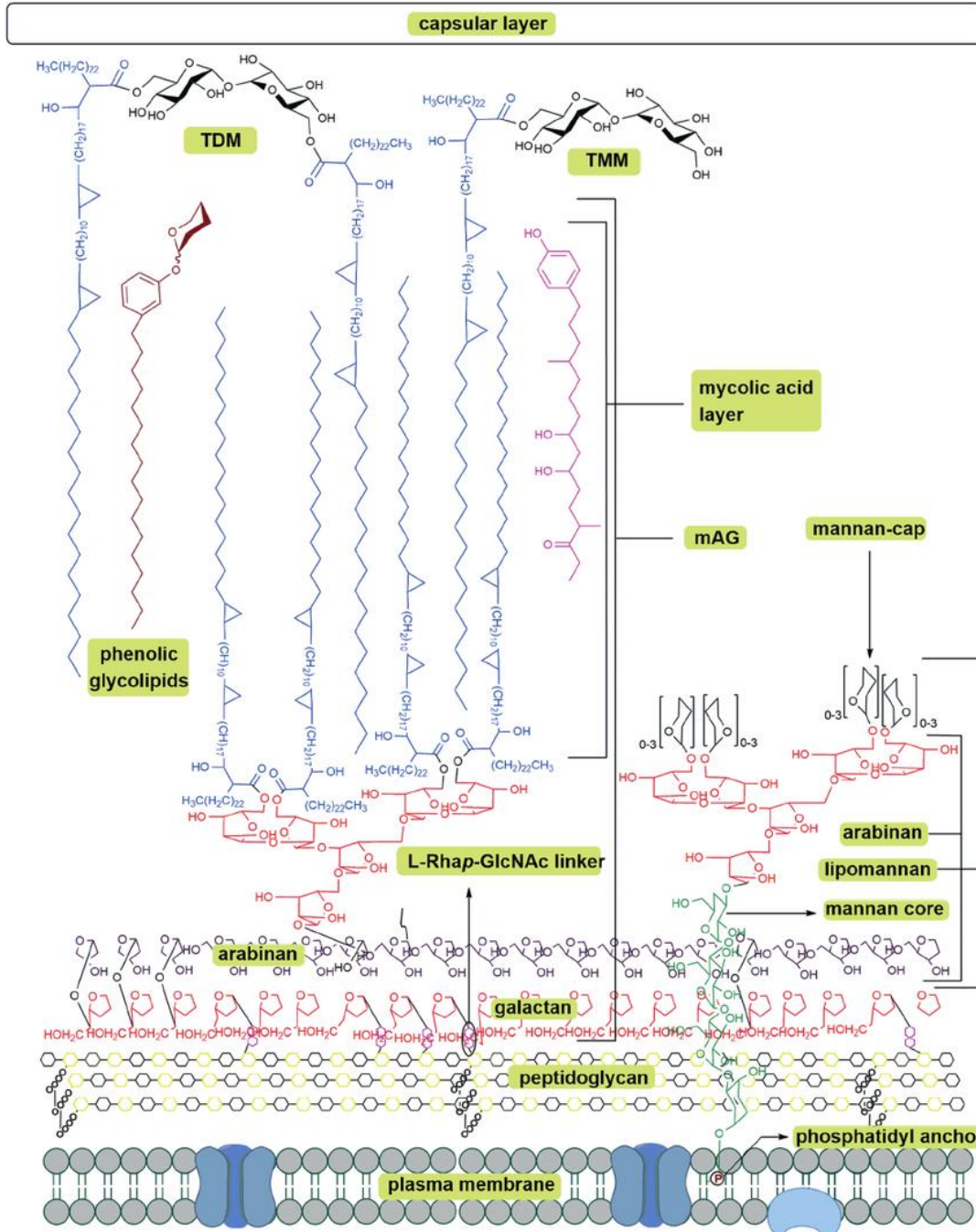
Η κυτταρική μεμβράνη παραμένει το σημείο, στο οποίο εστιάζει η έρευνα για τη φυματίωση. Η δομή και οι οδοί σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος έχουν μελετηθεί ως πιθανοί στόχοι για τη θεραπεία της φυματίωσης σε σύντομο χρονικό διάστημα ^[19].

Το κυτταρικό τοίχωμα του *M.tuberculosis* έχει χαρακτηριστικά τόσο gram- θετικών όσο και gram- αρνητικών βακτηρίων. Λαμβάνει ελαφριά χρώση gram αλλά όταν χρωματισθεί, δύσκολα αποχρωματίζεται με οργανικούς διαλύτες ^[14]. Παρόλα αυτά, μετά από μελέτες φαίνεται ότι είναι περισσότερο συγγενές στα gram- αρνητικά βακτήρια. Σε αυτό το συμπέρασμα οδήγησαν δεδομένα από την ανάλυση του 16S ριβοσωμικού RNA, η αναλογία γουανίνης και κυτοσίνης, η οποία βρέθηκε ανάλογη αυτής των gram- αρνητικών βακτηρίων, καθώς επίσης και το ποσοστό των λιπαρών συστατικών στο τοίχωμα του *M.tuberculosis*. Στο ίδιο συμπέρασμα οδήγησε και η ανάλυση γονιδίων, τα οποία σχετίζονται με την παραγωγή ενέργειας και τη σύνθεση του ATP ^[18].

Το *M.tuberculosis* διαθέτει εξωτερική μεμβράνη ^[19] που αποτελείται ευρέως από λιπίδια που περιλαμβάνουν λιπαρά οξέα με μακριές αλειφατικές αλυσίδες με διακλαδώσεις, τα οποία λέγονται μυκολικά οξέα. Η εξωτερική μεμβράνη (mycobacterial outer membrane/MOM) και το κυτταρικό τοίχωμα, λόγω αυτών των λιπιδίων αποτελούν το μυκοβακτηριδιακό φραγμό διαπερατότητας, που εμποδίζει την είσοδο σε πολλούς περιβαλλοντικούς διαλύτες. Η χαμηλή διαπερατότητα του κυτταρικού τοιχώματος αποτελεί ουσιαστική προϋπόθεση για την επιβίωση του μυκοβακτηριδίου στον ξενιστή ^[17].

Το κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται από δύο τμήματα, το ανώτερο και το κατώτερο. Πάνω από τη μεμβράνη υπάρχει διασταυρούμενα συνδεδεμένη πεπτιδογλυκάνη (PG), σε ομοιοπολική σύνδεση με την αραβινογαλακτάνη (AG), η οποία με τη σειρά της είναι εστεροποιημένη στα απομακρυσμένα άκρα με μυκολικά οξέα (MAs), με τις μακριές και τις μικρές μερομυκολικές α-αλυσίδες, σχηματίζοντας την εσωτερική επιφάνεια του MOM. Αυτά αποτελούν το σκελετό του κυτταρικού τοιχώματος, το σύμπλεγμα δηλαδή mAGP. Το μυκοβακτηριδιακό κυτταρικό τοίχωμα, αποτελείται επίσης από πρωτεΐνες και ελεύθερα γλυκολιπίδια, που δεν είναι ομοιοπολικά προσκολλημένα σε αυτό, αλλά σχετίζονται ή είναι μέρος της μυκοβακτηριδιακής εξωτερικής μεμβράνης ^[17,20].

Η πεπτιδογλυκάνη αποτελείται από εναλλασσόμενες μονάδες *N*-ακετυλογλυκοζαμίνης (GlcNAc), διασταυρούμενα συνδεδεμένες με τροποποιημένο μουραμικό οξύ (Mur), μέσω ενός τετραπεπτιδίου. Οι τετραπεπτιδικές πλευρικές αλυσίδες της πεπτιδογλυκάνης αποτελούνται από αλληλουχίες *L*-alanyl-*D*-isoglutaminyl-*meso*-diaminopimelyl-*D*-alanine (*L*-Ala-*D*-Glu-*A*₂pm-*D*-Ala), με τη γλουταμίνη να είναι περαιτέρω αμιδοποιημένη.



Εικόνα 3. Κυτταρικό τοίχωμα *M.tuberculosis* ^[19].

Αυτός ο τύπος πεπτιδογλυκάνης (PG) είναι ο πιο συχνά απαντούμενος στα βακτήρια. Αρχικά, μερικά ή και όλα τα μουραμικά υπόλοιπα είναι *N*-ακυλιωμένα με γλυκολικό οξύ (MurNGly), και οι διασταυρούμενες συνδέσεις περιλαμβάνουν συγκεκριμένη αναλογία ανάμεσα σε δύο υπόλοιπα διαμινοπιμελικού οξέος (A_2pm), παράγωγα της λυσίνης, συνδεδεμένα μεταξύ τους και ένα A_2pm συνδεδεμένο με D-Ala. Είναι γνωστό πως ο κύριος πολυσακχαρίτης του κυτταρικού τοιχώματος είναι μια διακλαδισμένη αλυσίδα αραβινογαλακτάνης (AG) με υπόλοιπα της αραβινόζης να σχηματίζουν το αναγωγικό άκρο. Το πολυμερές της AG είναι μοναδικό, όχι μόνο λόγω των σακχάρων που το αποτελούν, αλλά γιατί σε αντίθεση με τους περισσότερους βακτηριακούς πολυσακχαρίτες, στερείται επαναλαμβανομένων μονάδων, αποτελούμενο αντί αυτών από λίγα διακριτά δομικά μοτίβα. Η στιβάδα αραβινογαλακτάνης (AG) αποτελείται από ομοιοπολικά ζεύγη πολυμερών ομογαλακτάνης και ομοαραβινάνης. Στην ομογαλακτάνη, τα μονομερή της β -D-γαλακτοφουρανόζης συνδέονται εναλλάξ μέσω των C-5 και C-6. Το υπόλοιπο της γαλακτάνης συνδέεται στην PG, μέσω ενός φωσφορικού δεσμού *N*-ακετυλογλυκοζαμίνης και ραμνόζης. Οι διακλαδούμενες αλυσίδες αραβινάνης, που περιέχουν α -D-αραβινοφουρανόζη (Araf), προσδέονται μέσω του αναγωγικού τους άκρου στον C-5 των μονάδων β -D-γαλακτοφουρανόζης. Οι δομές της α -D-αραβινοφουρανόζης (Araf) συνδέονται μεταξύ τους με διευθέτηση $\alpha(1\rightarrow5)$, $\alpha(1\rightarrow3)$ και $\alpha(1\rightarrow2)$. Μια διακλαδισμένη δομή με 6 αραβινοφουρανοζυλο-υπομονάδες βρίσκεται στο μη αναγωγικό άκρο του πολυμερούς αραβινάνης: τα δύο τρίτα των Araf εξασακχαρικών υπολειμμάτων εστεροποιούνται με τα μυκολικά οξέα^[19]. Τα προϊόντα που σχηματίζονται από την εστεροποίηση των MAs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην τοξικότητα του Mtb^[22].

Τα μυκολικά οξέα (MAs) είναι α -αλκυλ- β -υδροξυλιπαρά οξέα που αποτελούνται από μία κορεσμένη αλυσίδα 20-26C, με α - διακλάδωση και ένα ήμισυ μερομυκολικού οξέος (μία αλυσίδα με 60 άτομα άνθρακα, το μέγιστο)^[17]. Απαντώνται επίσης ως μονο- και δι-μυκολική τρεχαλόζη και ως ελεύθερα υδροξυ-οξέα. Στο *Mycobacterium tuberculosis* τα μυκολικά οξέα βρίσκονται σε τρεις κύριες μορφές, τα α -, μεθοξυ- και κετο-μυκολικά οξέα. Οι δύο τελευταίες ομάδες έχουν και υποκατηγορίες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία *cis*-κυκλοπροπανικού δακτυλίου ή *trans*-κυκλοπροπανικής ομάδας με μία γειτονική διακλάδωση μεθυλίου, με το πρώτο να κυριαρχεί στα μεθοξυ-οξέα και το δεύτερο στα κετοξέα. Οι διαφορετικοί τύποι μυκολικών οξέων, που συναντώνται στα μυκοβακτηρίδια, χρησιμοποιούνται για να χαρακτηρίσουν και να διαφοροποιήσουν το κάθε είδος^[21]. Τα α -mycolates είναι ο πιο άφθονος τύπος απαντούμενος στο *M.tuberculosis*^[17].

Τα κετο-μυκολικά οξέα επικρατούν στα μακροφάγα και η απουσία τους μειώνει την επιτυχή είσοδο και πολλαπλασιασμό του μυκοβακτηριδίου στα μακροφάγα. Τα οξυγονωμένα μυκολικά οξέα φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στη συσσώρευση των λιπιδίων στον

ξενιστή και στο σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων, στο σημείο της λοίμωξης, διευκολύνοντας τη μακρά παραμονή στον ξενιστή. Δημιουργούν περιβάλλον πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά, κατάλληλο για τα βακτήρια που βρίσκονται σε λανθάνουσα κατάσταση και έτσι βοηθούν το βακτήριο να επιμείνει επί μακρόν και να δημιουργεί υποτροπές σε έναν ασθενή με φυματίωση ^[21].

Εξέχουσα σημασία έχει η βιοχημεία και η βιοσύνθεση των μυκολικών οξέων. Η καρβοξυλάση του ακετυλο-CoA (AcCoA) δημιουργεί το μηλονυλο-CoA. Το CoA ανταλλάσσεται με ACP, το οποίο στη συνέχεια ανάγεται, υφίσταται αφυδάτωση, αναγωγή της ενόυλο ACP ομάδας και τελικά επιμήκυνση ^[20].

Οι αναλογίες των διαφόρων ειδών μυκολικών οξέων στα μυκοβακτηρίδια επηρεάζουν τη βιολογική δραστηριότητα, την παθογένεια, την τοξικότητα και τη διαπερατότητα του κυτταρικού τοιχώματος. Τα ελεύθερα μυκολικά οξέα είναι υπεύθυνα για ορισμένα χαρακτηριστικά της μόλυνσης από το *M.tuberculosis*, όπως για το σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων στη θέση της μόλυνσης. Η τάση που έχουν να αναδιπλώνονται τους προσδίδει συγκεκριμένες δομές και διαμορφώσεις στο κυτταρικό τοίχωμα, οι οποίες φαίνεται να είναι εξαιρετικής σημασίας, όσον αφορά στην ανάπτυξη της φυματίωσης σε έναν ασθενή που μολύνθηκε από το βακτήριο ^[21].

Μέσα στο λιπιδικό περιβάλλον, που παρέχουν τα μυκολικά οξέα του συμπλέγματος mAGP, βρίσκεται μία σειρά λιπιδίων που έχει απασχολήσει πολύ τους ερευνητές, μερικά από τα οποία είναι τα εξής: διμυκοσεροσική φθιοσερόλη (DIM/ PDIM), μονομυκολική τρεχαλόζη (TMM), διμυκολική τρεχαλόζη (TDM), η οποία συχνά αναφέρεται ως cord factor, φαινολικά γλυκολιπίδια (PGLs), μαννοσίδες φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PIMs) και σουλφολιπίδια (SLs) ^[17,20]. Ένα άλλο σημαντικό γλυκολιπίδιο είναι η λιποαραβινομαννάνη (LAM). Αυτά τα λιπίδια αλληλεπιδρούν με το μυκολικό υπόλοιπο του mAGP σκελετού, σχηματίζοντας μία διπλοστιβάδα που λειτουργεί ως φραγμός διαπερατότητας ^[17].

Σήμερα, η στόχευση του μυκοβακτηριδιακού κυτταρικού τοιχώματος αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο στη θεραπεία της φυματίωσης. Έτσι, η μελέτη της δομής και της βιοσύνθεσής του είναι εξέχουσας σημασίας για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων.

1.3 ΘΕΡΑΠΕΙΑ

1.3.1 Γενικά στοιχεία

Τα αντιφυματικά φάρμακα, τα οποία χορηγούνται για τη θεραπεία της φυματίωσης (TB), έχουν ως στόχο την εξόντωση όλων των φυματικών βακτηριδίων στο ανθρώπινο σώμα. Ωστόσο, τα μυκοβακτηρίδια θανατώνονται με πολύ αργό ρυθμό, επομένως τα φάρμακα πρέπει να λαμβάνονται για διάρκεια μερικών μηνών. Ακόμη και στην περίπτωση που ο ασθενής αρχίσει να αισθάνεται βελτίωση, είναι πιθανόν ζωντανά βακτήρια να εξακολουθούν να βρίσκονται στο σώμα του. Συνεπώς, ο ασθενής επιβάλλεται να συνεχίσει τη λήψη της φαρμακευτικής αγωγής που διαρκεί μέχρι να υπάρξει ολοκληρωτική θανάτωση των βακτηριδίων.

Κύριο χαρακτηριστικό της θεραπείας είναι ότι απαιτείται χορήγηση συνδυασμού φαρμάκων. Εάν λαμβάνονται μόνο ένα ή δύο φάρμακα για την καταπολέμηση της TB, τότε πιθανόν να μην επιτευχθεί πλήρης εξόντωση των βακτηριδίων, καθώς η μονοθεραπεία οδηγεί σε ταχεία εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών του *M.tuberculosis* ^[14,20,23, 24] και κατά συνέπεια σε αδράνεια του φαρμάκου ως προς τα βακτήρια. Εάν το άτομο επαναπροσβληθεί, τότε χρειάζεται χορήγηση διαφορετικού είδους αντιφυματικών φαρμάκων ^[25].

Η αντοχή στα αντιφυματικά φάρμακα απειλεί να υπονομεύσει τον αποτελεσματικό έλεγχο της TB. Οι αναφορές του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO), καθώς και της Διεθνούς Ένωσης εναντίον της Φυματίωσης και της Πνευμονοπάθειας υποδεικνύουν ότι σε περιοχές με αδύναμα προγράμματα ελέγχου της ασθένειας και με κακή χρήση των αντιφυματικών φαρμάκων, εμφανίστηκαν εστίες με πολυανθεκτικά στελέχη της φυματίωσης (MDR-TB) ^[26, 27], δηλαδή που έχουν αναπτύξει αντοχή σε περισσότερα από ένα από τα γνωστά αντιφυματικά. Οι περιπτώσεις αυτές είναι δυσκολότερες στη θεραπεία, ενώ υπάρχουν και στελέχη με αντοχή ακόμα και σε αντιφυματικά δεύτερης γραμμής (XDR-TB) ^[6,28]. Η πολυανθεκτικότητα έναντι της TB απαιτεί μεγαλύτερης διάρκειας θεραπευτικά προγράμματα που αποδεικνύονται συχνά τοξικότερα, ακριβότερα και πιο πιθανά να αποτύχουν σε σχέση με την υπερευαίσθητη αγωγή για τη φυματίωση ^[29].

Κατά τη διάρκεια της αντιφυματικής αγωγής διακρίνονται δύο φάσεις, η αρχική (initial high intensity phase) και η συνεχιζόμενη (continuation). Η αρχική φάση, διάρκειας 2-3 μηνών, αποσκοπεί στην ταχεία καταστροφή των πολυπληθών, ταχέως αναπτυσσόμενων μυκοβακτηριδίων, ενώ η συνεχιζόμενη φάση στην αποστείρωση, δηλαδή στη θανάτωση ολόκληρου του πληθυσμού και κυρίως των ενδοκυττάρων στελεχών, αποτρέποντας έτσι το ενδεχόμενο υποτροπής της νόσου ^[14, 30].

Η θεραπευτική αποτυχία, δηλαδή η παρουσία θετικών καλλιιεργειών μετά τη συμπλήρωση τεσσάρων μηνών αντιφυματικής αγωγής, είναι αποτέλεσμα πολλών παραγόντων ή και πολλές φορές οφείλεται σε συνδυασμό καταστάσεων. Μεταξύ άλλων, η θεραπευτική αποτυχία ενδεχομένως να οφείλεται και στο ότι ο ασθενής δε συμμορφώνεται με τη θεραπεία, λόγω της μακράς της διάρκειας και της πληθώρας χρήσης φαρμάκων ^[31, 32]. Επιπλέον, η ύπαρξη ανεπιθύμητων ενεργειών, το κόστος της θεραπείας, καθώς και η πεποίθηση που αποκτά ο ασθενής ότι έχει επιτευχθεί η θεραπεία, οδηγούν σε ένα μεγάλο ποσοστό στη μη ολοκλήρωση της θεραπείας ^[14]. Γι' αυτό το λόγο, μια επιτυχημένη τακτική είναι η "άμεσα παρατηρούμενη θεραπεία", γνωστή ως DOT (Directly Observed Therapy), κατά τη διάρκεια της οποίας ο ασθενής λαμβάνει τα φάρμακά του με εποπτεία, η οποία προσφέρεται από τοπικούς και κρατικούς φορείς υγείας ^[14].

Η εφαρμογή της αντιφυματικής θεραπείας καθίσταται ακόμα πιο δυσχερής όταν οι ασθενείς προέρχονται από ιδιαίτερες κοινωνικές ομάδες. Πρόκειται συχνά για ασθενείς αλκοολικούς, άστεγους, χρήστες ναρκωτικών ουσιών, ηλικιωμένους που διαμένουν μόνοι τους ή πάσχουν από ψυχικές και νοητικές διαταραχές. Η θεραπεία γίνεται κατά ένα μεγάλο βαθμό πιο πολύπλοκη όσον αφορά στους πάσχοντες από AIDS ^[32], λόγω των κοινών τοξικών δράσεων των φαρμάκων που ενδέχεται να επιτείνουν την ανοσοκαταστολή, καθώς και εξαιτίας των φαρμακοκινητικών αλληλεπιδράσεων, οι οποίες μειώνουν τα επίπεδα του φαρμάκου στο αίμα. Επομένως, απαιτούνται θεραπευτικά σχήματα, τα οποία είναι μικρότερης διάρκειας, πιο απλά, ασφαλέστερα, καλώς ανεκτά, καθώς και πιο αποτελεσματικά έναντι των ανθεκτικών στελεχών, και κατάλληλα για τη συνδυασμένη θεραπεία της φυματίωσης και του HIV ^[33].

1.3.2 Φάρμακα

Μετά από δεκαετίες στασιμότητας στην έρευνα επί νέων αντιφυματικών φαρμάκων, παρουσιάστηκε σημαντικό ενδιαφέρον από φαρμακευτικές εταιρίες, καθώς και μία πιο συνεχής οικονομική στήριξη, τόσο από κυβερνητικές όσο και από μη κυβερνητικές οργανώσεις. Το ενδιαφέρον αυτό, έχει οδηγήσει στο να βρεθούν ενώσεις ορισμένων τάξεων φαρμάκων, τα οποία επιδρούν σε διαφορετικούς βιολογικούς οδούς, όπως τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, τη σύνθεση του νουκλεϊκού οξέος, την πρωτεϊνική σύνθεση, κλπ, τα οποία βρίσκονται υπό τα στάδια κλινικών δοκιμών ^[34-37].

I. Φάρμακα πρώτης γραμμής

Τα πέντε βασικά φάρμακα "πρώτης γραμμής" που αφορούν στη φυματίωση είναι:^[2]
Ισονιαζίδιο (H/Inh, 1952) ^[38-40], ριφαμπικίνη (R/Rif, 1957) ^[41-42], πυραζιναμίδιο (Z/Pza, 1952)

[41,43-46], εθαμβουτόλη (E/Emb, 1961) [47] και στρεπτομυκίνη (S/Stm, 1944) [48]. Τα φάρμακα αυτά παρουσιάζουν την καλύτερη δραστηριότητα έναντι του βακτηρίου της φυματίωσης και χρησιμοποιούνται ιδιαίτερα σε άτομα με ενεργό φυματίωση, τα οποία δεν έχουν λάβει κάποια αντιφυματική θεραπεία στο παρελθόν. Όλα τα άλλα αντιφυματικά φάρμακα, αναφέρονται, γενικά, ως "δεύτερης γραμμής" φάρμακα ή φάρμακα κατά της φυματίωσης [38].

i. ΙΣΟΝΙΑΖΙΔΙΟ (H/Inh)

Το ισονιαζίδιο (INH) αποτελεί ένα μικρό πολικό μόριο, συνθετικό ανάλογο της πυριδοξίνης. Το INH (**Εικόνα 4**) είναι το πλέον δραστικό αντιφυματικό φάρμακο, έχοντας βακτηριοστατική δράση έναντι των στατικών πληθυσμών, και βακτηριοκτόνο έναντι των ταχέως αναπτυσσόμενων βακίλων [14]. Παρόλα αυτά, η δράση του στα άτυπα μυκοβακτηριακά είδη είναι περιορισμένη [23]. Μια πιο λεπτομερής ανάλυση, όσον αφορά στη δράση του ισονιαζιδίου γίνεται παρακάτω.

Στο μεταβολισμό του ισονιαζιδίου εμπλέκεται το ένζυμο *N*-ακετυλοτρανσφεράση και στο ανθρώπινο είδος υπάρχει ποικιλομορφία για το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο αυτό. Έτσι, παρατηρούνται ταχείς και αργοί ακετυλιωτές του INH, με το 50% των ατόμων της λευκής φυλής να ανήκουν στους αργούς. Αυτό, μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένα επίπεδα στο αίμα και αυξημένη ηπατοτοξικότητα, γεγονός που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά το σχεδιασμό τη θεραπείας [14].

Το ισονιαζίδιο, είναι το μοναδικό φάρμακο που συνιστάται και για την πρόληψη της ενεργούς φυματίωσης σε ομάδες αυξημένου κινδύνου, όπως όσοι εμφανίζουν θετική αντίδραση φυματίνης, τα μικρά παιδιά, οι HIV μολυνθέντες και οι ασθενείς με AIDS, καθώς και όσοι έχουν έλθει σε επαφή με άτομα με ενεργή πνευμονική φυματίωση [23].

ii. ΠΥΡΑΖΙΝΑΜΙΔΙΟ (Z/Pza)

Το πυραζιναμίδιο (**Εικόνα 4**) είναι ένα σταθερό, ελαφρώς υδατοδιαλυτό μόριο, συνθετικό ανάλογο του νικοτιναμιδίου. Είναι προφάρμακο, το οποίο ενεργοποιείται με τη βοήθεια της πυραζιναμιδάσης των βακτηρίων, που το υδρολύει προς πυραζινοϊκό οξύ. Διεισδύει στα μακροφάγα και έχει βακτηριοκτόνο δράση έναντι των ενδοκυτταρικών φυματιοβακίλων, οι οποίοι αναπτύσσονται στο όξινο pH των λυσοσώματων, αφού το όξινο περιβάλλον είναι απαραίτητο για την εκδήλωση της δράσης [23]. Αυτό το καθιστά χρήσιμο φάρμακο για την πρόληψη των υποτροπών, καθώς αυτές οφείλονται συχνά σε υπολειμματικά στελέχη που αντιστέκονται στη θανάτωση και παραμένουν ενδοκυττάρια [14].

iii. ΕΘΑΜΒΟΥΤΟΛΗ (E/Emb)

Η εθαμβουτόλη (**Εικόνα 4**) είναι μια συνθετική, υδατοδιαλυτή ουσία που διατίθεται υπό τη μορφή του δισυδροχλωρικού άλατος ^[23]. Είναι βακτηριοστατικό και ο μηχανισμός δράσης της έγγυται στην αναστολή των μυκοβακτηριακών αραβινοτρανσφερασών, οι οποίες κωδικοποιούνται από το γονίδιο embB (μέρος του οπερονίου embCAB). Τα ένζυμα αυτά καταλύουν την αντίδραση πολυμερισμού της αραβινογλυκάνης, που είναι απαραίτητο συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των μυκοβακτηριδίων. Επίσης, διακόπτουν τη βιοσύνθεση της αραβινογαλακτάνης και της λιποααραβινομαννάνης ^[24]. Έτσι, το κυτταρικό τοίχωμα καθίσταται ευαίσθητο στην προσβολή από λιπόφιλα φάρμακα, όπως η ριφαμπικίνη, που χρησιμοποιούν τα λιπιδικά τμήματα αυτής της δομής για να διαπεράσουν τον κυτταρικό φραγμό ^[14, 23]. Οι περισσότερες μεταλλάξεις, οι οποίες οδηγούν σε αντοχή στο συγκεκριμένο φάρμακο αφορούν στο οπερόνιο embCAB ^[24]. Διαπερνά τον ΑΕΦ μόνο εάν οι μήνιγγες φλεγμαίνουν, γι' αυτό είναι κατάλληλο για τις περιπτώσεις της φυματιώδους μηνιγγίτιδας ^[23].

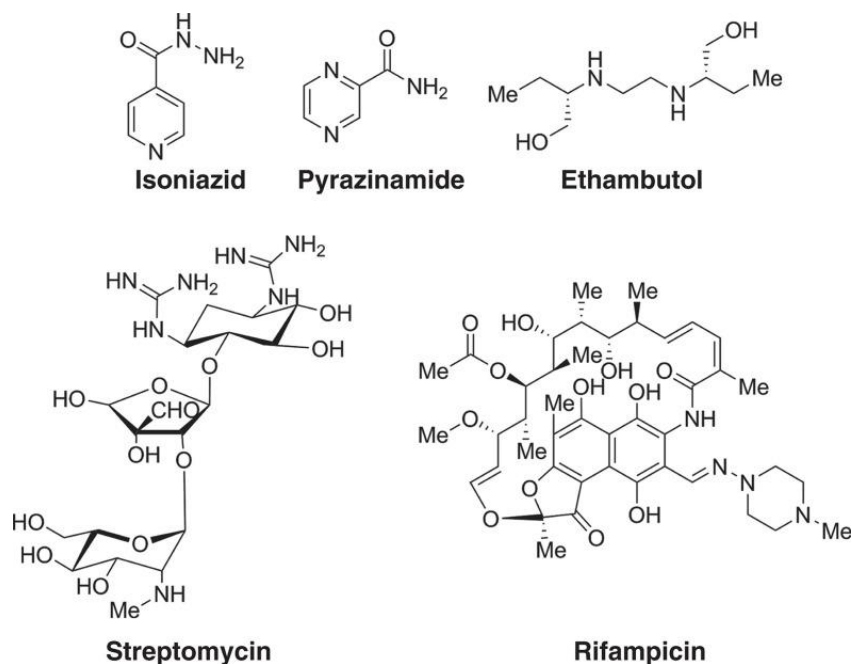
iv. ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΙΝΗ (S/Stm)

Η στρεπτομυκίνη (**Εικόνα 4**) είναι ένας υδατοδιαλυτός αμινογλυκοζίτης, ο οποίος παράγεται από το μύκητα *Streptomyces griseus* και ασκεί μικροβιοκτόνο δράση ^[14]. Είναι μη αναστρέψιμος αναστολέας της πρωτεϊνικής σύνθεσης. Εισέρχεται στο κύτταρο με τη βοήθεια πρωτεϊνικών διαύλων και συνδέεται με την ειδική 30S υπομονάδα των ριβοσωμικών πρωτεϊνών, αναστέλλοντας έτσι τη σύνθεσή τους ^[23]. Δε διαπερνά εύκολα το κυτταρικό τοίχωμα, γι' αυτό είναι δραστική, κυρίως έναντι των εξωκυττάρων βακίλων ^[14]. Διαπερνά τον ΑΕΦ και επιτυγχάνει θεραπευτικές συγκεντρώσεις στις φλεγμίνουσες μήνιγγες. Χρησιμοποιείται όταν είναι αναγκαίο ή επιθυμητό ένα ενέσιμο φάρμακο, κυρίως σε άτομα με σοβαρές και ενδεχομένως επικίνδυνες για τη ζωή μορφές φυματίωσης, όπως είναι η μηνιγγίτιδα και η διάσπαρτη νόσος, καθώς και για τη θεραπεία λοιμώξεων που είναι ανθεκτικές έναντι των άλλων φαρμάκων ^[23]. Παρόλα αυτά, η ευρεία χρήση του, κατά το παρελθόν, έχει δημιουργήσει αρκετά μικροβιακά στελέχη ανθεκτικά στη στρεπτομυκίνη, γι' αυτό η χρήση περιορίζεται σε περιπτώσεις που δεν είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί εθαμβουτόλη ^[14].

v. ΡΙΦΑΜΠΙΚΙΝΗ (R/Rif)

Η ριφαμπικίνη (**Εικόνα 4**) είναι ημισυνθετικό παράγωγο της ριφαμυκίνης, αντιβιοτικού που παράγεται από τον *Streptomyces mediterranei*. Είναι βακτηριοκτόνος και διεισδύει εύκολα στους περισσότερους ιστούς και τα φαγοκύτταρα. Μπορεί να θανατώσει μικροοργανισμούς που προσεγγίζονται πλημμελώς από πολλά φάρμακα, όπως είναι οι ενδοκυτταρικοί

μικροοργανισμοί και εκείνοι που συγκεντρώνονται σε αποστήματα και πνευμονικές λοιμώξεις. Το φάρμακο δρα παρεμποδίζοντας το αρχικό βήμα της σύνθεσης του mRNA, επιδρώντας στη β-υπομονάδα της βακτηριακής (όχι όμως της ανθρώπινης) RNA πολυμεράσης. Οι μεταλλάξεις, οι οποίες οδηγούν σε αντοχή, μειώνουν τη συγγένεια του φαρμάκου για τη βακτηριακή RNA πολυμεράση ή επηρεάζουν τη διαπερατότητα του κυτταρικού τοιχώματος. Αποτελεί εναλλακτικό μέσο πρόληψης για ασθενείς που δεν μπορούν να λάβουν ισονιαζίδιο ή που ήρθαν σε επαφή με στέλεχος ανθεκτικό στο INH^[23].

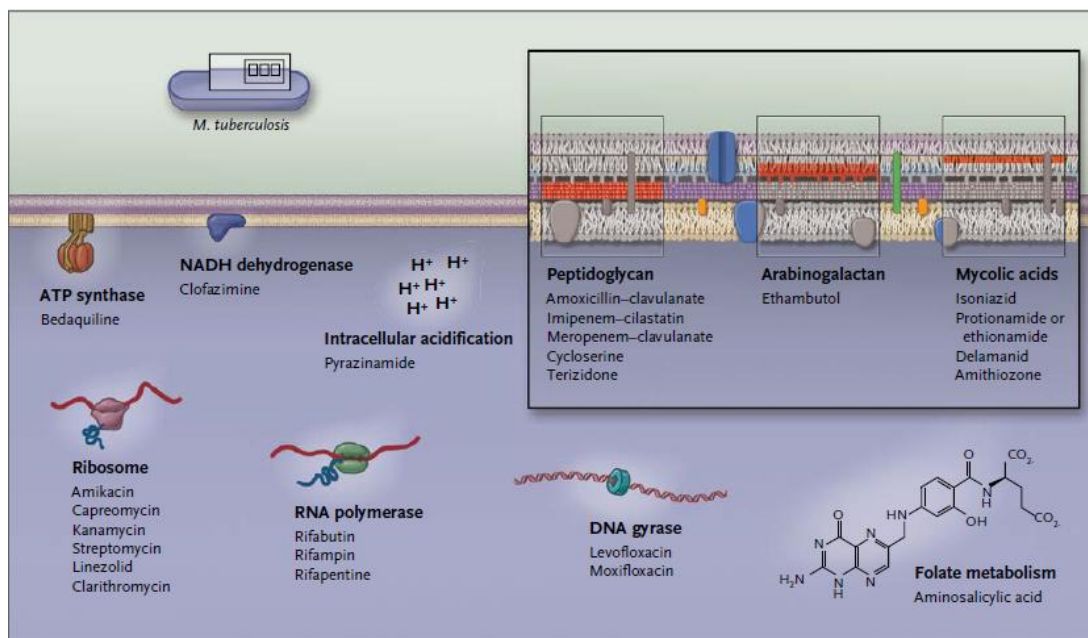


Εικόνα 4. Φάρμακα πρώτης γραμμής^[49].

II. Φάρμακα δεύτερης και τρίτης γραμμής

Τα φάρμακα δεύτερης γραμμής (SLDs) είναι λιγότερα αποτελεσματικά απ' ό τι τα φάρμακα της πρώτης γραμμής ή παρουσιάζουν κάποιες παρενέργειες. Σ' αυτή την κατηγορία μπορούν να καταταγούν και φάρμακα, τα οποία δε διατίθενται σε πολλές αναπτυσσόμενες χώρες. Επιπλέον, τα φάρμακα δεύτερης γραμμής χωρίζονται σε 6 κατηγορίες. Αυτές είναι (i) αμινογλυκοζίτες (αμικασίνη/AMK, καναμυκίνη/KM), (ii) πολυπεπτίδια (καπρεομυκίνη, βιομυκίνη, ενβιομυκίνη), (iii) φθοροκινολόνες (σιπροφλοξασίνη/CIP, μοξιφλοξακίνη/MXF, λεβοφλοξασίνη), (iv) θειαμίδια (προθειοναμίδιο, εθειοναμίδιο), (v) κυκλοσερίνη, και (vi) *p*-αμινοσαλικυλικό οξύ/PAS/P.

Τα φάρμακα τρίτης γραμμής δεν είναι επίσης πολύ δραστικά ή δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί η δραστικότητά τους. Αυτή η κατηγορία περιλαμβάνει τα ακόλουθα μόρια: λινεζολίδη (LZD), ριφαμπουτίνη, μακρολίδια (κλαριθρομυκίνη/ CLR), βιταμίνη D, thioacetazone (T), θειοριδαζίνη, και αργινίνη^[50]. Παρόλη τη δραστικότητα της ριφαμπουτίνης, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) δεν το θεωρεί επί του παρόντος ένα φάρμακο δεύτερης γραμμής, εξαιτίας της έλλειψης σχετικών χρηματοδοτικών πόρων στα αναπτυσσόμενα κράτη.



Εικόνα 5. Θέσεις και μηχανισμοί δράσης αντιμυκοβακτηριακών παραγόντων^[14].

1.3.3 Θεραπευτικό σχήμα

Το πρότυπο φαρμακευτικό σχήμα, το οποίο συστήνεται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) και τη Διεθνή Ένωση κατά της Φυματίωσης και των Νόσων του Αναπνευστικού (IUATLD) είναι διάρκειας 6 μηνών. Η θεραπεία αυτή περιλαμβάνει για τους πρώτους δύο μήνες *ισονιαζίδιο, ριφαμπικίνη, πυραζιναμίδιο και εθαμβουτόλη* (αρχική φάση) ακολουθούμενη από *ισονιαζίδιο και ριφαμπικίνη*, για τους υπόλοιπους τέσσερις μήνες (συνεχιζόμενη φάση)^[6,14,24,51-52]. Σε περιπτώσεις υποτροπής της νόσου ή προσβολής από πολυανθεκτικό στέλεχος του μικροβίου, στη θεραπεία πρώτης γραμμής, μπορούν να προστεθούν εναλλακτικά φάρμακα δεύτερης γραμμής και η θεραπεία να διαρκέσει έως και δύο χρόνια^[24]. Φυσικά, η τελική θεραπεία προσαρμόζεται στην ιδιοσυγκρασία του εκάστοτε

ασθενούς, σε συνδυασμό με τα δεδομένα που προκύπτουν ως προς την ευαισθησία του στελεχούς και τη μορφή της νόσου ^[14].

Η αύξηση του αριθμού των ατόμων που προσβάλλονται από την ανθεκτική στα φάρμακα φυματίωση (πολυανθεκτική/MDR-TB, εκτεταμένης αντοχής/XDT-TB), καθώς και τη λανθάνουσα φυματίωση, είναι ανησυχητική. Η θεραπεία αυτής της μορφής φυματίωσης XDT-TB αποτυγχάνει σε πολλές περιπτώσεις και η αποτυχία εντείνεται, όταν συνυπάρχει με τη νόσο HIV/AIDS. Γενικά, το ένα τρίτο του παγκόσμιου πληθυσμού εκτιμάται ότι θα προσβληθεί από τη λανθάνουσα φυματίωση (LTBI/Latent Tuberculosis Infection): τα άτομα δε θα πάσχουν από την ενεργό πνευμονική φυματίωση, αλλά είναι πιθανόν να την αναπτύξουν στο κοντινό ή μακρινό μέλλον, μια διαδικασία που ονομάζεται "επανενεργοποίηση της φυματίωσης". ^[53]

Καθώς η σημερινή διάρκεια της τρέχουσας θεραπείας είναι μακράς διάρκειας (6-8 μήνες) και περιλαμβάνει ένα συνδυασμό διαφόρων φαρμάκων, δημιουργούνται επακόλουθα προβλήματα τόσο συμμόρφωσης, όσο και τοξικότητας ^[14, 54]. Ωστόσο, με την απουσία της ενδεδειγμένης φαρμακευτικής αγωγής, το άτομο με φυματίωση ενεργού μορφής θα μπορούσε ενδεχομένως να μεταδώσει αυτή την ασθένεια σε άλλα άτομα, ανεξάρτητα ηλικίας, γένους, ή άλλων κοινωνικών παραγόντων. Η φυματίωση είχε κηρυχθεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, το 1993, ως παγκόσμια κατάσταση έκτακτης ανάγκης ^[55].

Επομένως, όλα αυτά καθιστούν αναγκαία την ανακάλυψη νέων φαρμάκων με διαφορετικούς και κυρίως αποτελεσματικούς μηχανισμούς δράσης, ώστε η φυματίωση να αντιμετωπιστεί δυναμικά, και έτσι να επιτευχθεί η πλήρης εξάλειψή της ^[28, 56].

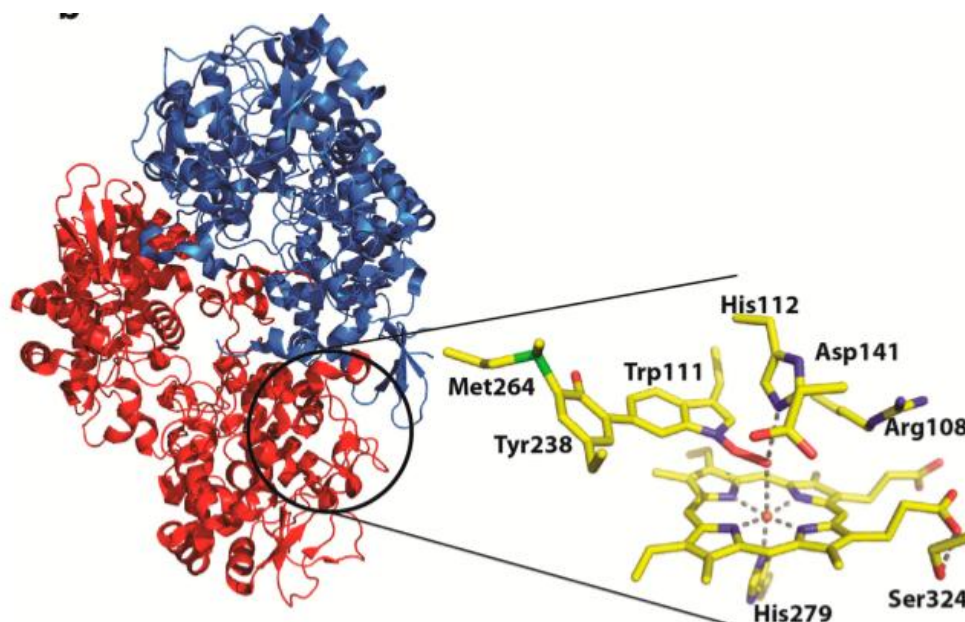
1.4 Μελέτη εισόδου και γενικής δράσης του ισονιαζιδίου στο *Mycobacterium tuberculosis*

Το υδραζίδιο του ισονικοτινικού οξέος (ισονιαζίδιο ή INH) είναι ένα προφάρμακο, το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως πρώτη γραμμής φάρμακο, για τη χημειοθεραπεία της φυματίωσης ^[57-60, 65]. Είναι γεγονός ότι το ισονιαζίδιο εξακολουθεί να αποτελεί το πιο αποτελεσματικό φάρμακο εναντίον στο φυσικού τύπου *M.tuberculosis* και συνεπώς συνεχίζεται η χρήση του για την καταπολέμηση της ασθένειας ^[34].

Προτείνεται ότι το INH εισέρχεται στα κύτταρα του *M. tuberculosis* με παθητική διάχυση μέσω πωρίνων. Το INH είναι ένα μικρό, υδατοδιαλυτό μόριο, που δεν ιονίζεται μεταξύ των τιμών pH 6-9 (Kriiger-Thiemer, 1956) ^[61]. Προτείνεται ότι η διέλευση του ισονιαζιδίου από το πλούσιο λιπιδικό κυτταρικό τοίχωμα του *M. tuberculosis*, πραγματοποιείται με διευκολυμένη παθητική διάχυση, μέσω των πωρίνων, οι οποίοι είναι ανοικτοί δίαυλοι με νερό στο εσωτερικό τους ^[62].

Πολλές γενετικές και βιοχημικές έρευνες έχουν αποκαλύψει ότι το INH μετατρέπεται στην ενεργό του μορφή, από τη βακτηριακή καταλάση-υπεροξειδάση KatG του *Mycobacterium tuberculosis* (**Εικόνα 6**)^[57-60,63-65]. Αρχικά, οι πρωτεΐνες KatG αναγνωρίστηκαν ως ένζυμα αίμης διπλής λειτουργίας, εμφανίζοντας τόσο καταλυτική, όσο και ευρεία δράση υπεροξειδασών και ανήκουν στην τάξη I της οικογένειας των υπεροξειδασών^[58].

Ο κύριος ρόλος της καταλάσης-υπεροξειδάσης KatG, στην ενεργοποίηση του INH, έχει διερευνηθεί επαρκώς, μέσω της ταυτοποίησης ενός μεγάλου αριθμού μεταλλαγμένων KatG που προκαλούν ανοχή στο INH^[66-69]. Ένα κατάλοιπο σερίνης, Ser, το οποίο βρίσκεται στην είσοδο της κοιλότητας της αίμης, αποτελεί την πιο συνήθη θέση, στην οποία λαμβάνουν χώρα μεταλλάξεις, που προκαλούν την ανοχή στο INH^[70,71].

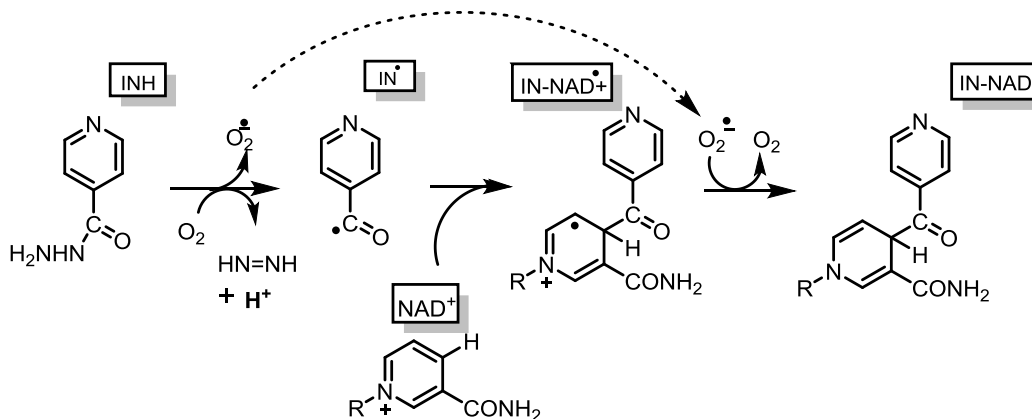


Εικόνα 6. Σύμπλοκο καταλάσης-υπεροξειδάσης KatG, βασισμένο στην κρυσταλλική δομή της καταλάσης *Burkholderia pseudomallei* KatG (BpKatG) (PDB code 2FXJ). Η αίμη και τα κύρια αμινοξικά κατάλοιπα του ενεργού κέντρου, το οποίο περιλαμβάνει και το σύμπλοκο προσθήκης, M-Y-W (Met255-Tyr229-Trp107/ Μεθειονίνη-Τυροσίνη-Τρυπτοφάνη)^[72].

Η καταλάση-υπεροξειδάση KatG δεν εμπλέκεται στη μεταφορά του INH εντός του μυκοβακτηριδίου, παρά μόνο στην ενδοκυττάρια συσσώρευση των οξειδωμένων παραγώγων του INH, κυρίως του ισονικωτικού οξέος, το οποίο παγιδεύεται εντός των κυττάρων στην ιονισμένη του μορφή^[61].

1.4.1 Ενεργοποίηση του INH: δημιουργία του συμπλόκου IN-NAD

Η ενεργοποίηση του INH περιλαμβάνει μία σχάση που οδηγεί στο σχηματισμό της ισονικοτινυλικής ρίζας (IN[•])^[77], η οποία ακολούθως συζεύγνυται με την οξειδωμένη μορφή του νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (NAD⁺). Έτσι, σχηματίζεται το σύμπλοκο της ισονικοτινυλικής ρίζας με το νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο, (ισονικοτινυλο-NAD / IN-NAD)^[77] (Εικόνα 7).



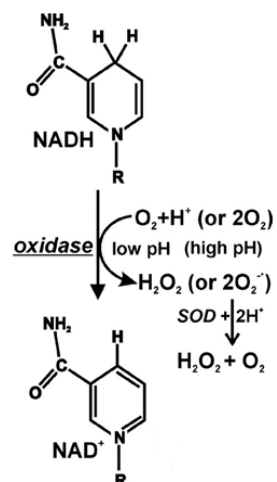
Εικόνα 7. Η οξειδωση του ισονιαζιδίου (INH) προς την ισονικοτινυλική ρίζα (IN[•]), η αντίδρασή της με το NAD⁺ για το σχηματισμό του IN-NAD^{•+} και το τελικό προϊόν IN-NAD με την παρουσία της υπεροξειδικής ρίζας^[71].

Στη συνέχεια, το σύμπλοκο IN-NAD συνδέεται και αναστέλλει την αναγωγία μίας ενοϋλοακυλοφόρου πρωτεΐνης (enoyl-acyl carrier protein reductase) (InhA). Οι αναγωγάσες των ενοϋλοακυλοφόρων πρωτεϊνών αποτελούν ένζυμα του συστήματος τύπου II (FASII) της συνθάσης των λιπαρών οξέων. Συγκεκριμένα, έχουν την ικανότητα να καταλύουν την αναγωγή του διπλού δεσμού, στη 2-θέση μίας αλυσίδας λιπαρών οξέων, η οποία είναι συνδεδεμένη στην ακυλοφόρο πρωτεΐνη (ACP). Επίσης, η αναγωγή πραγματοποιείται με τη βοήθεια της ανηγμένης μορφής του νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (NADH). Αυτή η ενζυματική δράση είναι κοινή σε όλες τις γνωστές βιοσυνθετικές οδούς των λιπαρών οξέων. Η αναγωγία InhA, κατά προτίμηση, μειώνει το μέγεθος των υποστρωμάτων μακριάς λιπιδικής αλυσίδας (αυτών που περιέχουν 16 ή περισσότερα άτομα άνθρακα).

Συνεπώς, τα προϊόντα κατάλυσης της αναγωγίας InhA, χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία των μυκολικών οξέων. Αυτή η αναστολή προκαλεί, αρχικά τη συσσώρευση των λιπαρών οξέων μακριάς αλυσίδας, ακολούθως την αναστολή της βιοσύνθεσης των μυκολικών οξέων και τελικά τον κυτταρικό θάνατο του βακτηρίου^[34,59,60,78-82].

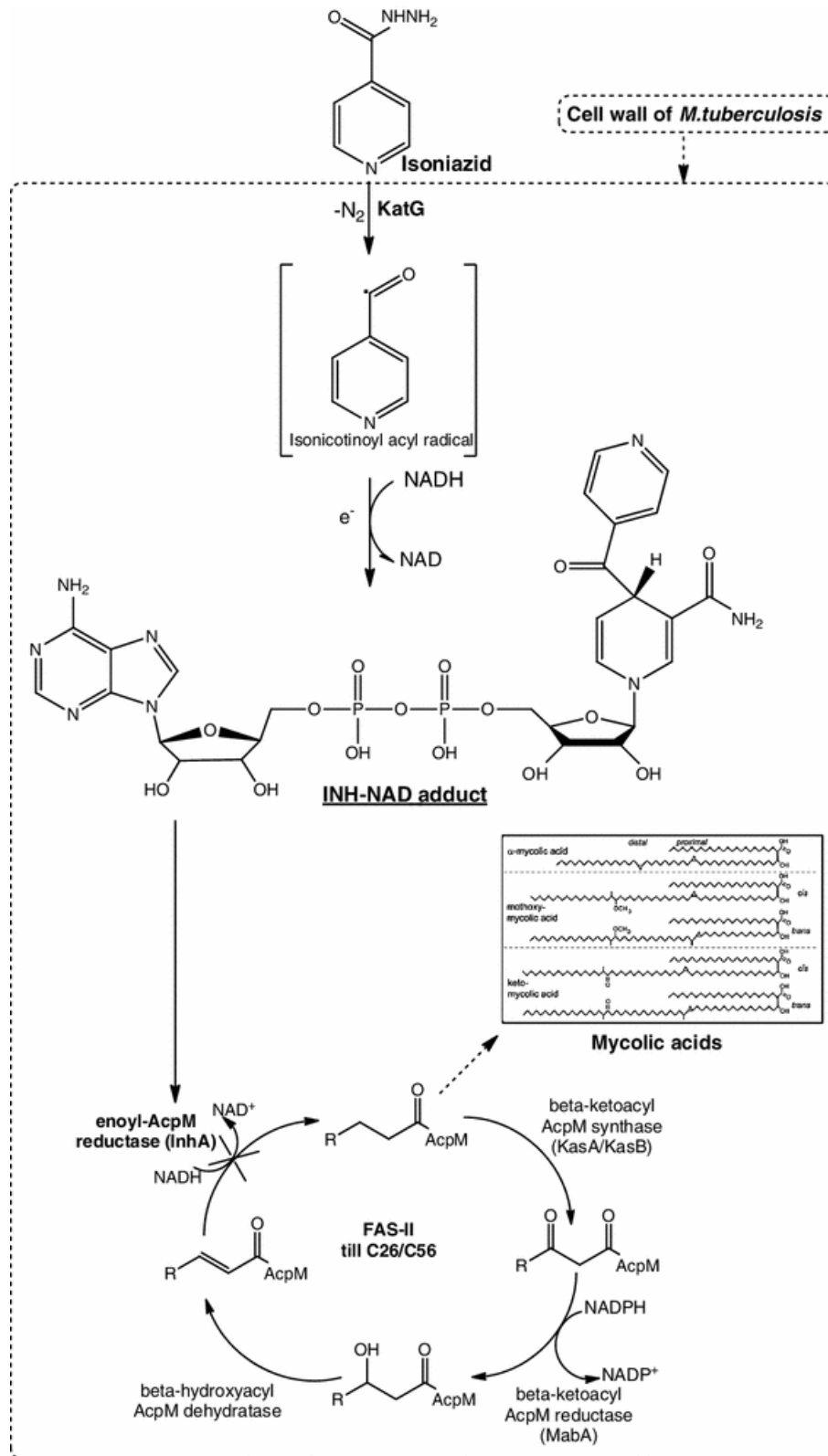
1.4.2 Οξειδάση NADH και ενεργοποίηση του ισονιαζιδίου από την καταλάση-υπεροξειδάση KatG

Η πρωτεΐνη KatG που προέρχεται από το *Mycobacterium tuberculosis*, έχει πολλές δράσεις^[73]. Δύο εξ' αυτών είναι οι δράσεις της οξειδάσης NADH, καθώς και της συνθάσης του αναστολέα IN-NAD, οι οποίες και ξεχωρίζουν από τις δράσεις των καταλασών και των υπεροξειδασών της KatG. Σε κάποιες περιπτώσεις, πιθανόν, οι δράσεις τους να ενισχύονται με την προσθήκη H₂O₂ ή άλλων υπεροξειδίων, ενώ μπορούν να λειτουργούν χωρίς επιπρόσθετα υπεροξείδια. Επίσης, περιλαμβάνουν τη δημιουργία ή και τη συμμετοχή της υπεροξειδικής ρίζας O₂^{•-}. Αυτές οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται με πολύ πιο αργό ρυθμό από εκείνες των καταλασών ή υπεροξειδασών, αλλά έχουν σημαντικό ρόλο στην αντιφυματική δράση του INH^[63].



Εικόνα 8. Πιθανές επιλογές αντίδρασης της οξειδάσης NADH, ανάλογα με το pH σε κάθε περίπτωση^[73].

Η οξειδάση NADH καταλύει την οξείδωση του NADH για να σχηματιστεί το NAD⁺ και H₂O₂ ή υπεροξειδική ρίζα (superoxide radical), ανάλογα με το pH. Η δημιουργία των υπεροξειδικών ριζών, O₂^{•-}, γίνεται με τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH προς το εσωτερικό του κυττάρου, κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης, μέσω σύζευξής τους με το μοριακό οξυγόνο (δέκτης ηλεκτρονίων)^[74]. Κατ' αυτόν τον τρόπο, πραγματοποιείται η αναγωγή του O₂ προς O₂^{•-}/H₂O₂, γνωστή αντίδραση στις υπεροξειδάσες^[63,75,76]. Η αντίδραση της οξειδάσης NADH στην καταλάση-υπεροξειδάση KatG, απαιτεί μοριακό οξυγόνο, O₂, αλλά δεν απαιτεί υπεροξείδιο του υδρογόνου, H₂O₂. Επίσης, η αντίδραση της οξειδάσης NADH δεν αναστέλλεται από το υπεροξείδιο της δισμουτάσης (superoxide dismutase/SOD), που καταλύει την αυτοοξειδαναγωγή της υπεροξειδικής ρίζας O₂^{•-} προς H₂O₂ και O₂, αλλά ούτε και από την καταλάση (catalase)^[73], που διασπά το H₂O₂ προς H₂O και O₂ (βέλτιστο pH 8.75). Αυτή η προτίμηση στο pH, στο οποίο δρα η οξειδάση NADH, κάνει τις αντιδράσεις της να είναι ξεχωριστές και να διαφοροποιούνται σαφώς από τις αντιδράσεις της υπεροξειδάσης και της καταλάσης, με βέλτιστο pH 5.5 και 6.5, αντίστοιχα^[73] (**Εικόνα 8**).



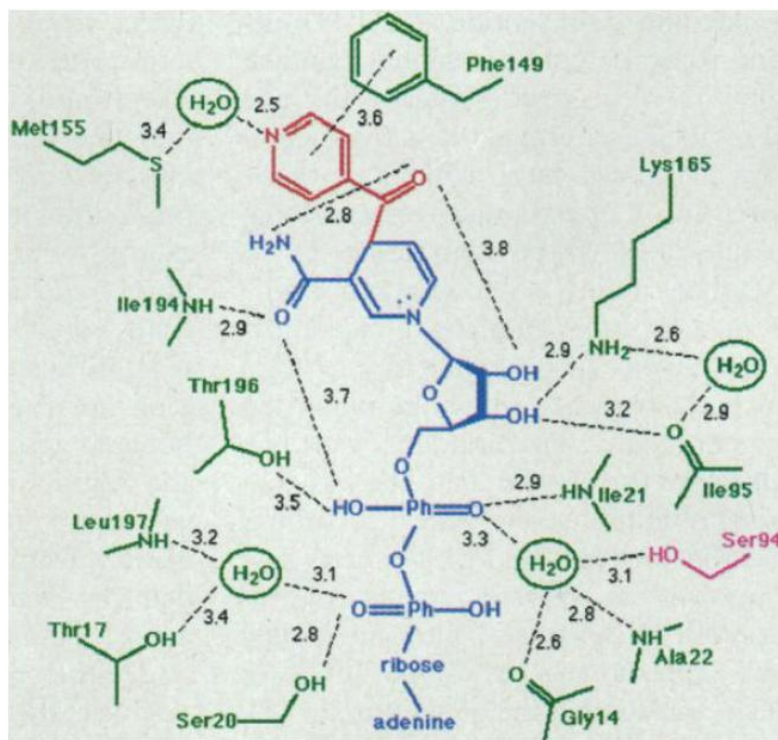
Εικόνα 9. Μηχανισμός δράσης του INH στο *M.tb* [80-82].

1.4.3 Ο μηχανισμός αναστολής της αναγωγής InhA από το ενεργοποιημένο σύμπλοκο IN-NAD [57, 59]

Η ευαισθησία και η αντοχή του *M.tuberculosis* στο ισονιαζίδιο εξηγούνται από την ύπαρξη του αναστολέα, ισονικοτινυλο-NAD (IN-NAD), τη συγγένεια της αναγωγής InhA για την ανηγμένη μορφή του NADH, καθώς και τη σειρά με την οποία η ανηγμένη μορφή του NADH και τα υποστρώματα της ακυλοφόρου πρωτεΐνης προσδένονται στην αναγωγή InhA. Έχει αποδειχθεί, ότι η αλληλουχία πρόσδεσης του NADH ανηγμένης μορφής και των μεγάλου μήκους υποστρωμάτων της ακυλοφόρου πρωτεΐνης (acyl-ACP), στην αναγωγή InhA, δεν είναι αυστηρά καθορισμένη, αλλά ότι υπάρχει μία προτίμηση στο να προσδένεται πρώτα το NADH ανηγμένης μορφής [83]. Συνεπώς, τα περισσότερα ένζυμα φυσικού τύπου InhA παραμένουν δεσμευμένα με το NADH, και είναι διαθέσιμα για προσβολή από το ενεργοποιημένο ισονιαζίδιο, IN-NAD, σχηματίζοντας ομοιοπολικό δεσμό με αυτά [17,14,23]. Αν η αναγωγή InhA φυσικού τύπου δεν μπορεί να αποδεσμεύσει επαρκείς ποσότητες του ισονικοτινυλο-NAD (IN-NAD), θα οδηγήσει στη μόνιμη αναστολή του ενζύμου InhA και κατά συνέπεια στην αναστολή της βιοσύνθεσης του μυκολικού οξέος.

Το φαινόμενο της αντοχής του μυκοβακτηριδίου (Mtb) στο ισονιαζίδιο (INH) οφείλεται σε χρωμοσωμικές μεταλλάξεις είτε στην καταλάση-υπεροξειδάση KatG, είτε στο ένζυμο στόχο του ισονιαζιδίου, την αναγωγή InhA, που λαμβάνει χώρα ταχύτατα, όταν το INH χρησιμοποιηθεί ως μονοθεραπεία [14, 23].

Επομένως, στο μεταλλαγμένο στελέχος S94A, που προέρχεται από την αντικατάσταση ενός αμινοξέος σερίνης από αλανίνη [Ser⁹⁴ με Ala (S94A)] στο *M.tuberculosis*, η μειωμένη συγγένεια του ενζύμου InhA για την ανηγμένη μορφή του NADH ευνοεί την πρόσδεση των υποστρωμάτων της ακυλοφόρου πρωτεΐνης στη μεταλλαγμένη αναγωγή InhA, πριν από την ανηγμένη μορφή του NADH. Με αυτό τον τρόπο, επιτρέπεται η προστασία των περισσότερων αναγωγών InhA από την προσβολή που προέρχεται από το ενεργοποιημένο ισονιαζίδιο. Όταν το ισονικοτινυλο-NAD (IN-NAD) σχηματίζεται στο μεταλλαγμένο ένζυμο, η χαμηλή συγγένεια για το NADH οδηγεί στην αποδέσμευση του ισονικοτινυλο-NAD και την εμφάνιση της φυματίωσης με αντοχή στο ισονιαζίδιο.



Εικόνα 10. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ του συμπλόκου ισονικωτινυλο-NAD (IN-NAD) και του ενεργού κέντρου της αναγωγάσης IthA, την οποία αναστέλλει. Η ισονικωτινυλομάδα, που προέρχεται από το ισονιαζίδιο επισημαίνεται με κόκκινο χρώμα, το τμήμα του αναλόγου που αντιστοιχεί στην ανηγμένη μορφή NADH φαίνεται με μπλε, οι πλευρικές αλυσίδες της αναγωγάσης IthA με πράσινο, και τέλος η σερίνη, Ser⁹⁴, η οποία είναι το κατάλοιπο που προκαλεί αντοχή στο ισονιαζίδιο, όταν μετατρέπεται σε αλανίνη, Ala, παρουσιάζεται με ροζ χρώμα. Οι αριθμοί αναφέρονται στην απόσταση μεταξύ επιλεγμένων ατόμων σε angstroms ^[59].

Στην Εικόνα **10**, ο προσανατολισμός της ισονικωτινυλομάδας, όσον αφορά στο τμήμα της ανηγμένης μορφής NADH του αναστολέα, επιτρέπει στο οξυγόνο του καρβονυλίου να βρίσκεται περίπου στο ήμισυ της απόστασης των δύο δοτών δεσμού υδρογόνου, του αμιδικού αζώτου του νικοτιναμιδικού δακτυλίου, και του 2'-υδροξυλικού οξυγόνου του δακτυλίου της νικοτιναμιδικής ριβόζης. Επιπλέον, το άτομο αζώτου της ισονικωτινυλομάδας σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με ένα μόριο νερού, το οποίο συγκρατείται από την πλευρική αλυσίδα ενός καταλοίπου μεθιονίνης, Met¹⁵⁵. Ο πυριδινικός δακτύλιος της ισονικωτινυλομάδας περιβάλλεται από υδρόφοβα κατάλοιπα αμινοξέων, όπως Phe¹⁴⁹, Gly¹⁹², Pro¹⁹³, Leu²¹⁸, Tyr¹⁵⁸, και Trp²²².

1.5 Διερεύνηση του μηχανισμού ενεργοποίησης του INH από την καταλάση-υπεροξειδάση KatG, καθώς και της θέσης πρόσδεσης του INH στην KatG του *M.tuberculosis*

Με στόχο την κατανόηση του τρόπου δράσης του ισονιαζιδίου, καθώς και για το σχεδιασμό βελτιωμένων παραγώγων του, είναι απαραίτητη η λεπτομερής μελέτη της ενζυματικής ενεργοποίησης του ισονιαζιδίου από την καταλάση-υπεροξειδάση KatG του *M. tuberculosis*.

Η καταλάση-υπεροξειδάση KatG ^[63] αποτελεί τον κατάλληλο στόχο για τη διερεύνηση της δομής και της λειτουργίας της πρωτεϊνικής αίμης. Παρόλο που το σύνολο των καταλασών-υπεροξειδασών KatG δείχνουν πολυλειτουργικότητα, η δράση που κυριαρχεί, είναι η καταλυτική ^[84,85]. Πριν ακόμα γίνει γνωστή η δομή της καταλάσης-υπεροξειδάσης KatG ^[86], η αμινοξική αλληλουχία υπεδείκνυε με σαφήνεια ότι δεν είχε καμία σχέση με τη μεγάλη ή τη μικρή υπομονάδα των καταλασών της αίμης. Αντιθέτως, η καταλάση-υπεροξειδάση KatG ταυτίζεται απόλυτα σε υπερροξειδάσες που δε βρίσκονται στα ζώα ^[87-91], οι οποίες είναι πλέον γνωστές ως υπεροικογένεια των υπερροξειδασών-καταλασών. Μετά από συγκρίσεις των ενεργών τους κέντρων, αποδείχθηκε ότι η καταλάση-υπεροξειδάση KatG ανήκει στην τάξη I της υπεροικογένειας, μαζί με την υπερροξειδάση του κυτοχρώματος c (CcP), καθώς και την ασκορβική υπερροξειδάση (APx) (**διαμόρφωση μεγέθυνσης: Εικόνα 11**).

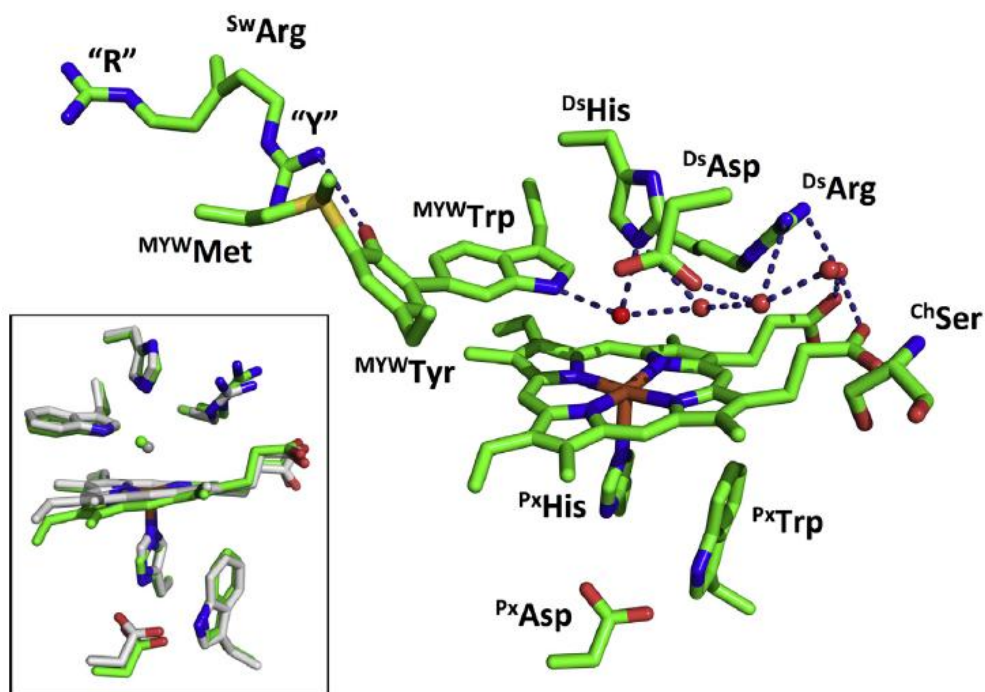
1.5.1 KatG σε κατασταση ηρεμίας

Αίμη: περιγραφή πουρινικού δακτυλίου αίμης

Ως γνωστόν, η αίμη b αποτελείται από έναν ετεροκυκλικό πορφυρινικό δακτύλιο, στο κέντρο του οποίου βρίσκεται δεσμευμένο ένα ιόν σιδήρου. Ο σίδηρος της αίμης b, που περιέχεται στην καταλάση-υπεροξειδάση KatG, είναι δεσμευμένος στους τέσσερις πυρρολικούς δακτυλίους, μέσω των αντίστοιχων αζώτων τους (σχηματίζοντας ένα επίπεδο), όπου προσδέεται ένας πέμπτος υποκαταστάτης, που περιέχει άτομο δότη ζεύγους ηλεκτρονίων. Ένα τέτοιο άτομο προσφέρεται από το ιμιδαζόλιο της ιστιδίνης (His) της καταλάσης-υπεροξειδάσης KatG προς το άτομο σιδήρου της αίμης, και έτσι σχηματίζεται ο πεντασχιδής σίδηρος.

Το επίπεδο της αίμης, διχοτομεί το ενεργό κέντρο και ο υποκαταστάτης της ιστιδίνης περιέχεται στο πλησιέστερο (proximal) μισό. Όπως και για κάθε άλλο μέλος της υπεροικογένειάς του, ο πλησιέστερος υποκαταστάτης ιστιδίνης (^{Px}His) της καταλάσης-υπεροξειδάσης KatG, αποκτά διαμόρφωση στο χώρο που οφείλεται σε ένα δεσμό υδρογόνου

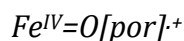
με ένα αμινοξύ του ασπαραγινικού οξέος (^{Px}Asp) (**Εικόνα 11**). Στην υπεροξειδάση του κυτοχρώματος c (CcP), το ασπαραγινικό οξύ προσφέρει ένα ισχυρό ανιονικό χαρακτήρα και ένα χαμηλό δυναμικό αναγωγής για το σίδηρο της αίμης (-182 mV)^[92]. Μετά από μέτρηση των δυναμικών αναγωγής για πολλαπλές καταλάσες-υπεροξειδάσες KatG, βρέθηκε ότι κυμαίνονται μεταξύ -186 mV και -226 mV^[93-95]. Ωστόσο, σύμφωνα με προηγούμενες έρευνες, σε αυτό το εύρος τιμών δεν εμπίπτει το δυναμικό αναγωγής της καταλάσας-υπεροξειδάσης KatG του *M. tuberculosis* (MtKatG), το οποίο βρέθηκε ότι είναι $Fe^{III}/Fe^{II} \sim -60$ mV^[96]. Εντούτοις, το δυναμικό του σιδήρου της αίμης είναι επαρκώς αρνητικό, έτσι ώστε όλα τα υπό εξέταση ένζυμα KatG, που διαχωρίστηκαν, να βρεθούν στην οξειδωτική κατάσταση Fe^{III} .



Εικόνα 11.^[63] Το ενεργό κέντρο της καταλάσας-υπεροξειδάσης KatG. Τα κατάλοιπα αμινοξέων της πλησιέστερης κοιότητας συμβολίζονται με τον εκθέτη Px (π.χ ^{Px}His), ενώ εκείνα της απομακρυσμένης κοιότητας με Ds (π.χ ^{Ds}His). Τα μέλη του συμπαραγόνα MYW (Met-Tyr-Trp/μεθειονίνη-τυροσίνη-τρυπτοφάνη) συμβολίζονται με τον αντίστοιχο εκθέτη (π.χ ^{MYW}Trp) ως οι “R” και “Y” διαμορφώσεις που η αργινίνη μπορεί και εναλλάσσει (^{Sw}Arg) και τέλος η σερίνη συμβολίζεται με ^{Ch}Ser , που επιτρέπει την είσοδο στο διάυλο (channel). Στην κρυσταλλική δομή, που απεικονίζεται στη μεγέθυνση της εικόνας, παρατηρείται ένα στρώμα των συντηρητικών καταλοίπων του ενεργού κέντρου της υπεροξειδάσης CcP (άνθρακες με γκρι χρώμα) (PDB: 2CYP^[97]) και τα αντίστοιχα κατάλοιπα της καταλάσας-υπεροξειδάσης KatG (άνθρακες με πράσινο χρώμα) (2CCA^[98,99]).

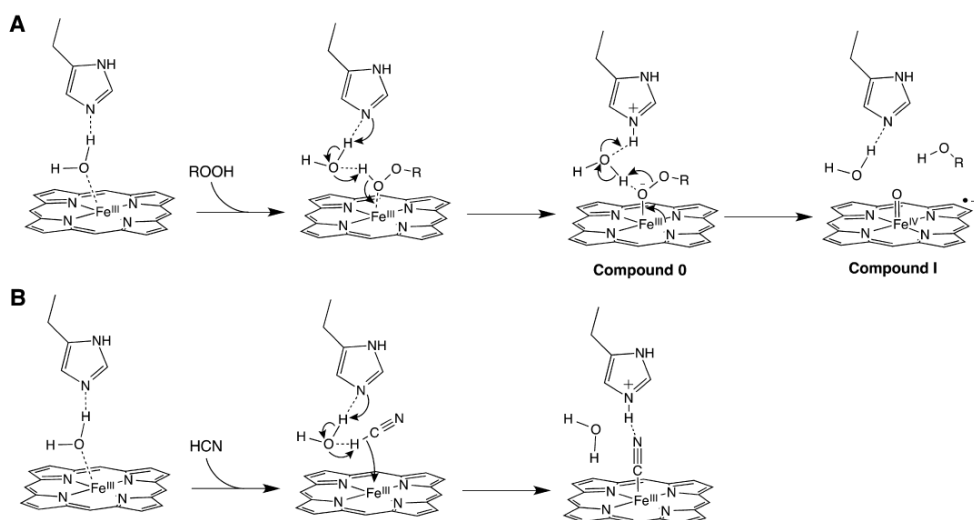
Γενικά, η δομή της καταλάσης-υπεροξειδάσης KatG διασφαλίζει την υπεροχή των ατόμων σιδήρου αίμης υψηλού spin (high-spin/HS) έναντι εκείνων που βρίσκονται σε καταστάσεις χαμηλού spin (low-spin/LS) ^[100-103]. Παρόλο που η αίμη υψηλού spin κυριαρχεί, οι καταλάσεις-υπεροξειδάσες KatG δεν είναι σταθερές ^[104-108]. Ο αριθμός των καταστάσεων και ο βαθμός κατά τον οποίο κατανέμονται, σχετίζονται με τη θέση και την εγγύτητα του H₂O γύρω από την έκτη θέση συναρμογής του σιδήρου της αίμης. Με τον ίδιο τρόπο, η κατανομή αυτών των καταστάσεων συναρμογής υψηλού spin, παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία ως προς το pH, στα ρυθμιστικά διαλύματα ταυτοποίησης, στο χρόνο ζωής του ενζύμου, στα υποστρώματα και την υποκατάσταση των αμινοξέων περίξ του ενεργού κέντρου του ενζύμου ^[100,102,109,110].

1.5.2 Οι υψηλότερες οξειδωτικές καταστάσεις της καταλάσης-υπεροξειδάσης KatG ^[63]



Η αντίδραση Fe^{III} του ενζύμου με το H₂O₂ για να σχηματιστεί το ενδιάμεσο της σιδηροπορφυρινικής π κατιονικής ρίζας (Fe^{IV}=O[por]⁺), που αναφέρεται ως ένωση I, είναι αντιπροσωπευτική της υπεροικογένειας των υπεροξειδασών-καταλασών (**Εικόνα 12**).

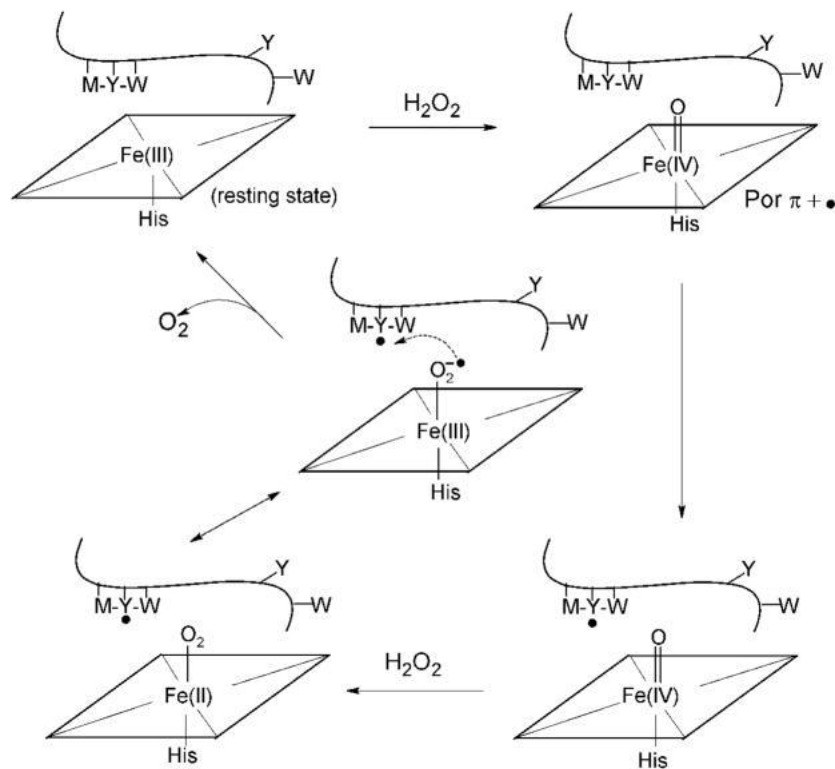
Η καταλάση-υπεροξειδάση KatG, δεν παρουσιάζει μόνο τάση για ενδομοριακές μεταφορές ηλεκτρονίων, αλλά και μια ισχυρή καταλυτική δράση. Αυτή η δράση, διασφαλίζει ότι οι υψηλότερες ενεργειακές καταστάσεις δεν είναι σταθερές, πριν το ένζυμο επιστρέψει στην οξειδωτική κατάσταση Fe^{III}, μέσω των επακόλουθων αντιδράσεων με το H₂O₂. Έτσι, πολλά από τα στοιχεία για το ενδιάμεσο της σιδηροπορφυρινικής π κατιονικής ρίζας (Fe^{IV}=O[por]⁺) της καταλάσης-υπεροξειδάσης KatG έχουν προέλθει είτε από αντιδράσεις ενζύμων φυσικού τύπου με άλλα υπεροξειδία, όπως το υπεροξικό οξύ (peracetic acid/PAA), είτε από αντιδράσεις άλλων μορφών ενζύμων, που εμφανίζουν ένδεια σε καταλάσες, με το H₂O₂.



Εικόνα 12. (A) Η οξειδωση του Fe της καταλάσης-υπεροξειδάσης και (B) ο ανάλογος σχηματισμός του σιδηροκυανικού συμπλόκου κατά την αντίδραση του με HCN ^[63].

Ο σχηματισμός της σιδηροπορφυρινικής π κατιονικής ρίζας ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}[\text{por}]^+$) έχει προταθεί ότι λαμβάνει χώρα μέσω ενός συμπλόκου $\text{Fe}^{\text{III}}-\text{OOH}$, που αναφέρεται ως ένωση 0. Συμπτωματικά, μία πιο βραδεία αντίδραση της καταλάσης *burkholderia pseudomallei* KatG (BrKatG) με το υπεροξικό οξύ ^[111] επιτρέπει να ανιχνευθούν δύο διαδοχικά στάδια, τα οποία υποδεικνύουν την παρουσία μιας ενδιάμεσης ένωσης, παρόμοια με την ένωση 0 ^[112]. Η δέσμευση με το υδροκυάνιο έχει αναγνωρισθεί ως ένας χρήσιμος τρόπος μίμησης του σχηματισμού της σιδηροπορφυρινικής π κατιονικής ρίζας ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}[\text{por}]^+$), ειδικά κατά τον αρχικό σχηματισμό της ένωσης 0, επειδή συμμετέχει το HCN, ακριβώς όπως είναι το H_2O_2 (όχι HO_2^-), το οποίο αντιδρά με τη σιδηρική υπεροξειδάση (**Εικόνα 12**) ^[113].

Σύμφωνα με το μηχανισμό Roulas-Kraut, το απομακρυσμένο κατάλοιπο ιστιδίνης (DisHis) είναι ο βασικός δέκτης H^+ για το σχηματισμό του ενδιάμεσου σιδηροπορφυρινικής π κατιονικής ρίζας ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}[\text{por}]^+$) ^[114], όπως επίσης το ίδιο προβλέπεται ότι ισχύει κατά τη δέσμευση με το HCN ^[113]. Οι υπολογισμοί υποδεικνύουν την ύπαρξη ενός "άνυδρου" ενεργού κέντρου υπεροξειδάσης, το οποίο δημιουργεί ένα φραγμό για την αποπρωτονίωση του H_2O_2 από το απομακρυσμένο κατάλοιπο ιστιδίνης (DisHis). Ένα ενδιάμεσο μόριο H_2O , που λειτουργεί ως μεταφορέας H^+ , μειώνει τον φραγμό κατά τρεις φορές, με βάση τις πειραματικές παρατηρήσεις ^[115,116]. Έτσι, η ανάπτυξη δεσμών υδρογόνου στο ενεργό κέντρο σε συνδυασμό με την παρουσία του μορίου του νερού, που είναι δεσμευμένο σε μόριο αίμης, παίζουν σημαντικό ρόλο για την κατανόηση της λειτουργίας της καταλάσης-υπεροξειδάσης KatG. Επομένως, η δέσμευση του υδροκυανίου από τα σύμπλοκα με εξασιδήρο χαμηλού spin (με ένα μόριο H_2O ως ο έκτος υποκαταστάτης) είναι 1000 φορές ταχύτερη από ότι τα σύμπλοκα με πεντασιδήρο χαμηλού spin, με μία παρόμοια τάση να παρατηρείται στις αντιδράσεις των υπεροξειδίων ^[117].



Εικόνα 13. Σχηματισμός της ρίζας του συμπλόκου προσθήκης και ο πιθανός ρόλος της στην καταλυτική δράση της καταλάσης-υπεροξειδάσης KatG. Τα σχήματα αναπαριστούν την αίμη, το απομακρυσμένο σύμπλοκο προσθήκης και την αντίστοιχη ρίζα του, Met-Tyr-Trp (MYW), καθώς επίσης και τις θέσεις της πρωτεΐνης (Y, W κατάλοιπα), στις οποίες άλλες αμινοξικές ρίζες μπορούν να σχηματιστούν ^[118].

1.5.3 Ενεργοποίηση του ισονιαζιδίου (INH)

Όπως έχει ήδη αναφερθεί και προηγουμένως, το προφάρμακο ισονιαζίδιο οξειδώνεται από την καταλάση-υπεροξειδάση KatG προς μια ισονικοτινυλική ρίζα (IN'), η οποία στη συνέχεια αντιδρά με την οξειδωμένη μορφή NAD^+ για να σχηματιστεί η ενεργοποιημένη μορφή του INH, ισονικοτινυλο-NAD (IN-NAD) (Εικόνα 7) ^[77,119]. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου, η καταλάση-υπεροξειδάση KatG οξειδώνει και κατ' αυτόν τον τρόπο ενεργοποιεί το INH, έχει αποτελέσει θέμα έντονης έρευνας.

Έχει παρουσιαστεί μεγάλο εύρος οξειδωτικών μέσων με μεθόδους παγίδευσης ριζών, για τη λήψη της ισονικοτινυλικής ρίζας (IN') ως πρωτεύοντος προϊόντος ^[120]. Σε προηγούμενες έρευνες, στις οποίες χρησιμοποιήθηκε η υπεροξειδάση της ραπανίδας (horseradish peroxidase / HRP), ως μόριο μιμητής της καταλάσης-υπεροξειδάσης KatG, φάνηκε ότι η

οξειδωση του INH μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω μηχανισμών εξαρτημένων ή και ανεξάρτητων από το H_2O_2 [121]. Προτάθηκαν πολλοί μηχανισμοί οξειδωσης του INH, εξαρτημένοι από την καταλάση-υπεροξειδάση KatG, οι οποίοι μπορούν να χωριστούν σε δύο κύριες κατηγορίες: έναν υπεροξειδικό μηχανισμό με κύριο ρόλο το σχηματισμό της σιδηροπορφυρινικής π κατιονικής ρίζας ($Fe^{IV}=O[por]^+$), και ένα μηχανισμό ανεξάρτητο από υπεροξείδια, με σχηματισμό του συμπλόκου $Fe^{III}-O_2^-$ (**Εικόνα 14**).

Κατά τον υπεροξειδικό μηχανισμό, όπου στην **Εικόνα 14** συμβολίζεται με κόκκινα βέλη, η καταλάση-υπεροξειδάση KatG δεν παράγει μόνο την ισονικοτινυλική ρίζα, IN^- [122], αλλά παράγει επίσης τον αναστολέα ισονικοτινυλο-NAD (IN-NAD), όταν η οξειδωμένη μορφή NAD^+ είναι παρούσα [77], και έτσι το σύμπλοκο IN-NAD που προκύπτει αναστέλλει την αναγωγήση InhA [98].

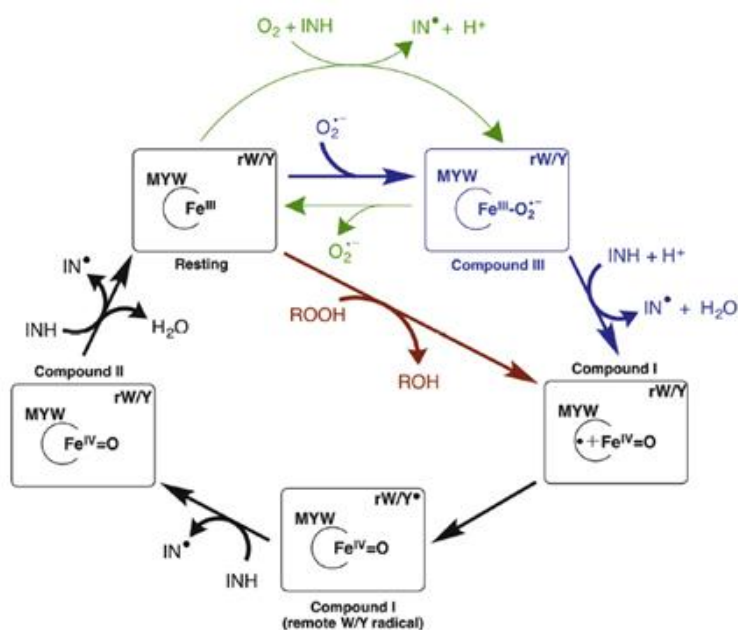
Αξιοσημείωτη, είναι η δημιουργία ενός στεροχημικού κέντρου στο σύμπλοκο προσθήκης IN-NAD, κατά την προσθήκη της ισονικοτινυλικής ρίζας στην ανηγμένη μορφή NAD^+ . Το ισομερές *S* του συμπλόκου προσθήκης IN-NAD προσδένεται στην αναγωγήση InhA [59,123] και την αναστέλλει ισχυρά [60]. Παρόλο που η επακόλουθη κύκλωση αυτών των δύο αρχικών συμπλόκων προσθήκης IN-NAD δημιουργεί διαστερεοϊσομερή [124-126], αυτά δε διαθέτουν τη βιολογική δράση του άκυκλου *S* ισομερούς να αναστείλουν την αναγωγήση InhA [123].

Επιπλέον, σημαντικό είναι το γεγονός ότι η καταλάση-υπεροξειδάση KatG δημιουργεί ακόμα περισσότερα μόρια αναστολεις IN-NAD, όταν το H_2O_2 εισάγεται με μία αργή και σταθερή ροή, παρά με προσθήκη σε μεγάλες ποσότητες [98]. Στην περίπτωση ταχείας προσθήκης H_2O_2 η ενεργοποίηση του INH θα περιοριζόταν, γιατί ευνοείται περισσότερο ο καταλυτικός παρά ο υπεροξειδικός κύκλος της καταλάσης-υπεροξειδάσης KatG. Σύμφωνα με την επεξήγηση αυτή, με την αργή ροή H_2O_2 τα οργανικά υδροϋπεροξείδια, R-OOH, (ανίκανα να υποστηρίξουν τον καταλυτικό κύκλο), ουσιαστικά, διεγείρουν την οξειδωση του INH και κατά συνέπεια δημιουργείται ο αναστολέας IN-NAD από την καταλάση-υπεροξειδάση KatG [66,122,127,128]. Καθίσταται, λοιπόν, κατανοητό ότι ο βαθμός σχηματισμού του αναστολέα IN-NAD είναι ισχυρά συνδεδεμένος με την ταχύτητα παροχής του H_2O_2 [66].

Επίσης, τα ενδιάμεσα της σιδηροπορφυρινικής π κατιονικής ρίζας ($Fe^{IV}=O[por]^+$), που ορίζεται ως ένωση I, ανάγονται πολύ πιο γρήγορα στην κατάσταση Fe^{III} (ηρεμίας) παρουσία ισονιαζιδίου, παρά χωρίς αυτό [70,129]. Πράγματι, τα απομακρυσμένα κατάλοιπα της θρυπτοφάνης, Trp', και της τυροσίνης, Tyr', (rW/Y' στην **Εικόνα 14**) που προκύπτουν από την αρχική αντίδραση της μυκοβακτηριακής καταλάσης-υπεροξειδάσης, MtKatG, με το υπεροξικό οξύ (PAA) ελαττώνονται από το INH [130]. Αυτά τα δεδομένα, λοιπόν, υποδεικνύουν έναν υπεροξειδικό μηχανισμό, στον οποίο τα υπεροξείδια οξειδώνουν την καταλάση-υπεροξειδάση KatG (π.χ $Fe^{IV}=O[por]^+$ και $Fe^{IV}=O$) και το ισονιαζίδιο έχει την ιδιότητα να ανάγει την καταλάση-υπεροξειδάση KatG στην κατάσταση Fe^{III} (**Εικόνα 14**). Η αντικατάσταση του καταλοίπου σερίνης, που βρίσκεται στην είσοδο του ενεργού κέντρου, (^{Ch}Ser) (**Εικόνα 11**) από τη θρεονίνη,

Thr, (S315T στο MtKatG) ^[70, 98], μεταβάλλει την ενεργότητα του ενζύμου και συνακόλουθα την ενεργοποίηση του INH, που βασίζεται στην καταλάση-υπεροξειδάση. Αυτή είναι μια από τις πιο κοινές μεταλλάξεις της καταλάσης-υπεροξειδάσης KatG, που παρατηρείται στο μυκοβακτηρίδιο με αντοχή στο INH ^[131,132]. Το INH ανάγει την σιδηροπορφυρινική π κατιονική ρίζα, $Fe^{IV}=O[por]^{+}$, με έξι φορές μεγαλύτερη ταχύτητα στην καταλάση-υπεροξειδάση KatG φυσικού τύπου, από ό,τι σε αυτήν με την μετάλλαξη S315T ^[70].

Παρόλο που η ροή του H_2O_2 είναι η επιθυμητή, δηλαδή χαμηλή, η καταλάση-υπεροξειδάση KatG που φέρει τη μετάλλαξη στο S315T, παρουσιάζει δέκα φορές μικρότερη ταχύτητα δημιουργίας του αναστολέα IN-NAD, σε σχέση με την καταλάση-υπεροξειδάση KatG φυσικού τύπου ^[66,98]. Αυτό, κατά συνέπεια, επιφέρει μειωμένη αποτελεσματικότητα όσον αφορά στην αναστολή της αναγωγάσης InhA ^[98].

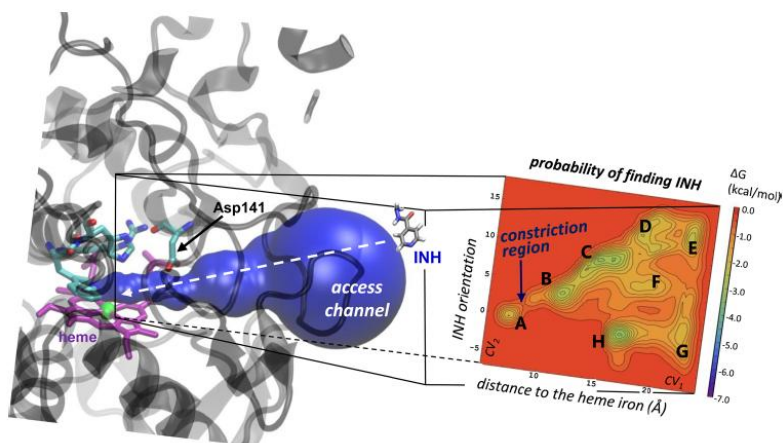


Εικόνα 14. Τρεις προτεινόμενοι μηχανισμοί για την οξείδωση του ισονιαζιδίου (INH) προς τη ρίζα ισονιαζιδίου IN^{\bullet} , που εξαρτάται από την καταλάση-υπεροξειδάση KatG. Πράσινη πορεία: Κατά την απουσία οποιασδήποτε εξωγενούς πηγής υπεροξειδίου ή υπεροξειδικής ρίζας $O_2^{\bullet-}$. Η KatG ένωση III προτείνεται ως πηγή $O_2^{\bullet-}$ ^[60]. Μπλε πορεία: Κατά την παρουσία μιας εξωγενούς πηγής $O_2^{\bullet-}$ (π.χ Mn^{II}/INH , X/XO κλπ) ^[66,128]. Κόκκινη πορεία: Κατά την παρουσία ενός εξωγενούς υπεροξειδίου (χαμηλή ροή H_2O_2 , *t*-butylhydroperoxide/*t*-butyl-OOH κλπ) ^[66,98]. Μαύρη πορεία: Τα βήματα που είναι πιθανά και στους τρεις μηχανισμούς. Οι απομακρυσμένες θέσεις οξείδωσης της Trp/Tyr και οι αντίστοιχες ρίζες συμβολίζονται με rW/Y και rW/Y^{\bullet} , αντίστοιχα.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα δεδομένα μαζί, η καταλάση-υπεροξειδάση KatG φαίνεται ικανή να παράγει τον αναστολέα IN-NAD μόνο παρουσία του INH, της οξειδωμένης NAD^+ , και του O_2 μέσω ενός μηχανισμού, ο οποίος παράγει O_2^- (πράσινη πορεία **Εικόνας 14**). Η εξωγενής παραγωγή O_2^- ($\text{Mn}^{2+}/\text{INH}$, X/XO , κλπ) ή η συμμετοχή του H_2O_2 (ή άλλου υπεροξειδίου) ουσιαστικά ενισχύει την ενεργοποίηση του INH (κόκκινη πορεία **Εικόνας 14**). Ο βαθμός στον οποίο το εξωγενές O_2^- παράγεται, περιορίζει αντίστοιχα την επίδραση των υπεροξειδίων. Οι ελεύθερες ρίζες υπεροξειδίων (superoxide) προτείνεται ότι καθοδηγούν την καταλάση-υπεροξειδάση KatG σε μια κατάσταση $\text{Fe}^{\text{III}}-\text{O}_2^-$, η οποία ακολουθείται από μια μετατροπή στο ενδιάμεσο της σιδηροπορφυρινικής π κατιονικής ρίζας ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}[\text{por}]^+$), ενώ τα υπεροξείδια (peroxides) παρακάμπτουν την ενδιάμεση κατάσταση $\text{Fe}^{\text{III}}-\text{O}_2^-$ και σχηματίζουν απευθείας την κατάσταση της ρίζας $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}[\text{por}]^+$.

1.5.4 Θέση πρόσδεσης του INH στην καταλάση-υπεροξειδάση KatG

Η θέση πρόσδεσης του αντιφυματικού προφαρμάκου INH στην καταλάση-υπεροξειδάση KatG παραμένει ένα σημαντικό θέμα έρευνας. Ενώ, έχει προταθεί από πολλές μελέτες ότι η πρόσδεσή του γίνεται στην κοιλότητα της αίμης ^[133-135], η θέση του INH σε αυτή την περιοχή αποδείχτηκε ότι δεν είναι σαφής.



Εικόνα 15 ^[65]. Ο διάυλος πρόσβασης της καταλάσης-υπεροξειδάσης KatG σε σχήμα χωνιού και το διάγραμμα ελεύθερης ενέργειας που αντιστοιχεί στη δέσμευση του INH στο διάυλο. Οι ισοϋψείς καμπύλες (contour lines) εμφανίζουν διαφορά ενέργειας κατά 0.25 kcal/mol. Το ενεργειακό ελάχιστο του διαγράμματος της ελεύθερης ενέργειας (συμβολίζεται από A-H), αντιστοιχεί στις πιο πιθανές θέσεις πρόσδεσης του INH.

Μετά από διάφορες μελέτες, έγινε η εξαγωγή τριών κύριων συμπερασμάτων. Αρχικά, υπάρχουν αρκετές ασθενείς θέσεις πρόσδεσης του INH κατά μήκος του διαύλου πρόσβασης. Κατά δεύτερον, το INH που προσδέεται στο δ-άκρο της αίμης, αλλά όχι βαθιά στην κοιλότητα της αίμης, όπως προτάθηκε από τις κρυσταλλογραφικές δομές του INH σε σύμπλοκο με την ομόλογη του υπεροξειδάση CcP, οδηγεί σε μια σταθερή πρόσδεση (Θέση A στην **Εικόνα 15**) τόσο στην κατάσταση Fe^{III} , όσο και στην κατάσταση της Ένωσης I.

Ωστόσο, συγκρίνοντας την καταλάση-υπεροξειδάση KatG με τις υπεροξειδάσες των φυτών, προκύπτει ένα τρίτο συμπέρασμα. Η πρόσβαση στην περιοχή πρόσδεσης A της KatG είναι παρεμποδισμένη λόγω του μικρού μήκους της κοιλότητας της αίμης, που προκύπτει από την πλευρική αλυσίδα του ασπαραγινικού οξέος, Asp141, του ενζύμου. Η καρβοξυλική ομάδα του Asp141 προβάλλει εντός της κοιλότητας της αίμης και παρουσιάζει μικρή ευκαμψία, καθώς σταθεροποιείται από ένα δεσμό υδρογόνου με το NH της ισολευκίνης, Ile237. Αυτός ο καθοριστικός δομικός παράγοντας, αντικατοπτρίζεται στο διάγραμμα ελεύθερης ενέργειας, δείχνοντας ότι η μετακίνηση προς (και έξω από) τη θέση A απαιτεί διαμορφώσεις υψηλότερης ενέργειας.

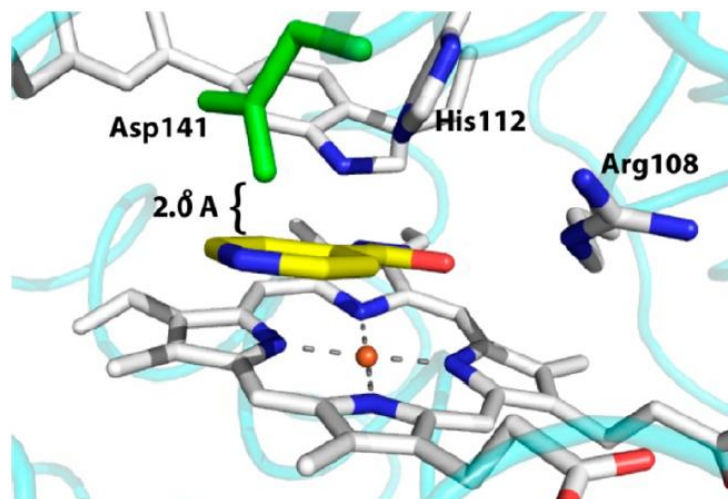
Αξίζει να σημειωθεί, ότι η μορφή πρόσδεσης του INH στη μετάλλαξη του καταλοίπου του ασπαραγινικού οξέος D141, είναι διαφορετική από αυτήν που είχε προβλεφθεί για το ένζυμο φυσικού τύπου. Το INH επικάθεται στην κορυφή της ομάδας της αίμης, με την καρβονυλική ομάδα να αλληλεπιδρά μέσω δεσμών υδρογόνου, τόσο με την πλευρική αλυσίδα του καταλοίπου αργινίνης, Arg108, όσο και με το αμινοτελικό άκρο της υδραζινικής ομάδας, που με τη σειρά της αλληλεπιδρά με ένα άτομο σιδήρου.

Περιληπτικά, προτείνεται ότι στην είσοδο του διαύλου της αίμης υπάρχουν περισσότερες από μία ασθενείς θέσεις δέσμησης-πρόσδεσης του ισονιαζιδίου στις καταλάσες-υπεροξειδάσες KatG. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι τα συμπεράσματα αυτά ^[65] δείχνουν να συμφωνούν με προηγούμενες έρευνες ^[136]. Προς επιβεβαίωση των προηγουμένων, η μετάλλαξη D141S προκαλεί μια σημαντική αύξηση στη σύνθεση του αναστολέα IN-NAD. Προτάθηκε, ότι μια τέτοια αύξηση στη δράση πιθανόν να οφείλεται σε ένα δίαυλο πρόσβασης μεγαλύτερου μεγέθους. Σε γενικές γραμμές, αυτές οι παρατηρήσεις συνεισφέρουν στην κατανόηση του τρόπου ενεργοποίησης του προφαρμάκου INH από την καταλάση-υπεροξειδάση.

Η παρεμπόδιση του INH να εισέλθει στην κοιλότητα της αίμης, που δημιουργείται από το καρβοξυλικό τμήμα στη μετάλλαξη του καταλοίπου του ασπαραγινικού οξέος D141, γίνεται περισσότερο εμφανής, όταν η περιοχή δέσμησης του INH στο D141A επικαλύπτεται (superimposed) στη δομή φυσικού τύπου (**Εικόνα 16**). Οι παρεμποδίσεις (conflicts) μεταξύ του πυριδινικού δακτυλίου και του καρβοξυλικού τμήματος λαμβάνουν χώρα σε απόσταση μικρότερη από 2.1 Å. Περαιτέρω περιορισμό στην πρόσβαση του INH στην είσοδο της κοιλότητας της αίμης του μεταλλαγμένου S324T (ισοδύναμο με το S315T στο MtKatG) δημιουργεί το επιπλέον μεθύλιο, λόγω των "συγκρούσεων" του με το INH ^[65].

Επιπλέον, τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η δραστηριότητα ενός φαρμάκου, ίσως να μην εξαρτάται μόνο από τη συγγένεια πρόσδεσής του, αλλά επίσης, από το πόσο εύκολα μπορεί να έχει πρόσβαση στη θέση πρόσδεσης. Από την άποψη αυτή, οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν στην έρευνα αυτή ^[65], οι οποίες δε βασίζονται σε οποιαδήποτε

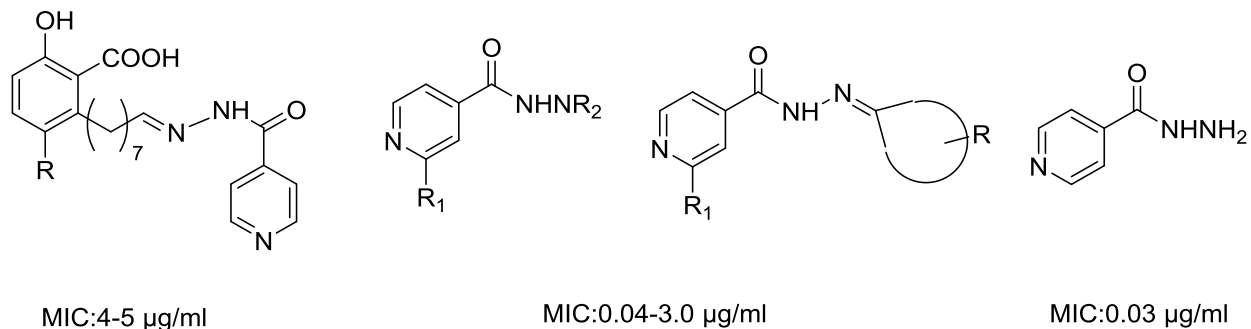
προηγούμενη μελέτη για τη θέση πρόσδεσης του φαρμάκου στο ένζυμο, ίσως συμβάλουν στο μέλλον στη διευκόλυνση του σχεδιασμού νέων πιθανών αναστολέων ^[137,138].



Εικόνα 16. Υπέρθηση του ισονιαζιδίου στην κοιλότητα της αίμης του BrKatG φυσικού τύπου, εάν συνδεόταν με το D141A. Οι αποστάσεις που είναι σημειωμένες μεταξύ των πλησιέστερων ατόμων του μορίου του INH (πυριδινικός δακτύλιος) και του γειτονικού καρβοξυλίου του ασπαραγινικού οξέος Asp141 (φαίνεται με πράσινο χρώμα) απεικονίζει τις στερεοχημικές παρεμποδίσεις που θα προκαλούνταν με το INH, εάν προσδενόταν στη θέση αυτή.

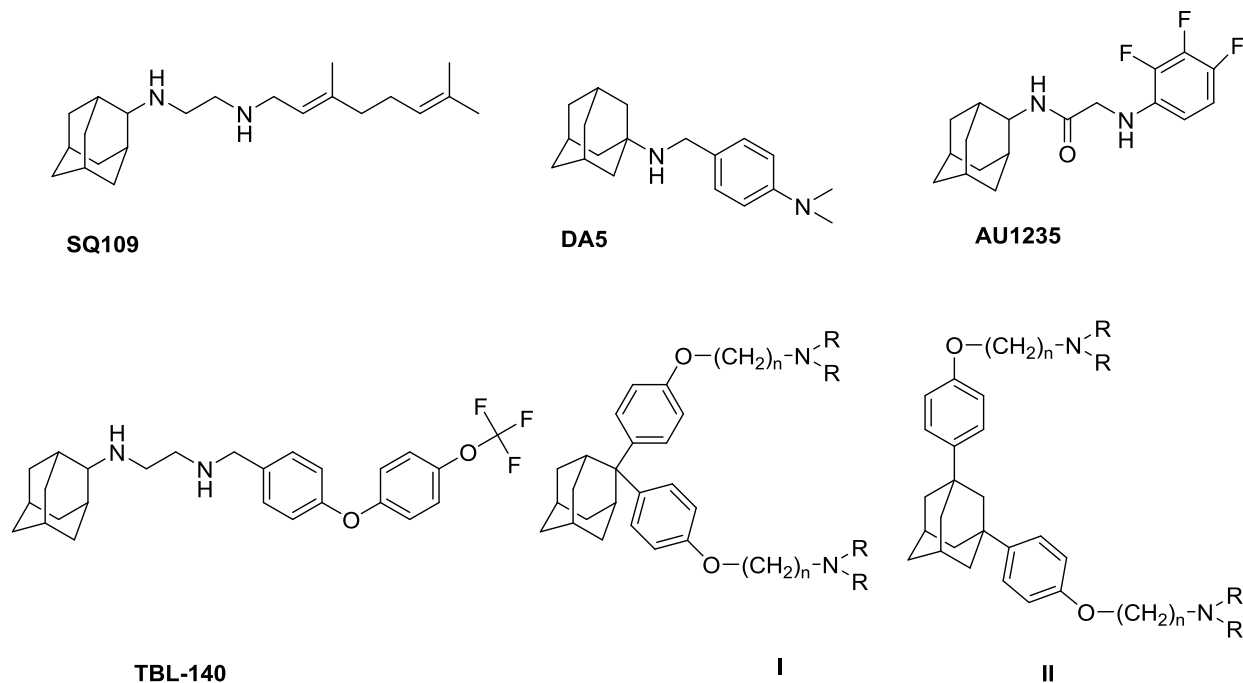
1.6 Σχεδιασμός των ενώσεων της παρούσας διατριβής

Η κλινική χρήση του ισονιαζιδίου ως αντιφυματικού μέσου καθιερώθηκε τη δεκαετία του 1950, όταν και ανακαλύφθηκε η υψηλή δραστηρότητά του. Στη βιβλιογραφία ^[34,81,139,140], υπάρχει πληθώρα εργασιών με δομικές τροποποιήσεις της μητρικής ένωσης, οι οποίες ενδεικτικά απεικονίζονται στην **Εικόνα 17**.



Εικόνα 17. Τροποποιημένα παράγωγα του ισονιαζιδίου.

Η ανάπτυξη αντοχής στα κλασσικά αντιφυματικά φάρμακα οδήγησε στην ανακάλυψη νέων στόχων φαρμακολογικού ενδιαφέροντος. Από τη βιβλιογραφία ^[141-145], είναι γνωστή η χρησιμοποίηση αδαμαντανικών παραγώγων (SQ109, DA5, AU1235, TBL-140) για τη στόχευση του MmpL3 μεταφορέα μυκολικών οξέων στο κυτταρικό τοίχωμα του *M. Tuberculosis* (**Εικόνα 18**).

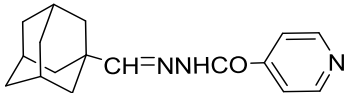
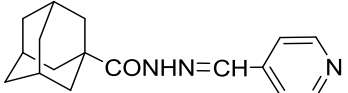
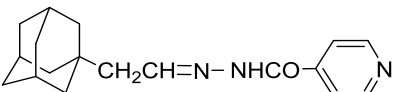
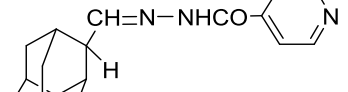
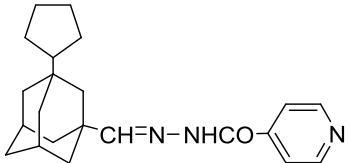
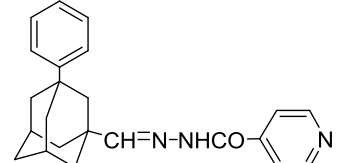
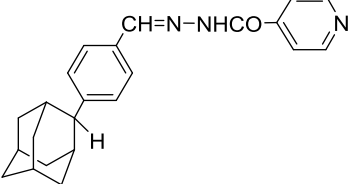
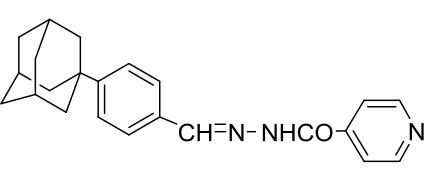
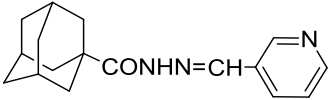
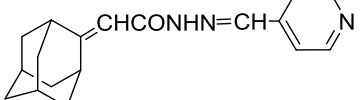
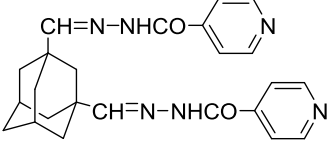
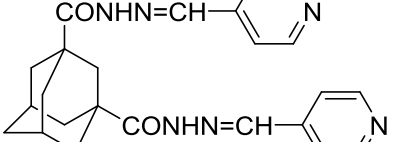


Εικόνα 18. Αδαμαντανικά παράγωγα με αντιφυματική δράση.

Η ερευνητική μας ομάδα έχει στο παρελθόν δημοσιεύσει εργασίες ^[146,147] αδαμαντανικών ενώσεων με αντιφυματική δράση (ενώσεις I και II). Στην παρούσα εργασία σχεδιάστηκαν ενώσεις που συνδυάζουν στη δομή τους τον αδαμαντανικό σκελετό και το

ισονιαζίδιο. Ο συνδυασμός αυτός βασίστηκε στο γεγονός ότι το ισονιαζίδιο δρα στο περιβάλλον του μυκοβακτηριακού τοιχώματος και επομένως ο αδαμαντανικός κλωβός θα προσέδιδε μεγαλύτερη λιποφιλικότητα και θα διευκόλυνε τη μεταφορά^[148] και συνακόλουθα τη δράση της μητρικής ένωσης στο μυκοβακτηριακό τοίχωμα. Στη βιβλιογραφία^[81], έχουν αναφερθεί δομικές τροποποιήσεις στη λειτουργική ομάδα της υδραζίνης του ισονιαζιδίου, που δεν είχαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα και για το λόγο αυτό θεωρείται πιο ασφαλές οι δραστικές ενώσεις που μιμούνται τη δράση του ισονιαζιδίου να έχουν αυξημένη λιποφιλικότητα^[149,150]. Οι νέες αδαμαντανικές ενώσεις περιλαμβάνονται στον **Πίνακα 1** που ακολουθεί.

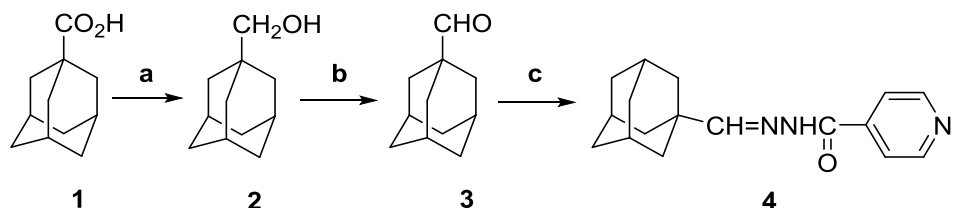
Πίνακας 1. Αδαμαντανικά παράγωγα του ισονιαζιδίου.

Ένωση	Δομή	Ένωση	Δομή
4		39	
8		32	
17		22	
37		28	
40		45	
50		54	

Οι παραπάνω ενώσεις διακρίνονται στις αδαμαντανικές υδραζόνες του ισονικοτινικού υδραζιδίου (ενώσεις **4, 8, 17, 22, 28, 32, 37, 50**), καθώς και στις ισομερείς τους, τις υδραζόνες της αντίστοιχης πυριδινοκαρβοξαλδεΐδης και του 1-αδαμαντανοκαρβοϋδραζιδίου (ενώσεις **39** και **40**) και του δικαρβοαδαμαντανοϋδραζιδίου (ένωση **54**). Η υποκατάσταση στον αδαμαντανικό σκελετό πραγματοποιήθηκε στις θέσεις 1 (ενώσεις **4, 8, 28, 39** και **40**) και 2 (ενώσεις **32, 37,** και **45**). Επιπλέον, σχεδιάστηκαν και δισυποκατεστημένα παράγωγα, είτε με την ίδια πλάγια υδραζονική αλυσίδα (ενώσεις **50** και **54**), είτε με την εισαγωγή ενός κυκλοπεντανικού ή βενζολικού δακτυλίου και διατήρηση της υδραζονικής πλάγιας αλυσίδας (ενώσεις **17** και **22**).

2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

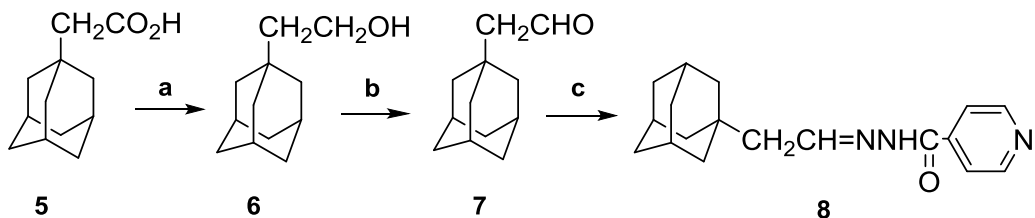
Η συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε για την παρασκευή του *N'*-(αδαμαντ-1-υλο)μεθυλεν)ισονικοτινοϋδραζιδίου (**4**) απεικονίζεται στο **Σχήμα 1**.



Σχήμα 1. Αντιδραστήρια και συνθήκες: a.i) LiAlH₄, THF, rt, 3 h, ii) H₂O/OH⁻, 0 °C; b. PCC, DCM (dry), rt, 1.5 h; c. INH, MeOH, reflux, 3 h.

Ως πρώτη ύλη για την παρασκευή της υδραζόνης **4** χρησιμοποιείται το 1-αδαμαντανοκαρβοξυλικό οξύ (**1**), το οποίο ανάγεται με λιθιοαργιλιοϋδρίδιο σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο προς την 1-αδαμαντανομεθανόλη (**2**)^[151]. Η αλκοόλη **2** οξειδώνεται προς την αντίστοιχη αλδεΐδη **3** με χλωροχρωμικό πυριδίνιο^[152,153] σε διχλωρομεθάνιο. Τέλος, η 1-αδαμαντοκαρβοξυαλδεΐδη (**3**) συζεύγνυται με το ισονιαζίδιο, υπό βρασμό σε μεθανόλη για 4 ώρες, οπότε λαμβάνεται η επιθυμητή υδραζόνη **4**.

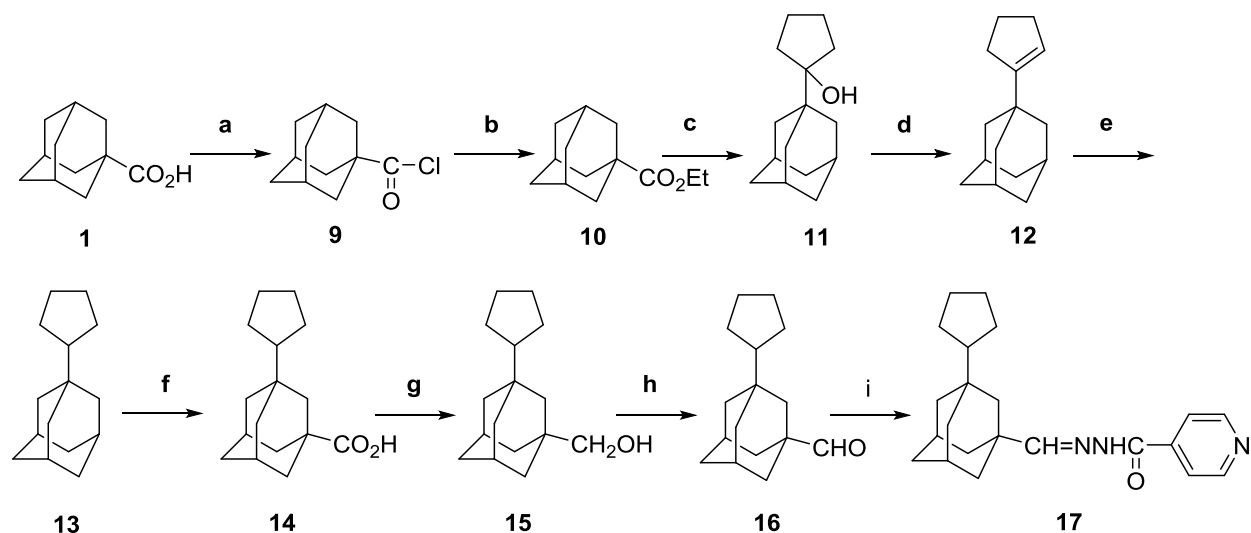
Η παρασκευή του *N'*-(αδαμαντ-1-υλο)αιθυλεν)ισονικοτινοϋδραζιδίου (**8**) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το **Σχήμα 2**.



Σχήμα 2. Αντιδραστήρια και συνθήκες: a. i) LiAlH₄, THF, rt, 3 h, ii) H₂O/OH⁻, 0 °C; b. PCC, DCM (dry), rt, 1.5 h; c. INH, MeOH, reflux, 3 h.

Για την παρασκευή της υδραζόνης **8** ακολουθήθηκε ανάλογη συνθετική πορεία με την υδραζόνη **4**, χρησιμοποιώντας το 1-αδαμαντανοξικό οξύ (**5**), ως πρώτη ύλη.

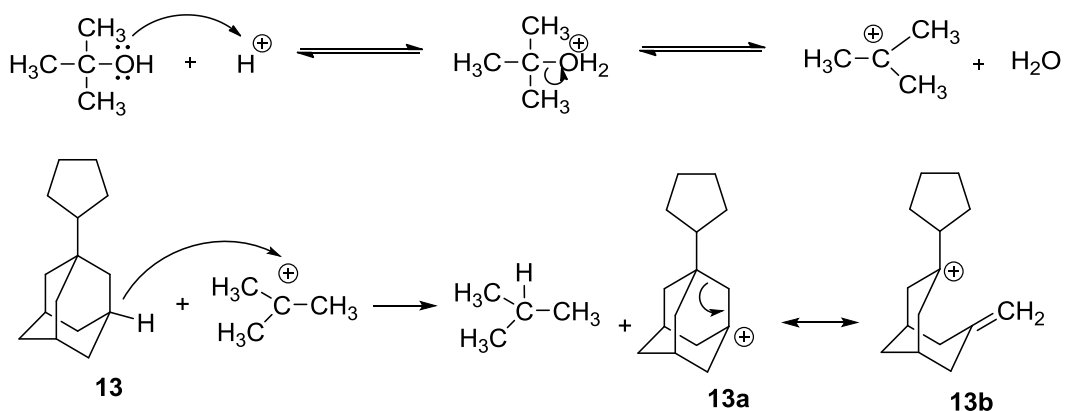
Οι αντιδράσεις για την παρασκευή του *N'*-(3-κυκλοπεντυλο-1-αδαμαντ-1-υλο)μεθυλενοϊσονικοτινοϋδραζιδίου (**17**) συνοψίζονται στο **Σχήμα 3**.



Σχήμα 3. Αντιδραστήρια και συνθήκες: a. SOCl_2 , reflux, 1.5 h; b) EtOH, reflux, 1.5 h; c. i) 1,4-δισ(βρωμομαγνησιο)βουτάνιο, THF, rt, 18 h, ii) $\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_4\text{Cl}$, 0 °C; d. $\text{CCl}_3\text{CO}_2\text{H}$, CHCl_3 , reflux, 3 h; e. H_2/PtO_2 , EtOH, 45 psi, 3 h; f. HCO_2H , *t*-BuOH, H_2SO_4 (conc.), 6 h, και μετά rt, 18 h; g i) LiAlH_4 , THF, rt, 3 h, ii) $\text{H}_2\text{O}/\text{OH}^-$, 0 °C; h) PCC, DCM (dry), rt, 1.5 h; i) INH, MeOH, reflux, 3 h.

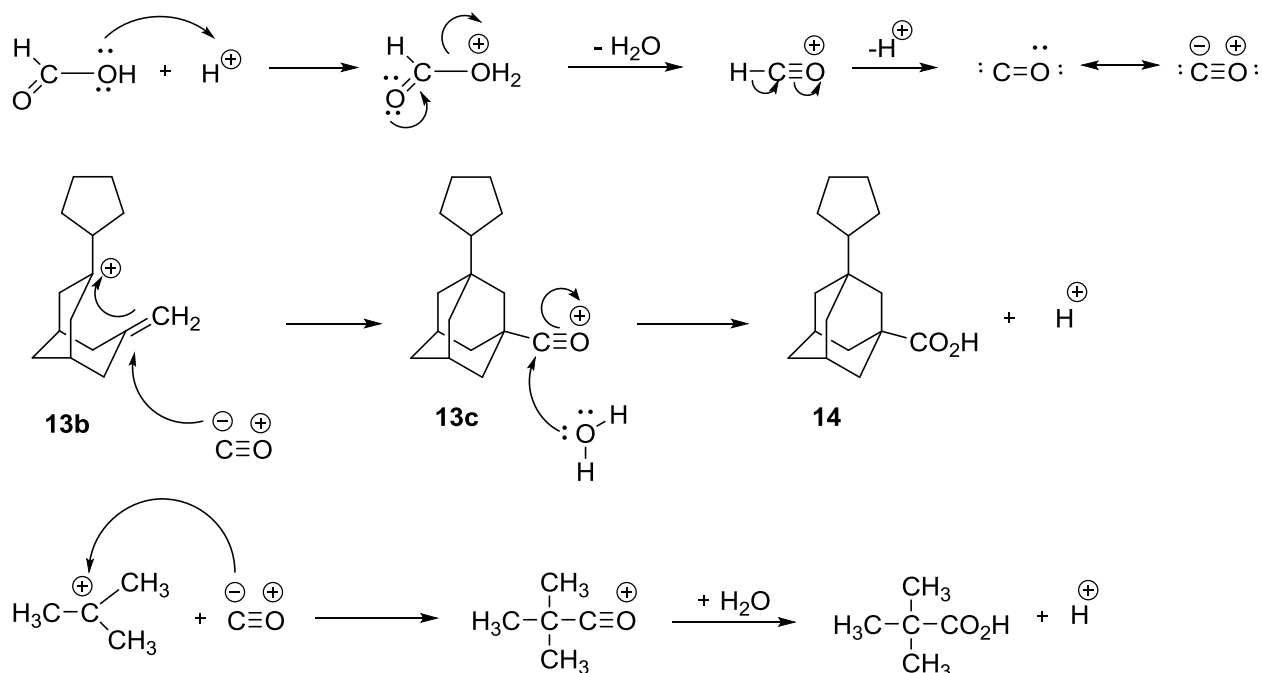
Ως πρώτη ύλη για την παρασκευή της υδραζόνης **17** χρησιμοποιείται το 1-αδαμαντανοκαρβοξυλικό οξύ (**1**), το οποίο μετατρέπεται προς τον αιθυλεστέρα **10**, μέσω του χλωριδίου **9** και εστεροποίηση με αιθανόλη. Ο αιθυλεστέρας **10** με την επίδραση 1,4-δισ(βρωμομαγνησιο)βουτανίου σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο αποφέρει την 1-(1-αδαμαντυλο)κυκλοπεντανόλη (**11**)^[154]. Η αλκοόλη **11** θερμαινόμενη με τριχλωροξικό οξύ σε χλωροφόρμιο αφυδατώνεται προς το 1-(1-κυκλοπεντενυλο)αδαμαντάνιο (**12**)^[155], το οποίο στη συνέχεια υδρογονώνεται, παρουσία οξειδίου του λευκοχρύσου, προς το 1-κυκλοπεντυλοαδαμαντάνιο (**13**)^[155]. Η εφαρμογή της αντίδρασης Koch-Haaf^[156,157] επί του υδρογονάνθρακα **13**, σε μίγμα πυκνού θεικού οξέος-*tert*-βουτανόλης με στάγδην προσθήκη μυρμηκικού οξέος, οδηγεί προς το 3-κυκλοπεντυλο-1-αδαμαντανοκαρβοξυλικό οξύ (**14**)^[155]. Το καρβοξυλικό οξύ **14** μετατρέπεται, κατά τα γνωστά, προς την 3-κυκλοπεντυλο-1-αδαμαντοκαρβοξυαλδεΐδη (**16**)^[152,153], η οποία συζεύγνυται με το ισονιαζίδιο, υπό βρασμό σε μεθανόλη για 3 ώρες, οπότε προκύπτει η επιθυμητή υδραζόνη (**17**).

Ο μηχανισμός της αντίδρασης Koch-Haaf απεικονίζεται στα **Σχήματα 4** και **5**. Σε πρώτο στάδιο, πραγματοποιείται η μετατροπή της *tert*-βουτυλικής αλκοόλης προς το *tert*-βουτυλοκατιόν, με την επίδραση του θεικού οξέος. Στη συνέχεια, το σχηματιζόμενο *tert*-βουτυλοκατιόν αποσπά ένα άτομο υδρογόνου, υπο μορφή υδριδίου, από τον 1-άνθρακα του αδαμαντανίου, οπότε μετατρέπεται προς ισοβουτάνιο, ενώ το 3-κυκλοπεντυλοαδαμαντάνιο μετατρέπεται προς το ασταθές 3-κυκλοπεντυλο-1-αδαμαντυλοκατιόν (**13b**) (**Σχήμα 4**).



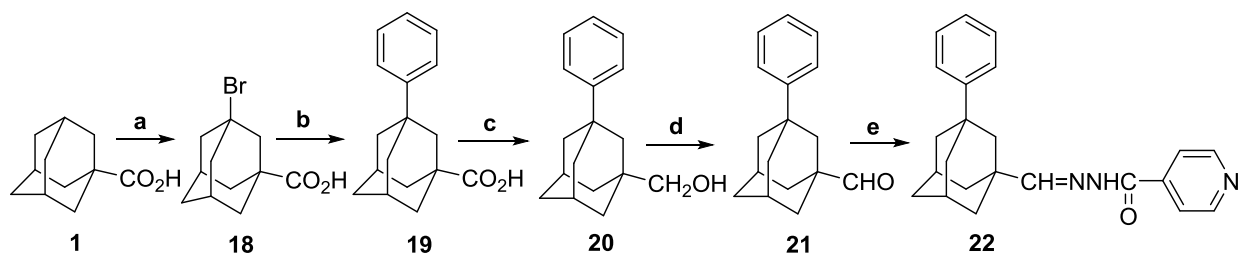
Σχήμα 4. Πρώτο στάδιο σχηματισμού του αδαμαντανοκαρβοξυλικού οξέος **14**.

Παράλληλα, το μυρμηκικό οξύ αφυδατώνεται από το θειικό οξύ προς μονοξειδίο του άνθρακα. Το μονοξειδίο του άνθρακα προσβάλλει το 3-κυκλοπεντυλο-1-αδαμαντυλοκατιόν (**13b**), με αποτέλεσμα τον επανασχηματισμό του αδαμαντανικού σκελετού, οπότε προκύπτει το κατιόν του οξοκαρβωνίου **13c**, το οποίο κατόπιν υδρόλυσης μετατρέπεται προς το 3-κυκλοπεντυλο-1-αδαμαντανοκαρβοξυλικό οξύ (**14**). Από την επίδραση του μονοξειδίου του άνθρακα επί του *tert*-βουτυλοκατιόντος, σχηματίζεται σε μεγάλο βαθμό πιβαλικό οξύ (Σχήμα 5).



Σχήμα 5. Δεύτερο στάδιο σχηματισμού του αδαμαντανοκαρβοξυλικού οξέος **14**.

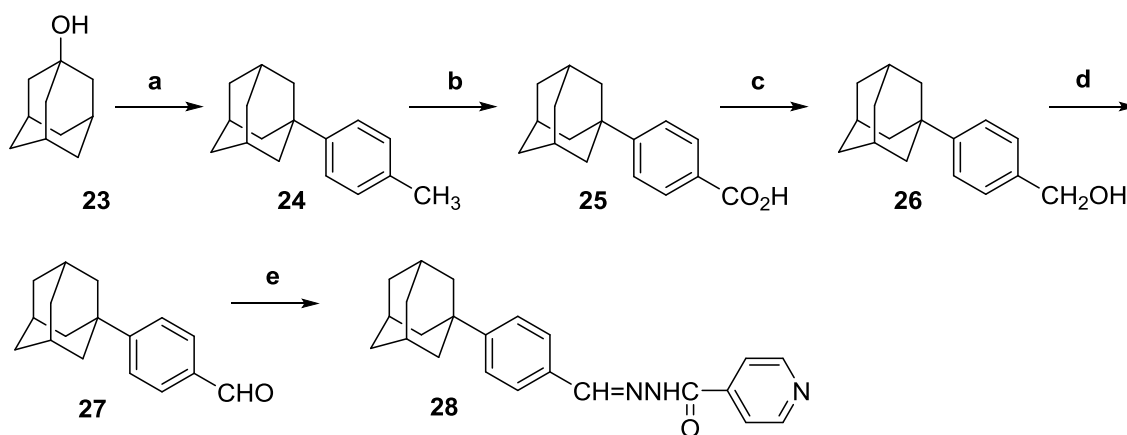
Η συνθετική πορεία για την παρασκευή του *N'*-(3-φαινυλο-1-αδαμαντ-1-υλ)μεθυλενοϊσονικοτινουδραζιδίου (**22**) περιγράφεται από τις αντιδράσεις του Σχήματος 6.



Σχήμα 6. Αντιδραστήρια και συνθήκες: a. Br_2 , AlCl_3 , $-5 \rightarrow 0^\circ\text{C}$, 2 h και μετά 5 ημέρες στους 0°C ; b) AlCl_3 , βενζόλιο (dry), $-10 \rightarrow 0^\circ\text{C}$, 1 h και μετά rt; c. i) LiAlH_4 , THF, rt, 3 h, ii) $\text{H}_2\text{O}/\text{OH}^-$, 0°C ; d. PCC, DCM (dry), rt, 1.5 h; e. INH, MeOH, reflux, 3 h.

Η σύνθεση της φαινυλοϋδραζόνης (**22**), περιλαμβάνει σε πρώτο στάδιο τη βρωμίωση του 1-αδαμαντανοκαρβοξυλικού οξέος (**1**) με την προσθήκη βρωμίου, παρουσία τριχλωριούχου αργιλίου στους -5°C ^[158]. Το σχηματιζόμενο κατά την προηγούμενη αντίδραση 3-βρωμο-1-αδαμαντανοκαρβοξυλικό οξύ (**18**) με τριχλωριούχο αργίλιο, σε άνυδρο βενζόλιο (συνθήκες αντιδράσεως Friedel-Crafts), μετατρέπεται προς το 3-φαινυλο-1-αδαμαντανοκαρβοξυλικό οξύ (**19**) ^[158], το οποίο αποφέρει, κατά τα γνωστά, την 3-φαινυλο-1-αδαμαντανοκαρβοξυαλδεΐδη (**21**), η οποία συζεύγνυται με το ισονιαζίδιο, με βρασμό σε μεθανόλη για 3 ώρες, οπότε προκύπτει η υδραζόνη (**22**).

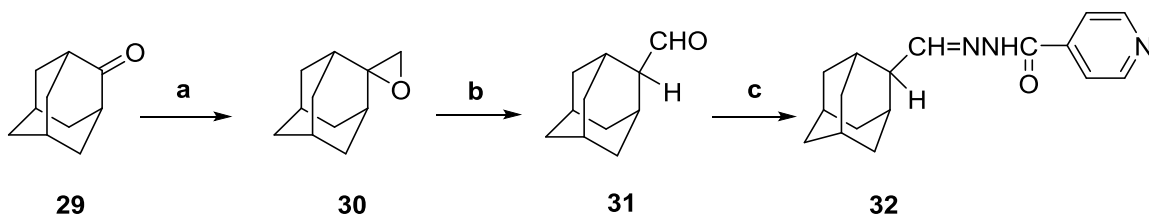
Η παρασκευή του *N'*-(4-(αδαμαντ-1-υλο)βενζυλιδεν)ισονικοτινοϋδραζιδίου (**28**) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις αντιδράσεις του **Σχήματος 7**.



Σχήμα 7. Αντιδραστήρια και συνθήκες: a. τολουόλιο, TFA, rt, overnight; b. KMnO_4 , Py/ H_2O , 100°C ; c. i) LiAlH_4 , THF, rt, 3 h, ii) $\text{H}_2\text{O}/\text{OH}^-$, 0°C ; d. PCC, DCM (dry), rt, 1.5 h; e. INH, MeOH, rt, 48 h.

Η 1-αδαμαντανόλη (**23**) χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη για την παρασκευή της βενζυλιδενοϋδραζόνης **28**. Η αδαμαντανόλη **23** μετατρέπεται με τολουόλιο, παρουσία τριφθοροξικού οξέος, προς το 1-(π-τολυλο)αδαμαντάνιο (**24**)^[159], το οποίο στη συνέχεια οξειδώνεται με υπερμαγγανικό κάλιο προς το αντίστοιχο βενζοϊκό οξύ **25**^[159]. Το καρβοξυλικό οξύ **25** μετατρέπεται κατά τα γνωστά προς τη βενζαλδεΰδη (**27**), η οποία συζεύγνυται με το ισωνιαζίδιο, δίνοντας υπό ανάδευση, σε μεθανόλη για 48 ώρες, απουσία θέρμανσης, λόγω της δραστηκότητάς της, δίνοντας την επιθυμητή υδραζόνη (**28**). Η 4-(1-αδαμαντυλο)βενζοκαρβοξαλδεΰδη (**27**) έχει συντεθεί και με διαφορετικούς τρόπους από την ερευνητική μας ομάδα στο παρελθόν^[159], αλλά στην παρούσα εργασία επιλέχθηκε η αποδοτικότερη μέθοδος.

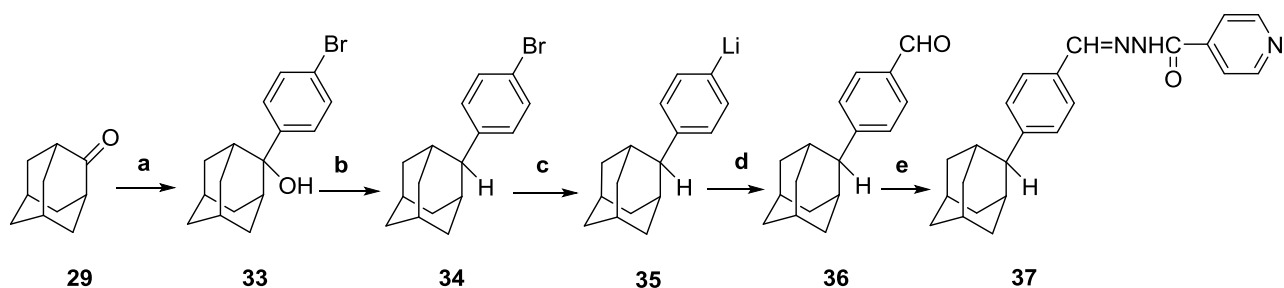
Οι αντιδράσεις για τη σύνθεση του *N'*-(αδαμαντ-2-υλο)μεθυλεν)ισονικωτινοϋδραζιδίου (**32**) συνοψίζονται στο **Σχήμα 8**.



Σχήμα 8. Αντιδραστήρια και συνθήκες: a. i) Μεθυλίδιο του διμεθυλοσουλφοξωνίου, DMSO, ii) H₂O; b. i) BF₃·Et₂O, βενζόλιο; ii) H₂O; c. INH, MeOH, reflux, 4.5 h.

Ως πρώτη ύλη χρησιμοποιείται η 2-αδαμαντανόνη (**29**), η οποία κατά την επίδραση του μεθυλιδίου του διμεθυλοσουλφοξωνίου^[160] (που σχηματίζεται με την επίδραση νατριοϋδριδίου επί του ιωδιούχου τριμεθυλοσουλφοξωνίου σε DMSO) μετατρέπεται προς το σπειρο[αδαμαντανο-2 (2')-οξιράνιο] (**30**)^[161]. Κατά την επίδραση του αιθερικού συμπλόκου του τριφθοριούχου βορίου στο σπειρανικό εποξείδιο **30** και μετά από υδρόλυση σχηματίζεται η 2-αδαμαντανοκαρβοξαλδεΰδη (**31**)^[162-163], η οποία συζεύγνυται με το ισωνιαζίδιο, υπό βρασμό, σε μεθανόλη για 4.5 ώρες και οδηγεί στην επιθυμητή υδραζόνη (**32**).

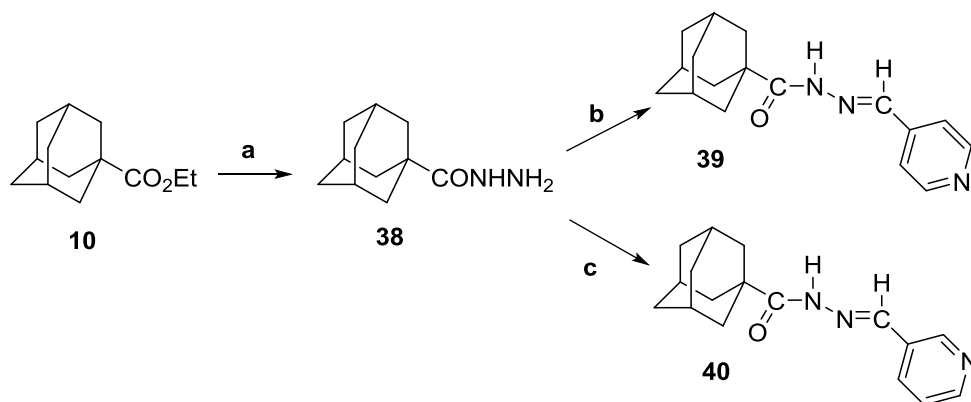
Η βενζυλοϋδραζόνη **37** παρασκευάζεται σύμφωνα με τις αντιδράσεις της συνθετικής πορείας που απεικονίζεται στο **Σχήμα 9**.



Σχήμα 9. Αντιδραστήρια και συνθήκες: a. i) π-βρωμοφαινυλομαγνησιοβρωμίδιο, Et₂O/THF, Ar, rt, 3 h, ii) HCl 10%, 0 °C; b. i) TFA, DCM, Ar, rt, 15 min, ii) Et₃SiH, Ar, rt for 1 h, iii) H₂O, 0 °C; c. *n*-BuLi 2.5 M/hexanes, THF, Ar, -80 °C, 2 h; d. i) DMF rt, 1 h, ii) HCl 10%, 0 °C; e. INH, MeOH, rt, 18 h.

Με επίδραση του π-βρωμοφαινυλομαγνησιοβρωμιδίου επί της 2-αδαμαντανόνης (**29**) προκύπτει η 2-(π-βρωμοφαινυλο)-2-αδαμαντανόλη (**33**)^[164], η οποία ανάγεται με τριαιθυλοσιλάνιο σε τριφθοροξικό οξύ προς το 4-(2-αδαμαντυλο)βρωμοβενζόλιο (**34**)^[165]. Το βρωμοβενζόλιο **34** μετατρέπεται με διάλυμα *n*-BuLi 2.5 M, στους -80 °C, υπό αδρανή ατμόσφαιρα, προς το λιθιακό ενδιάμεσο παράγωγο **35**, το οποίο φορμυλιώνεται με διμεθυλοφορμαμίδιο, για να οδηγήσει στην 4-(2-αδαμαντυλο)βενζαλδεΐδη (**36**)^[165]. Η βενζαλδεΐδη **36** μετατρέπεται στην αντίστοιχη βενζυλοϋδραζόνη **37**, υπό ανάδευση, με το ισονιαζίδιο σε μεθανόλη για 18 ώρες.

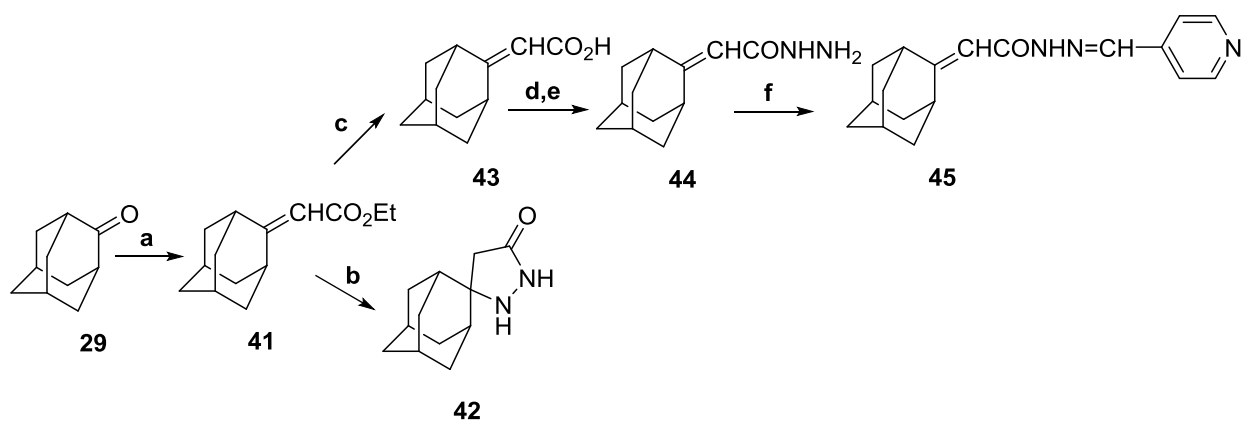
Οι ενώσεις *N'*-((*E*)-πυριδιν-4-υλμεθυλενο)-1-αδαμαντανο-1-καρβοϋδραζίδιο (**39**) και *N'*-((*E*)-πυριδιν-3-υλμεθυλενο)-1-αδαμαντανο-1-καρβοϋδραζίδιο (**40**) παρασκευάζονται σύμφωνα με το **Σχήμα 10**.



Σχήμα 10. Αντιδραστήρια και συνθήκες: a. H₂NNH₂·H₂O, διαιθυλενογλυκόλη, microwave, 210 °C, 90 min; b. 4-πυριδινοκαρβοξαλδεΐδη, MeOH, reflux, 4.5 h; c. 3-πυριδινοκαρβοξαλδεΐδη, MeOH, reflux, 3 h.

Για την παρασκευή των υδραζονών **39** και **40** χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη ο 1-αδαμαντυλοκαρβοξυλικός αιθυλεστέρας (**10**), ο οποίος μετατρέπεται προς το αντίστοιχο υδραζίδιο **38** ^[166]. Όπως είναι γενικά γνωστό, τα καρβοϋδραζίδια παρασκευάζονται με θέρμανση μεθυλεστέρων ή αιθυλεστέρων των καρβοξυλικών οξέων με υδραζίνη σε μεθανόλη ή αιθανόλη στο σ.ζ. των χρησιμοποιούμενων διαλυτών. Όμως, για τη σύνθεση των καρβοϋδραζιδίων της παρούσας εργασίας η εφαρμογή της προηγούμενης μεθόδου είναι γενικά ανέφικτη, λόγω του ότι ο καρβονυλικός άνθρακας του 1-αδαμαντυλοκαρβοξυλικού αιθυλεστέρα (**10**), είναι στερεοχημικά παρεμποδισμένος λόγω του ογκώδους αδαμαντανικού σκελετού. Στη βιβλιογραφία ^[167] περιγράφεται η παρασκευή του 1-αδαμαντανοκαρβοϋδραζιδίου (**38**) με επίδραση περίσσειας ένυδρης υδραζίνης στον 1-αδαμαντανοκαρβοξυλικό αιθυλεστέρα (**10**) σε διαιθυλενογλυκόλη, στο σ.ζ. του διαλύτη (240-250 °C) για 40 ώρες. Η ερευνητική μας ομάδα έχει στο παρελθόν δημοσιεύσει αντίστοιχη μέθοδο ^[166] με πιο ήπιες συνθήκες, με τη χρήση συσκευής μικροκυμάτων, η οποία και ακολουθήθηκε στην παρούσα εργασία για την παρασκευή του υδραζιδίου **38**. Στη συνέχεια το υδραζίδιο **38** συζεύγνυται με την αντίστοιχη 4-πυριδινοκαρβοξαλδεΐδη και 3-πυριδινοκαρβοξαλδεΐδη για τη σύνθεση των επιθυμητών υδραζονών **39** και **40**.

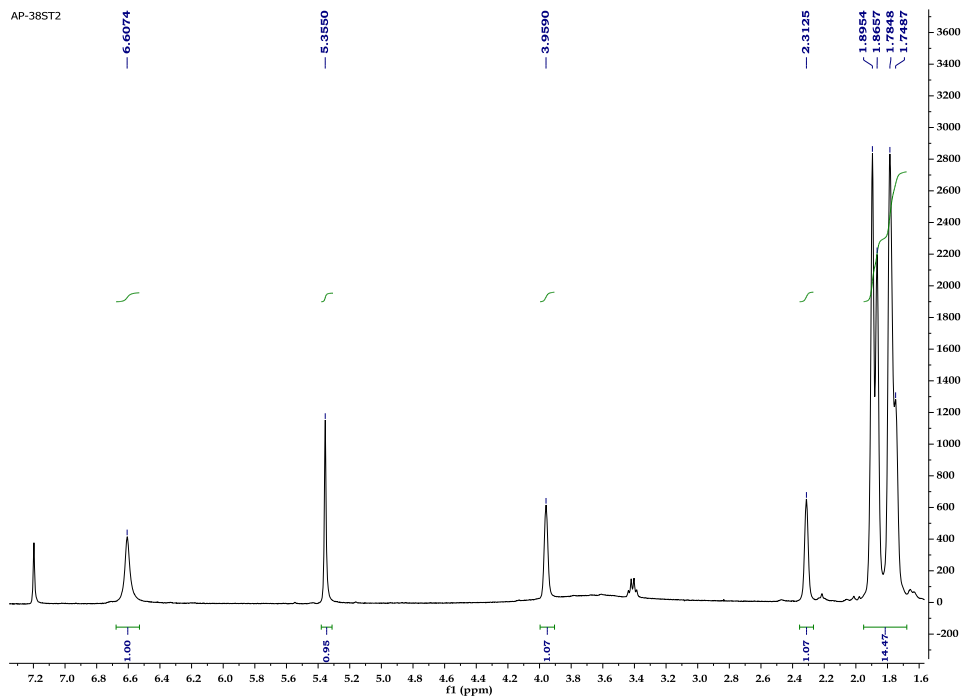
Το 2-(αδαμαντ-2-υλιδενο)-N'-(πυριδιν-4-υλμεθυλεν)ακετοϋδραζίδιο (**45**) παρασκευάζεται σύμφωνα με τις αντιδράσεις που απεικονίζονται στο **Σχήμα 11**.



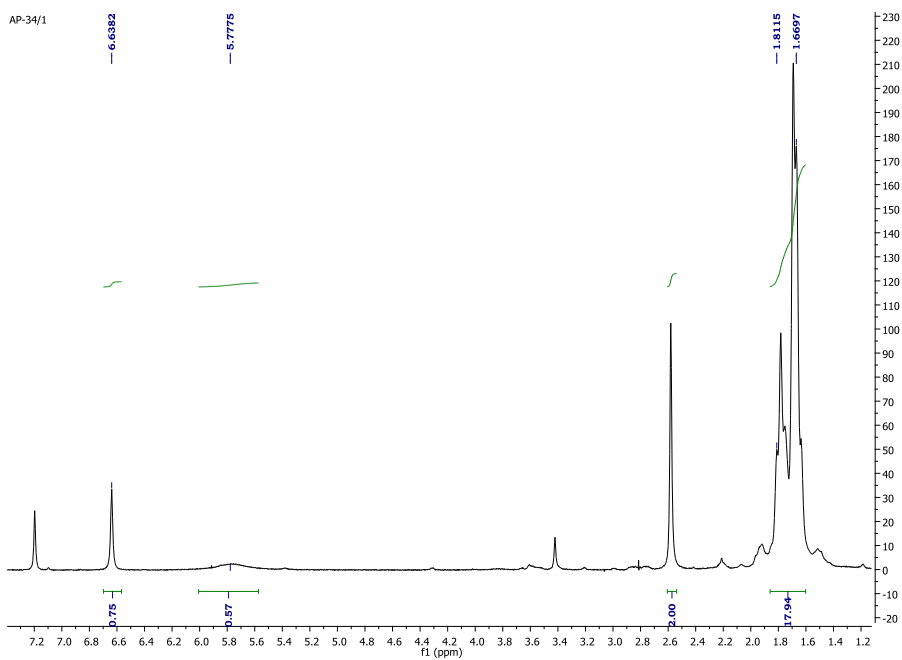
Σχήμα 11. Αντιδραστήρια και συνθήκες: a. i) NaH, THF, φωσφονοξικός τριαιθυλεστέρας, 0 °C, Ar, 30 min, ii) H₂O/NH₄Cl, 0 °C; b. H₂NNH₂·H₂O, EtOH, 150 °C, αυτόκλειστο, 5 ημέρες; c. NaOH, EtOH/H₂O, reflux, 4 h; d. HOBt, EDC.HCl, DIPEA, DCM/DMF, rt, 24 h; e. H₂NNH₂·H₂O, cyclohexane, rt, 48 h; f. 4-πυριδινοκαρβοξαλδεΐδη, MeOH, reflux, 6 h και μετά rt, 18 h.

Αρχικά, με εφαρμογή των συνθηκών της αντίδρασης Emmons-Horner επί της αδαμαντανόνης **29** λαμβάνεται ο 2-αδαμαντιλυδενοξικός αιθυλεστέρας (**41**)^[166]. Με επίδραση υδραζίνης στον ακόρεστο αιθυλεστέρα **41**, παρά τη στερεοχημική παρεμπόδιση και την ανίχνευση μη αντιδρώντος εστέρα, σχηματίστηκε προϊόν προσθήκης Michael, και συγκεκριμένα η σπειρανική πυραζολιδινόνη **42**. Αντίθετα, κατόπιν σαπωνοποίησης του αιθυλεστέρα **41** προκύπτει το 2-αδαμαντιλυδενοξικό οξύ (**43**)^[168], το οποίο με επίδραση των συμπλεκτικών αντιδραστηρίων 1-υδροξυβενζοτρίαζολίου (HOBT) και υδροχλωρικού 1-(3-διμεθυλαμινοπροπυλο)-3-αιθυλοκαρβοδιιμιδίου ή *N*-(3-διμεθυλαμινοπροπυλ)-*N'*-αιθυλοκαρβοδιιμιδίου (EDC.HCl), παρουσία *N,N*-δισοπροπυλαιθυλαμίνης (DIPEA) και στη συνέχεια υδραζίνης, οδηγεί προς το ακόρεστο υδραζίδιο **44**^[169]. Το υδραζίδιο **44** συζεύγνυται με την αντίστοιχη 4-πυριδινοκαρβοξαλδεΐδη για τη σύνθεση της επιθυμητής ακόρεστης υδραζόνης **45**.

Από τη σύγκριση των φασμάτων ¹H-NMR του ακόρεστου υδραζιδίου **44** και της πυραζολιδινόνης **42**, που φαίνονται στις **Εικόνες 19** και **20**, προκύπτουν οι διαφορές στις ολοκληρώσεις και τις χημικές μετατοπίσεις δ των πρωτονίων. Στο υδραζίδιο το 1-αδαμαντανικό πρωτόνιο δίνει κορυφή στα 2.31 ppm, το 3-αδαμαντανικό πρωτόνιο στα 3.36 ppm και το μεθινικό πρωτόνιο στα 5.36 ppm. Αντίθετα, στο σπειρανικό προϊόν, τα 1,3-αδαμαντανικά πρωτόνια συντονίζονται στα 2.58 ppm και τα μεθυλενικά πρωτόνια στα 6.65 ppm.

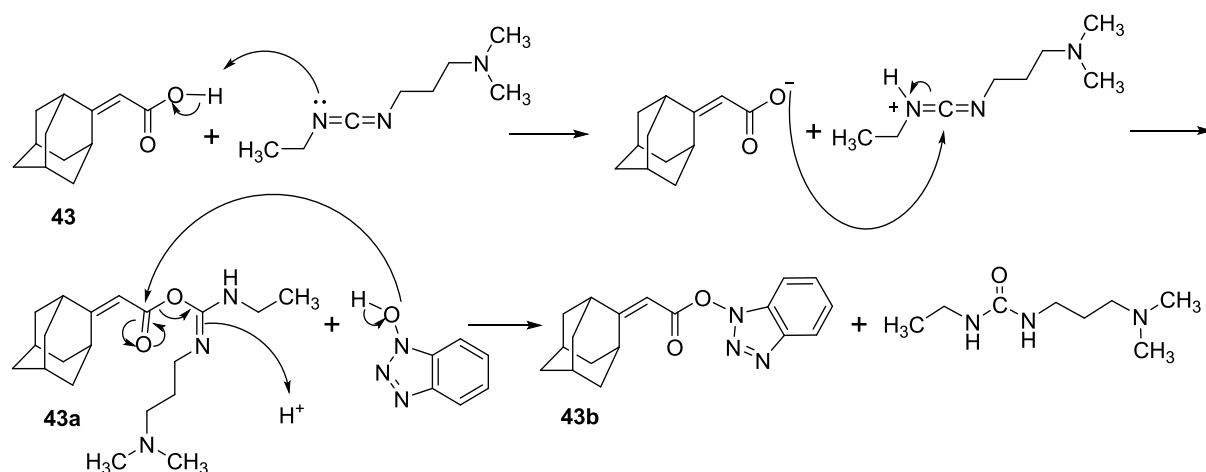


Εικόνα 19. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του 2-αδμαντυλιδενοακετούδραζιδίου **44**.



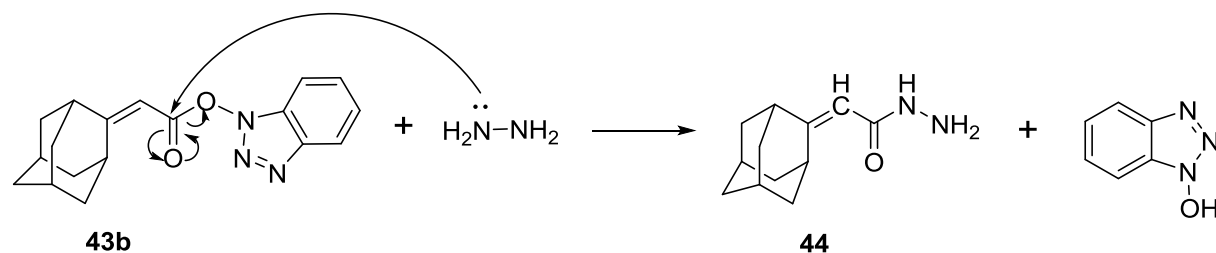
Εικόνα 20. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της σπειραδμαντανοπυραζολιδινόνης **42**.

Ο μηχανισμός της παρασκευής του 2-αδαμαντυλιδενακετοϋδραζιδίου (**44**) αναλύεται στα ακόλουθα **Σχήματα 12** και **13**. Σε πρώτο στάδιο η *N,N*-δισοπροπυλαιθυλαμίνη (DIPEA) απελευθερώνει τη βάση του υδροχλωρικού 1-(3-διμεθυλαμινοπροπυλο)-3-αιθυλοκαρβοδιιμιδίου (EDC.HCl), η οποία δεσμεύει αρχικά το όξινο πρωτόνιο του 2-αδαμαντυλιδενοξικού οξέος (**43**) και στη συνέχεια δρα ως οξύ κατά Lewis σχηματίζοντας με το προαναφερόμενο οξύ **43** το ενδιάμεσο καρβαμυδικό αμίδιο **43a**. Η αύξηση του ηλεκτρονιόφιλου χαρακτήρα του καρβονυλίου καθιστά δυνατό το σχηματισμό του εστέρα του 1-υδροξυβενζοτρίαζολίου **43b** απελευθερώνοντας ως παραπροϊόν την 1-(3-διμεθυλαμινο)προπυλο)-3-αιθυλουρία.



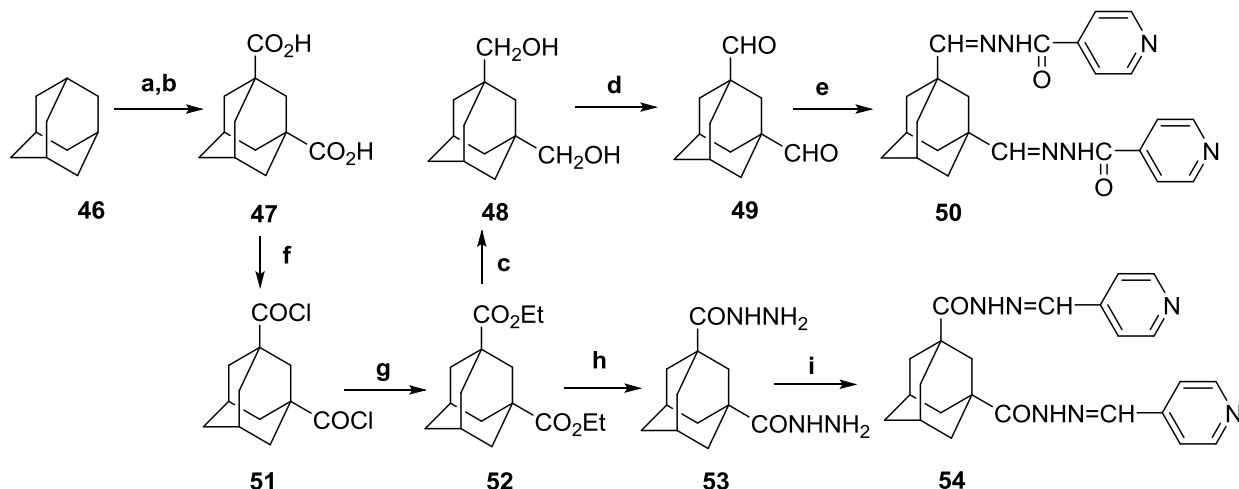
Σχήμα 12. Πρώτο στάδιο μηχανισμού για το σχηματισμό του 2-αδαμαντυλιδενακετοϋδραζιδίου (**44**)

Στη συνέχεια, με επίδραση υδραζίνης στον εστέρα **43b** σχηματίζεται το υδραζίδιο **44** και απελευθερώνεται το 1-υδροξυβενζοτρίαζόλιο (**Σχήμα 13**).



Σχήμα 13. Δεύτερο στάδιο μηχανισμού σχηματισμού του 2-αδαμαντυλιδενακετοϋδραζιδίου (**44**).

Η σύνθεση των διυδραζονών **50** και **54** πραγματοποιείται σύμφωνα με τις αντιδράσεις του **Σχήματος 14**.



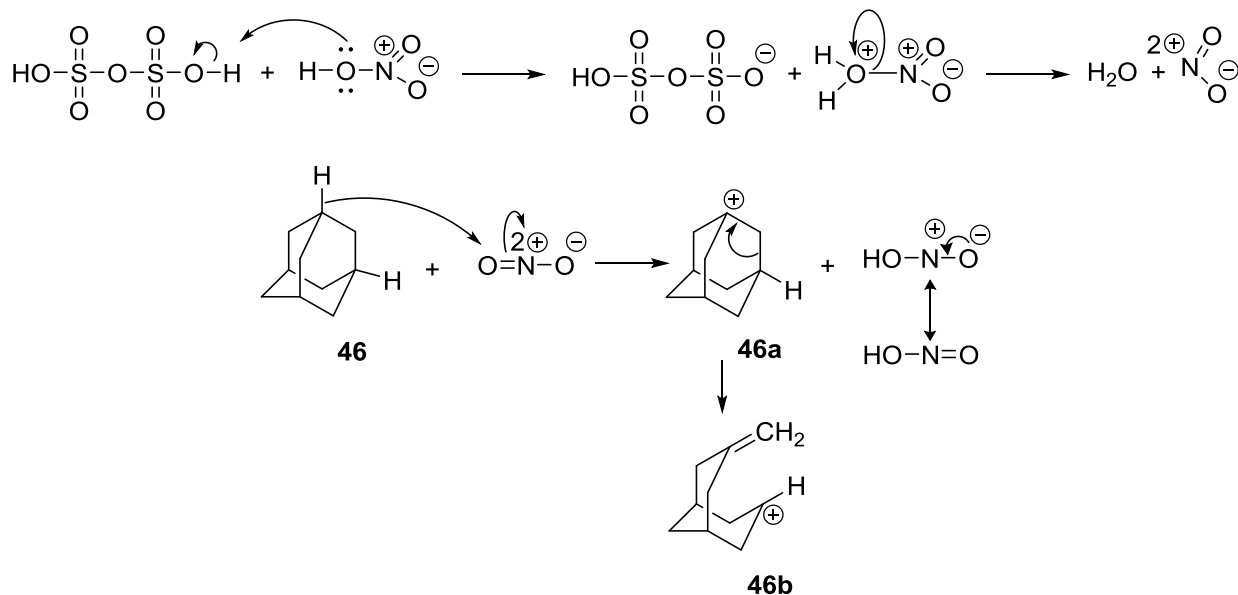
Σχήμα 14. Αντιδραστήρια και συνθήκες: a. HCO_2H , $\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_7$, H_2SO_4 , HNO_3 ; b. H_2O , 0°C ; c. LiAlH_4 THF, reflux, 36 h, ii) $\text{H}_2\text{O}/\text{OH}^-$, 0°C ; d. PCC, DCM (dry), rt, 2.5 h; e. INH , MeOH, reflux, 6 h και μετά rt, 18 h; f. i) SOCl_2 , reflux, 1.5 h, ii) βενζόλιο; g. EtOH, reflux, 1.5 h; h. $\text{H}_2\text{NNH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, διαιθυλενογλυκόλη, microwave, 210°C , 90 min; i. 4-πυριδινοκαρβοξαλδεΐδη, MeOH, reflux, 6 h και μετά rt, 18 h.

Με βραδεία προσθήκη μυρμηκικού οξέος, με τη βοήθεια αυτόματης σταγονομετρικής χοάνης, σε μίγμα αδαμαντανίου **46** και πυκνού θειικού οξέος/πυροθειικού οξέος/νιτρικού οξέος και μετά από υδρόλυση του μίγματος της αντίδρασης σχηματίζεται το 1,3-αδαμαντανοδικαρβοξυλικό οξύ (**47**)^[170, 171]. Ακολούθως το δικαρβοξυλικό οξύ **47** εστεροποιείται προς το διαιθυλεστέρα **52**, ο οποίος είτε ανάγεται προς την αλκοόλη **48**, είτε μετατρέπεται προς το υδραζίδιο **53**, κατά τα γνωστά. Από την αλκοόλη **48** και το υδραζίδιο **53** προκύπτουν οι αντίστοιχες ισομερείς υδραζόνες **50** και **54** με τις μεθόδους που ήδη αναφέρθηκαν για τα μονοϋποκατεστημένα παράγωγα.

Ο μηχανισμός της παρασκευής του 1,3-αδαμαντανοδικαρβοξυλικού οξέος (**47**) παρατίθεται αναλυτικά, στα **Σχήματα 15-17**.

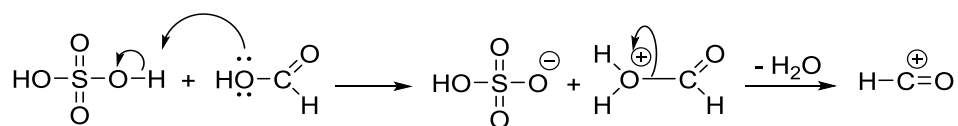
Σε πρώτο στάδιο πραγματοποιείται ο σχηματισμός του 1-αδαμαντυλοκατιόντος (**46b**), το οποίο δημιουργείται κατά την επίδραση μίγματος πυκνού θειικού οξέος/πυροθειικού οξέος (oleum) και πυκνού νιτρικού οξέος στο αδαμαντάνιο (**46**). Η επίδραση του μίγματος πυροθειικού οξέος και πυκνού θειικού οξέος, στο νιτρικό οξύ έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό κατιόντος νιτρωνίου. Το κατιόν νιτρωνίου έχει τη δυνατότητα αποσπάσεως υδριδίου από μεθινικό άνθρακα του αδαμαντανίου και σχηματισμό του 1-

αδαμαντυλοκαρβοκατιόντος (**46a**), το οποίο ουσιαστικά υφίσταται υπό τη μορφή του ανοικτού κατιόντος **46b** (Σχήμα 15).

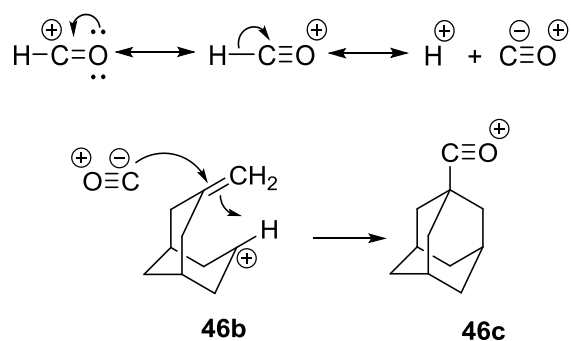


Σχήμα 15. Πρώτο στάδιο μηχανισμού για το σχηματισμό του 1,3-αδαμαντανοδικαρβοξυλικού οξέος (47).

Σε δεύτερο στάδιο, κατά την προσθήκη μυρμηκικού οξέος σε μίγμα αδαμαντανίου/πυκνού θεικού οξέος/πυροθεικού οξέος/νιτρικού οξέος, σχηματίζεται μονοξειδίο του άνθρακα, το οποίο αντιδρά με το 1-αδαμαντυλοκατιόν **46b** προς σχηματισμό του κατιόντος οξοκαρβωνίου **46c** (Σχήμα 16).

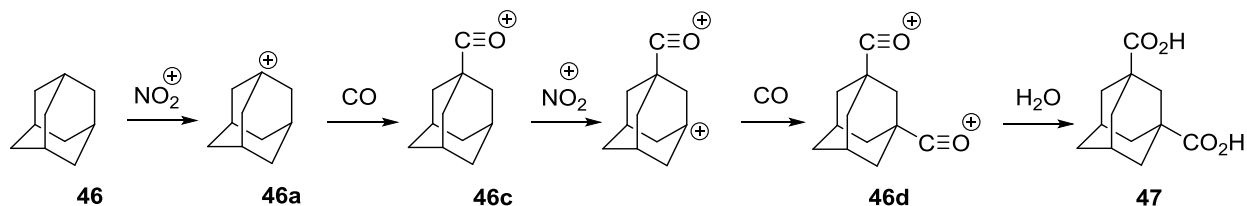


και



Σχήμα 16. Δεύτερο στάδιο μηχανισμού για το σχηματισμό του 1,3-αδαμαντανοδικαρβοξυλικού οξέος (47).

Με περίσσεια κατιόντων νιτρωνίου και μονοξειδίου του άνθρακα, το κατιόν οξοκαρβωνίου **46c** μετατρέπεται προς το διπλό κατιόν οξοκαρβωνίου **46d**, το οποίο κατά την υδρόλυση σχηματίζει το 1,3-αδαμαντανοδικαρβοξυλικό οξύ (**47**). Η συνολική πορεία των αντιδράσεων απεικονίζεται στο **Σχήμα 17**.



Σχήμα 17. Συνολική απεικόνιση του μηχανισμού για το σχηματισμό του δικαρβοξυλικού οξέος **47**.

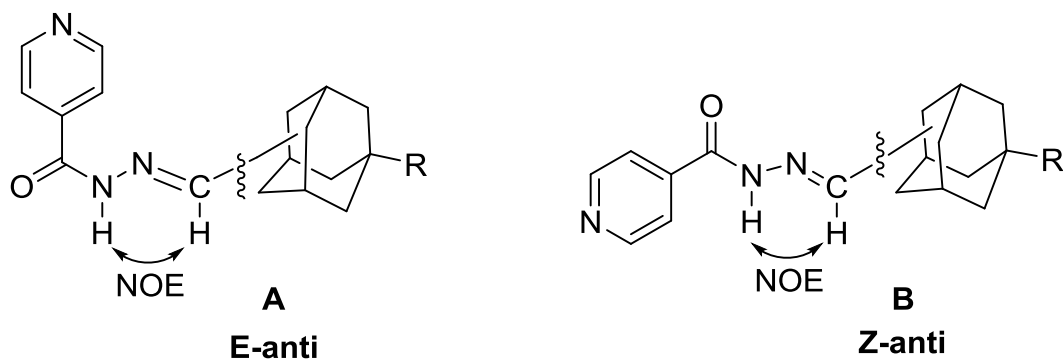
Μελέτη των φασμάτων NMR

Από τα φάσματα ^1H και ^{13}C -NMR των αδαμαντανικών υδραζονών του ισονιαζιδίου **4,8,17,22,28,32,37** και **50** φαίνεται ότι πρόκειται για μίγματα των διαμορφομερών **A** και **B**, τα οποία βρίσκονται σε αναλογία από 5:1 έως 11:1 σε διάλυμα $\text{DMSO}-d_6$ ή από 7:5 έως 3:2 σε διάλυμα CDCl_3 , όπως προκύπτει από τις σχετικές τιμές των ολοκληρώσεων των χαρακτηριστικών ομάδων στα φάσματα ^1H -NMR. Αντίθετα, στις υδραζόνες των 1-αδαμαντανοκαρβοϋδραζιδίων **39,40,45** και του δικαρβοϋδραζιδίου **54** με την ισονικοτινική αλδεϋδη, επικρατεί μόνο ένα διαμορφομερές.

Αρχικά, θα πρέπει να σημειωθεί ότι από τα φάσματα NOE των αδαμαντανικών υδραζονών του ισονιαζιδίου φαίνεται ότι τα **A** και **B** είναι διαμορφομερή που βρίσκονται σε ισορροπία και όχι γεωμετρικά ισομερή, δηλαδή αποκλείεται η περίπτωση μίγματος *anti* και *syn*-υδραζονών (**Σχήμα 18**). Αυτό προκύπτει από την κορυφή της σύζευξης NOE μεταξύ των πρωτονίων N-H και =C-H για τις δύο διαμορφώσεις (**Εικόνα 21** και **Εικόνες 22,23** για την ένωση 4)

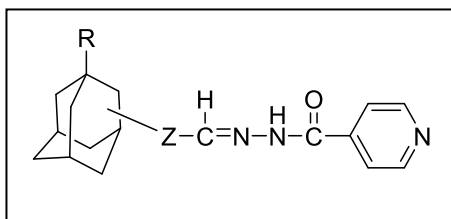
Επιπλέον, στον Πίνακα 2 παρατίθενται οι τιμές συντονισμού του αζωμεθινικού πρωτονίου, καθώς και του πρωτονίου NH στα φάσματα ^1H -NMR. Επίσης, παρατίθενται οι τιμές συντονισμού του αζωμεθινικού και του καρβονυλικού άνθρακα στα φάσματα ^{13}C -NMR των διαμορφομερών **A** και **B** των παραγώγων **4,8,17,22,28,32,37** και **50**. Από τη σύγκριση των τιμών του Πίνακα 2, καθίσταται εμφανές ότι υπάρχει σαφέστατη αναλογία μεταξύ των τιμών συντονισμού των χαρακτηριστικών ομάδων στα διαμορφομερή **A**, η οποία είναι διαφορετική από εκείνη στα διαμορφομερή **B**. Αναφορικά με τα αζωμεθινικά πρωτόνια, αυτά των **A**

εμφανίζονται ως περισσότερο αποπροστατευμένα απ' ό τι τα αζωμεθινικά πρωτόνια των **B**. Ανάλογες διαφορές, παρατηρούνται και στις τιμές συντονισμού των ανθράκων των χαρακτηριστικών και άλλων ομάδων των διαμορφομερών **A** και **B**. Επιπρόσθετα, στην υδραζόνη **8**, τα α -μεθυλενικά πρωτόνια των **A** συντονίζονται σε σαφώς χαμηλότερες τιμές πεδίου απ' ό τι τα α -μεθυλενικά πρωτόνια των **B**.







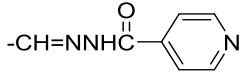
Σχήμα 18. Απεικόνιση των διαμορφομερών **A** και **B** των αδαμαντανικών υδραζονών του ισονιαζιδίου.

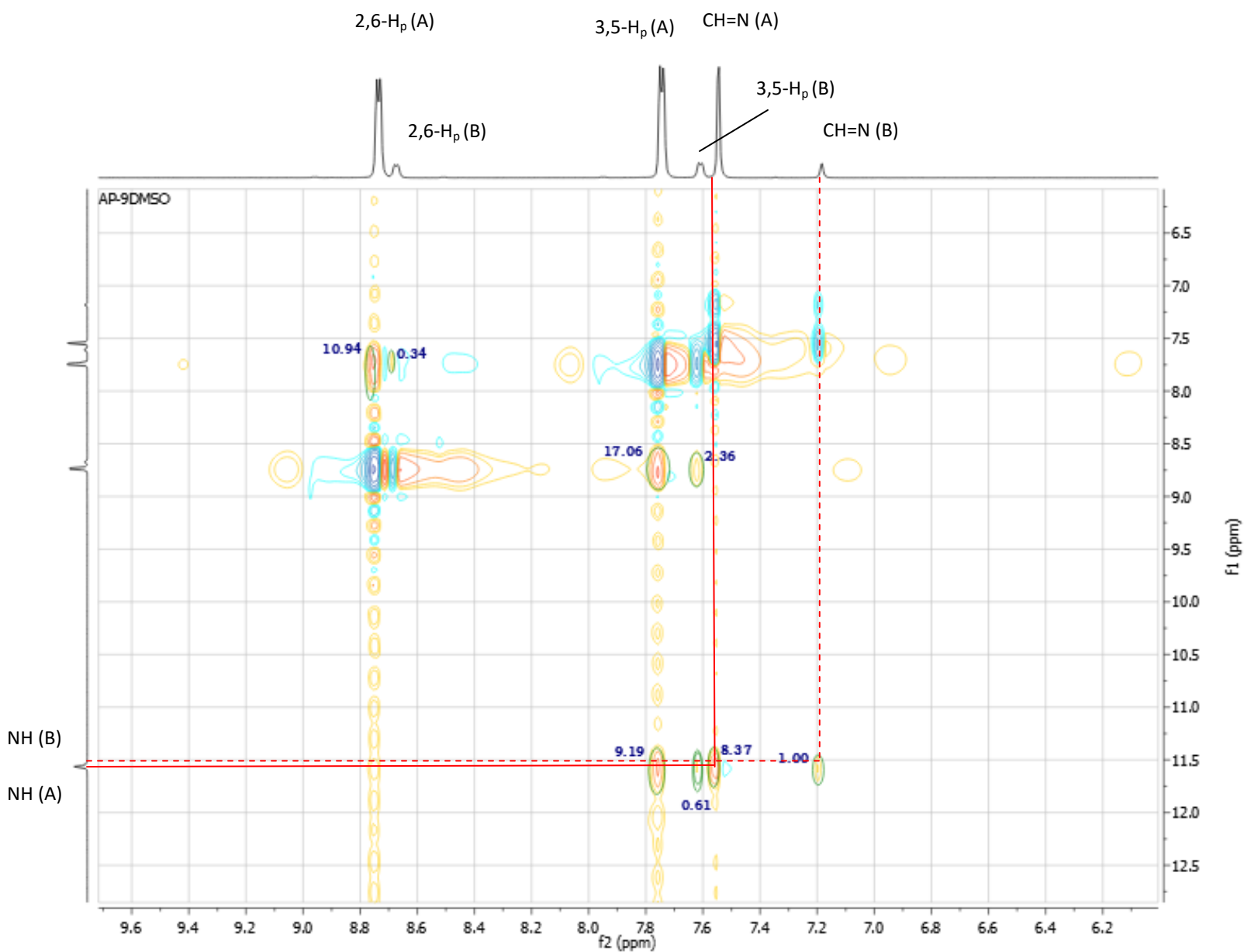
Τα παραπάνω δεδομένα, οδηγούν στο συμπέρασμα ό τι πιθανώς η επικρατέστερη (χαμηλότερης ενέργειας) δομή **A** αντιστοιχεί στην *anti*-γεωμετρική ισομέρεια της υδραζόνης και στην *E*-υδραζιδική διαμόρφωση, ενώ η σε μικρότερη αναλογία (υψηλότερης ενέργειας) δομή **B** αντιστοιχεί στην *anti*-γεωμετρική ισομέρεια της υδραζόνης και στην *Z*-καρβοϋδραζιδική διαμόρφωση (**Πίνακας 2**).



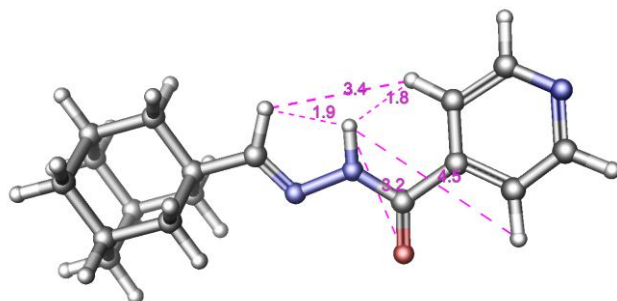
Πίνακας 2

Ένωση	R	Z	Υποκατάσταση	Διαμορφομέρες	Διαλύτης	¹ H-NMR δ(ppm)		¹³ C-NMR δ(ppm)	
						CH=N	NH	C=N	C=O
4	H	-	1	A	DMSO-d ₆	7.54	11.55	160.3	161.4
8	H	-CH ₂ -	1	A	CDCl ₃	7.63-7.64	10.45	153.2	162.5
17		-	1,3	A	DMSO-d ₆	7.53	11.60	160.8	161.8
22		-	1,3	A	CDCl ₃	7.42	9.64	161.1	162.4
28	H		1	A	DMSO-d ₆	8.44	12.00	149.0	161.5
32	-	-	2	A	CDCl ₃	7.89-7.90	9.93	158.3	172.2
37	H		2	A	DMSO-d ₆	8.49	12.06	149.1	161.5
50		-	1,3	A	DMSO-d ₆	7.63	11.64	161.3	163.0

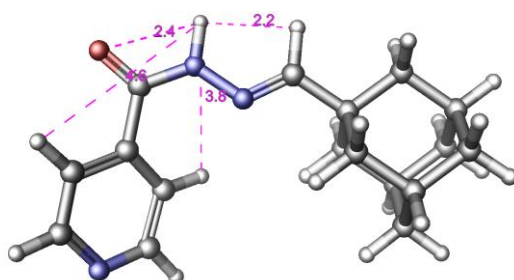
4	H	-	1	B	DMSO-d ₆	7.19	11.50	155.7	161.4
8	H	-CH ₂ -	1	B	CDCl ₃	7.26-7.29	9.54	153.2	162.5
17		-	1,3	B	DMSO-d ₆	7.18	11.51	155.9	161.8
22		-	1,3	B	CDCl ₃	7.04	9.74	156.1	162.4
28	H		1	B	DMSO-d ₆	8.08	12.00	149.5	161.5
32	-	-	2	B	CDCl ₃	7.30	9.77	162.4	172.2
37	H		2	B	DMSO-d ₆	8.12	12.03	146.6	161.5
50		-	1,3	B	DMSO-d ₆	7.26	11.59	161.3	163.0



Εικόνα 21. 2D NOESY φάσμα της ένωσης **4**. Φαίνεται η σχετική ένταση των NOE συζεύξεων που οφείλονται στο κύριο A και δευτερεύον B διαμορφομερές. Η συνεχής γραμμή δείχνει τη σύζευξη μεταξύ NH και =CH που αποδεικνύει τη διαμόρφωση της **Εικόνας 23**.



Εικόνα 22. Minor διαμόρφωση της ένωσης 4.



Εικόνα 23. Major διαμόρφωση της ένωσης 4.

Θέτοντας ως απόσταση αναφοράς αυτή των *ορθο*- και *μετα*- πρωτονίων του μορίου της πυριδίνης ίσης με 2,5 Å, κατέστη δυνατό, μέσω του πειράματος 2D NOESY, να υπολογιστούν άλλες κρίσιμες αποστάσεις και να συγκριθούν με τα αποτελέσματα της Μοριακής Μοντελοποίησης.

Πίνακας 3.

Αποστάσεις εκφρασμένες σε Å		
Πρωτόνια	Πειραματικά Αποτελέσματα	Θεωρητικά
A διαμ (Major) <u>CH=N-NH</u>	2.4	1.9
A διαμ (Major) <u>NH-arom.</u> 3,5	2.4	3.2
B διαμ (Minor) <u>CH=N-NH</u>	2.3	2.2
B διαμ (Minor) <u>NH-arom.</u> 3,5	2.5	4.3

Είναι εμφανές ότι τα πειραματικά αποτελέσματα συμφωνούν με τα θεωρητικά. Η απόσταση NH-αρωματικών πρωτονίων 3 και 5 είναι μεγαλύτερη στα πειραματικά δεδομένα στην περίπτωση της *minor* διαμόρφωσης όπως προκύπτει και από τα θεωρητικά αποτελέσματα.

3. ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Ο έλεγχος της αντιφυματικής δράσης των νέων αδαμαντανικών παραγώγων της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του Global Health Institute του Πολυτεχνείου της Λωζάνης, στην Ελβετία, υπό τη διεύθυνση του καθηγητή Stewart T. Cole.

Ο φαρμακολογικός έλεγχος ^[172,173] των ενώσεων πραγματοποιήθηκε έναντι του αναπαραγόμενου στελέχους H37Rv του *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) και του μη αναπαραγόμενου στελέχους SS18b. Επιπρόσθετα, ελέγχθηκε και η κυτταροτοξικότητα έναντι της κυτταρικής σειράς HepG2 (human liver hepatocellular carcinoma cell line). Τα αποτελέσματα του φαρμακολογικού ελέγχου παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4**.

Πίνακας 4. Φαρμακολογικά αποτελέσματα αντιφυματικής αξιολόγησης.

Ένωση	H37Rv	SS18b		HepG2		SI
	MIC*	I _{max}	Inhib. at 1μg/mL	TD ₉₉ *	TD ₅₀ *	TD ₅₀ /MIC
4	0.04	0%	0%	>100	100	2500
8	0.05	0%	0%	83.2	40.1	802
17	0.06	0%	0%	39.8	37.5	625
22	0.06	0%	0%	44.9	25	417
28	0.1	0%	0%	24.7	18.7	187
32	0.06	0%	0%	>100	>100	>1666
37	23	98%	12%	34.2	9.7	0
39	29.3	0%	0%	N.T	N.T	N.T
40	26.9	0%	0%	N.T	N.T	N.T
45	>100	0%	0%	N.T	N.T	N.T
50	0.04	0%	0%	>100	>100	>2500
54	>100	0%	0%	N.T	N.T	N.T
Isoniazid	0.03	0%	0%	>100	>100	>3333
Ethambutol	0.3	0%	0%	>100	>100	>333

MIC, minimal inhibitory concentration, η ελάχιστη συγκέντρωση αναστολής.

TD₅₀, η δόση που προκαλεί τοξικό αποτέλεσμα στο 50% του πληθυσμού.

TD₉₉, η δόση που προκαλεί τοξικό αποτέλεσμα στο 99% του πληθυσμού.

SI, selectivity index, δείκτης εκλεκτικότητας.

I_{max}, maximal inhibition, μέγιστη αναστολή.

* μg/mL.

Από τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα, προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Τα νέα αδαμαντανικά παράγωγα του ισονιαζιδίου έχουν δράση μόνο κατά του αναπαραγόμενου στελέχους H37Rv του *Mycobacterium tuberculosis* και όχι κατά του μη αναπαραγόμενου στελέχους SS18b, γεγονός που προτείνει ότι και τα νέα αδαμαντανικά παράγωγα έχουν τον ίδιο μηχανισμό δράσης με το ισονιαζίδιο.
- Οι ενώσεις που έχουν ενσωματωμένη στο σκελετό τους τη δομή της υδραζόνης του ισονικωτινικού υδραζιδίου (ενώσεις **4**, **8**, **17**, **22**, **28**, **32** και **50**) έχουν σαφώς καλύτερη δράση από τις ισομερείς τους ενώσεις τις υδραζόνες του 1-αδαμαντανοκαρβονυλοϋδραζιδίου (ενώσεις **39** και **40**) του 2-αδαμαντιλυδενοακετοϋδραζιδίου (ένωση **45**) και του 1,3-αδαμαντανοδικαρβονυλοϋδραζιδίου (ένωση **54**). Η διαφοροποίηση αυτή πιθανώς αποδίδεται στο μηχανισμό ενεργοποίησης του ισονιαζιδίου από τα αντίστοιχα ένζυμα. Οι υδραζόνες του ισονικωτινικού οξέος μπορούν να προσεγγίσουν την κοιλότητα της αίμης και να προσδεθούν στο σημείο σύνδεσης της KatG, ώστε να δημιουργηθεί η αντίστοιχη ισονικωτινική ρίζα. Αντιθέτως, οι ισομερείς υδραζόνες λόγω του όγκου του αδαμαντανίου δεν μπορούν να προσεγγίσουν το σημείο πρόσδεσης της αίμης της KatG. Η ένωση **4** είναι 733 φορές ισχυρότερη από την ισομερή της ένωση **39** και αντίστοιχα η ένωση **50** περισσότερο από 2500 φορές από την ένωση **54**.
- Η προσθήκη του αδαμαντανίου στο μόριο του ισονιαζιδίου που αυξάνει τη λιποφιλικότητα του μορίου, για την καλύτερη στόχευση στο λιπόφιλο περιβάλλον του τοιχώματος του μυκοβακτηριδίου, οδήγησε σε δραστικό μόριο (όχι όμως πιο δραστικό του ισονιαζιδίου) χωρίς να επηρεάζεται αισθητά ο δείκτης εκλεκτικότητας SI, όπως φαίνεται από το παράγωγο **4**. Η περαιτέρω αύξηση της λιποφιλικότητας με την εισαγωγή του κυκλοπεντανικού και του φαινολικού δακτυλίου στο σκελετό των νέων αντιφυματικών παραγώγων μείωσε σημαντικά το δείκτη εκλεκτικότητας SI, όπως φαίνεται στις ενώσεις **17**, **22** και **28**, **37**. Ωστόσο, οι ενώσεις **17** και **22** διατηρούν την ίδια τάξης μεγέθους δραστικότητα.
- Η παρουσία του φαινολικού δακτυλίου σε συζυγιακή θέση με την υδραζόνη διαφοροποιεί την επίδρασή της στη δράση, ανάλογα με τη θέση υποκατάστασης στον αδαμαντανικό κλωβό. Έτσι, στη θέση-2 του αδαμαντανίου μειώνει σημαντικά τη δράση στην ένωση **37** και όχι τόσο στην ένωση **28**, με υποκατάσταση στην θέση-1 του αδαμαντανίου.
- Η επιμήκυνση, κατά ένα μεθυλένιο από τον αδαμαντανικό κλωβό της πλάγιας υδραζονικής αλυσίδας, μειώνει το δείκτη εκλεκτικότητας SI κατά 3 φορές, όπως φαίνεται στην ένωση **8**.

- Η διϋδραζόνη **50** εμφανίζει την ίδια δραστικότητα με τη μονοϋδραζόνη **4** παρά το γεγονός ότι φέρει δυο φαρμακοφόρες ομάδες, γιατί φαίνεται ότι μόνο η μια ομάδα μπορεί να προσεγγίσει στερεοχημικά την κοιλότητα της αίμης και να προσδεθεί στο σημείο σύνδεσης της KatG, για την ενεργοποίηση της ισονικοτινικής ρίζας.
- Συνολικά, όλες οι αδαμαντανικές υδραζόνες του ισονικοτινικού υδραζιδίου παρουσιάζουν την ίδια τάξη δραστικότητας με το ισονιαζίδιο και παρουσιάζονται πιο δραστικές και λιγότερο τοξικές από την εθαμβουτόλη. Τα παρόντα αποτελέσματα, προσφέρουν χρήσιμες πληροφορίες για το μελλοντικό σχεδιασμό νέων παραγώγων, τα οποία θα συνδυάζουν ισχυρή δράση και χαμηλή κυτταροτοξικότητα.

4. ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Οι δομές των υπο εξέταση νέων ενώσεων, προετοιμάστηκαν μέσω του προγράμματος LigPrep 3.4^[174] (ελαχιστοποίηση ενέργειας μέσω του πεδίου δυνάμεων OPLS3, ιοντισμός σε pH = 7,4). Για την ελαχιστοποίηση της ενέργειας των ενώσεων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό MacroModel έκδοση 10.8^[175]. Ενώ, για τον υπολογισμό των φορτίων έγινε χρήση του πεδίου δυνάμεων OPLS2005 και ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το νερό. Ως μέθοδος ελαχιστοποίησης ενέργειας χρησιμοποιήθηκε η PRCG (Polak-Ribiere Conjugate Gradient – Μέθοδος συζυγούς βαθμίδας Polak-Ribiere), αφού θεωρείται ως η πιο ακριβής γενική μέθοδος ελαχιστοποίησης δομών. Ως μέγιστος αριθμός επαναληπτικών κύκλων ελαχιστοποίησης (maximum iterations) ορίστηκε το 500. Ακόμα, για τη δημιουργία διαμορφώσεων επιλέχθηκε η μέθοδος επιλογής μίγματος δίδρων γωνιών μικτής περιστροφής/δειγματοληψία χαμηλού επιπέδου (Mixed Torsional/Low Mode Sampling) και χρησιμοποιήθηκαν 100 βήματα ανά περιστρεφόμενο δεσμό (100 steps per rotatable bond). Το παράθυρο ενέργειας μεταξύ των διαμορφώσεων (energy window for saving structures) που αποθηκεύονται ήταν 21,0 kcal/mol.

Μέσω του προγράμματος QikProp 3.4 υπολογίσθηκαν χρήσιμες σταθερές, που χρειάζονται για την εκτίμηση των παραβιάσεων των κανόνων Lipinski (κανόνας των πέντε)^[176,177] ή των κανόνων του Jorgensen (κανόνας των τριών)^[178,179]. Στο λογισμικό QikProp θεωρείται πως συμβαδίζουν με τους κανόνες Lipinski ενώσεις για τις οποίες:

- Το μοριακό βάρος είναι μικρότερο από 500 (mol_MW<500)
- Η πρόβλεψη για το συντελεστή κατανομής *n*-οκτανόλης/νερού είναι μεταξύ -2 και 6.

$$\text{LogP} = \frac{\text{Συγκέντρωση διαλυμένης ουσίας σε οκτανόλη}}{\text{Συγκέντρωση ουσίας σε μη ιοντισμένο νερό}}$$

- Ο αριθμός των δοτών δεσμών υδρογόνου είναι μικρότερος ή ίσος του πέντε. (donorHB≤5).
- Ο αριθμός των δεκτών δεσμών υδρογόνου είναι μικρότερος ή ίσος του δέκα (acceptorHB≤10).

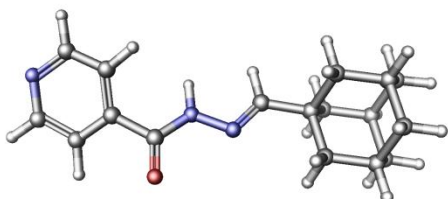
Θεωρείται ότι συμβαδίζουν με τους κανόνες του Jorgensen ενώσεις για τις οποίες:

- Το προβλεπόμενο logS είναι μεγαλύτερο του -5,7. Το S μετριέται σε mol dm⁻³ και εκφράζεται συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας σε κορεσμένο διάλυμα, που είναι σε ισορροπία με το κρυσταλλικό στερεό. Ουσιαστικά, εκφράζει τη διαλυτότητα της ουσίας στο νερό.

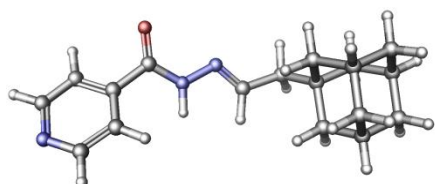
- Το QPPCaco είναι μεγαλύτερο από 22 nm/s. Οι προβλεπόμενες τιμές διαπερατότητας των κυττάρων Caco-2 εκφράζεται σε nm/sec. Τα κύτταρα Caco-2 αποτελούν ένα μοντέλο για το βλεννογόνο εντερικό φραγμό. Οι προβλέψεις που γίνονται μέσω QikProp αφορούν την παθητική μεταφορά. Προτεινόμενες τιμές: αποτελέσματα μικρότερα από 25 θεωρούνται ότι έχουν μικρή διαπερατότητα. Θεωρούνται ιδανικά τα αποτελέσματα με τιμές μεγαλύτερες από το 500.
- Ο αριθμός πρωταρχικών μεταβολιτών (primary metabolites) είναι μικρότερος από 7.

Συμπεράσματα:

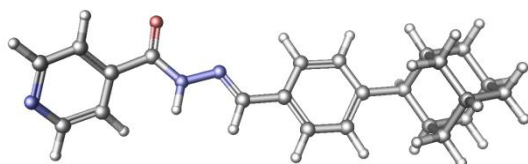
Ελαχιστοποιημένη τρισδιάστατη δομή της ένωσης **4**:



Ελαχιστοποιημένη τρισδιάστατη δομή της ένωσης **8**:



Ελαχιστοποιημένη τρισδιάστατη δομή της ένωσης **37**:



Πίνακας 5: Κύριοι περιγραφητές και πρόβλεψη ιδιοτήτων για τις 3 ενώσεις. Στην τελευταία στήλη παρουσιάζεται το εύρος τιμών για το 95% των φαρμάκων. Οι τιμές που υπερβαίνουν το εύρος τιμών έχουν επισημανθεί με έντονη γραφή.

Κύριοι περιγραφητές	ένωση 4	ένωση 8	ένωση 37	Εύρος τιμών για το 95% των φαρμάκων
Μοριακό βάρος	283.372	297.399	359.470	130.0-725.0
Διπολική ροπή (D)	6.143	6.319	6.297	1.0-12.5
Συνολικό SASA	570.485	595.654	681.766	300.0-1000.0
Υδρόφοβο SASA	303.795	321.798	291.100	0.0-750.0
Υδρόφιλο SASA	102.149	109.323	97.014	7.0-330.0
Άνθρακας-π SASA	164.542	164.533	293.652	0.0-450.0
Ασθενές πολικό SASA	0	0	0	0.0-175.0
Μοριακός όγκος (A ³)	977.498	1029.729	1197.617	500.0-2000.0
Πολική και Van der Waals επιφάνεια (PSA)	74.506	75.832	63.346	7.0-200.0
Αριθμός περιστρεφόμενων δεσμών	4	5	4	0.0-15.0
Δότες δεσμών υδρογόνων	1	1	1	0.0-6.0
Δέκτες δεσμών υδρογόνου	4	4	4	2.0-20.0
Σφαιρικότητα (Τιμή για τη σφαίρα = 1)	0.835	0.828	0.8	0.75-0.95
Δυναμικό ιονισμού - IP (eV)	9.661	9.659	9.037	7.9-10.5
Ηλεκτρονιακή συγγένεια - EA (eV)	0.761	0.761	0.816	-0.9-1.7
Πρόβλεψη ιδιοτήτων				
Πολωσιμότητα (Angstroms ³)	31.968	33.417	42.011	13.0-70.0
log P για δεκαεξάνιο/αέριο	9.349	9.897	12.347	4.0-18.0
log P για οκτανόλη/αέριο	14.240	14.739	17.787	8.0-35.0
log P για νερό/αέριο	7.428	7.317	8.540	4.0-45.0
log P για οκτανόλη/νερό	3.221	3.499	4.793	-2.0-6.5
QPlog S για διαλυτότητα σε νερό	-4.582	-4.866	-6.576	-6.5-0.5
QPlog S – ανεξάρτητη από τη διαμόρφωση	-3.687	-3.968	-5.589	-6.5-0.5
log K hsa	0.335	0.431	0.925	-1.5-1.5
log BB για μυαλό/αίμα	-0.654	-0.801	-0.688	-3.0-1.2
Αριθμός κυρίων μεταβολιτών	2	3	3	1.0-8.0
QPhERG K+ log IC50	-4.987	-5.101	-6.169	Ανησυχητικές τιμές κάτω από -5

QPPCaco-2 (nm/sec)	1064	910	1191	<25 μη ευνοϊκό, >500 ευνοϊκό
QPPMDCK (nm/sec)	529	446	597	<25 μη ευνοϊκό, >500 ευνοϊκό
Παραβιάσεις του κανόνα των πέντε του Lipinski	0	0	0	Μέγιστο 4
Παραβιάσεις του κανόνα των τριών του Jorgensen	0	0	1	Μέγιστο 3
% Ανθρώπινη στοματική απορρόφηση (+/-20%)	100	100	100	Τιμές μικρότερες από <25% μη ευνοϊκές

- **SASA:** Επιφάνεια του μορίου προσβάσιμη στο διαλύτη (SASA) μετρημένη σε Å².
- **Υδροφοβο SASA:** Η επιφάνεια που επικαλύπτεται από κορεσμένους υδρογονάνθρακες.
- **Υδροφιλο SASA:** Η επιφάνεια που επικαλύπτεται από άτομα αζώτου, οξυγόνου, υδρογόνου όταν είναι ενωμένα με ένα ετεροάτομο και άτομα άνθρακα σε καρβονύλιο.
- **CH-π SASA:** Η επιφάνεια που είναι προσβάσιμη μέσω αλληλεπιδράσεων CH-π.
- **PSA:** Van der Waals επιφάνεια των πολικών ατόμων οξυγόνου και αζώτου και των ατόμων άνθρακα των καρβονυλίων.
- **Ασθενές πολικό SASA:** Η επιφάνεια που επικαλύπτεται από άτομα Cl, P και S.
- **Δότες δεσμών υδρογόνου:** Υπολογισμένος αριθμός δοτών δεσμών υδρογόνου της υπό μελέτη ένωσης σε μόρια νερού σε υδατικό διάλυμα. Η αναγραφόμενη τιμή εμφανίζεται ως μέσος όρος μιας πληθώρας διαμορφώσεων και γι' αυτό ο αριθμός αυτός μπορεί να μην είναι ακέραιος.
- **Δέκτες δεσμών υδρογόνου:** Υπολογισμένος αριθμός δεκτών δεσμών υδρογόνου της υπό μελέτη ένωσης από μόρια νερού σε υδατικό διάλυμα. Η αναγραφόμενη τιμή εμφανίζεται ως μέσος όρος μιας πληθώρας διαμορφώσεων και γι' αυτό ο αριθμός αυτός μπορεί να μην είναι ακέραιος.
- **Σφαιρικότητα:** Περιγραφητής σφαιρικότητας, $(4\pi R^2)/SASA$, όπου R είναι η ακτίνα μιας σφαίρας με όγκο ίσο προς το μοριακό όγκο. Η σφαιρικότητα είναι 1.0 για ένα σφαιρικό μόριο.
- **IP (ionization potential):** Ενέργεια ιονισμού, όπως υπολογίζεται μέσω της ημιεμπειρικής κβαντομηχανικής μεθόδου PM3.
- **EA (electron affinity):** Ηλεκτρονική συγγένεια όπως υπολογίζεται μέσω της ημιεμπειρικής κβαντομηχανικής μεθόδου PM3.
- **QPlog HERG K+:** Προβλεπόμενη τιμή IC₅₀ για την παρεμπόδιση της λειτουργίας των αντλιών HERG K⁺.
- **logP:** Προβλεπόμενος δείκτης κατανομής για την υπό μελέτη ένωση στις εξής περιπτώσεις: δεκαεξάνιο (l)/δεκαεξάνιο (g); οκτανόλη (l)/ οκτανόλη (g); νερό (l)/νερό (g).

- **QPLogS**: Προβλεπόμενη διαλυτότητα στο νερό, $\log S$, όπου το S μετράται σε mol dm^{-3} και είναι η συγκέντρωση της υπό μελέτης ένωσης σε ένα κορεσμένο διάλυμα νερού που βρίσκεται σε ισορροπία με το κρυσταλλικό στερεό.
- **QPPCaco-2**: Προβλεπόμενη διαπερατότητα κυττάρων Caco-2 μετρημένη σε nm/sec . Τα κύτταρα Caco-2 αποτελούν ένα μοντέλο για τον εντερικό φραγμό. Οι προβλέψεις που γίνονται μέσω του προγράμματος QikProp αφορούν στην παθητική μεταφορά.
- **QPPMDCK**: Προβλεπόμενη διαπερατότητα κυττάρων MDCK σε nm/sec . Τα κύτταρα MDCK θεωρείται ότι αποτελούν ένα αξιόπιστο μοντέλο για τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Οι προβλέψεις που γίνονται μέσω του προγράμματος QikProp αφορούν στην παθητική μεταφορά.
- **LogK hsa (human serum albumin)**: Πρόβλεψη για τη δέσμευση της ένωσης στην ανθρώπινη αλβουμίνη του ορού.
- **% Human oral absorption**: Προβλεπόμενη ανθρώπινη στοματική απορροφητικότητα σε κλίμακα από 0 έως 100%. Η πρόβλεψη βασίζεται σε ένα ποσοτικό μοντέλο πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης. Αυτή η ιδιότητα συχνά συσχετίζεται με τη Human Oral Absorption, καθώς και οι δύο μετρούν την ίδια ιδιότητα.
- **Παραβιάσεις του κανόνα των τριών του Jorgensen**: Οι τρεις κανόνες είναι: $\text{QPlogS} > -5.7$, $\text{QPPCaco} > 22 \text{ nm/s}$, Αριθμός Κύριων Μεταβολιτών < 7 . Ενώσεις με λιγότερες (ή ιδανικά καμία) παραβιάσεις αυτών των κανόνων είναι πιο πιθανό να χορηγούνται στοματικά (orally available).

Από τους κύριους περιγραφητές των ενώσεων, φαίνεται ότι οι νέες ενώσεις βρίσκονται εντός του εύρους τιμών για το 95% των φαρμακομοριών με μικρές εξαιρέσεις. Οι τιμές για την επιφάνεια, που είναι προσβάσιμη στο διαλύτη, φαίνονται να είναι κοντά στο όριο των 1000 \AA^2 .

Όσον αφορά στις ιδιότητες των μορίων, ο προβλεπόμενος συντελεστής κατανομής οκτανόλης/νερού δείχνει ότι οι ενώσεις παρουσιάζουν υψηλή λιποφιλία, χωρίς να υπερβαίνουν, όμως, το όριο του 6.5. Το ίδιο συμβαίνει και με την προβλεπόμενη διαλυτότητα στο νερό, οπότε μόνο η φαινυλοϋδραζόνη **37** βρίσκεται εκτός του εύρους τιμών. Καμία απόκλιση, πάνω από το μέγιστο όριο, δεν παρατηρείται για τις προβλεπόμενες τιμές δέσμευσης των ενώσεων στην ανθρώπινη αλβουμίνη του ορού. Κάποια ερωτηματικά, προκαλούν οι προβλεπόμενες τιμές IC_{50} για την παρεμπόδιση της λειτουργίας των αντλιών HERG K^+ , με την ένωση **37** να εμφανίζει τη μεγαλύτερη τοξικότητα. Η προβλεπόμενη διαπερατότητα κυττάρων Caco-2, δείχνει ότι όλες οι ενώσεις παρουσιάζουν πολύ καλά αποτελέσματα (δηλ. οι τιμές είναι πάνω από 500). Τα προβλεπόμενα ποσοστά ανθρώπινης

στοματικής απορρόφησης, είναι πολύ ικανοποιητικά για όλες τις ενώσεις και δεν εμφανίζουν παραβιάσεις στους στατιστικούς κανόνες Lipinski και Jorgensen.

Επίλογος

Ο κυτταροτοξικός έλεγχος επιβεβαίωσε την έλλειψη τοξικότητας για την ένωση **4**, που είχε προβλεφθεί από τις υπολογιστικές μεθόδους. Οι καλές φυσικοχημικές ιδιότητες και οι προβλεπόμενες ιδιότητες κατά την απορρόφηση και κατανομή σε συνδυασμό με την υψηλή δραστηριότητα επιτρέπουν την περαιτέρω *in vitro* φαρμακοκινητική μελέτη και *in vivo* φαρμακολογική αξιολόγηση της ένωσης **4**.

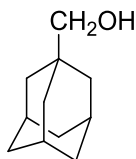
5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5.1 Χημεία

Τα σημεία τήξεως ελήφθησαν σε συσκευή Büchi και δεν είναι διορθωμένα. Για τη χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (flash) χρησιμοποιήθηκε ενεργοποιημένο διοξείδιο του πυριτίου (silica gel) με $pH=7$, (Silice 60 AC.C 40-63 μm). Το μέγεθος των σωματιδίων της silica είναι 40-63 μm και η ειδική επιφάνεια των σωματιδίων $S_m=550 m^2/g$. Για τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) χρησιμοποιήθηκαν φύλλα αργιλίου 5x10 cm επιστρωμένα με λεπτή στιβάδα διοξειδίου του πυριτίου (silica gel 60). Το άνυδρο THF, που χρησιμοποιήθηκε, ελήφθη κατόπιν βρασμού του THF του εμπορίου, παρουσία $CaH_2/LiAlH_4$ και απόσταξη υπό ατμόσφαιρα Αργού.

Τα φάσματα υπερύθρου ελήφθησαν σε φασματοφωτόμετρο Perkin-Elmer RX 1 FT-IR. Τα φάσματα 1H -NMR ελήφθησαν σε φασματογράφους Bruker MSL 400 MHz και Bruker MSL 600 MHz, ενώ τα φάσματα ^{13}C -NMR ελήφθησαν σε φασματογράφο Bruker MSL 200 MHz και Bruker MSL 600 MHz. Η αποτίμηση των κορυφών έγινε με τη βοήθεια φασμάτων 1H -NMR, ^{13}C -NMR, DEPT, 2D-HMQC, 2D-COSY, NOESY. Οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων δ εκφράζονται σε ppm. Τα φάσματα συσχέτισης 1H - 1H COSY ελήφθησαν με τις εξής παραμέτρους: $ns=4$, $ds=8$, $dl=2s$, $d0=3\mu s$, $TD1=256$, $TD2=1024$. Η επεξεργασία των φασμάτων πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή της συναρτήσεως του συνημιτόνου. Τα φάσματα συσχέτισης 1H - ^{13}C HMQC ελήφθησαν με τις εξής παραμέτρους: $ns=48$, $ds=16$, $dl=2s$, $d0=30\mu s$, $TD1=256$, $TD2=1024$.

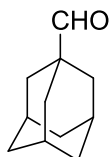
1-Τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκανομεθανόλη (**2**) [151]



Σε αναδευόμενο εναιώρημα $LiAlH_4$ (3.0 g, 79 mmol) σε άνυδρο THF (120 ml) προστίθεται στάγδην διάλυμα του 1-αδαμαντανοκαρβοξυλικού οξέος (**1**) (4.5 g, 25 mmol) σε άνυδρο THF (30 ml). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 3 h και στη συνέχεια υδrolύεται, υπό ψύξη, με τη στάγδην προσθήκη αιθανόλης, νερού και διαλύματος $NaOH$ 10%. Τα ανόργανα άλατα απομακρύνονται με διήθηση και πλένονται με θερμό THF. Από τα συνενωμένα διηθήματα-εκπλύματα το THF απομακρύνεται υπό κενό και στο υπόλειμμα προστίθεται νερό. Το λαμβανόμενο μίγμα εκχυλίζεται με αιθέρα, τα συνενωμένα αιθερικά εκχυλίσματα πλένονται με νερό, ξηραίνονται με Na_2SO_4 και εξατμίζονται. Λαμβάνονται 3.45 g

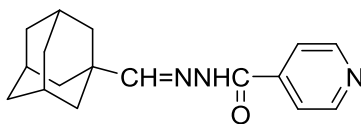
στερεού προϊόντος **2**, το οποίο χρησιμοποιείται χωρίς περαιτέρω καθαρισμό στο επόμενο στάδιο (απόδοση 84%). Σ.τ.: 115 °C.

1-Τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκανοκαρβαξαλδεΐδη (**3**) [152,153]



Σε αναδευόμενο διάλυμα χλωροχρωμικού πυριδινίου (3.36 g, 16 mmol) σε άνυδρο DCM (30 ml) προστίθεται άπαξ διάλυμα της 1-αδαμαντανομεθανόλης (**2**) (2.0 g, 12.3 mmol) σε άνυδρο DCM (10 ml) και το μίγμα αναδεύεται υπό ατμόσφαιρα Αργού και σε θερμοκρασία δωματίου για 1.5 h. Στο μίγμα της αντίδρασης προστίθεται ο αιθέρας (50 ml) και μετά την κατεργασία το μίγμα διηθείται μέσω βραχείας στήλης διοξειδίου του πυριτίου και η στήλη εκπλένεται με αιθέρα. Τα συνενωμένα αιθερικά διηθήματα συμπυκνώνονται μέχρι μικρού όγκου, στο υπόλειμμα προστίθενται άλλα 50 ml άνυδρου αιθέρα και 20 ml n-πεντανίου και το κατέργασμα επαναδιηθείται μέσω δεύτερης βραχείας στήλης διοξειδίου του πυριτίου. Με εξάτμιση του διηθήματος λαμβάνονται 1.44 g στερεού προϊόντος **3**, το οποίο χρησιμοποιείται χωρίς περαιτέρω καθαρισμό στο επόμενο στάδιο (απόδοση 72%). Σ.τ.: 131-134°C.

N'-(1-(Τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκανο)μεθυλενο)-4-πυριδινοκαρβοϋδραζίδιο (**4**)



Σε αναδευόμενο διάλυμα της αλδεΐδης **3** (0.6 g, 3.64 mmol) σε MeOH (15 ml) προστίθεται το ισονιαζίδιο (0.5 g, 3.64 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται (reflux) για 3 h. Ακολούθως, ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό, στο μίγμα της αντίδρασης προστίθεται νερό και διηθείται. Το ίζημα εκπλένεται με νερό, και υποβάλλεται σε βαθμιδωτή χρωματογραφία με διαλύτη έκλουσης EtOAc 3 έως 6% MeOH σε EtOH. Λαμβάνονται 620 mg λευκού στερεού προϊόντος **4** (απόδοση 57%). Σ.τ.: 233-235 °C (CHCl₃-Et₂O).

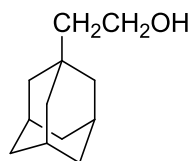
Από τη μελέτη των φασμάτων NMR προκύπτει ότι πρόκειται για μίγμα διαμορφομερών με αναλογία A:B=E:Z=5:1.

Διαμορφομερές **A(E)**: $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 1.66-1.73 (m, 12H, 2,4,6,8,9,10- H_{ad}), 1.99 (s, 3H, 3,5,7- H_{ad}), 7.54 (s, 1H, CH=N), 7.74-7.75 (dd, $J = 6.0$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 2H, 3,5- H_{p}), 8.73-8.74 (dd, $J = 6.0$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 2H, 2,6- H_{p}), 11.55 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 27.4 (3,5,7- C_{ad}), 36.2 (4,6,10- C_{ad}), 36.6 (1- C_{ad}), 39.3 (2,8,9- C_{ad}), 121.5 (3,5- C_{p}), 140.8 (4- C_{p}), 150.2 (2,6- C_{p}), 160.3 (C=N), 161.4 (C=O).

Διαμορφομερές **B(Z)**: $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 1.57-1.61 (m, 12H, 2,4,6,8,9,10- H_{ad}), 1.93 (s, 3H, 3,5,7- H_{ad}), 7.19 (s, 1H, CH=N), 7.60-7.61 (d, $J = 6$ Hz, 2H, 3,5- H_{p}), 8.66-8.67 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H, 2,6- H_{p}), 11.50 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 27.4 (3,5,7- C_{ad}), 36.2 (4,6,10- C_{ad}), 36.6 (1- C_{ad}), 39.3 (2,8,9- C_{ad}), 123.3 (3,5- C_{p}), 140.8 (4- C_{p}), 149.4 (2,6- C_{p}), 155.7 (C=N), 161.4 (C=O).

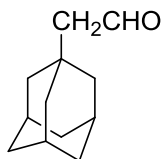
Υδροχλωρικό αλάτι: Σ.τ.: 297-299 °C ($\text{EtOH-Et}_2\text{O}$).

1-Τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκανοαιθανόλη (6)



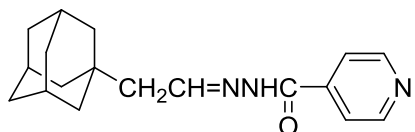
Σε αναδευόμενο εναιώρημα LiAlH_4 (3.0 g, 79 mmol) σε άνυδρο THF (120ml) προστίθεται στάγδην διάλυμα του 1-αδαμαντανοξικού οξέος (**5**) (4.5 g, 23 mmol) σε άνυδρο THF (30 ml). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 3 h και στη συνέχεια υδρολύεται υπό ψύξη με τη στάγδην προσθήκη αιθανόλης, νερού και διαλύματος NaOH 10%. Τα ανόργανα άλατα απομακρύνονται με διήθηση και πλένονται με θερμό THF. Από τα συνενωμένα διηθήματα-εκπλύματα το THF απομακρύνεται υπό κενό και στο υπόλειμμα προστίθεται νερό. Το λαμβανόμενο μίγμα εκχυλίζεται με αιθέρα, τα συνενωμένα αιθερικά εκχυλίσματα πλένονται με νερό, ξηραίνονται με Na_2SO_4 και εξατμίζονται. Λαμβάνονται 3.73 g στερεού προϊόντος **6**, το οποίο χρησιμοποιείται χωρίς περαιτέρω κάθαρση στο επόμενο στάδιο (απόδοση 89%). Σ.τ.: 67-69°C.

1-Τρικυκλο[3.3.1.1^{3,7}]δεκανοακεταλδεΰδη (7)



Σε αναδευόμενο διάλυμα χλωροχρωμικού πυριδινίου (3.45 g, 16 mmol) σε άνυδρο DCM (30 ml) προστίθεται άπαξ διάλυμα 1-αδαμαντανοαιθανόλης (2.0 g, 12.3 mmol) σε άνυδρο DCM (10 ml) και το μίγμα αναδύεται υπό ατμόσφαιρα Αργού και σε θερμοκρασία δωματίου για 1.5 h. Στο μίγμα της αντίδρασης προστίθεται αιθέρας (50 ml) και μετά την κατεργασία το μίγμα διηθείται μέσω βραχείας στήλης διοξειδίου του πυριτίου και η στήλη εκπλένεται με αιθέρα. Τα συνενωμένα αιθερικά διηθήματα συμπυκνώνονται μέχρι μικρού όγκου, στο υπόλειμμα προστίθενται άλλα 50 ml άνυδρου αιθέρα και 20 ml *n*-πεντανίου και το κατέργασμα επαναδιηθείται μέσω δεύτερης βραχείας στήλης διοξειδίου του πυριτίου. Με εξάτμιση του διηθήματος λαμβάνονται 1.44 g στερεού προϊόντος **7**, το οποίο χρησιμοποιείται χωρίς περαιτέρω καθαρισμό στο επόμενο στάδιο (απόδοση 72%). Σ.τ.: 131-134°C.

N'-((1-Τρικυκλο[3.3.1.1^{3,7}]δεκαν)αιθυλιδENO)-4-πυριδινοκαρβοϋδραζίδιο (8)



Σε αναδευόμενο διάλυμα της 1-αδαμαντανοακεταλδεΰδης (**7**) (0.65 g, 3.64 mmol) σε μεθανόλη (15 ml), προστίθεται το ισονιαζίδιο (0.5 g, 3.64 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται (reflux) για 3 h. Ακολούθως, εξατμίζεται ο διαλύτης, οπότε προκύπτει αφρώδες στερεό, το οποίο κατεργάζεται με αιθέρα για να κρυσταλλώσει. Πραγματοποιείται βαθμιδωτή χρωματογραφία με διαλύτη έκλουσης EtOAc και στη συνέχεια με μίγμα EtOAc και MeOH (3-6%). Λαμβάνονται 930 mg του λευκού στερεού προϊόντος **8** (απόδοση 86%). Σ.τ.: 162-164 °C (CHCl₃-Et₂O).

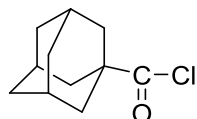
Από τη μελέτη των φασμάτων NMR προκύπτει ότι πρόκειται για μίγμα διαμορφομερών με αναλογία A:B=E:Z=6:1.

Διαμορφομερές **A(E)**: ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.41 (s, 3H, 3,5,7-H_{ad}), 1.47-1.50 (m, 6H, 4,6,10-H_{ad}), 1.59-1.62 (m, 6H, 2,8,9-H_{ad}), 1.99-2.00 (d, 2H, *J* = 6.3 Hz, α-H), 7.63-7.64 (m, 1H, CH=N), 7.67-7.68 (d, 2H, *J* = 5.2 Hz, 3,5-H_p), 8.61-8.62 (m, 2H, 2,6-H_p), 10.45 (s, 1H, NH); ¹³C-

NMR (50 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 28.6 (3,5,7-C_{ad}), 33.5 (1-C_{ad}), 36.8 (4,6,10-C_{ad}), 42.7 (2,8,9-C_{ad}), 46.6 (α-C), 121.5 (3,5-C_p), 140.6 (4-C_p), 150.5 (2,6-C_p), 153.2 (C=N), 162.5 (C=O).

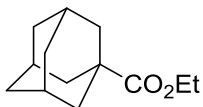
Διαμορφομερές **B(Z)**: ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.41 (s, 3H, 3,5,7-H_{ad}), 1.47-1.50 (m, 6H, 4,6,10-H_{ad}), 1.59-1.62 (m, 6H, 2,8,9-H_{ad}), 1.84 (s, 2H, α-H), 7.26-7.29 (t, 1H, *J* = 6.2 Hz, CH=N), 7.71-7.72 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, 3,5-H_p), 8.61-8.62 (m, 2H, 2,6-H_p), 9.54 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 28.5 (3,5,7-C_{ad}), 33.5 (1-C_{ad}), 36.7 (4,6,10-C_{ad}), 42.5 (2,8,9-C_{ad}), 46.3 (α-C), 123.8 (3,5-C_p), 140.6 (4-C_p), 149.7 (2,6-C_p), 153.2 (C=N), 162.5 (C=O).

1-Τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκανοκαρβονυλοχλωρίδιο (9)



Μίγμα του 1-αδαμαντανοκαρβοξυλικού οξέος (**1**) (19 g, 0.11 mol) και θειονυλοχλωριδίου (20 g, 13 ml), προσφάτως απεσταγμένου υπεράνω κινολίνης, φέρεται σε ήπιο βρασμό για 1 h. Στη συνέχεια απομακρύνεται υπό κενό η περίσσεια του θειονυλοχλωριδίου και τα τελευταία ίχνη με τη βοήθεια άνυδρου βενζολίου. Μετά από ψύξη το υπόλειμμα κρυσταλλώνει και ανακρυσταλλώνεται από βενζόλιο. Λαμβάνονται 20.4 g καρβονυλοχλωριδίου. (απόδοση 98%). Σ.τ.: 54-56°C.

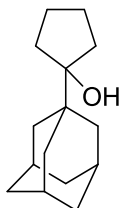
1-Τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκανοκαρβοξυλικός αιθυλεστέρας (10)



Το καρβονυλοχλωρίδιο **9** (14 g, 0.07 mol) προστίθεται σε απόλυτη αιθανόλη (50 ml) και το διάλυμα φέρεται σε ήπιο βρασμό υπό ανάδευση για 90 min. Στη συνέχεια η αιθανόλη εξατμίζεται υπό κενό και στο υπόλειμμα προστίθεται νερό. Το κατέργασμα εκχυλίζεται με αιθέρα και τα συνενωμένα αιθερικά εκχυλίσματα πλένονται με νερό, διάλυμα Na₂CO₃ 10%, και ξηραίνονται με Na₂SO₄. Ακολουθεί απομάκρυνση του διαλύτη υπό κενό και το υπόλειμμα

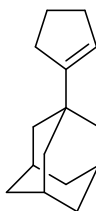
υποβάλλεται σε κλασματική απόσταξη, οπότε λαμβάνονται 13 g άχρωμου υγρού (απόδοση 89%). Σ.ζ.: 146-148 °C/21 mm.

1-(1-Τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκυλο)κυκλοπεντανόλη (11)



Σε αναδευόμενο διάλυμα 1,4-δισ(βρωμομαγνησιο)βουτανίου παρασκευασμένου με το συνήθη τρόπο^[154] από το 1,4-διβρωμοβουτάνιο (12.5 g, 0.06 mol) και τορνεύματα μαγνησίου (3.12 g, 0.13 Gratom) σε άνυδρο THF (100 ml), προστίθεται στάγδην και υπό ατμόσφαιρα Αργού ο αιθυλεστέρας **10** (10.4 g, 0.05 mol) σε άνυδρο THF (60 ml). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 18 h και υδρολύεται υπό ψύξη με κορεσμένο διάλυμα NH₄Cl. Παραλαμβάνεται η οργανική στιβάδα και η υδατική εκχυλίζεται με αιθέρα. Οι συνενωμένες οργανικές φάσεις πλένονται με νερό, ξηραίνονται υπεράνω Na₂SO₄ και εξατμίζονται. Το υπόλειμμα κατεργάζεται με *n*-πεντάνιο, αφήνεται υπό ψύξη για 18 h και το στερεό που σχηματίζεται παραλαμβάνεται με διήθηση (απόδοση 7.9 g λευκού προϊόντος 72%). Σ.τ.: 94-96 °C. IR: ν (OH): 3350-3470 cm⁻¹; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 1.28 (complex m, 23H, 2,3,4,5,6,7,8,9,10-H_{ad}, 2,3,4,5-H_c), 5.20 (br. s, 1H, OH).

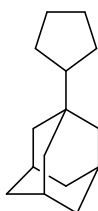
1-(1-Κυκλοπεντενυλο)τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκάνιο (12)^[155]



Μίγμα της αλκοόλης **11** (10.8 g, 0.05 mol) και τριχλωροοξικού οξέος (8.0 g, 0.05 mol) σε CHCl₃ (100 ml) φέρεται σε βρασμό για 3 h και στη συνέχεια αποχύνεται σε μίγμα υδατικού

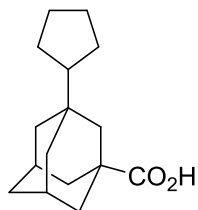
διαλύματος αμμωνίας 25% (100 ml) και πάγου (100 g). Η υδατική στιβάδα εκχυλίζεται με CHCl_3 και οι συνενωμένες οργανικές φάσεις πλένονται με νερό, ξηραίνονται υπεράνω Na_2SO_4 και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το υπόλειμμα υποβάλλεται σε απόσταξη, οπότε λαμβάνονται 8.4 g αλκενίου υπό ελαιώδη μορφή (απόδοση 85%). Σ.ζ.: 90-92°C/0.03 mm. Σ.τ.: 38-39 °C (MeOH).

1-Κυκλοπεντυλοτρικυκλο[3.3.1.1.3,7]δεκάνιο (13)



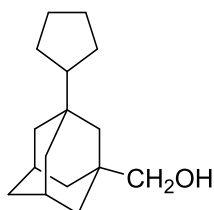
Σε διάλυμα της ολεφίνης **12** (6.1 g, 0.03 mol) σε απόλυτη αιθανόλη (80 ml), προστίθεται οξείδιο του λευκοχρύσου κατά Adams (100 mg) και το μίγμα υποβάλλεται σε καταλυτική υδρογόνωση σε θερμοκρασία δωματίου υπό πίεση 45 psi για 3 h. Στη συνέχεια, ο καταλύτης απομακρύνεται με διήθηση και το διήθημα εξατμίζεται. Το υπόλειμμα υποβάλλεται σε απόσταξη, οπότε προκύπτει ο υδρογονάνθρακας **13** (6.1 g) υπό ελαιώδη μορφή (απόδοση σχεδόν ποσοτική). Σ.ζ.: 95 °C/0.03 mm. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 1.12-1.75 (m, 21H, 2,4,6,8,9,10- H_{ad} , 1,2,3,4,5- H_{C}), 1.85-2.00 (m, 3H, 3,5,7- H_{ad}); $^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 25.3 (3,4- C_{C}), 25.8 (2,5- C_{C}), 28.8 (3,5,7- C), 33.9 (1- C_{ad}), 37.5 (2,8,9- C_{ad}), 4.5 (4,6,10- C_{ad}), 51.6 (1- C_{C}).

3-Κυκλοπεντυλο-1-τρικυκλο[3.3.1.1.3,7]δεκανοκαρβοξυλικό οξύ (14)



Σε αναδευόμενο διάλυμα του 1-κυκλοπεντυλοαδαμαντανίου (**13**) (7.8 g, 0.04 mol) σε πυκνό θειικό οξύ (124 ml), προστίθεται στάγδην μίγμα μυρμηκικού οξέος (27 g) και *tert*-βουτανόλης (15 g) σε διάστημα 6 h. Η ανάδευση συνεχίζεται για επιπλέον 15 h σε θερμοκρασία δωματίου. Το μίγμα της αντίδρασης αποχύνεται σε παγόνερο και εκχυλίζεται με αιθέρα. Οι αιθερικές στιβάδες πλένονται με νερό και ξηραίνονται υπεράνω Na₂SO₄. Μετά την απομάκρυνση του διαλύτη, το λαμβανόμενο άμορφο καρβοξυλικό οξύ **14** διαλύεται σε τετραχλωράνθρακα (150 ml) και κατεργάζεται με υδατική αμμωνία 25% (45 ml). Το αμμωνιακό άλας που καθιζάνει παραλαμβάνεται με διήθηση, πλένεται με ψυχρή ακετόνη (10 ml) και απαιωρείται σε διάλυμα υδροχλωρικού οξέος (18%). Το σχηματιζόμενο στερεό διηθείται, πλένεται με νερό και ξηραίνεται. Λαμβάνονται 7.0 g καθαρού οξέος **14** (απόδοση 75%). Σ.τ.: 134-136 °C (MeOH-H₂O). IR (nujol), ν(C=O): 1680 cm⁻¹; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 1.45-1.95 (m, 21H, 2,4,6,8,9,10-H_{ad}, 1,2,3,4,5-H_C), 2.02-2.25 (m, 2H, 5,7-H_{ad}), 10.80 (br. s, 1H CO₂H); ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 25.4 (3,4-C_C), 25.6 (2,5-C_C), 28.2 (5,7-C_{ad}), 34.3 (3-C_{ad}), 36.2 (6-C_{ad}), 38.4 (4,10-C_{ad}), 39.3 (8,9-C_{ad}), 41.2 (1-C_{ad}), 41.5 (2-C_{ad}), 51.1 (1-C_C), 183.7 (CO₂H).

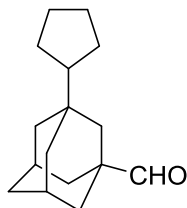
3-Κυκλοπεντυλο-1-τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκανομεθανόλη (**15**)



Σε αναδευόμενο εναιώρημα LiAlH₄ (4.0 g, 0.11 mol) σε άνυδρο THF (150 ml) προστίθεται στάγδην διάλυμα καρβοξυλικού οξέος **14** (6.3 g, 0.03 mol) σε άνυδρο THF (40 ml). Το μίγμα της αντίδρασης αναδύεται για 3 h σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια υδρολύεται υπό ψύξη με τη στάγδην προσθήκη αιθανόλης, νερού και διαλύματος NaOH (10%). Τα άλατα του αργιλίου και του λιθίου απομακρύνονται με διήθηση και το διήθημα εξατμίζεται υπό κενό. Στο υπόλειμμα προστίθεται νερό και το μίγμα εκχυλίζεται με αιθέρα. Οι συνενωμένες αιθερικές στιβάδες πλένονται με νερό, ξηραίνονται υπεράνω Na₂SO₄ και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Λαμβάνονται 6.1 g της αλκοόλης **15** υπό ελαιώδη μορφή. (απόδοση 96%). Σ.ζ.: 115-117 °C/0.03 mm. IR (film), ν(OH): 3350-3200 cm⁻¹; ¹H-NMR (50 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 1.12-1.58 (m, 22H, 2,4,6,8,9,10-H_{ad}, 1,2,3,4,5-H_C, OH), 1.92-2.02 (m, 2H, 5,7-H_{ad}), 3.12 (s, 2H, α-H); ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 25.6 (3,4-C_C), 25.8 (2,5-C_C), 28.4 (5,7-C_{ad}), 34.5 (3-C_{ad}), 35.3 (1-C_{ad}),

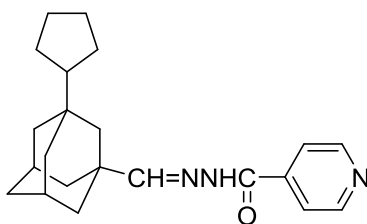
37.1 (6-C_{ad}), 39.1 (4,10-C_{ad}), 40.2 (8,9-C_{ad}), 42.1 (2-C_{ad}), 51.4 (1-C_C), 73.9 (α-C). Αναλ. Υπολ. για C₁₆H₂₆O (%): C, 81.99; H, 11.18; ευρ.: C, 81.72, H, 11.23.

3-Κυκλοπεντυλο-1-τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκανοκαρβοξαλδεΰδη (16)



Σε αναδευόμενο διάλυμα χλωροχρωμικού πυριδινίου (5.5 g, 20 mmol), σε άνυδρο DCM (35 ml) προστίθεται άπαξ διάλυμα της αλκοόλης **15** (4.0 g, 17 mmol) σε άνυδρο DCM (10 ml). Το μίγμα της αντίδρασης αναδευείται υπό ατμόσφαιρα Αργού, σε θερμοκρασία δωματίου για 1.5 h. Στη συνέχεια προστίθεται αιθέρας (100 ml) και μετά από κατεργασία το μίγμα διηθείται μέσω βραχείας στήλης διοξειδίου του πυριτίου. Το διήθημα συμπυκνώνεται μέχρι μικρού όγκου και στο συμπύκνωμα προστίθεται μίγμα αιθέρα (100 ml)-*n*-πεντανίου (50 ml). Το προκύπτον διάλυμα διηθείται μέσω δεύτερης βραχείας στήλης διοξειδίου του πυριτίου και το διήθημα εξατμίζεται υπό κενό. Λαμβάνονται 3.2 g (απόδοση 88%) της καρβοξαλδεΰδης **16** υπό μορφή ανοιχτοκίτρινου ελαιώδους υγρού, το οποίο χρησιμοποιείται χωρίς περαιτέρω κάθαρση για το επόμενο στάδιο. IR (film), $\nu(\text{C}=\text{O})$: 1722 cm⁻¹; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 0.74-1.05 (br. m, 4H, 3,4-H_C), 1.18-1.35 (br. m, 4H, 2,5-H_C), 1.39-1.72 (dm, 13H, 2,4,8,9,10-H, 1-H_C), 2.13 (br. s, 2H, 5,7-H_{ad}), 9.34 (s, 1H, CH=O); ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 25.5 (3,4-C_C), 25.8 (2,5-C_C), 28.0 (5,7-C_{ad}), 34.1 (3-C_{ad}), 35.9 (4,10-C_{ad}), 36.5 (6-C_{ad}), 37.1 (1-C_{ad}), 38.8 (2-C_{ad}), 39.7 (8,9-C_{ad}), 51.3 (1-C_C), 206.2 (C=O).

N'-(3-κυκλοπεντυλο-1-τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκανο)μεθυλενο)-4-πυριδινοκαρβουϊδραζίδιο (17)



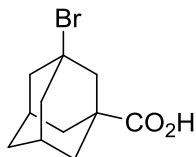
Σε αναδευόμενο διάλυμα της αλδεΐδης **16** (846 mg, 3.64 mmol) σε MeOH (15 ml), προστίθεται το ισονιαζίδιο (500 mg, 3.64 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται (reflux) για 3 h. Ακολούθως, εξατμίζεται ο διαλύτης, προστίθεται νερό στο μίγμα της αντίδρασης και το προκύπτον μίγμα διηθείται. Το ίζημα πλένεται με νερό και ξηραίνεται υπό κενό παρουσία P₂O₅. Λαμβάνονται 880 mg (απόδοση 69%). Σ.τ.: 202-204 °C (CHCl₃-Et₂O);

Από τη μελέτη των φασμάτων NMR προκύπτει ότι πρόκειται για μίγμα διαμορφομερών με αναλογία A:B=E:Z=8:1.

Διαμορφομερές **A(E)**: ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.24-1.26 (m, 2H, 3_{eq},4_{eq}-H_C), 1.39-1.52 (m, 7H, 1,2,5,3_{ax},4_{ax}-H_C), 1.55-1.64 (m, 6H, 4,6,10-H_{ad}), 2.03 (s, 2H, 5,7-H_{ad}), 7.53 (s, 1H, CH=N), 7.71-7.72 (m, 2H, 3,5-H_p), 8.70-8.72 (d, *J* = 4.4 Hz, 2H, 2,6-H_p), 11.60 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 25.5 (3,4-C_C), 25.8 (2,5-C_C), 28.2 (5,7-C_{ad}), 34.3 (3-C_{ad}), 36.4 (6-C_{ad}), 37.8 (1-C_{ad}), 39.5 (4-C_{ad}), 39.8 (10-C_{ad}), 39.9 (9-C_{ad}), 40.0 (8-C_{ad}), 42.7 (2-C_{ad}), 51.1 (1-C_C), 122.1 (3,5-C_p), 141.2 (4-C_p), 150.7 (2,6-C_p), 161.5 (C=N), 162.4 (C=O).

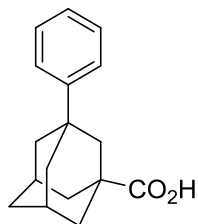
Διαμορφομερές **B(Z)**: ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.24-1.26 (m, 2H, 3_{eq},4_{eq}-H_C), 1.39-1.52 (m, 7H, 1,2,5,3_{ax},4_{ax}-H_C), 1.55-1.64 (m, 6H, 4,6,10-H_{ad}), 1.96 (s, 2H, 5,7-H_{ad}), 7.18 (s, 1H, CH=N), 7.59-7.60 (d, *J* = 4.2 Hz, 2H, 3,5-H_p), 8.63-8.64 (d, *J* = 4.4 Hz, 2H, 2,6-H_p), 11.51 (s, 1H, NH). ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 25.5 (3,4-C_C), 25.8 (2,5-C_C), 28.2 (5,7-C_{ad}), 34.3 (3-C_{ad}), 36.4 (6-C_{ad}), 37.8 (1-C_{ad}), 39.5 (4-C_{ad}), 39.8 (10-C_{ad}), 39.9 (9-C_{ad}), 40.0 (8-C_{ad}), 42.7 (2-C_{ad}), 51.1 (1-C_C), 123.9 (3,5-C_p), 141.2 (4-C_p), 149.7 (2,6-C_p), 156.7 (C=N), 162.4 (C=O).

3-Βρωμο-1-τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκανοκαρβοξυλικό οξύ (**18**) [158]



Σε μίγμα βρωμίου (31.19 g, 0.19 mol) και τριχλωριούχου αργιλίου (3.5 g, 0.026 mol) προστίθεται υπό ανάδευση στους -5 °C και σε διάστημα 2-3 h, το 1-αδαμαντανοκαρβοξυλικό οξύ **1** (3 g, 0.017 mol). Μετά το τέλος της προσθήκης το μίγμα της αντίδρασης παραμένει στους -5 με 0 °C για 5 ημέρες και στη συνέχεια αναδεύεται για 5 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Κατόπιν αποχύνεται σε 100-150 g παγόνερου και στο προκύπτον κατέργασμα η περίσσεια του βρωμίου εξουδετερώνεται με προσθήκη μεταδιθειώδους νατρίου. Το μίγμα εκχυλίζεται με CHCl₃ και από τις συνενωμένες χλωροφορμικές στιβάδες το καρβοξυλικό οξύ **18** παραλαμβάνεται με διάλυμα NaOH 4% (3x50 ml). Οι συνενωμένες αλκαλικές στιβάδες εκπλένονται με αιθέρα και οξινίζονται υπό ψύξη με διάλυμα HCl (18%). Μετά από παραμονή στο ψυγείο για 3 h το αποβληθέν καρβοξυλικό οξύ **18** παραλαμβάνεται με διήθηση και ξηραίνεται. Λαμβάνονται 3.43 g του επιθυμητού προϊόντος (απόδοση 78%). Σ.τ.: 142-143 °C.

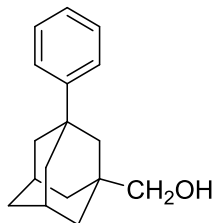
3-Φαινυλο-1-τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκανοκαρβοξυλικό οξύ (**19**) [158]



Σε αναδευόμενο εναιώρημα τριχλωριούχου αργιλίου (6.1 g, 45 mmol) σε άνυδρο βενζόλιο (80 ml) προστίθεται στάγδην στους -10 °C διάλυμα του 3-βρωμο-1-αδαμαντανοκαρβοξυλικού οξέος **18** (3.43 g, 13 mmol) σε άνυδρο βενζόλιο (46 ml). Η ανάδευση συνεχίζεται στους -10 °C για 1 h και στη συνέχεια σε θερμοκρασία δωματίου για 18 h. Ακολουθεί ανάδευση στους 50 °C για 2 h και μετά από ψύξη το μίγμα της αντίδρασης αποχύνεται σε μίγμα 150 g παγόνερου και 150 ml υδροχλωρικού οξέος (37%). Παραλαμβάνεται η βενζολική στιβάδα και η υδατική φάση εκχυλίζεται με βενζόλιο. Οι συνενωμένες βενζολικές στιβάδες πλένονται με νερό, ξηραίνονται

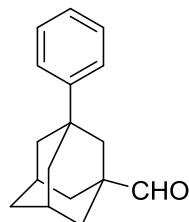
υπεράνω Na_2SO_4 και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Λαμβάνονται 3.33 g λευκοίτρινου στερεού (απόδοση σχεδόν ποσοτική). Σ.τ.: 163-164 °C.

3-Φαινυλο-1-τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκανομεθανόλη (20)



Η αλκοόλη **20** παρασκευάζεται με αναγωγή του καρβοξυλικού οξέος **19** με LiAlH_4 , ακολουθώντας την ίδια διαδικασία, όπως κατά την παρασκευή της αλκοόλης **15** από το καρβοξυλικό οξύ **14** (απόδοση σχεδόν ποσοτική). Σ.τ.: 67-68 °C; IR (nujol), $\nu(\text{OH})$: 3325 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 1.42-1.50 (m, 5H, 4,10- H_{ad} , OH), 1.59 (br. s, 2H, 2-H), 1.62-1.65 (complex m, 2H, 6- H_{ad}), 2.13 (~s, 2H, 5,7- H_{ad}), 3.21 (s, 2H, α -H), 7.08-7.09 (m, 1H, 4- H_{ar}), 7.11-7.39 (m, 4H, 2,3,5,6- H_{ar}); $^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 28.9 (5,7- C_{ad}), 35.6 (3- C_{ad}), 36.3 (6- C_{ad}), 36.6 (1- C_{ad}), 38.3 (4,10- C_{ad}), 42.7 (8,9- C_{ad}), 44.7 (2- C_{ad}), 73.5 (α -C), 124.8 (3,5 C_{ar}), 125.6 (4- C_{ar}), 128.1 (2,6- C_{ar}), 156.6 (1- C_{ar}); Αναλ. Υπολ. για $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}$ (%): C, 84.25; H, 9.15, ευρ.: (%) C, 84.35; H, 9.26.

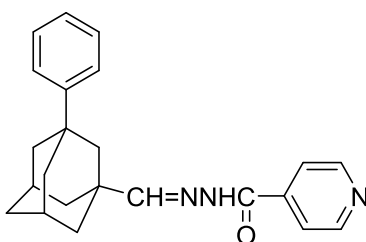
3-Φαινυλο-1-τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκανοκαρβοξaldeύδη (21)



Η aldeύδη **21** παρασκευάζεται με οξείδωση της αλκοόλης **20** με τη βοήθεια χλωροχρωμικού πυριδινίου, με παρόμοιο τρόπο, όπως και για την παρασκευή της aldeύδης **16**. Απόδοση 70% υποκίτρινου κρυσταλλικού στερεού, το οποίο χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο χωρίς

περαιτέρω καθαρισμό. Σ.τ.: 57-58 °C. IR (nujol), $\nu(\text{C}=\text{O})$: 1721 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 1.65-1.73 (m, 6H, 4,6,10- H_{ad}), 1.78-1.90 (m, 4H, 8,9- H_{ad}), 1.80 (br. s, 2H, 2- H_{ad}), 2.21-2.22 (m, 2H, 5,7- H_{ad}), 7.11-7.15 (m, 1H, 4- H_{ar}), 7.25-7.30 (m, 4H, 2,3,5,6- H_{ar}), 9.33 (s, 1H, $\text{CH}=\text{O}$); $^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 27.9 (5,7- C_{ad}), 35.2 (4,10- C_{ad}), 35.7 (6- C_{ad}), 36.0 (3- C_{ad}), 40.9 (2- C_{ad}), 41.9 (8,9- C_{ad}), 45.7 (1- C_{ad}), 124.6 (3,5- C_{ar}), 125.8 (4- C_{ar}), 128.1 (2,6- C_{ar}), 149.7 (1- C_{ar}), 205.1 ($\text{C}=\text{O}$).

***N'*-((3-φαινυλο-1-τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκανο)μεθυλενο)-4-πυριδινοκαρβουϋδραζίδιο (22)**



Σε αναδευόμενο διάλυμα της αλδεϋδης **21** (0.875 g, 3.64 mmol) σε MeOH (15 ml) προστίθεται το ισονιαζίδιο (0.5 g, 3.64 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 60 h. Σχηματίζεται ίζημα και το μίγμα της αντίδρασης διηθείται. Το ίζημα εκπλένεται με νερό και στη συνέχεια ξηραίνεται για 18 h υπό κενό, παρουσία P_2O_5 . Λαμβάνονται 803 mg (απόδοση 61%). Σ.τ.: 210-211 °C. (CHCl_3 / Et_2O);

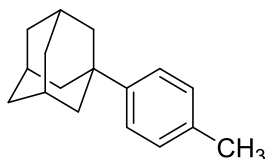
Από τη μελέτη των φασμάτων NMR προκύπτει ότι πρόκειται για μίγμα διαμορφομερών με αναλογία A:B=E:Z=2:3

Διαμορφομερές **A(E)**: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.64-1.87 (very complex m, 12H, 2,4,6,8,9,10- H_{ad}), 2.17 (s, 2H, 5,7- H_{ad}), 7.04 (s, 1H, $\text{CH}=\text{N}$), 7.13 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, 4- H_{ar}), 7.25 (s, 4H, 2,3,5,6- H_{ar}), 7.69-7.70 (d, $J = 4.7$ Hz, 2H, 3,5- H_{p}), 8.64-8.65 (d, $J = 4.9$ Hz, 2H, 2,6- H_{p}), 9.74 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 28.7 (5,7-C), 35.8 (4,10-C), 36.5 (6- C_{ad}), 38.2 (1- C_{ad}), 38.4 (3- C_{ad}), 39.0 (9- C_{ad}), 42.2 (8- C_{ad}), 45.3 (2- C_{ad}), 123.9 (3,5- C_{p}), 124.9 (3,5- C_{ar}), 126.1 (4- C_{ar}), 128.4 (2,6- C_{ar}), 140.8 (4- C_{p}), 149.7 (1- C_{ar}), 149.9 (2,6- C_{p}), 156.1 ($\text{C}=\text{N}$), 162.4 ($\text{C}=\text{O}$).

Διαμορφομερές **B(Z)**: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.64-1.87 (very complex m, 12H, 2,4,6,8,9,10- H_{ad}), 2.17 (s, 2H, 5,7- H_{ad}), 7.13 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, 4- H_{ar}), 7.25 (s, 4H, 2,3,5,6- H_{ar}),

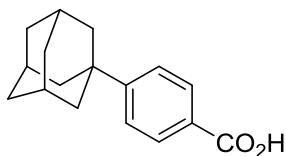
7.42 (s, 1H, CH=N), 7.57-7.58 (d, $J = 4.7$ Hz, 2H, 3,5- H_p), 8.61-8.62 (d, $J = 4.9$ Hz, 2H, 2,6- H_p), 9.64 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 28.7 (5,7- C_{ad}), 35.8 (4,10- C_{ad}), 36.5 (6- C_{ad}), 38.2 (1- C_{ad}), 38.4 (3- C_{ad}), 39.0 (9- C_{ad}), 42.2 (8- C_{ad}), 45.3 (2- C_{ad}), 121.3 (3,5- C_p), 124.9 (3,5- C_{ar}), 126.1 (4- C_{ar}), 128.4 (2,6- C_{ar}), 140.8 (4- C_p), 149.7 (1- C_{ar}), 150.6 (2,6- C_p), 161.1 (C=N), 162.4 (C=O).

1-(4-Μεθυλοφαινυλο)τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκάνιο (24)



Σε αναδευόμενο διάλυμα άνυδρου τολουολίου (1.8 g, 19.54 mmol) και τριφθοροξικού οξέος (48 ml) προστίθεται η 1-αδαμαντανόλη (**23**) (2.4 g, 15.76 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 18 h σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια αποχύνεται σε 200 g παγόνερου. Το σχηματιζόμενο ίζημα παραλαμβάνεται με διήθηση, πλένεται με νερό, διάλυμα Na_2CO_3 , με νερό εκ νέου και ξηραίνεται υπό κενό παρουσία P_2O_5 . Λαμβάνονται 3.31 g λευκού κρυσταλλικού προϊόντος **24** (απόδοση: 93.62 %). Σ.τ.: 87-89 °C (*n*-πεντάνιο); ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 1.76-1.80 (m, 6H, 4, 6, 10- H_{ad}), 1.93 (s, 6H, 2,8,9- H_{ad}), 2.12 (s, 3H, 3,5,7- H_{ad}), 3.35 (s, 3H, CH_3), 7.16-7.18 (d, 2H, AA'BB', $J_{AB} = J_{A'B'} \approx 8.2$ Hz, $J_{AA'} = J_{BB'} \approx 0$ Hz, 2,6- H_{ar}); ^{13}C -NMR (50 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 21.02 (CH_3), 29.15 (3,5,7- C_{ad}), 35.97 (1- C_{ad}), 36.99 (4,6,10- C_{ad}), 43.42 (2,8,9- C_{ad}), 124.86 (2,6- C_{ar}), 128.95 (3,5- C_{ar}), 135.03 (4- C_{ar}), 148.61 (1- C_{ar}).

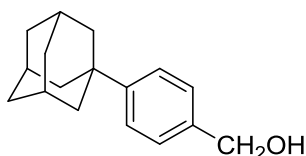
4-(1-Τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκυλο)βενζοϊκό οξύ (25)



Σε αναδευόμενο διάλυμα KMnO_4 (8.38 g, 53.01 mmol) σε μίγμα πυριδίνης-νερού (40/28 ml) προστίθεται ο υδρογονάνθρακας **24** (2.0 g, 8.8 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται αρχικά σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min και στη συνέχεια θερμαίνεται στους 95-100 °C για 1.5 h. Το αναδευόμενο μίγμα οξινίζεται υπό ψύξη μέχρι ισχυρώς όξινης αντίδρασης με τη στάγδην προσθήκη διαλύματος HCl (15%). Στο μίγμα προστίθεται οξικός αιθυλεστέρας (100

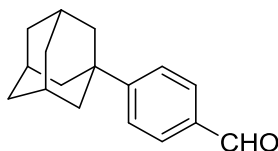
ml) και η ανάδευση συνεχίζεται για 15 min. Ο σχηματιζόμενος πυρολουσίτης απομακρύνεται με διήθηση και το διήθημα φέρεται σε διαχωριστική χοάνη και παραλαμβάνεται η οργανική στιβάδα. Ο πυρολουσίτης κατεργάζεται με οξικό αιθυλεστέρα (100 ml) και διηθείται. Το διήθημα μεταφέρεται στη διαχωριστική χοάνη, που περιέχει τη μητρική υδατική στιβάδα και το μίγμα ανακινείται, οπότε παραλαμβάνεται η οργανική στιβάδα. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται τρεις φορές και οι συνενώμενες οργανικές φάσεις πλένονται με διάλυμα HCl (10%) και νερό, ξηραίνονται υπεράνω Na₂SO₄ και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το υπόλειμμα κατεργάζεται με *n*-πεντάνιο (20 ml) και το στερεό παραλαμβάνεται με διήθηση. Λαμβάνονται 2.02 g στερεού 4-(1-αδαμαντυλο)βενζοϊκού οξέος (**25**), το οποίο χρησιμοποιείται χωρίς περαιτέρω καθαρισμό για την παρασκευή της αλκοόλης **26**.

4-(1-Τρικυκλο[3.3.1.1.3,7]δεκυλο)βενζολομεθανόλη (**26**)



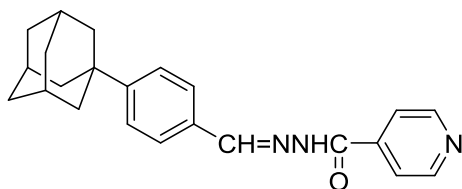
Σε αναδευόμενο εναιώρημα LiAlH₄ (391 mg, 10.3 mmol) σε άνυδρο THF (40 ml) προστίθεται στάγδην διάλυμα του αδαμαντανοκαρβοξυλικού οξέος **25** (800 mg, 3.12 mmol) σε άνυδρο THF (10 ml). Το μίγμα της αντίδρασης αναδύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 3 h και στη συνέχεια υδρολύεται υπό ψύξη με τη στάγδην προσθήκη αιθανόλης, νερού και διαλύματος NaOH (10%). Τα ανόργανα άλατα απομακρύνονται με διήθηση και πλένονται με θερμό THF. Από τα συνενωμένα διηθήματα-εκπλύματα το THF απομακρύνεται υπό κενό και στο υπόλειμμα προστίθεται νερό. Το λαμβανόμενο μίγμα εκχυλίζεται με EtOAc, τα συνενωμένα οργανικά εκχυλίσματα πλένονται με νερό, ξηραίνονται υπεράνω Na₂SO₄ και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Λαμβάνονται 750 mg στερεού προϊόντος, το οποίο καθαρίζεται με βαθμιδωτή χρωματογραφία στήλης και διαλύτη έκλουσης *n*-hexanes: Et₂O. Μέχρι 10% Et₂O σε *n*-hexanes εκλούεται το 4-τολυλο-αδαμαντάνιο (μη αντιδράσαν) και στη συνέχεια 360 mg της επιθυμητής αλκοόλης **26** (απόδοση 48%). Ακολούθως, με έκλυση με Et₂O λαμβάνονται και 350 mg της (4-(3-υδροξυαδαμανταν-1-υλο)φαινυλο)μεθανόλης.

4-(1-Τρικυκλο[3.3.1.1.3,7]δεκυλο)βενζολοκαρβοξαλδεΰδη (**27**) [159]



Σε αναδευόμενο διάλυμα χλωροχρωμικού πυριδινίου (1.15 g, 5.35 mmol) σε άνυδρο DCM (15 ml) προστίθεται άπαξ διάλυμα της 1-αδαμαντανομεθανόλης **26** (360 mg, 1.49 mmol) σε άνυδρο DCM (5 ml) και το μίγμα αναδεύεται υπό ατμόσφαιρα Αργού σε θερμοκρασία δωματίου για 1.5 h. Στο μίγμα της αντίδρασης προστίθεται αιθέρας (50 ml) και μετά από κατεργασία το μίγμα διηθείται μέσω βραχείας στήλης διοξειδίου του πυριτίου και η στήλη εκπλένεται με αιθέρα. Τα συνενωμένα αιθερικά διηθήματα συμπυκνώνονται μέχρι μικρού όγκου, στο υπόλειμμα προστίθενται άλλα 50 ml άνυδρου αιθέρα και *n*-πεντάνιο (20 ml) και το κατέργασμα επαναδιηθείται μέσω δεύτερης βραχείας στήλης διοξειδίου του πυριτίου. Μετά την εξάτμιση του διηθήματος λαμβάνονται 280 mg στερεού προϊόντος **27**, το οποίο χρησιμοποιείται χωρίς περαιτέρω καθαρισμό στο επόμενο στάδιο (απόδοση 78%).

N'-(4-(Τρικυκλο[3.3.1.1.3,7]δεκ-1-υλο)βενζυλιδενο)-4-πυριδινοκαρβουΰδραζίδιο (**28**)



Σε αναδευόμενο διάλυμα της αλδεΰδης **27** (280 mg, 1.16 mmol) σε μεθανόλη (10 ml) προστίθεται το ισονιαζίδιο (160 mg, 1.16 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 48 h, οπότε σχεδόν αμέσως φαίνεται να σχηματίζεται λευκό ίζημα. Στη συνέχεια, το μίγμα της αντίδρασης αραιώνεται με νερό και διηθείται, οπότε λαμβάνονται 336 mg του λευκού στερεού προϊόντος **28** (απόδοση 81%). Σ.τ: 240-242 °C (CHCl₃-Et₂O)

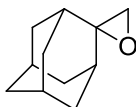
Από τη μελέτη των φασμάτων NMR προκύπτει ότι πρόκειται για μίγμα διαμορφομερών με αναλογία A:B=E:Z=10:1.

Διαμορφομερές **A(E)**: ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1.71-1.76 (m, 6H, 4,6,10-H_{ad}), 1.87-1.88 (m, 6H, 2,8,9-H_{ad}), 2.03-2.08 (m, 3H, 3,5,7-H_{ad}), 7.45-7.46 (d, 2H, *J*=8.6 Hz, 2,6-H_{ar}),

7.68-7.69 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, 3,5- H_{ar}), 7.81-7.83 (dd, $J = 6.0$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 2H, 3,5- H_p), 8.44 (s, 1H, CH=N), 8.77-8.78 (dd, $J = 6.0$ Hz, $J = 2.8$ Hz, 2H, 2,6- H_p), 12.00 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 28.3 (3,5,7- C_{ad}), 36.1 (4,6,10- C_{ad}), 40.1 (1- C_{ad}), 42.4 (2,8,9- C_{ad}), 121.5 (3,5- C_p), 125.3 (2,6- C_{ar}), 127.2 (3,5- C_{ar}), 131.4 (4- C_{ar}), 140.5 (4- C_p), 149.0 (C=N), 150.3 (2,6- C_p), 153.4 (1- C_{ar}), 161.5 (C=O).

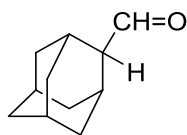
Διαμορφομερές **B(Z)**: 1H -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): δ (ppm): 1.71-1.76 (m, 6H, 4,6,10- H_{ad}), 1.82 (s, 6H, 2,8,9- H_{ad}), 2.03-2.08 (m, 3H, 3,5,7- H_{ad}), 7.36-7.38 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, 2,6- H_{ar}), 7.65-7.66 (d, $J = 5.1$, 2H, 3,5- H_{ar}), 8.08 (s, 1H, CH=N), 8.72-8.73 (dd, $J = 4.8$ Hz, 2H, 2,6- H_p), 12.00 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 28.3 (3,5,7- C_{ad}), 36.1 (4,6,10- C_{ad}), 40.1 (1- C_{ad}), 42.4 (2,8,9- C_{ad}), 123.2 (3,5- C_p), 125.3 (2,6- C_{ar}), 126.7 (3,5- C_{ar}), 131.4 (4- C_{ar}), 140.5 (4- C_p), 149.5 (C=N), 150.3 (2,6- C_p), 153.4 (1- C_{ar}), 161.5 (C=O).

Σπειρο[οξιρανο-2(2')-τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκάνιο] (30) ^[161]



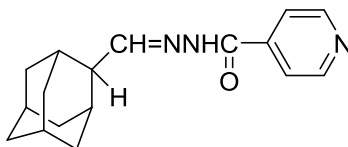
Σε εναιώρημα (852 mg, 35.5 mmol) νατριοϋδριδίου (1.42 g διασποράς 60% σε παραφινέλαιο, προπλυθέν με *n*-πεντάνιο) σε άνυδρο DMSO (60 ml) προστίθεται υπό ανάδευση και υπό ατμόσφαιρα Αργού, στερεό ιωδιούχο τριμεθυλοσουλφοξώνιο (7.5 g, 34.1 mmol) σε διάστημα 5 min. Το μίγμα αναδεύεται μέχρι να ολοκληρωθεί ο σχηματισμός του υλιδίου (παύση εκλύσεως υδρογόνου, περίπου 15 min) και στη συνέχεια προστίθεται η αδαμαντανόνη (**29**) (4.5 g, 30 mmol) εντός 5 min. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται στους 55 °C και υπό ατμόσφαιρα Αργού για 1.5 h και στη συνέχεια αποχύνεται σε μίγμα παγόνερου. Το κατέργασμα ανακινείται ελαφρά σε διαχωριστική χοάνη με *n*-εξάνιο. Η υδατική σιβάδα εκχυλίζεται στη συνέχεια με *n*-εξάνιο και οι συνενωμένες οργανικές φάσεις ξηραίνονται με Na_2SO_4 και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Λαμβάνονται 4.0 g του στερεού εποξειδίου **30** (απόδοση 87 %). Σ.τ.: 178-179 °C (μερική εξάχνωση).

2-Τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκανοκαρβοξαλδεΐδη (**31**) ^[162,163]



Σε διαχωριστική χοάνη φέρεται το εποξειδίο **30** (4.15 g, 25 mmol) διαλυμένο σε άνυδρο βενζόλιο (45-50 ml). Στο διάλυμα προστίθεται άπαξ αιθερικό τριφθοριούχο βόριο (2.5 g) και το μίγμα ανακινείται έντονα. Αφού αφεθεί σε ηρεμία για 1 min προστίθεται παγόψυχρο νερό (25 ml), το μίγμα ανακινείται, παραλαμβάνεται η βενζολική στιβάδα και η υδατική εκχυλίζεται με βενζόλιο (10 ml). Οι συνενωμένες βενζολικές φάσεις ξηραίνονται υπεράνω Na₂SO₄ και συμπυκνώνονται υπό κενό σε θερμοκρασία κάτω των 25 °C, μέχρις όγκου 30 ml. Το λαμβανόμενο βενζολικό διάλυμα της αλδεΐδης **31** χρησιμοποιείται χωρίς καθυστέρηση στο επόμενο στάδιο.

N'-(1-(Τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκανο)μεθυλενο)-4-πυριдиноκαρβοϋδραζίδιο (**32**)



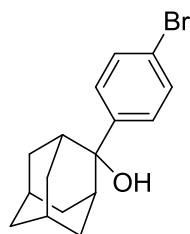
Σε αναδευόμενο διάλυμα της αλδεΐδης **31** (5.15 g, 31.36 mmol) σε MeOH (45-50 ml) προστίθεται το ισονιαζίδιο (4.3 g, 31.36 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται (reflux) για 6 h. Ακολούθως, παρατηρείται σχηματισμός κρυσταλλικού στερεού και αφού το μίγμα παραμείνει 18 h στην κατάψυξη, το ίζημα διηθείται και εκπλένεται με νερό. Στη συνέχεια, αυτό ξηραίνεται για 5 μέρες υπό κενό, παρουσία P₂O₅. Το διήθημα που προκύπτει εκχυλίζεται με CHCl₃ και η οργανική φάση που επίσης κρυσταλλώνει με τη βοήθεια άνυδρου Et₂O, διηθείται και παραλαμβάνεται εκ νέου στερεό. Συνολικά λαμβάνονται 4.425 g κρυσταλλικού στερεού (απόδοση 48%). Σ.τ: 174-176 °C (CHCl₃-Et₂O).

Από τη μελέτη των φασμάτων NMR προκύπτει ότι πρόκειται για μίγμα διαμορφομερών με αναλογία A:B=E:Z=7:5

Διαμορφομερές **A(E)**: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 1.59-1.60 (m, 2H, 4,9-eq- H_{ad}), 1.64-1.98 (very complex m, 10H, 4,9H-ax,5,6,7,8,10- H_{ad}), 2.29 (s, 2H, 1,3- H_{ad}), 2.59 (s, 1H, 2- H_{ad}), 7.89-7.90 (d, $J = 5.40$ Hz, 1H, CH=N), 7.64 (s, 2H, 3,5- H_p), 8.68 (s, 2H, 2,6- H_p), 9.93 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 27.7(7-Cad), 27.8 (5-Cad), 31.3 (1,3-Cad), 32.7 (4,9-Cad), 37.6 (6-Cad), 38.2 (8-Cad), 39.2 (10-Cad), 46.9 (2-Cad), 121.3, 121.5 (3,5-Cp), 140.8 (4-Cp), 150.5, 150.6 (2,6-Cp), 158.3 (C=N), 172.2 (C=O).

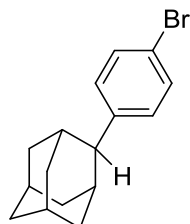
Διαμορφομερές **B(Z)**: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 1.59-1.60 (m, 2H, 4,9-eq- H_{ad}), 1.64-1.98 (very complex m, 10H, 4,9-ax,5,6,7,8,10- H_{ad}), 2.29 (s, 2H, 1,3- H_{ad}), 2.59 (s, 1H, 2- H_{ad}), 7.30 (s, 1H, CH=N), 7.69 (s, 2H, 3,5- H_p), 8.68 (s, 2H, 2,6- H_p), 9.77 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 27.5 (7-Cad), 27.6 (5-Cad), 30.7 (1,3-Cad), 32.1 (4,9-Cad), 36.2 (6-Cad), 38.1 (10-Cad), 38.2 (8-Cad), 46.9 (2-Cad) 123.7, 123.9 (3,5-Cp), 141.2 (4-Cp), 149.7 (2,6-Cp), 162.4 (C=N), 172.2 (C=O).

2-(π -Βρωμοφαινυλο)-2-τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκανόλη (**33**) [164]



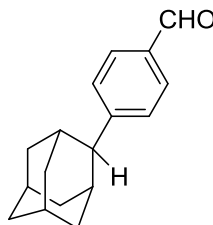
Διάλυμα της 2-αδαμαντανόνης (**29**) (3.0g, 20 mmol) σε άνυδρο THF (20 ml) προστίθεται στάγδην και υπό ατμόσφαιρα Αργού, σε αναδευόμενο διάλυμα του 4-βρωμοφαινυλομαγνησιοβρωμιδίου, που έχει παρασκευασθεί κατά τον συνήθη τρόπο από 1.0 g τορνευμάτων Mg (0.042 grat) και 1,4-διβρωμοβενζόλιο (9.5g, 40mmol) σε άνυδρο αιθέρα (70 ml). Το μίγμα υποβάλλεται σε ήπιο βρασμό υπό ανάδευση για 1.5 h και στη συνέχεια υδρολύεται στους 0 °C με τη στάγδην προσθήκη διαλύματος HCl (10%). Παραλαμβάνεται η οργανική στιβάδα, ενώ η υδατική εκχυλίζεται με αιθέρα. Τα συνενωμένα αιθερικά εκχυλίσματα εκπλένονται με νερό, ξηραίνονται υπεράνω Na_2SO_4 και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το υπόλειμμα υποβάλλεται σε χρωματογραφία στήλης με τη χρησιμοποίηση μίγματος *n*-hexane:Et₂O, 4:1, ως διαλύτου έκλουσης. Λαμβάνονται 5.16 g του στερεού προϊόντος **33** (απόδοση 84%).Σ.τ.: 64-66°C.

4-(2-Τρικυκλο[3.3.1.1^{3,7}]δεκυλο)βρωμοβενζόλιο (34)



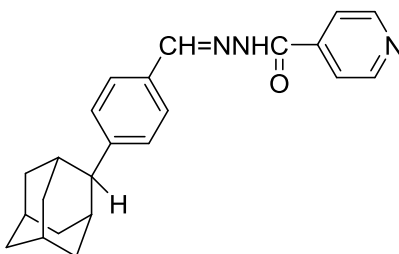
Σε διάλυμα της αλκοόλης **33** (3.1 g, 10mmol) σε άνυδρο DCM (10 ml) προστίθεται τριφθοροξικό οξύ (7.6 g, 67 mmol) σε ατμόσφαιρα Αργού και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min. Στη συνέχεια, στο μίγμα της αντίδρασης προστίθεται στάγδην τριαιθυλοσιλάνιο (1.28 g, 11 mmol) και υπό ήπια εξωτερική ψύξη, και το μίγμα που προκύπτει αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1h. Ακολούθως, προστίθεται παγωμένο νερό, το μίγμα αλκαλοποιείται με στερεό Na₂CO₃ και εκχυλίζεται με DCM. Τα συνενωμένα οργανικά εκχυλίσματα εκπλένονται με νερό, ξηραίνονται υπεράνω Na₂SO₄ και συμπυκνώνονται υπό κενό. Το υπόλειμμα διαλύεται σε THF (20 ml) και προστίθεται KOH (1 g), διαλυμένο στην ελάχιστη δυνατή ποσότητα νερού. Το μίγμα αναδεύεται για 2 h, στη συνέχεια, ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό και στο προκύπτον υπόλειμμα προστίθεται νερό. Το μίγμα εκχυλίζεται με DCM και τα συνενωμένα οργανικά εκχυλίσματα πλένονται με νερό, ξηραίνονται υπεράνω Na₂SO₄ και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Ακολούθως πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το *n*-εξάνιο, οπότε λαμβάνονται 2.52 g στερεού προϊόντος **34** (απόδοση 87%). Σ.τ: 39-41 °C (*n*-πεντάνιο). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.48-1.49 (m, 2H, 4,9-Heq), 1.71 (m, 5H, 4,9-Hax,5,6-H_{ad}), 1.85-1.96 (complexm, 5H, 7,8,10-H), 2.36 (s, 2H, 1,3-H), 2.87 (s, 1H, 2-H), 7.15-7.17 (d, 2H, AA'BB', J_{AB}=J_{A'B'}≈ 8.8 Hz, J_{AA'}=J_{BB'}≈ 0 Hz, 2, 6-H_{ar}), 7.36-7.38 (d, 2H, AA'BB', J_{AB}=J_{A'B'}≈ 8.8 Hz, J_{AA'}=J_{BB'}≈ 0 Hz, 3, 5-H_{ar}); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 27.61, 27.79 (7-C_{ad}), 27.94, 28.03 (5-C_{ad}), 30.93, 31.02 (1,3-C_{ad}), 31.82, 31.96 (4,9-C_{ad}), 37.73, 37.88 (6-C_{ad}), 38.99, 39.16 (8, 10-C_{ad}), 46.35, 46.78 (2-C_{ad}), 118.87 (4-C_{ar}), 126.81, 128.72 (2, 6-C_{ar}), 128.10, 131.12 (3, 5-C_{ar}), 143.38 (1-C_{ar}); Anal. Calcd for C₁₆H₁₉Br (%): C, 65.98; H, 6.58; Found (%): C, 66.18; H, 6.39.

4-(2-Τρικυκλο[3.3.1.1^{3,7}]δεκυλο)βενζολοκαρβοξαλδεΰδη (36)



Σε αναδευόμενο διάλυμα του αρυλοβρωμιδίου **34** (1.23 g, 4.23 mmol) σε άνυδρο THF (15 ml) προστίθεται το *n*-βουτυλολίθιο (2.1 ml, 2.5 M διάλυμα σε εξάνιο, 5.12 mmol) στους -80 °C υπό ατμόσφαιρα Αργού. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται στην ίδια θερμοκρασία για 2 h και ακολούθως προστίθεται DMF (1.7 ml) στο μίγμα, το οποίο αφήνεται να φτάσει σταδιακά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια, στο μίγμα της αντίδρασης προστίθεται διάλυμα HCl (10%) στους 0 °C. Οι οργανικοί διαλύτες απομακρύνονται υπό κενό και στο υπόλειμμα προστίθεται νερό. Το μίγμα εκχυλίζεται με DCM, οι οργανικές φάσεις πλένονται με νερό, ξηραίνονται υπεράνω Na₂SO₄ και συμπυκνώνονται υπό κενό. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης, χρησιμοποιώντας μίγμα διαλυτών έκλουσης *n*-hexane:Et₂O, 7:1, οπότε λαμβάνονται 611 mg του στερεού προϊόντος **36** (απόδοση 66%). Σ.τ: 26-27 °C; IR (nujol) ν (C=O): 1706.6 cm⁻¹; ¹H-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.51-1.54 (br. d, 2H, 4, 9-Heq.), 1.71-1.72 (m, 5H, 4, 9-Hax, 5, 6-H), 1.87-1.97 (complexm, 5H, 7, 8, 10-H), 2.44 (s, 2H, 1, 3-H), 2.99 (s, 1H, 2-H), 7.45-7.47 (d, 2H, AA'BB', J_{AB}=J_{A'B'} ≈ 8.2Hz, J_{AA'}=J_{BB'} ≈ 0 Hz, 3, 5-Har), 7.76-7.78 (d, 2H, AA'BB', J_{AB}=J_{A'B'} ≈ 8.2 Hz, J_{AA'}=J_{BB'} ≈ 0 Hz, 2, 6-Har), 9.92 (s, 1H, CH=O); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 27.58 (7-C_{ad}), 27.84 (5-C_{ad}), 31.07 (1,3-C_{ad}), 32.01 (4,9-C_{ad}), 37.62 (6-C_{ad}), 38.99 (8,10-C_{ad}), 47.34 (2-C_{ad}), 127.52 (3,5-C_{ar}), 129.68 (2,6-C_{ar}), 133.85 (4-C_{ar}), 152.19 (1-C_{ar}), 192.09 (C=O).

N'-(4-(Τρικυκλο[3.3.1.1^{3,7}]δεκ-2-υλ)βενζυλιδενο)-4-πυριδινοκαρβουδραζίδιο (37)



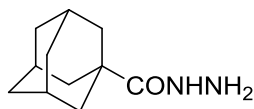
Σε αναδευόμενο διάλυμα της αλδεΐδης **36** (875 mg, 3.64 mmol) σε μεθανόλη (15 ml) προστίθεται το ισονιαζίδιο (0.5 g, 3.64 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 18 h, οπότε σχεδόν αμέσως φαίνεται να σχηματίζεται λευκό ίζημα. Στη συνέχεια, το μίγμα της αντίδρασης διηθείται με τη βοήθεια Et₂O, οπότε λαμβάνονται 1.01 g λευκού στερεού προϊόντος **37** (απόδοση 78%). Σ.τ: 267-269 °C (CHCl₃).

Από τη μελέτη των φασμάτων NMR προκύπτει ότι πρόκειται για μίγμα διαμορφομερών με αναλογία A:B=E:Z=8:1

Διαμορφομερές **A(E)**: ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1.55-1.58 (d, *J* = 12.1 Hz, 2H, 4,9-ax-H_{ad}), 1.72-1.76 (m, 4H, 4,9-ax-H_{ad},6-H), 1.97 (m, 6H, 5,7,8,10-H_{ad}), 2.50-2.54 (m, 2H, 1,3-H_{ad}), 3.02 (s, 1H, 2-H_{ad}), 7.47-7.49 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, 3,5-H_{ar}), 7.73-7.75 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, 2,6-H_{ar}), 7.85-7.87 (m, 2H, 3,5-H_p), 8.49 (s, 1H, CH=N), 8.81-8.83 (m, 2H, 2,6-H_p), 12.06 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 27.3 (5,7-C_{ad}), 30.3 (1,3-C_{ad}), 31.6 (4,9-C_{ad}), 37.2 (6-C_{ad}), 38.4 (8,10-C_{ad}), 46.2 (2-C_{ad}), 121.5 (3,5-C_p), 127.1-127.2 (2,3,5,6-C_{ar}), 131.1 (1-C_{ar}), 140.5 (4-C_p), 149.1 (C=N), 150.3 (2,6-C_p), 161.5 (C=O).

Διαμορφομερές **B(Z)**: ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1.52 (s, 2H, 4,9-eq-H_{ad}), 1.72-1.76 (m, 4H,4,9-ax-H_{ad},6-H), 1.97 (m, 6H, 5,7,8,10-H_{ad}), 2.45 (s, 2H,1,3-H_{ad}), 2.96 (s, 1H, 2-H_{ad}), 7.38-7.40 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, 3,5-H_{ar}), 7.69-7.71 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, 2,6-H_{ar}), 7.85-7.87 (m, 2H, 3,5-H_p), 8.12 (s, 1H, CH=N), 8.76-8.77 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, 2,6-H_p), 12.03 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 27.3 (5,7-C_{ad}), 30.3 (1,3-C_{ad}), 31.6 (4,9-C_{ad}), 37.2 (6-C_{ad}), 38.4 (8,10-C_{ad}), 46.2 (2-C_{ad}), 121.5 (3,5-C_p), 127.1-127.2 (2,3,5,6-C_{ar}), 131.1 (1-C_{ar}), 140.5 (4-C_p), 146.6 (C=N), 149.1, 150.3 (2,6-C_p), 161.5 (C=O).

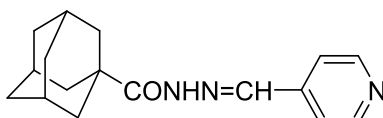
1-Τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκανοκαρβουδραζίδιο (**38**)



Σε διάλυμα του 1-αδαμαντανοκαρβοξυλικού αιθυλεστέρα (**10**) (2.0 g, 9.6 mmol) και σε διαιθυλενογλυκόλη (8 ml) προστίθεται ένυδρη υδραζίνη (2 ml). Το μίγμα αναδεύεται σε συσκευή μικροκυμάτων αρχικά στα 900 W και στη συνέχεια στα 500 W στους 210 °C για 90 min. Μετά από ψύξη το μίγμα της αντίδρασης αποχύνεται σε μίγμα πάγου-νερού και το αποβαλλόμενο στερεό παραλαμβάνεται με διήθηση, πλένεται με νερό και ξηραίνεται υπό κενό υπεράνω πεντοξειδίου του φωσφόρου. Λαμβάνονται 1.2 g του κρυσταλλικού στερεού **38**

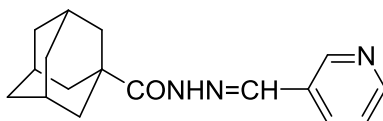
(απόδοση 62%). Σ.τ.: 156-157 °C. (MeOH-H₂O). ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 1.68-1.76 (br. q, 6H, 4,6,10-H_{ad}), 1.85 (s, 6H, 2,8,9-H_{ad}), 2.04 (br. s, 3H, 3,5,7-H_{ad}), 3.52 (br. s, 2H, NH₂), 6.98 (br. s, 1H, NH); ¹³C-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 28.1 (3,5,7-C_{ad}), 36.6 (4,6,10-C_{ad}), 39.1 (2,8,9-C_{ad}), 40.2 (1-C_{ad}), 178.7 (C=O).

N'-((E)-πυριδιν-4-υλμεθυλενο)-1-τρικυκλο[3.3.1.1.3,7]δεκανοκαρβοϋδραζίδιο (39)



Σε αναδεύόμενο διάλυμα 4-πυριδινοκαρβοξαλδεϋδης (110 mg, 1.03 mmol) σε MeOH (5 ml), προστίθεται το υδραζίδιο **38** (200 mg, 1.03 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται (reflux) για 4.5 h. Ακολουθως, εξατμίζεται ο διαλύτης και ακολουθεί χρωματογραφία στήλης με διαλύτη έκλουσης 2% MeOH σε DCM, οπότε λαμβάνονται 145 mg του λευκού στερεού προϊόντος **39** (απόδοση 50%). Σ.τ.: 219-221 °C (CHCl₃-Et₂O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1.66-1.73 (m, 6H, 4,6,10-H_{ad}), 1.87 (s, 6H, 2,8,9-H_{ad}), 2.01 (s, 3H, 3,5,7-H_{ad}), 7.58-7.59 (d, *J* = 4.4 Hz, 2H, 3,5-H_p), 8.38 (s, 1H, CH=N), 8.62-8.63 (d, *J* = 4.2 Hz, 2H, 2,6-H_p), 11.11 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ(ppm): 27.5 (3,5,7-C_{ad}), 36.0 (4,6,10-C_{ad}), 38.1 (2,8,9-C_{ad}), 39.8 (1-C_{ad}), 120.8 (3,5-C_p), 141.7 (4-C_p), 144.1 (CH=N), 150.2 (2,6-C_p), 168.3 (C=O).

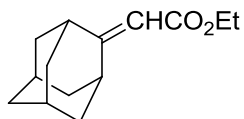
N'-((πυριδιν-3-υλμεθυλενο)-1-τρικυκλο[3.3.1.1.3,7]δεκανοκαρβοϋδραζίδιο (40)



Για την παρασκευή της υδραζόνης **40** ακολουθείται η ίδια τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση της υδραζόνης **39** με θέρμανση (reflux) για 3 h, διαλύματος της 3-πυριδινοκαρβοξαλδεϋδης και το υδραζίδιο **38**. Η χρωματογραφία πραγματοποιήθηκε με διαλύτη έκλουσης 1% MeOH σε DCM και απόδοση 58%. Σ.τ.: 199-201 °C (CHCl₃-Et₂O); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1.66-1.72 (m, 6H, 4,6,10-H_{ad}), 1.87 (s, 6H, 2,8,9-H_{ad}), 2.00 (s, 3H, 3,5,7-H_{ad}), 7.44-7.47 (dd, 1H, 5-H_p), 8.04-8.06 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, 4-H_p), 8.44 (s, 1H, CH), 8.57-8.58 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, 6-H_p), 8.78 (s, 1H, 2-H_p), 11.00 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 27.6 (3,5,7-C_{ad}),

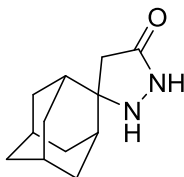
36.0 (4,6,10-C_{ad}), 38.2 (2,8,9-C_{ad}), 123.9 (5-C_p), 130.5 (3-C_p), 133.2 (4-C_p), 143.8 (CH=N), 148.5 (2-C_p), 150.4 (6-C_p), 173.3 (C=O).

2-Τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκυλιδενοξικός αιθυλεστέρας (41)



Σε εναιώρημα 480 mg (20 mmol) νατριοϋδριδίου (800 mg διασποράς 60% σε παραφινέλαιο, καθαρισμένο με *n*-πεντάνιο) σε άνυδρο THF (30 ml) προστίθεται στάγδην, υπό ανάδευση, ψύξη και υπό ατμόσφαιρα Αργού 4.2 g (18.5 mmol) φωσφονοξικού τριαιθυλεστέρα σε 10 ml άνυδρου THF. Η ανάδευση συνεχίζεται υπό ατμόσφαιρα Αργού για 30 min και στη συνέχεια προστίθεται στάγδην και υπό ψύξη διάλυμα 2.75 g (18.3 mmol) της 2-αδαμαντανόνης (**29**) σε 30 ml άνυδρου THF. Μετά από ανάδευση υπό ψύξη για μία ακόμη ώρα το μίγμα υδρολύεται με κορεσμένο διάλυμα NH₄Cl. Το THF απομακρύνεται υπό κενό, στο υπόλειμμα προστίθεται νερό και το κατέργασμα εκχυλίζεται με αιθέρα. Τα συνενωμένα αιθερικά εκχυλίσματα πλένονται με νερό, ξηραίνονται με Na₂SO₄ και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Λαμβάνονται 3.78 g ελαιώδους προϊόντος (απόδοση 87 %). IR (film), ν(C=O): 1710 cm⁻¹, ν(C=C): 1645 cm⁻¹. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 1.17-1.20 (t, 3H, A₃X₂, J_{AX}≈7.12Hz, CH₃), 1.73-1.88 (very complex dm, 12H, 4,5,6,7,8,9,10-H_{ad}), 2.34 (s, 1H, 1-H_{ad}), 3.98 (s, 1H, 3-H_{ad}), 4.02-4.06 (q, 2H, A₃X₂, J_{AX}≈7.12Hz, CH₂O), 5.50 (s, 1H, CH=).

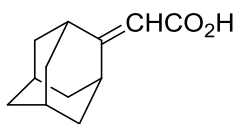
Σπειρο(πυραζολιδινο-3,2'-τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκαν)-5-όνη (42)



Σε διάλυμα του εστέρα **41** (342 mg, 1.55 mmol) σε EtOH (5 ml) προστίθενται 12 σταγόνες ένυδρης υδραζίνης (544 mg) και το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται στους 150-160 °C για 6 d. Ακολούθως, εξατμίζεται η EtOH, προστίθεται νερό και το μίγμα εκχυλίζεται με CHCl₃. Η οργανική φάση πλένεται καλά με νερό, ξηραίνεται υπεράνω Na₂SO₄ και ο διαλύτης εξατμίζεται

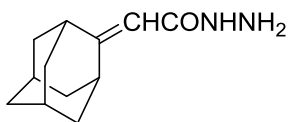
υπό κενό. Το υπόλειμμα που προκύπτει καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης, χρησιμοποιώντας μίγμα διαλυτών έκλουσης 2 % MeOH σε CHCl₃, οπότε λαμβάνονται 190 mg του στερεού προϊόντος **42** (απόδοση 60 %). Σ.τ: 108-110 °C (CHCl₃-Et₂O); ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 1.63-1.91 (very complex dm, 12H, 4,5,6,7,8,9,10-H_{ad}), 2.58 (s, 2H, 1,3-H_{ad}), 5.76 (s, 1H, NH), 6.64 (s, 2H, CH₂).

Τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκ-2-υλιδενοξικό οξύ (**43**) [168]



Διάλυμα του εστέρα **41** (510 mg, 2.32 mmol) σε EtOH (10 ml) προστίθεται σε πυκνό υδατικό διάλυμα NaOH (258 mg, 6.46 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται (reflux) υπό έντονη ανάδευση για 4 h. Ακολούθως, η EtOH απομακρύνεται υπό κενό και προστίθεται νερό στο υπόλειμμα. Το μίγμα οξινίζεται υπό ψύξη και ανάδευση με διάλυμα HCl (10%) και φυλάσσεται στο ψυγείο. Το ίζημα που σχηματίζεται, διηθείται, εκπλένεται με νερό και ξηραίνεται υπό κενό, παρουσία P₂O₅. Λαμβάνονται 419 mg της ουσίας **43** (απόδοση 96%).

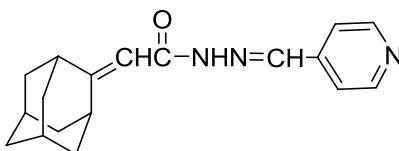
Τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκ-2-υλιδενακετοϋδραζίδιο (**44**)



Σε αναδευόμενο εναιώρημα του οξέος **43** (0.35 g, 1.82 mmol) σε DCM/DMF (2:1, 3 ml) προστίθενται HOBt (279 mg, 1.82 mmol), EDC.HCl (349 mg, 1.82 mmol) και DIPEA (235 mg, 1.82 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 24 h. Ακολούθως, το μίγμα αποχύνεται στάγδην σε αναδευόμενο διάλυμα υδραζίνης (0.189 ml, 3.64 mmol) σε κυκλοεξάνιο (2 ml) υπό ψύξη και αφήνεται για 48 h σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προστίθεται νερό (20 ml), οπότε σχηματίζεται ίζημα το οποίο διηθείται. Ακολούθως, το ίζημα χρωματογραφείται με διαλύτη έκλουσης EtOAc:hexanes, 30% έως 50% και μετά έκλουση με MeOH. Λαμβάνονται 290 mg του επιθυμητού προϊόντος **44** (απόδοση 77 %). Σ.τ: 271-273 °C (dec) (CHCl₃-Et₂O); ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 1.75-1.89 (very complex dm, 12H, 4,5,6,7,8,9,10-H_{ad}), 2.32 (s, 1H, 1-H_{ad}), 3.21 (very br.s, 2H, NH₂), 3.96 (s, 1H, 3-H_{ad}), 5.35 (s, 1H,

CH=) 6.61 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 28.1 (5,7- C_{ad}), 33.1 (3- C_{ad}), 37.0 (6- C_{ad}), 39.3 (4,10- C_{ad}), 40.2 (8,9- C_{ad}), 41.4 (1- C_{ad}), 108.6 (CH=), 168.3 (2- C_{ad}), 168.4 (C=O).

***N'*-(πυριδιν-4-υλομεθυλενο)τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκ-2-υλιδεν)ακετοϋδραζίδιο (45)**



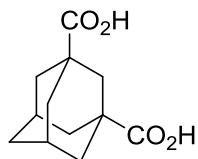
Σε αναδευόμενο διάλυμα της 4-πυριδινοκαρβοξαλδεΐδης (151 mg, 1.4 mmol) σε MeOH (5 ml) προστίθεται το υδραζίδιο **44** (290 mg, 1.4 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται (reflux) για 6 h και στη συνέχεια αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 24 h. Ακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη και στο υπόλειμμα που προκύπτει προστίθεται άνυδρος Et_2O , οπότε το προϊόν κρυσταλλώνει. Μετά από διήθηση λαμβάνονται 190 mg του προϊόντος **45** (απόδοση 46%). Σ.τ: 199-201 °C. (CHCl_3 - Et_2O).

Από τη μελέτη των φασμάτων NMR προκύπτει ότι πρόκειται για μίγμα διαμορφομερών με αναλογία A:B=E:Z=7:1.

Διαμορφομερές **A(E)**: ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 1.86-2.02 (very complex dm, 12H, 4,5,6,7,8,9,10- H_{ad}), 2.61 (s, 1H, 1- H_{ad}), 4.22 (s, 1H, 3- H_{ad}), 6.58 (s, 1H, CH=C), 7.51-7.52 (d, J =4.9 Hz, 2H, 3,5- H_{p}), 7.78 (s, 1H, CH=N), 8.64 (s, 2H, 2,6- H_{p}), 10.39 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 27.9 (5,7- C_{ad}), 33.4 (3- C_{ad}), 36.8 (6- C_{ad}), 39.3 (4,10- C_{ad}), 40.2 (8,9- C_{ad}), 42.0 (1- C_{ad}), 106.5 (CH=C), 120.8 (3,5- C_{p}), 139.5 (CH=N), 141.5 (4- C_{p}), 150.2 (2,6- C_{p}), 168.8 (2- C_{ad}), 172.9 (C=O).

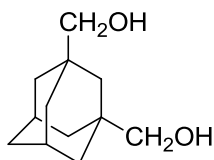
Διαμορφομερές **B(Z)**: ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 1.86-2.02 (very complex dm, 12H, 4,5,6,7,8,9,10- H_{ad}), 2.37 (s, 1H, 1- H_{ad}), 4.22 (s, 1H, 3- H_{ad}), 5.58 (s, 1H, CH=C), 7.51-7.52 (d, J =4.9 Hz, 2H, 3,5- H_{p}), 8.25 (s, 1H, CH=N), 8.59 (s, 2H, 2,6- H_{p}), 9.70 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 27.9 (5,7- C_{ad}), 33.4 (3- C_{ad}), 36.8 (6- C_{ad}), 39.3 (4,10- C_{ad}), 40.2 (8,9- C_{ad}), 42.0 (1- C_{ad}), 106.5 (CH=C), 120.8 (3,5- C_{p}), 139.5 (CH=N), 141.5 (4- C_{p}), 150.2 (2,6- C_{p}), 168.8 (2- C_{ad}), 172.9 (C=O).

1,3-Τρικυκλο[3.3.1.1.3,7]δεκανοδικαρβοξυλικό οξύ (47) [170,171]



Σε αναδευόμενο μίγμα πυκνού νιτρικού οξέος (8 ml), πυκνού θειικού οξέος (75 ml) και πυροθειικού οξέος (oleum 30%) (60 ml) προστίθεται το αδαμαντάνιο (4 g, 29 mmol), ενώ η θερμοκρασία διατηρείται στους 28 °C. Στο αναδευόμενο μίγμα της αντίδρασης και στην ίδια θερμοκρασία προστίθεται στάγδην άνυδρο μυρμηκικό οξύ (7 ml) σε χρονικό διάστημα 4 h με τη βοήθεια αυτόματης σταγονομετρικής χοάνης. Μετά το τέλος της προσθήκης το μίγμα αναδύεται για μία επί πλέον ώρα και στη συνέχεια αποχύνεται σε τριμμένο πάγο. Το αποβαλλόμενο ίζημα παραλαμβάνεται με διήθηση και πλένεται με νερό μέχρι ουδέτερης αντιδράσεως. Το στερεό κατεργάζεται με διάλυμα NaOH 10%, διηθείται υπό κενό και το ίζημα πλένεται με διάλυμα NaOH (10%) και με νερό. Τα συνενωμένα διηθήματα-εκπλύματα οξινίζονται υπό ανάδευση και ψύξη με τη στάγδην προσθήκη πυκνού υδροχλωρικού οξέος και το αποβαλλόμενο ίζημα παραλαμβάνεται με διήθηση υπό κενό, πλένεται με νερό και ξηραίνεται υπό κενό υπεράνω πεντοξειδίου του φωσφόρου. Λαμβάνονται 3.25 g λευκού κρυσταλλικού στερεού, το οποίο χρησιμοποιείται χωρίς περαιτέρω καθαρισμό στο επόμενο στάδιο (απόδοση 50%). Σ.τ.: 275 °C

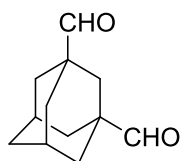
1,3-Τρικυκλο[3.3.1.1.3,7]δεκανοδιμεθανόλη (48)



Σε αναδευόμενο εναιώρημα LiAlH₄ (4.2 g, 110 mmol) σε άνυδρο THF (160 ml) προστίθεται στάγδην ο 1,3-αδαμαντανοδικαρβοξυλικός διαιθυλεστέρας (52) (4.2 g, 15 mmol) σε άνυδρο THF (40 ml). Το μίγμα της αντίδρασης φέρεται σε βρασμό υπό ανάδευση για 36 h και στη συνέχεια υδρολύεται υπό ψύξη με τη στάγδην προσθήκη αιθανόλης, νερού και διαλύματος NaOH (20 %). Μετά την υδρόλυση η ανάδευση συνεχίζεται για μία επιπλέον ώρα και στη συνέχεια τα ανόργανα άλατα απομακρύνονται με διήθηση και πλένονται επανειλημμένα με ζέον THF. Τα συνενωμένα διηθήματα-εκπλύματα συμπυκνώνονται υπό κενό και το υπόλειμμα

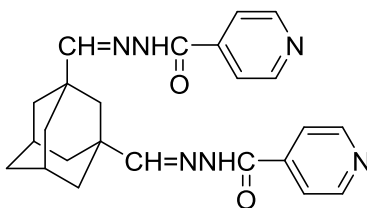
που προκύπτει κατεργάζεται με DCM. Το κατέργασμα πλένεται με μικρή ποσότητα κορεσμένου διαλύματος NaCl, ξηραίνεται με Na₂SO₄ και εξατμίζεται. Το υπόλειμμα υποβάλλεται σε χρωματογραφία στήλης με διαλύτη έκλυσης DCM:MeOH, 4:1. Λαμβάνονται 1.8 g στερεού προϊόντος (απόδοση 61 %). Σ.τ.: 180 °C. ¹H-NMR (CDCl₃), δ(ppm): 1.23 (br. s, 2H, 6-H), 1.27-1.41 (very complex m, 8H, 4,8,9,10-H), 1.53 (br. s, 2H, 5,7-H), 1.97 (br. s, 2H, 2-H), 2.96-2.99 (d, 4H, J≈11 Hz, α-H), 4.27-4.40 (br. m, 2H, 2xOH).

1,3-Τρικυκλο[3.3.1.1.3,7]δεκανοδικαρβοξαλδεΐδη (49)



Σε αναδεύόμενο διάλυμα χλωροχρωμικού πυριδινίου (4 g, 18.56 mmol) σε άνυδρο DCM (30 ml) προστίθεται άπαξ διάλυμα της 1,3-αδαμαντανομεθανόλης **48** (1.0 g, 5.09 mmol) σε άνυδρο DCM (15 ml) και το μίγμα αναδεύεται υπό ατμόσφαιρα Αργού σε θερμοκρασία δωματίου για 2.5 h. Στο μίγμα της αντίδρασης προστίθεται αιθέρας (50 ml) και μετά από κατεργασία το μίγμα διηθείται μέσω βραχείας στήλης διοξειδίου του πυριτίου και η στήλη εκπλένεται με αιθέρα. Τα συνενωμένα αιθερικά διηθήματα συμπυκνώνονται μέχρι μικρού όγκου, στο υπόλειμμα προστίθενται άλλα 50 ml άνυδρου αιθέρα και 20 ml *n*-πεντανίου και το κατέργασμα επαναδιηθείται μέσω δεύτερης βραχείας στήλης διοξειδίου του πυριτίου. Με την εξατμηση του διηθήματος λαμβάνονται 560 mg του παχύρευστου προϊόντος **49**, το οποίο χρησιμοποιείται χωρίς περαιτέρω καθαρισμό στο επόμενο στάδιο (απόδοση 57%).

N²,N^{2'}-(1,3-Τρικυκλο[3.3.1.1.3,7]δεκανοδιμεθυλενο)δισ(4-πυριδινοκαρβοϋδραζίδιο) (50)



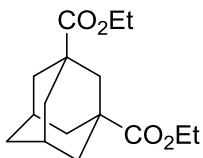
Σε αναδευόμενο διάλυμα της αλδεΰδης **49** (560 mg, 2.9 mmol) σε MeOH (20 ml) προστίθεται το ισονιαζίδιο (0.8 g, 5.83 mmol), το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται (reflux) για 10 h και στη συνέχεια αφήνεται για 18 h σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως, εξατμίζεται ο διαλύτης και το αφρώδες υπόλειμμα που προκύπτει παταλαμβάνεται με χλωροφόρμιο. Η οργανική στιβάδα πλένεται με νερό, ξηραίνεται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνεται υπό κενό. Μετά από χρωματογραφία στήλης με διαλύτη έκλουσης 1 έως 10% MeOH σε DCM λαμβάνονται 500 mg του προϊόντος **50** (απόδοση 40%). Σ.τ.: 254-255 °C (CHCl₃-Et₂O).

Από τη μελέτη των φασμάτων NMR προκύπτει ότι πρόκειται για μίγμα διαμορφομερών με αναλογία A:B=E:Z=11:1.

Διαμορφομερές **A(E)**: ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.59-1.74 (m, 12H, 2,4,6,8,9,10-H_{ad}), 2.15 (s, 2H, 5,7-H_{ad}), 7.63 (s, 2H, 2xCH=N), 7.75-7.76 (d, *J* = 4.2 Hz, 4H, 2x3,5-H_p), 8.74-8.75 (d, *J* = 4.4 Hz, 4H, 2x2,6-H_p), 11.64 (s, 2H, 2xNH); ¹³C-NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 27.6 (7-C_{ad}), 35.5 (2-C_{ad}), 37.5 (1,3-C_{ad}), 38.7 (4,8,9,10-C_{ad}), 41.5 (6-C_{ad}), 50.8 (5-C_{ad}), 121.6 (3,5-C_p), 140.5 (4-C_p), 150.6 (2,6-C_p), 161.3 (C=N), 163.0 (C=O).

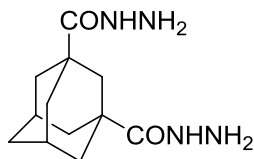
Διαμορφομερές **B(Z)**: ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.59-1.74 (m, 12H, 2,4,6,8,9,10-H_{ad}), 2.08 (s, 2H, 5,7-H_{ad}), 7.26 (s, 2H, 2xCH=N), 7.56 (s, 4H, 2x3,5-H_p), 8.69-8.70 (d, *J* = 3.5 Hz, 4H, 2x2,6-H_p), 11.59 (s, 2H, 2xNH); ¹³C-NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 27.6 (7-C_{ad}), 35.5 (2-C_{ad}), 37.5 (1,3-C_{ad}), 38.7 (4,8,9,10-C_{ad}), 41.5 (6-C_{ad}), 50.8 (5-C_{ad}), 121.6 (3,5-C_p), 140.5 (4-C_p), 150.6 (2,6-C_p), 161.3 (C=N), 163.0 (C=O).

1,3-Τρικυκλο[3.3.1.1.3,7]δεκανοδικαρβοξυλικός διαιθυλεστέρας (**52**)



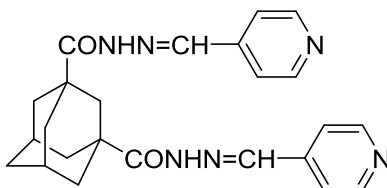
Παρασκευάζεται από το 1,3-αδαμαντανοδικαρβοξυλικό οξύ (**47**), μέσω του δικαρβονυλοχλωριδίου **51**, κατά τρόπο ανάλογο με τον αιθυλεστέρα **10**. Το επιθυμητό προϊόν λαμβάνεται ως ελαιώδες υγρό σε απόδοση 90%. IR (film), ν (C=O): 1722 cm⁻¹. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 1.22-1.26 (t, 6H, A₃X₂, *J*_{AX} ≈ 7.12 Hz, CH₃), 1.67 (br. s, 2H, 6-H), 1.81-1.89 (br. q, 8H, 4,8,9,10), 2.01 (s, 2H, 5,7-H), 2.14 (s, 2H, 2-H), 4.08-4.13 (q, 4H, A₃X₂, *J*_{AX} ≈ 7.14 Hz, CH₂O).

1,3-Τρικυκλο[3.3.1.1.3,7]δεκανοδικαρβοϋδραζίδιο (53)



Παρασκευάζεται από τον 1,3-αδαμαντανοδικαρβοξυλικό διαιθυλεστέρα (**52**) κατά τρόπο ανάλογο με το υδραζίδιο **38**. Μετά από αραίωση του μίγματος της αντίδρασης με νερό, το κατέργασμα εξατμίζεται υπό κενό, με αποτέλεσμα η υδραζίνη να απομακρύνεται αζεοτροπικά με το νερό. Στο υπόλειμμα προστίθεται αιθανόλη, οπότε το διϋδραζίδιο **53** κρυσταλλώνει (απόδοση 89%). Σ.τ.: 206-208 °C (EtOH). ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 1.57 (br. s, 2H, 6-H_{ad}), 1.64-1.73 (br. q, 4,8,9,10-H), 1.78 (s, 2H, 5,7-H_{ad}), 2.02 (s, 2H, 2-H_{ad}), 4.13 (s, 4H, 2xNH₂), 8.72 (s, 2H, 2xNH); ¹³C-NMR (DMSO-d₆), δ (ppm): 27.71 (5,7-C_{ad}), 35.19 (2-C_{ad}), 37.82 (4,8,9,10-C_{ad}), 39.52 (1,3-C_{ad}), 40.13 (6-C_{ad}), 175.83 (C=O).

(*E*) N²,N^{2'}-δι(4-πυριδινομεθυλενο)-1,3-τρικυκλο[3.3.1.1.3,7]δεκανοδικαρβοϋδραζίδιο (54)



Σε αναδευόμενο διάλυμα της 4-πυριδινοκαρβοξαλδεΐδης (145 mg, 1.35 mmol) σε MeOH (5 ml) προστίθεται το υδραζίδιο **53** (170 mg, 0.67 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται (reflux) για 6 h και αναδύεται για 18 h σε θερμοκρασία δωματίου. Σχηματίζεται ίζημα, το οποίο διηθείται. Λαμβάνονται 250 mg στερεού κρυσταλλικού προϊόντος (απόδοση 87%). Σ.τ.: 293-295 °C (CHCl₃-Et₂O); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 1.67 (br. s, 2H, 6-H), 1.84-1.89 (br. q, 4,8,9,10-H_{ad}), 2.04 (s, 2H, 2-H_{ad}), 2.17 (s, 2H, 5,7-H_{ad}), 7.59-7.60(d, *J* = 5 Hz, 4H, 3,5-H_p), 8.38 (s, 2H, 2xCH=N), 8.62-.63 (d, *J* = 5 Hz, 4H, 2,6-H_p), 11.23 (s, 2H, 2xNH) ¹³C-NMR (50 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 27.7 (5,7-C), 34.9 (2-C_{ad}), 37.3 (4,8,9,10-C_{ad}), 40.0 (1,3-C_{ad}), 40.4 (6-C_{ad}), 120.9 (3,5-C_p), 141.7 (4-C_p), 144.4 (CH=N), 150.2 (2,6-C_p), 173.1 (C=O).

5.2 Φαρμακολογικές δοκιμασίες.

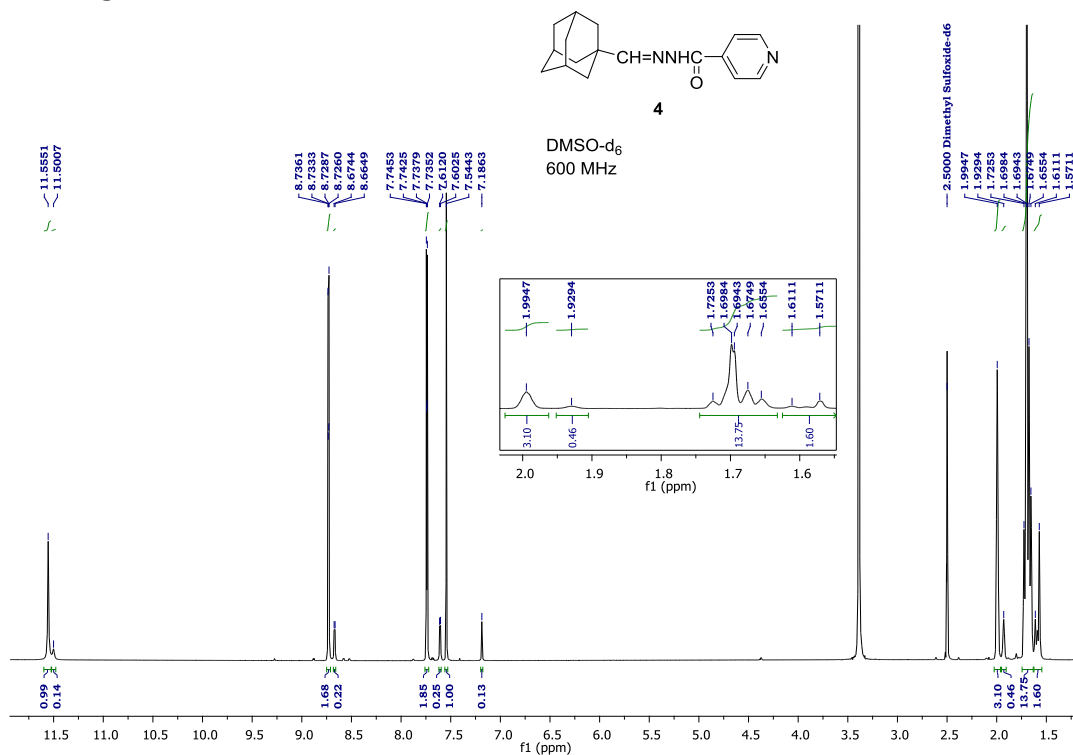
Βακτηριακά στελέχη και συνθήκες καλλιέργειας. Τα στελέχη του *Mycobacterium tuberculosis* που χρησιμοποιήθηκαν είναι το H37Rv και το μεταλλαγμένο μη αναπαραγόμενο στέλεχος SS18b^[173]. Αυτά αναπτύχθηκαν στους 37 °C υπό ανάδευση σε θρεπτικό υλικό 7H9 (Difco) εμπλουτισμένο με 10% αλβουμίνη-δεξτρόζη-καταλάση (ADC), 0,2% γλυκερόλη και 0,05% Tween 80. Στην καλλιέργεια του SS18b προστέθηκε στρεπτομυκίνη (50 μg/ml). Τα αντιγραφόμενα στελέχη H37Rv παράχθηκαν ως εξής. Το H37Rv αναπτύχθηκε στο μέσο έως την ημι-λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Τα μη αντιγραφόμενα SS18b αναπτύχθηκαν στην ημι-λογαριθμική φάση σε μέσο που περιείχε στρεπτομυκίνη και εκπλύθηκαν τρεις φορές με αλατούχο ρυθμικό διάλυμα φωσφορικών που περιείχε 0,05% Tween 80 (PBST). Τα τελικά βακτηριακά σφαιρίδια των H37Rv, και SS18b επαναιωρήθηκαν στο μέσο και ψύχθηκαν σε γλυκερόλη 15% στους -80 °C σε κλάσματα των 0.5 ml (εμπλουτισμένα με 50μg/mL στρεπτομυκίνης για τα στελέχη SS18b). Όταν έπρεπε ακολούθησε απόψυξη ενός από τα κλάσματα των H37Rv και SS18b και εμβολιασμός τους στο θρεπτικό υλικό 7H9. Η καλλιέργεια του SS18b διατηρήθηκε σε οπτική πυκνότητα 600nm (OD600) μεταξύ 0.2 και 0.5 ml για 2 εβδομάδες (με την προσθήκη νέου μέσου όταν ήταν αναγκαίο), κατά τον οποίο είχαν σταματήσει να αντιγράφονται.

Αντιμικροβιακά. Η εθαμβουτόλη (EMB) και το ισονιαζίδιο (INH) αγοράστηκαν από τη Sigma-Aldrich. Τα φάρμακα για τα *in vitro* πειράματα διαλύθηκαν ή απαιωρήθηκαν ως εξής: οι αδαμαντανικοί αμινοαιθέρες, το INH και η EMB διαλύθηκαν σε διμέθυλο σουλφοξείδιο (DMSO).

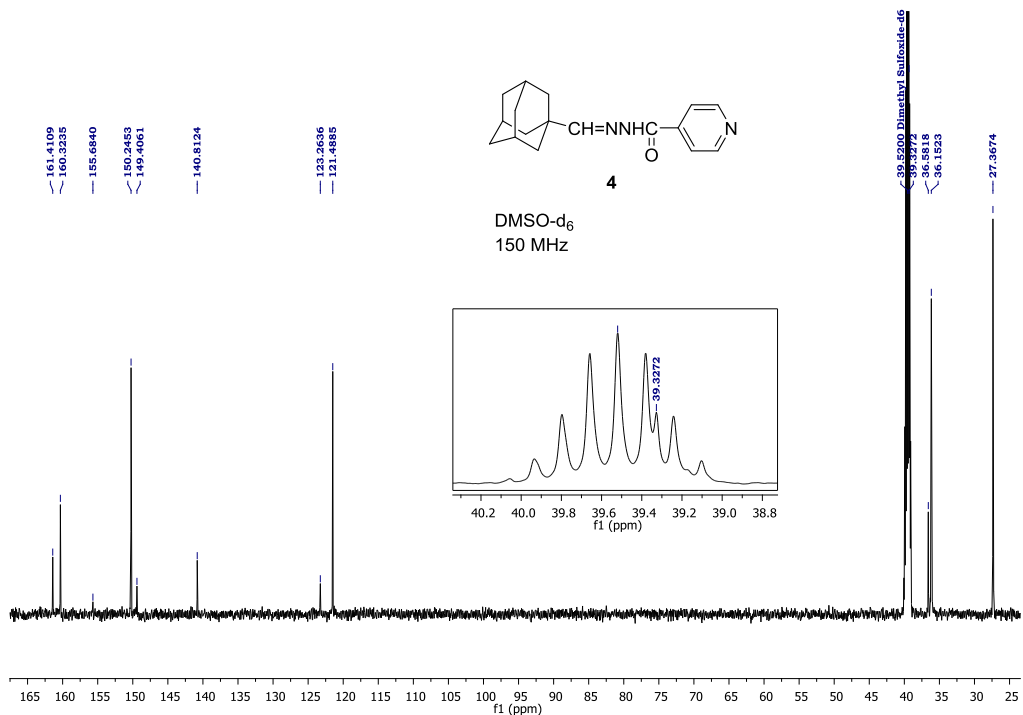
Resazurin reduction microplate assay (REMA). Δοκιμασία με αναγωγή της ρεσαζουρίνης. Για την αξιολόγηση της *in vitro* αποτελεσματικότητας των αναλόγων, μια καλλιέργεια του H37Rv (OD600 = 0,0001) και μια καλλιέργεια 2 εβδομάδων του SS18b (OD600 = 0,1) χρησιμοποιήθηκαν στη μέθοδο REMA^[172]. Δύο διαδοχικές διαλύσεις κάθε εξεταζόμενου αναλόγου παρασκευάστηκαν σε λευκές μικροπλάκες 96 κυψελών που περιείχαν το βάκιλο σε συνολικό όγκο 100 μL και στη συνέχεια επώαστηκαν για 6 ημέρες στους 37 °C πριν την προσθήκη 10 μL 0,025% ρεσαζουρίνης. Μετά από επώαση overnight, προσδιορίστηκε ο φθορισμός της ρεσορουφίνης, μεταβολίτη της ρεσαζουρίνης, (διέγερση 560 nm, εκπομπή 590 nm, ενίσχυση σήματος 70) με τη χρήση ενός αναλυτή μικροπλάκων Tecan Infinite M200.

Στατιστική ανάλυση. Η επεξεργασία των δεδομένων και ο σχεδιασμός των γραφημάτων έγινε με πρόγραμμα Prism version 5.0 (GraphPad).

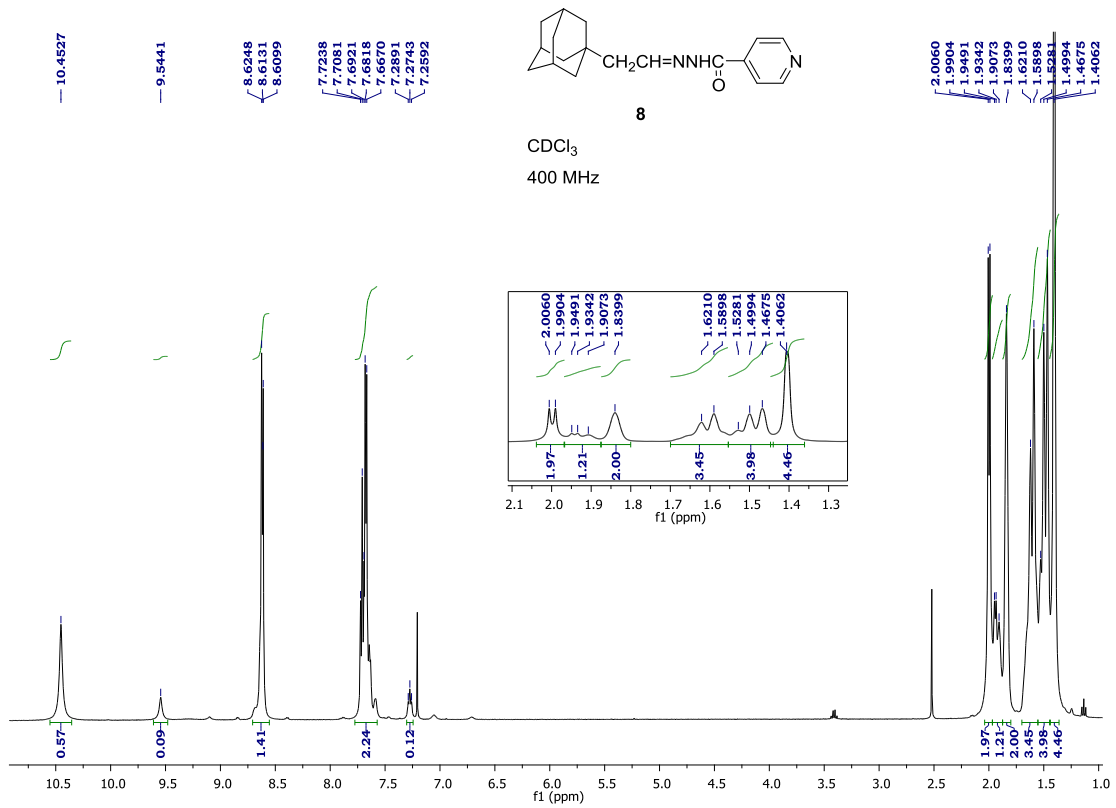
6. ΑΝΤΙΠΡΟΣΩΠΕΥΤΙΚΑ ΦΑΣΜΑΤΑ NMR



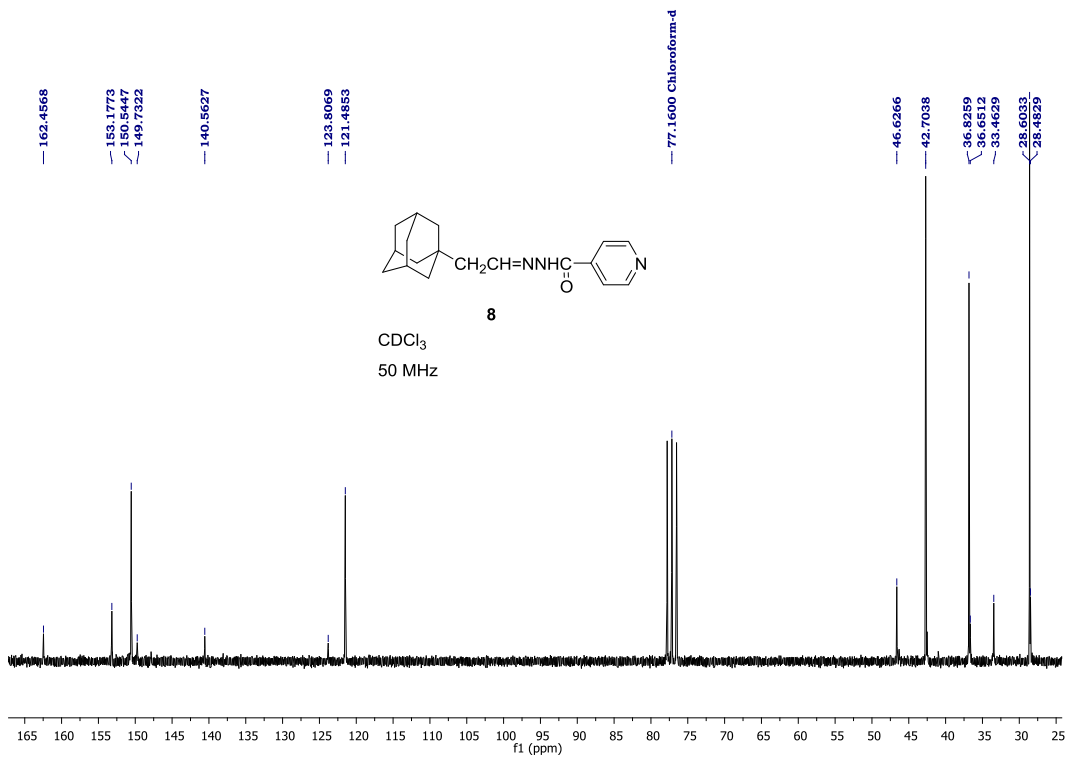
Εικόνα 25. Φάσμα ¹H-NMR του N'-(αδαμαντ-1-υλο)μεθυλεν)ισονικτινουδραζιδίου (**4**).



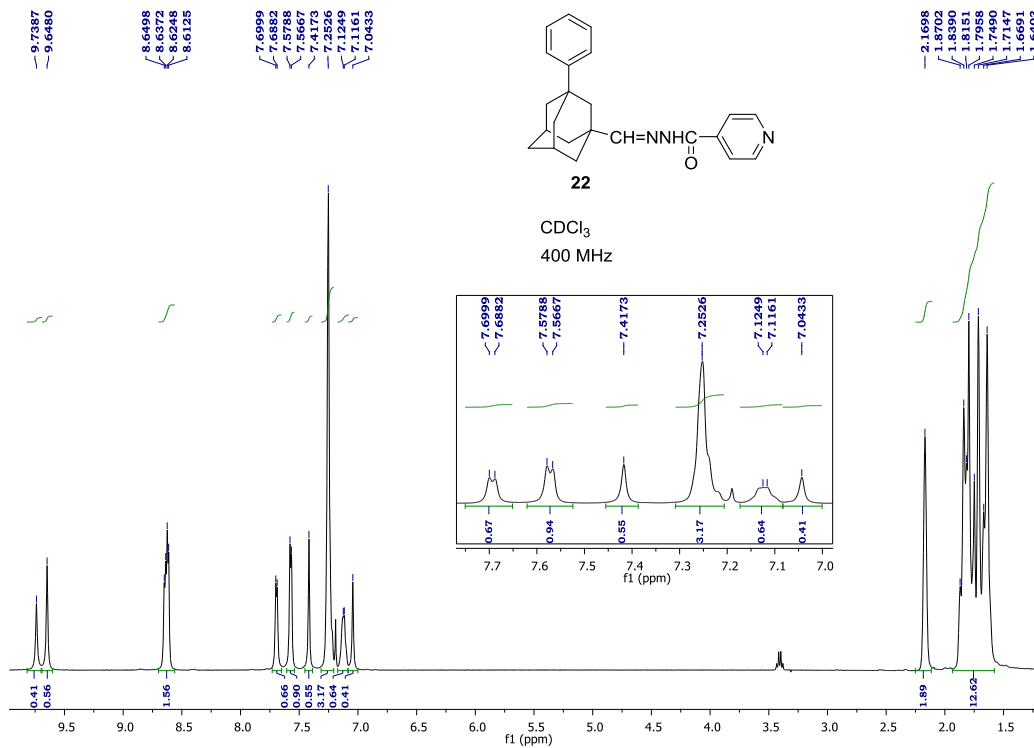
Εικόνα 26. Φάσμα ¹³C-NMR του N'-(αδαμαντ-1-υλο)μεθυλεν)ισονικτινουδραζιδίου (**4**).



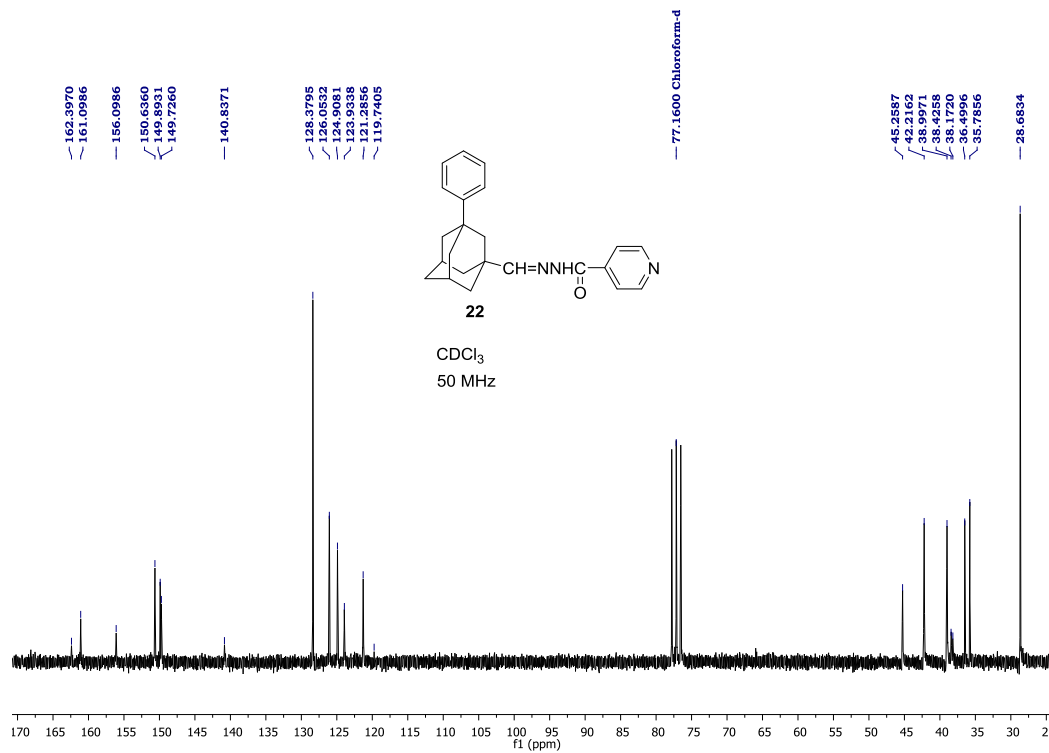
Εικόνα 27. Φάσμα ¹H-NMR του N'-(αδαμαντ-1-υλο)αιθυλεν)ισονικιτινούδραζιδίου (**8**).



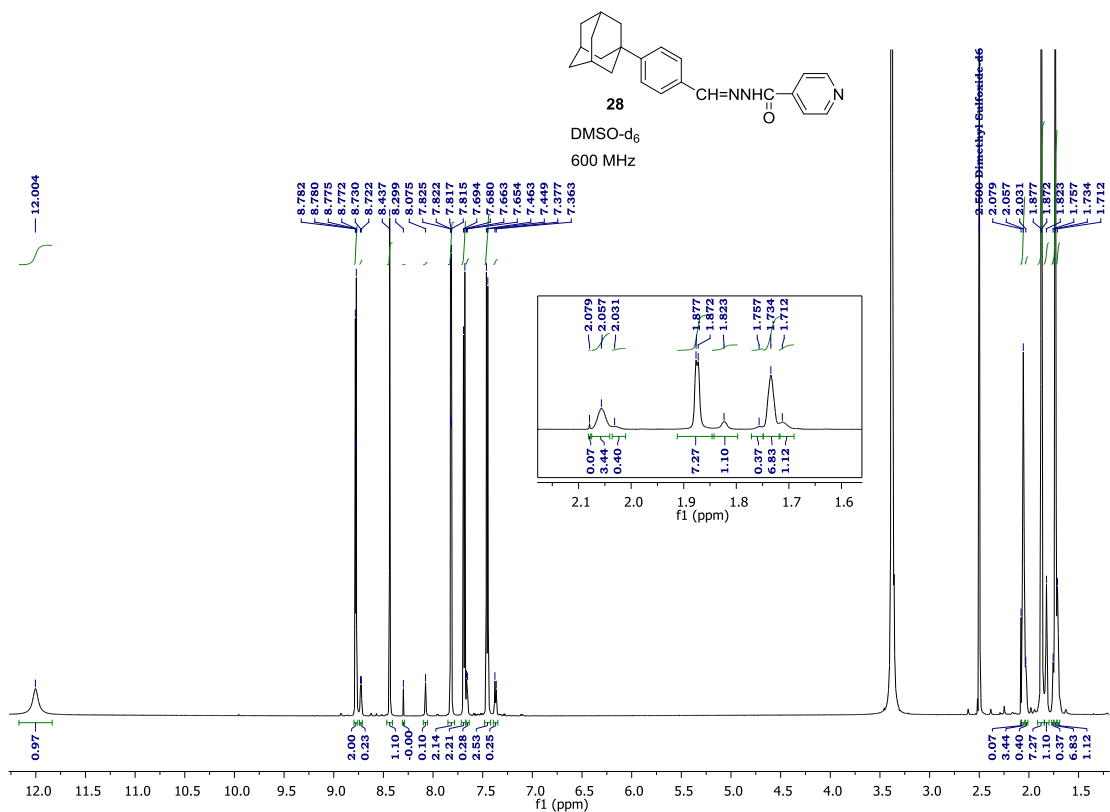
Εικόνα 28. Φάσμα ¹³C-NMR του N'-(αδαμαντ-1-υλο)αιθυλεν)ισονικιτινούδραζιδίου (**8**).



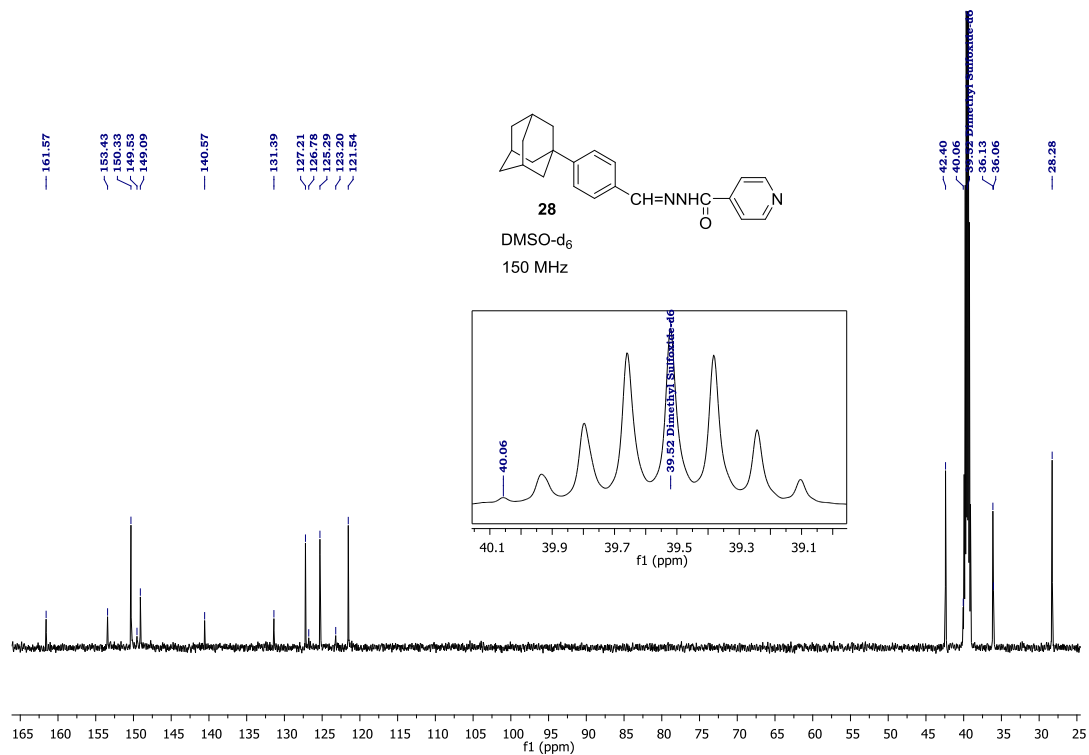
Εικόνα 29. Φάσμα ^1H -NMR του *N'*-(3-φαινυλο-1-αδαμαντ-1-υλ)μεθυλενοϊσονικτινοϋδραζιδίου (**22**).



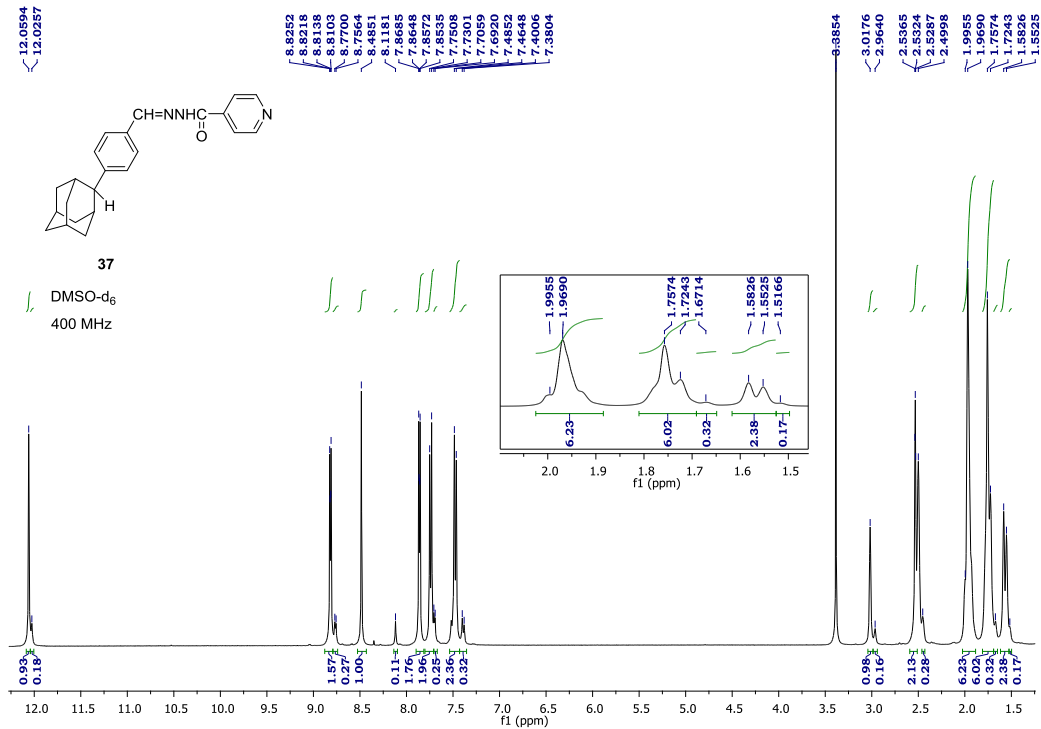
Εικόνα 30. Φάσμα ^{13}C -NMR του *N'*-(3-φαινυλο-1-αδαμαντ-1-υλ)μεθυλενοϊσονικτινοϋδραζιδίου (**22**).



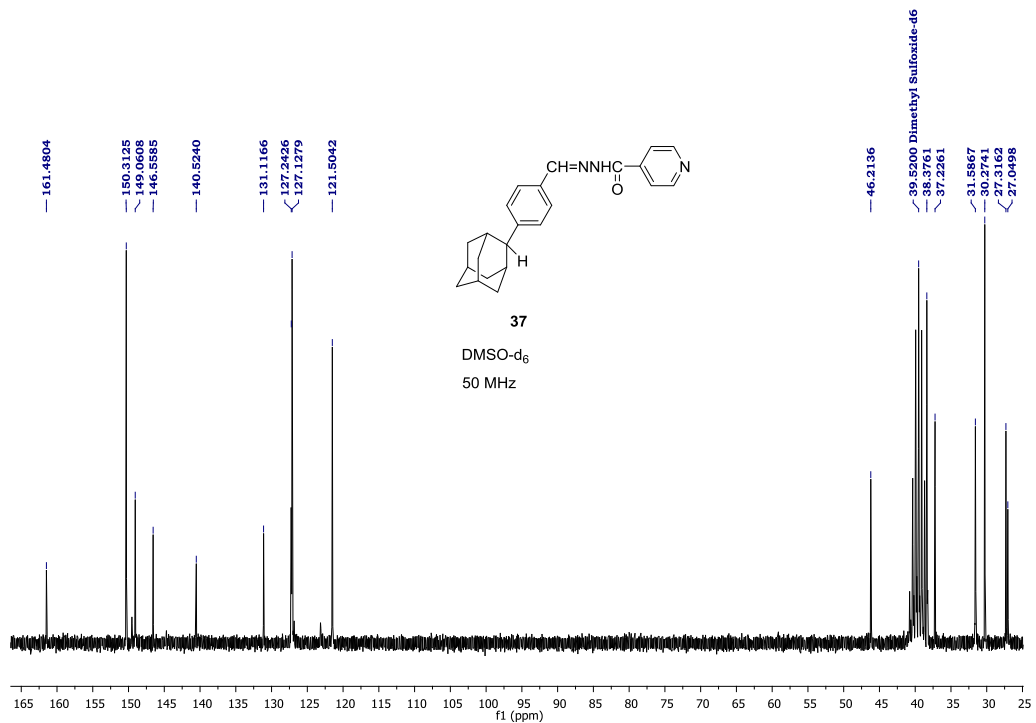
Εικόνα 31. Φάσμα ¹H-NMR του *N'*-(4-(αδαμαντ-1-υλο)βενζυλιδεν)ισονικωτινούδραζιδίου (**28**).



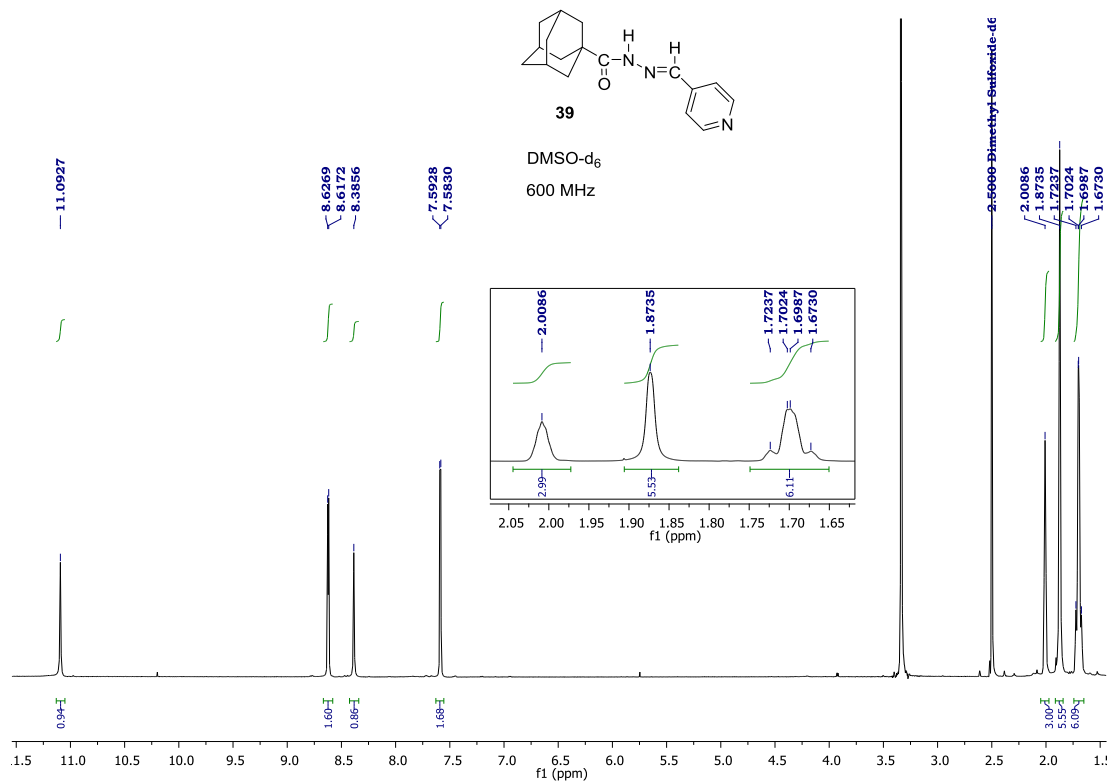
Εικόνα 32. Φάσμα ¹³C-NMR του *N'*-(4-(αδαμαντ-1-υλο)βενζυλιδεν)ισονικωτινούδραζιδίου (**28**).



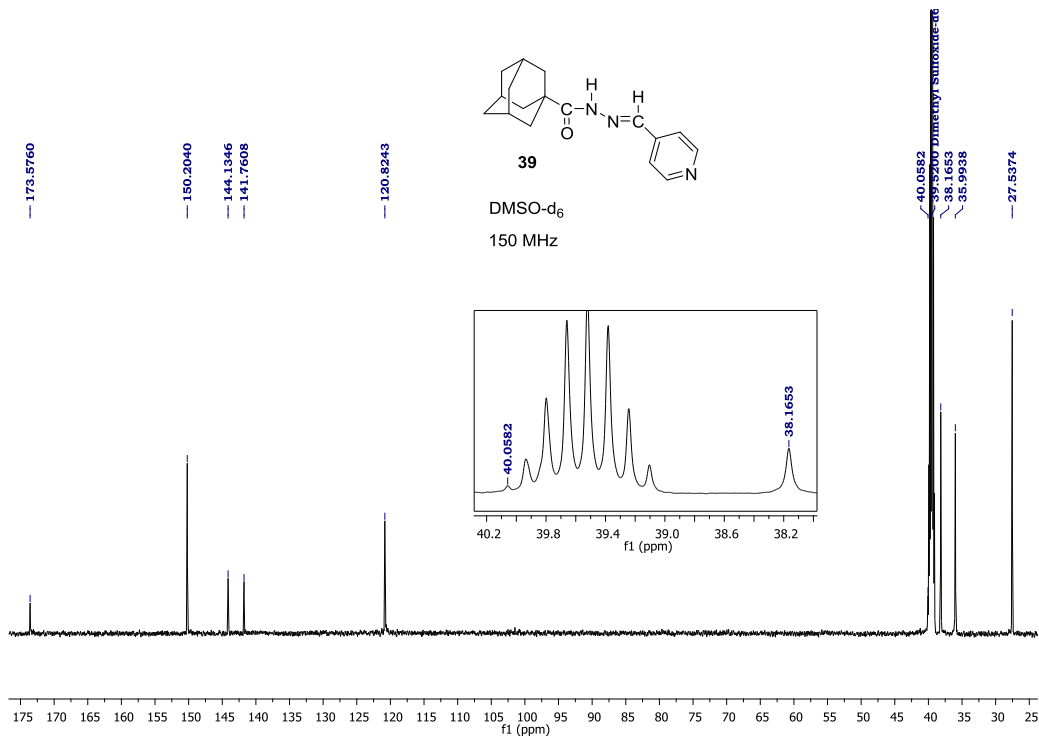
Εικόνα 33. Φάσμα ¹H-NMR του N'-(4-(Τρικυκλο[3.3.1.1^{3,7}]δεκ-2-υλ)βενζυλιδενο)-4-πυριдиноκαρβοϋδραζιδίου (**37**).



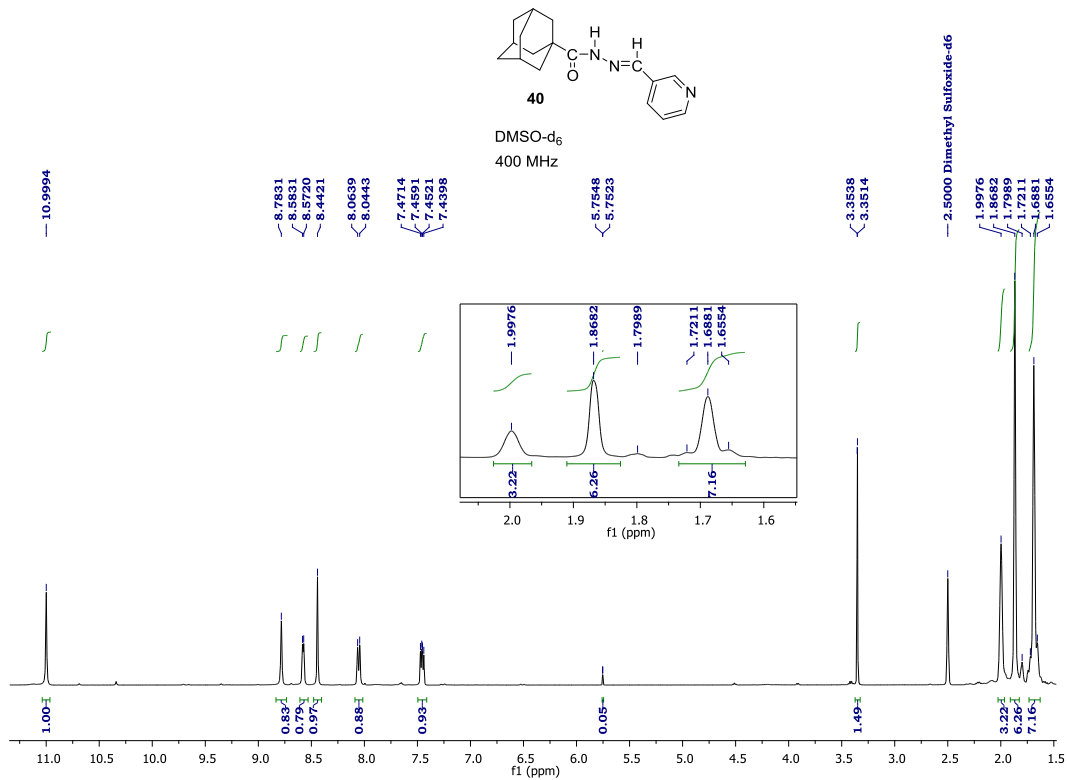
Εικόνα 34. Φάσμα ¹³C-NMR του N'-(4-(Τρικυκλο[3.3.1.1^{3,7}]δεκ-2-υλ)βενζυλιδενο)-4-πυριдиноκαρβοϋδραζιδίου (**37**).



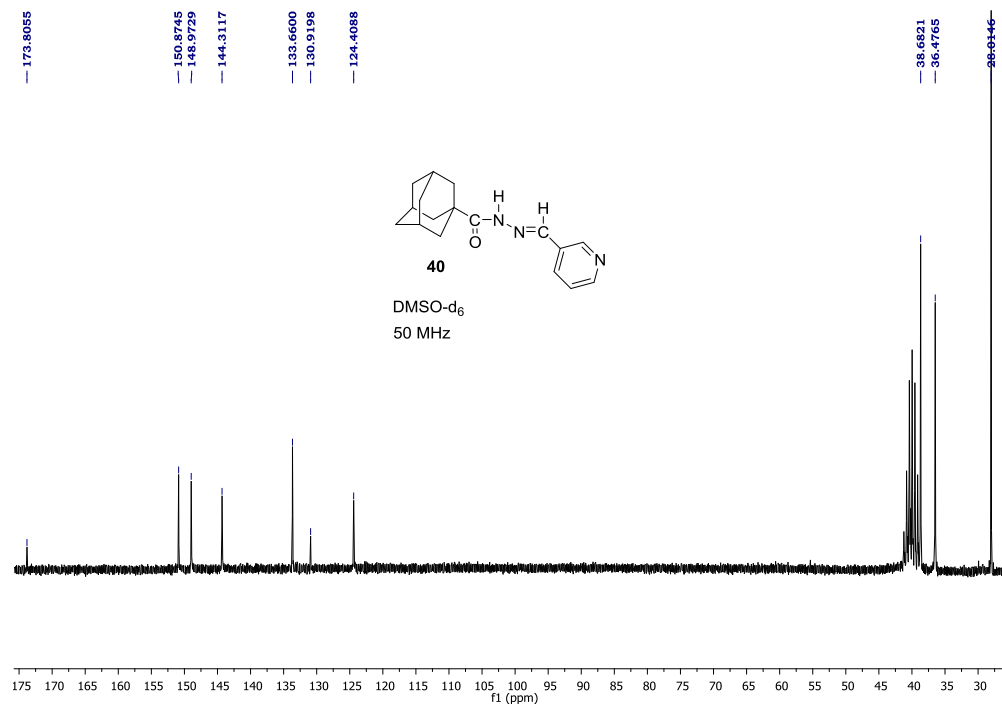
Εικόνα 35. Φάσμα ¹H-NMR του N'-((E)-πυριδιν-4-υλμεθυλενο)-1-τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκανοκαρβουϋδραζιδίου (**39**).



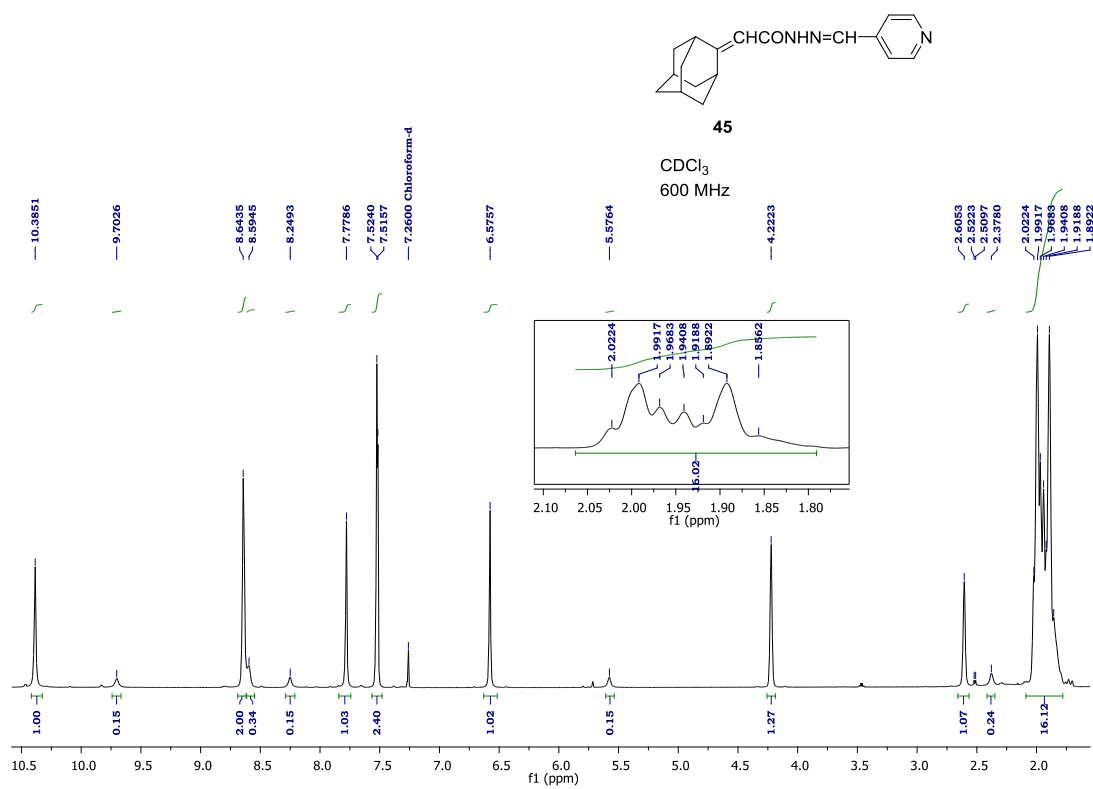
Εικόνα 36. Φάσμα ¹³C-NMR του N'-((E)-πυριδιν-4-υλμεθυλενο)-1-τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκανοκαρβουϋδραζιδίου (**39**).



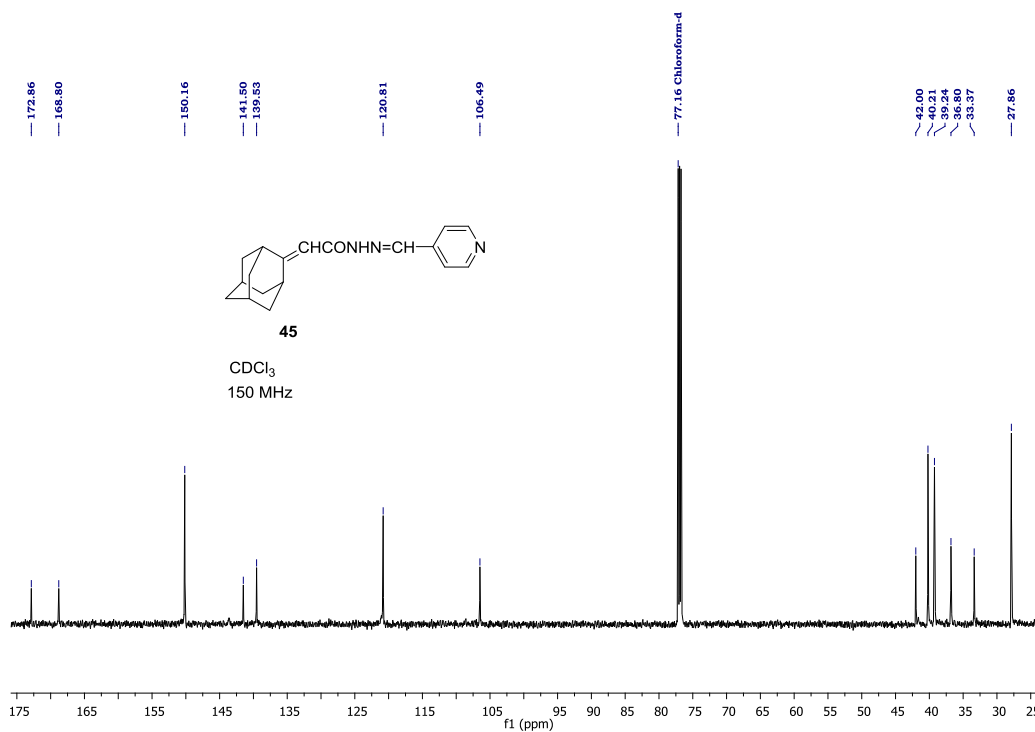
Εικόνα 37. Φάσμα ¹H-NMR του N'-(πυριδιν-3-υλμεθυλενο)-1-τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκανοκαρβοϋδραζιδίου (**40**).



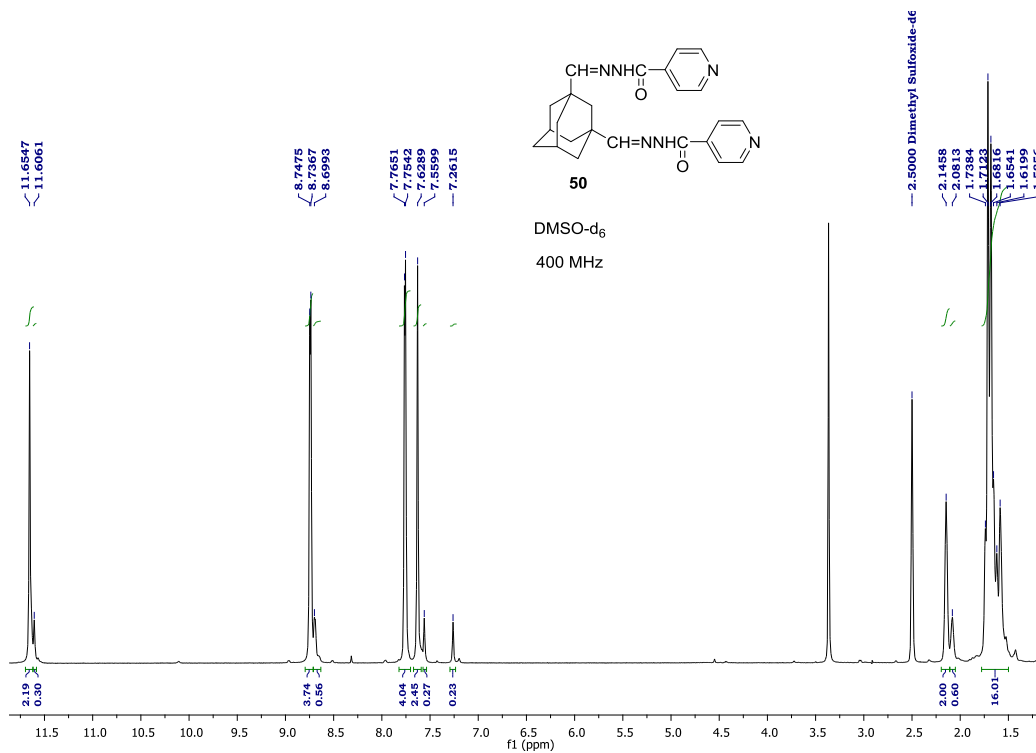
Εικόνα 38. Φάσμα ¹³C-NMR του N'-(πυριδιν-3-υλμεθυλενο)-1-τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκανοκαρβοϋδραζιδίου (**40**).



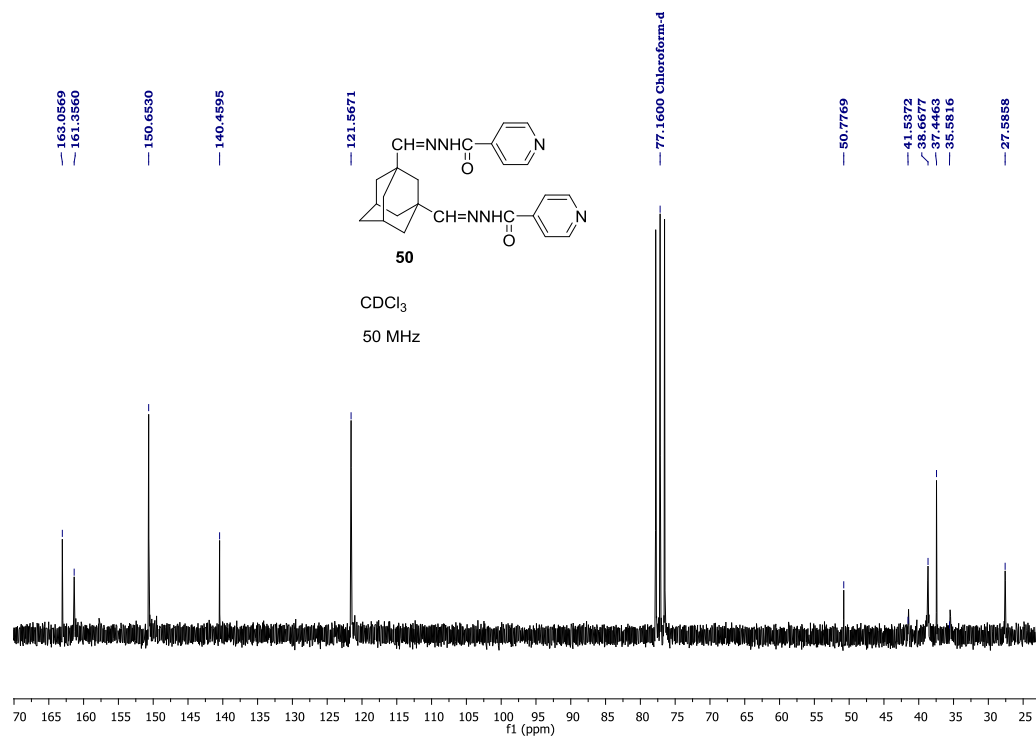
Εικόνα 39. Φάσμα ¹H-NMR του *N'*-(πυριδιν-4-υλομεθυλενο)τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκ-2-υλιδεν)ακετούδραζιδίου (**45**).



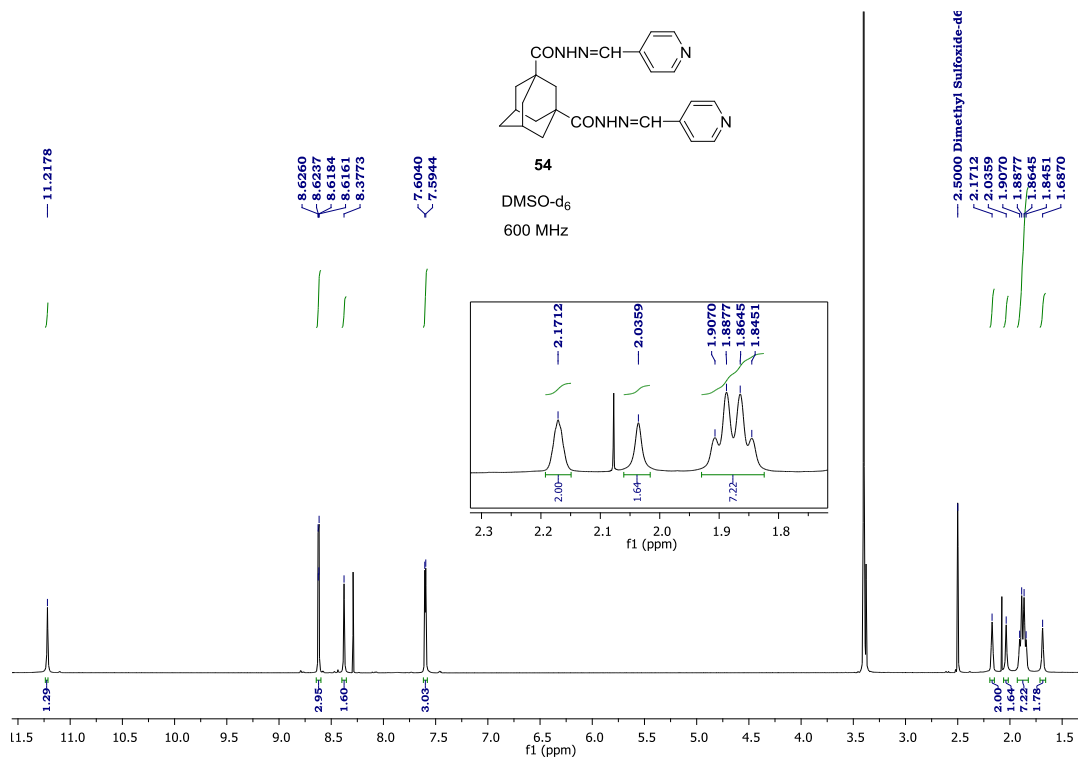
Εικόνα 40. Φάσμα ¹³C-NMR του *N'*-(πυριδιν-4-υλομεθυλενο)τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκ-2-υλιδεν)ακετούδραζιδίου (**45**).



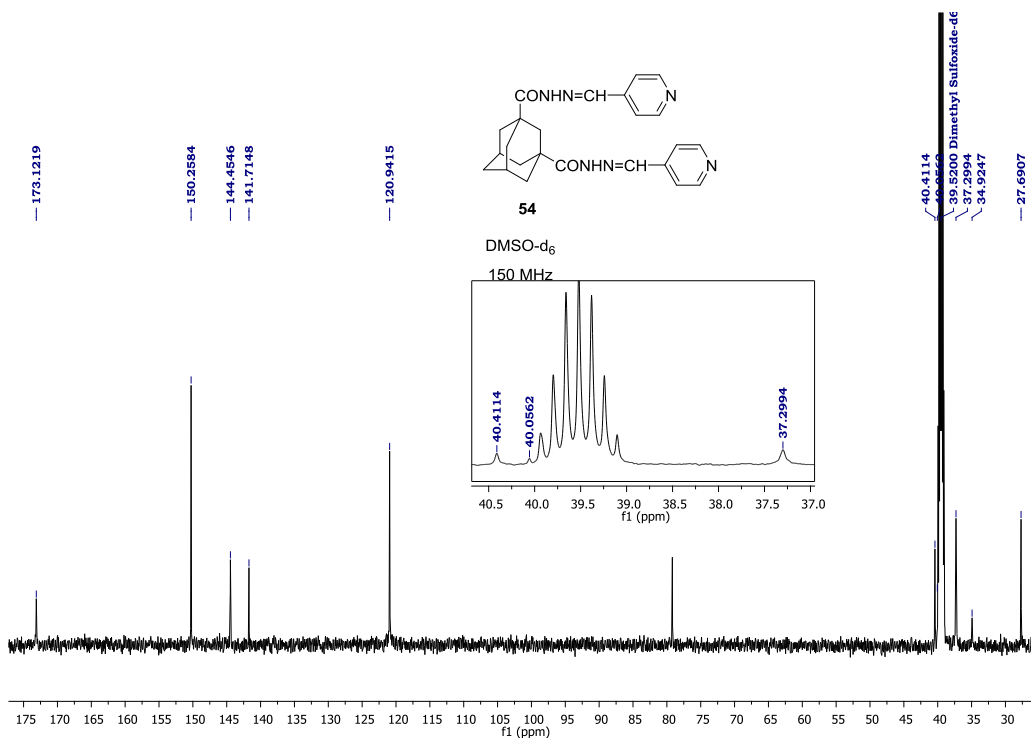
Εικόνα 41. Φάσμα ¹H-NMR του N²,N²¹-(1,3-Τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκανοδιμεθυλενο)δισ(4-πυριдиноκαρβουΐδραζιδίου) (**50**).



Εικόνα 42. Φάσμα ¹³C-NMR του N²,N²¹-(1,3-Τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκανοδιμεθυλενο)δισ(4-πυριдиноκαρβουΐδραζιδίου) (**50**).



Εικόνα 43. Φάσμα ¹H-NMR του (*E*) *N*²,*N*^{2'}-δι(4-πυριдиноμεθυλενο)-1,3-τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκανοδικαρβουδραζιδίου (**54**).



Εικόνα 44. Φάσμα ¹³C-NMR του (*E*) *N*²,*N*^{2'}-δι(4-πυριдиноμεθυλενο)-1,3-τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκανοδικαρβουδραζιδίου (**54**).

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Smith, I. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence, *Clin. Microbiol. Rev.* **2003**, *16*(3), 463-496.
2. Daniel, T. M. The history of tuberculosis, Elsevier, *Resp. Med.* **2006**, *100*, 1862-1870.
3. Heemskerk, D. ; Caws, D.; Marais, B.; Farrar, J.; Tuberculosis in Adults and Children, *SpringerBriefs in Public Health*, **2015**, *2*, 1-26.
4. Αντωνιάδης, Α.; Αντωνιάδης, Γ.; Λεγάκης, Ν.; Τσελέντης, Ι. Ιατρική Μικροβιολογία, *Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδη*, Αθήνα, **1999**.
5. Cole, E; Cook, C. Characterization of infectious aerosols in health care facilities: an aid to effective engineering controls and preventive strategies, *Am. J. Infect. Control.* **1998**, *26*(4), 453-64.
6. Zhang, M.; Sala, C.; Hartkoorn, R. C.; Dhar, N.; Mendoza-Losana, A.; Cole, S. T. Streptomycin-Starved *Mycobacterium tuberculosis* 18b, a Drug Discovery Tool for Latent Tuberculosis, *Antimicrob. Agents Ch.* **2012**, *56*(11), 5782-5789.
7. Fogel, N. Tuberculosis: A disease without boundaries, Elsevier, *Tuberculosis*, **2015**, *95*(5), 527-531.
8. Global Tuberculosis Report 2016, World Health Organization.
http://www.who.int/tb/publications/global_report/ (accessed Feb, 27, 2017).
9. Tang, J.; Yam, W. C.; Chen, Z. *Mycobacterium tuberculosis* infection and vaccine development, Elsevier, *Tuberculosis*, **2016**, *98*, 30-41.
10. Μανίκα, Κ. Η λανθάνουσα φυματίωση υπό το φως των νέων διεθνών οδηγιών, *Πνεύμων τρίμηνη ιατρική έκδοση*, **2015**, τεύχος 3.
11. Φώσκολος, Γ. Β.; Τσοτίνης, Α. Φαρμακευτική Χημεία Ι, *Εκδόσεις Συμμετρία*, **2011**, κεφ.4.
12. Zyl, L. van.; Plessis, J. du.; Viljoen, J. Cutaneous tuberculosis overview and current treatment regimens, Elsevier, *Tuberculosis*. **2015**, *95*, 629-638.
13. Πατάκας, Δ. Α. Επιτομή Πνευμονολογία, *University Studio Press*, **2006**, Κεφ.10, 118-150.
14. Harvey, R.A. Pharmacology. *Lippincott Illustrated Reviews*; 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, **2009**, 30-34.
15. Hanekom, W. A. ; Abel, B. ; Scriba, T. J. Immunological protection against tuberculosis *SAMJ*, **2007**, *97*(10).
<http://www.samj.org.za/index.php/samj/issue/view/11/showToc.htm> (accessed Feb 27, 2017).
16. http://www.pneumonologia.gr/articlefiles/20070307_Pathogeneia_ths_FYMATIOSHS.pdf (accessed Feb, 10, 2017).

17. Takayama, K.; Wang, C. ; Besra, G. S. Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*, *Cl. Microbiol. Rev.* **2005**, 81-101.
18. Fu, L. M.; Fu-Liu, C. S. Is *Mycobacterium tuberculosis* a closer relative to Gram- positive or Gram- negative bacterial pathogens?, *Tuberculosis*, **2002**, 82(2/3), 85-90.
19. Thanna, S.; Sucheck, S. J.; Targeting the trehalose utilization pathways of *Mycobacterium tuberculosis*, *Med. Chem. Commun.* **2015**.
20. Brennan, P.J. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*, Elsevier, *Tuberculosis*. **2003**, 83, 91-97.
21. Groenewald, W.; Baird, M. S.; Verschoor, J. A.; Minnikin, D. E.; Croft, A. K. Differential spontaneous folding of mycolic acids from *Mycobacterium tuberculosis*, *Chem. Phys. Lipids*, **2014**, 180, 15-22.
22. Jackson, M.; Stadthagen. G.; Gicquel, B. Long-chain multiple methyl-branched fatty acid-containing lipids of *Mycobacterium tuberculosis*: Biosynthesis, transport, regulation and biological activities, *Tuberculosis*, **2007**, 87, 78-86.
23. Katzung, B. G. Βασική και Κλινική Φαρμακολογία, Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης 9η Έκδοση, **2009**, 43-47.
24. Favrot, L.; Ronning, D. R. Targeting the mycobacterial envelope for tuberculosis drug development, *Expert Rev Anti-Infe.* **2012**, 10, 1023–1036
25. C.S.B. Lambregts-van Weezenbeek, J. Veen, Control of drug-resistant tuberculosis, *Tubercle Lung Dis.* **1995**, 76, 455-459.
26. Weldegebreel, S.; Mebrahtu, T. Anti-tuberculosis drug resistance in Ethiopia: systematic review, *Int. J. Tuberc. Lung.* **2017**, 21(1), 18–22.
27. World Health Organization. WHO report 2011: global tuberculosis control. WHO/HTM/TB/2011.16. Geneva, Switzerland, **2011**.
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44728/1/9789241564380_eng.pdf (accessed Apr, 19, 2017)
28. Petkova, Z.; Valcheva, V.; Momekov, G.; Petrov, P.; Dimitrov, V.; Doytchinova, I.; Stavrakov, G.; Stoyanova, M. Antimycobacterial activity of chiral aminoalcohols with camphane scaffold, *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 81, 150-157.
29. Huaman, M.A.; Brawley, R.; David Ashkin, D. Multidrug-resistant tuberculosis in transplant recipients: Case report and review of the literature, doi: 10.1111/tid.12672
30. Tuberculosis management, https://en.wikipedia.org/wiki/Tuberculosis_management (accessed Feb 27, 2017)
31. <http://www2.keelpno.gr/blog/?p=678> (accessed Feb 27, 2017)
32. Πολυζωγόπουλος Δ., Πολυχρονόπουλος Β. Κλινική Πνευμονολογία. Δεύτερη έκδοση, τόμος Β, εκδόσεις Πασχαλίδη **2005**, σελ: 1798 και 1804

33. W. Li, A. Obregón-Henao, J.B. Wallach, E. J. North, R. E. Lee, M. Gonzalez-Juarrero, D. Schnappinger and M. Jackson, Therapeutic potential of the Mycobacterium tuberculosis mycolic acid transporter, MmpL3, *Antimicrob. Agents Ch.* **2016**, *60(9)*, 5, 198-207.
34. Martins, F.; Santos, S.; Ventura C.; Elvas-Leitão, R.; Santos, L.; Vitorino, S.; Reis, M.; Miranda, V.; Correia, H.F.; Aires-de-Sousa J.; Kovalishyn, V.; Latino D.A.; Ramos, J.; Viveiros, M. Design, synthesis and biological evaluation of novel isoniazid derivatives with potent antitubercular activity, *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *81*, 119-138.
35. Tomioka, H.; Tatano, Y.; Yasumoto, K.; Shimizu T. Recent advances in antituberculous drug development and novel drug targets, *Expert Review of Respiratory Medicine*, **2008** , *2(4)*, 455-471.
36. Villemagne, B.; Crauste, C.; Flipo, M.; Baulard, A.R.; Déprez, B.; Willand, N. Tuberculosis: the drug development pipeline at a glance, *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *51*, 1-16.
37. Zumla, A.; Nahid, P.; Cole, S.T. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment against regimens, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 388-404.
38. Rawat, D. S. Antituberculosis Drug Research: A Critical Overview. *Med. Res. Rev.* [Online] **2012**, *00*, No.00, 1-72. DOI: 10.1002/med.21262 Wiley Online Library: wileyonlinelibrary.com (accessed Feb 27, 2017)
39. Bernstein, J.; Lott, W.A.; Steinberg, B.A.; Yale, H.L. Chemotherapy of experimental tuberculosis. V. Isonicotinic acid hydrazide (nydrazid) and related compounds. *Am. Rev. Tuberc.* **1952**, *65*, 357–364.
40. Fox, H.H. The chemical approach to the control of tuberculosis, *Science*, **1952**, *116*, 129–134
41. Sensi, P. History of the development of rifampin, *Rev. Infect. Dis.* **1983**, *5*, S402-S406.
42. Hammam, E.; Beltagi, A.M.; Ghoneim, M.M. Voltammetric assay of rifampicin and isoniazid drugs, separately and combined in bulk, pharmaceutical formulations and human serum at a carbon paste electrode. *Microchem. J.* **2004**, *77*, 53-62.
43. Yeager, R.L.; Munroe, W.G.C.; Dessau F.I. Pyrazinamide (aldinamide) in the treatment of pulmonary tuberculosis, *Am. Rev. Tuberc.* **1952**, *65*, 523-546.
44. Kushner, S.; Dalalian, H.; Sanjurjo J.L.; Bach, F.L.; Safir, S.R.; Jr.; Smith, V.K.; Jr.; William, J.H. Experimental chemotherapy of tuberculosis: II. The synthesis of pyrazinamides and related compounds, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 3617-3621.
45. Steele, M.A.; Des Prez, R.M.; The role of pyrazinamide in tuberculosis chemotherapy, *Chest*, **1988**, *94*, 845-850.
46. Sheen, P.; Ferrer, P.; Gilman R.H.; Lopez-Llano, J.; Fuentes, P.; Valencia, E.; Zimic, M.J. Effect of pyrazinamidase activity on pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis, *Tuberculosis*, **2009**, *89*, 109-113.
47. O'Brien, R.J.; Nunn, P.P. The need for new drugs against tuberculosis. Obstacles, opportunities and next steps. *Am. J. Resp. Crit. Care.* **2001**, *163*, 1055-1058.

48. Barry, P.J.; O'Connor T.M.; Novel agents in the management of *Mycobacterium tuberculosis* disease. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 2000-2008.
49. De Rosa, M.; Gising, J., Odell, L.R.; Larher, M. Syntheses of new tuberculosis inhibitors promoted by microwave irradiation, *Uppsala J. Med. Sci.* **2014**, *119*, 181-191.
50. Dartois, V.; Barry, C.E. Clinical pharmacology and lesion penetrating properties of second- and third-line antituberculous agents used in the management of multidrug-resistant (MDR) and extensively-drug resistant (XDR) tuberculosis, *Curr. Clin. Pharmacol.* **2010**, *5*, 96-114.
51. Murray, C.J.; DeJonghe, E.; Chum, H.J.; Nyangulu, D.S.; Salomao, A.; Styblo, K. Cost effectiveness of chemotherapy for pulmonary tuberculosis in three sub-Saharan African countries, *Lancet*, **1991**, *338*, 1305-1308.
52. Jindani, A.; Nunn, A.J.; Enarson D.A. Two 8-month regimens of chemotherapy for treatment of newly diagnosed pulmonary tuberculosis: International multicentre randomised trial, *Lancet*, **2004**, *364*, 1244-1251.
53. Denholm, J.T.; McBryde, E.S. The use of antituberculosis therapy for latent TB infection, *Infect. Drug Resist.* **2010**, *3*, 63–72.
54. Ananthan, S.; Faaleolea, E.R.; Goldman, R.C.; Hobrath, J.V.; Kwong, C.D.; Laughon B.E.; Maddry, J.A.; Mehta, A.; Rasmussen, L.; Reynolds, R.C.; Secrist III J.A.; Shindo, N.; Showe, D.N., Sosa, M.I.; Suling, W.J.; White, E.L. High-throughput screening for inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Tuberculosis*, **2009**, *89*, 334–353.
55. World Health Organization, Tuberculosis-fact sheet no. 104, Geneva **2000**, 1–3.
56. Panda, G.; Parai, M.K.; Das; Shagufta, S.K.; Sinha, M.; Chaturvedi, V.; Srivastava, A.K.; Manju, Y. S.; Gaikwad, A.N.; Sinha, S. Effect of substituents on diarylmethanes for antitubercular activity, *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42*, 410-419.
57. Kamachi, S.; Hirabayashi, K.; Tamoi, M.; Shigeoka, S.; Tada, T.; Wada, K. Crystal structure of the catalase-peroxidase KatG W78F mutant from *Synechococcus elongatus* PCC7942 in complex with the antitubercular pro-drug isoniazid, Elsevier, *FEBS Lett.* **2015**, *589*, 131–137.
58. Zhang, Y.; Heym, B.; Allen, B.; Young, D.; Cole, S. The Catalase-Peroxidase Gene and Isoniazid Resistance of *Mycobacterium Tuberculosis*, *Nature* **1992**, *358*, 591–593.
59. Rozwarski, D.A.; Grant, G.A.; Barton, D.H.; Jacobs Jr. W.R.; Sacchettini, J.C. Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*, *Science*, **1998**, *279*, 98–102.
60. Rawat, R.; Whitty, A; Tonge, P.J. The isoniazid-NAD adduct is a slow, tight-binding inhibitor of InhA, the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase: adduct affinity and drug resistance, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 13881–13886.

61. Bardou, F.; Raynaud, C.; Ramos, C.; Laneelle, M.A.; Laneelle, G. Mechanism of isoniazid uptake in *Mycobacterium tuberculosis*, *Microbiology*, **1998**, *144*, 2539-2544.
62. Sarathy, J.P.; Dartois, V.; Deon Lee E.J. The Role of Transport Mechanisms in *Mycobacterium Tuberculosis* Drug Resistance and Tolerance, *Pharmaceuticals*, **2012**, *5*, 1210-1235.
63. Njuma, O. J.; Ndontsa, E. N.; Goodwin, D. C. Catalase in Peroxidase Clothing: Interdependent Cooperation of Two Cofactors in the Catalytic Versatility of KatG. *Arch. Biochem. Biophys.* **2014**, *544*, 27–39.
64. Wakamoto, Y.; Dhar, N.; Chait, R.; Schneider, K.; Signorino-Gelo, F.; Leibler, S.; McKinney, J. D. Dynamic persistence of antibiotic-stressed mycobacteria, *Science*, **2013**, *339*, 91–95.
65. Vidossich, P.; Loewen, P. C.; Carpena, X.; Fiorin, G.; Fita, I.; Rovira, C. Binding of the Antitubercular Pro-Drug Isoniazid in the Heme Access Channel of Catalase-Peroxidase (KatG). A Combined Structural and Metadynamics Investigation, *J. Phys. Chem. B.* **2014**, *118*, 2924–2931.
66. Cade, C. E.; Dlouhy, A. C.; Medzihradzky, K. F.; Salas-Castillo, S. P.; Ghiladi, R. A. Isoniazid-Resistance Conferring Mutations in *Mycobacterium Tuberculosis* KatG: Catalase, Peroxidase, and INHNADH Adduct Formation Activities, *Protein Sci.* **2010**, *19*, 458–474.
67. Rouse, D. A.; DeVito, J. A.; Li, Z. M.; Byer, H.; Morris, S. L. Site- Directed Mutagenesis of the KatG Gene of *Mycobacterium Tuberculosis*: Effects on Catalase-Peroxidase Activities and Isoniazid Resistance. *Mol. Microbiol.*, **1996**, *22*, 583-592.
68. Saint-Joanis, B.; Souchon, H.; Wilming, M.; Johnsson, K.; Alzari, P. M.; Cole, S. T. Use of Site-Directed Mutagenesis to Probe the Structure, Function and Isoniazid Activation of the Catalase/Peroxidase, KatG, from *Mycobacterium Tuberculosis*, *Biochem. J.* **1999**, *338*, 753-760.
69. Rattan, A.; Kalia, A.; Ahmad, N. Multidrug-Resistant *Mycobacterium Tuberculosis*: Molecular Perspectives. *Emerg. Infect. Dis.* **1998**, *4*, 195-209.
70. Yu, S.; Giroto, S.; Lee, C.; Magliozzo, R. S. Reduced Affinity for Isoniazid in the S315T Mutant of *Mycobacterium Tuberculosis* KatG is a Key Factor in Antibiotic Resistance, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 14769-14775.
71. Heym, B.; Alzari, P. M.; Honore, N.; Cole, S. T. Missense Mutations in the Catalase-Peroxidase Gene, katG, are Associated with Isoniazid Resistance in *Mycobacterium Tuberculosis*, *Mol. Microbiol.* **1995**, *15*, 235–245.
72. Auclair, C.; Torres, M.; Hakim, J. Superoxide Anion Involvement in NBT Reduction Catalyzed by NADPH-Cytochrome P-450 Reductase: A Pitfall, *FEBS Lett.* **1978**, *89*, 26-28.

73. Singh, R.; Wiseman, B.; Deemagarn, T.; Donald, L.J.; Duckworth, H.W.; Carpena, X.; Fita, I.; Loewen, P.C. Catalase-peroxidases (KatG) Exhibit NADH Oxidase Activity, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, *41*, 43098-43106.
74. https://en.wikipedia.org/wiki/NADPH_oxidase (last accessed Apr, 01, 2017)
75. Yamazaki, I.; Yokota, K. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **1965**, *19*, 249-254.
76. Yamazaki, I.; Yokota, K.; Nakajima, R. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **1965**, *21*, 582-586.
77. Wilming, M.; Johnsson, K. Spontaneous Formation of the Bioactive Form of the Tuberculosis Drug Isoniazid, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2588-2590.
78. Timmins, G. S.; Deretic, V. Mechanisms of Action of Isoniazid, *Mol. Microbiol.* **2006**, *62*, 1220-1227.
79. Brennan, P.J.; Nkado, H. The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 29-63; Lee, R.E. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1996**, *215*, 1-27.
80. Vilchèze, C.; Jacobs W.R. Jr. The mechanism of isoniazid killing: clarity through the scope of genetics, *Annu. Rev. Microbiol.* **2007**, *61*, 35-50.
81. Naveen Kumar, H.S.; Parumasivam, T.; Ibrahim, P.; Asmawi, M.Z.; Sadikum A. Synthesis of hydrophobic N-acylated isonicotinic acid hydrazide derivatives as potential enoyl-acyl carrier protein reductase (InhA) inhibitors, *Med. Chem. Res.* **2014**, *23*, 1267-1277.
82. Bhatt, A.; Molle, V.; Besra, G.S.; Jacobs, W.R. Jr, Kremer, L. The *Mycobacterium Tuberculosis* FAS-II condensing enzymes: their role in mycolic acid biosynthesis, acid-fastness, pathogenesis and in future drug development, *Mol. Microbiol.* **2007**, *64*(6), 1442-1454.
83. Quémard, A.; Sacchettini, J. C.; Dessen, A.; Vilcheze, C.; Bittman. R.; Jacobs, W. R.; Jr, Blanchard, J. S. Enzymatic characterization of the target for isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*, *Biochemistry*, **1995**, *34*, 8235.
84. Singh, R.; Wiseman, B.; Deemagarn, T.; Jha, V.; Switala, J.; Loewen, P.C. *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, *471*, 207-214.
85. Switala, J.; Loewen, P.C. *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, *401*, 145-154.
86. Yamada, Y.; Fujiwara, T.; Sato, T.; Igarashi, N.; Tanaka, N. *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 691-695.
87. Triggs-Raine, B.L.; Doble, B.W.; Mulvey, M.R.; Sorby, P.A.; Loewen, P.C. Nucleotide sequence of katG, encoding catalase HPI of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* **1988**, *170*(9), 4415-4419.
88. Welinder, K. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1992**, *2*, 388-393.
89. Welinder, K.G. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1080*, 215-220.
90. Welinder K.G.; Mauro, J.M.; Norskov-Lauritsen, L. *Biochem. Soc. T.* **1992**, *20*, 337-340.
91. P.C. Loewen, *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, **1997**, New York.
92. Goodin, D.B.; McRee, D.E. *Biochemistry* **1993**, *32*, 3313-3324.

93. Bellei, M.; Jakopitsch, C.; Battistuzzi, G.; Sola M.; Obinger, C. *Biochemistry*, **2006**, *45*, 4768-4774.
94. Zamocky, M.; Furtmuller, P.G.; Bellei, M.; Battistuzzi, G.; Stadlmann J., Vlasits, J.; Obinger, C. Intracellular catalase/peroxidase from the phytopathogenic rice blast fungus *Magnaporthe grisea*: expression analysis and biochemical characterization of the recombinant protein. *Biochem. J.* **2009**, *418*, 443-451.
95. Zamocky, M.; Droghetti, E.; Bellei, M.; Gasselhuber, B.; Pabst, M.; Furtmuller, P.G.; Battistuzzi, G.; Smulevich, G.; Obinger, C. *Biochimie* **2012**, *94*, 673–683.
96. Wengenack, N.L.; Lopes, H.; Kennedy, M.J.; Tavares, P.; Pereira, A.S.; Moura, I.; Moura, J.J.; Rusnak, F. *Biochemistry*, **2000**, *39*, 11508-11513.
97. Finzel, B.C.; Poulos, T.L.; Kraut, J., *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 13027–13036.
98. Zhao, X.; Yu, H.; Yu, S.; Wang, F.; Sacchettini, J.C.; Magliozzo, R.S. *Biochemistry*, **2006**, *45*, 4131-4140.
99. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.6.0.0 Schrödinger, LLC.
100. Svistunenko, D.A.; Worrall, J.A.; Chugh, S.B.; Haigh, S.C.; Ghiladi, R.A.; Nicholls, P. *Biochimie*, **2012**, *94*, 1274-1280.
101. Heering, H.A.; Indiani, C.; Regelsberger, G.; Jakopitsch, C.; Obinger, C.; Smulevich, G. *Biochemistry*, **2002**, *41*, 9237-9247.
102. Ivancich, A.; Jakopitsch, C.; Auer, M.; Un, S.; Obinger, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14093-14102.
103. Kapetanaki, S.; Chouchane, S.; Giroto, S.; Yu, S.; Magliozzo, R.S.; Schelvis, J.P. *Biochemistry*, **2003**, *42*, 3835-3845.
104. Marcinkeviciene, J.A.; Magliozzo, R.S.; Blanchard, J.S. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 22290-22295.
105. Johnsson, K.; Froland, W.A.; Schultz, P.G. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 2834-2840.
106. Youn, H.D.; Yim, Y.I.; Kim, K.; Hah, Y.C.; Kang, S.O.; *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 13740-13747.
107. Cendrin, F.; Jouve, H.M.; Gaillard, J.; Thibault, P.; Zaccai, G. *Biochim. Biophys. Acta*, **1994**, *1209*, 1-9.
108. Wengenack, N.L.; Todorovic, S.; Yu, L.; Rusnak, F. *Biochemistry*, **1998**, *37*, 15825-15834.
109. Chouchane, S.; Giroto, S.; Kapetanaki, S.; Schelvis, J.P.; Yu, S.; Magliozzo, R.S. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 8154–8162.
110. Jakopitsch, C.; Ivancich, A.; Schmuckenschlager, F.; Wanasinghe, A.; Poltl, G.; Furtmuller, P.G.; Ruker, F.; Obinger, C. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 46082–46095.
111. Jakopitsch, C.; Vlasits, J.; Wiseman, B.; Loewen, P.C.; Obinger, C. *Biochemistry*, **2007**, *46*, 1183-1193.
112. Wiseman, B.; Colin, J.; Smith, A.T.; Ivancich, A.; Loewen, P.C. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2009**, *14*, 801-811.

113. Dunford, H.B. Heme Peroxidases, Wiley-VCH, New York, **1999**, 18-111.
114. Poulos, T.L.; Kraut, J. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 8199-8205.
115. Derat, E.; Shaik, S.; Rovira, C.; Vidossich, P.; Alfonso-Prieto, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6346–6347.
116. Vidossich, P.; Alfonso-Prieto, M.; Carpena, X.; Fita, I.; Loewen, P.C.; Rovira, C. *Arch. Biochem. Biophys.* **2010**, *500*, 37–44.
117. Ranguelova, K.; Suarez, J.; Metlitsky, L.; Yu, S.; Brejt, S.Z.; Zhao, L.; Schelvis, J.P.; Magliozzo, R.S. *Biochemistry*, **2008**, *47*, 12583-12592.
118. Zhao, X.; Suarez, J.; Khajo, A.; Yu, S., Metlitsky, L.; Magliozzo R. S., A radical on the Met-Tyr-Trp modification required for catalase activity in catalase-peroxidase is established by isotopic labeling and site-directed mutagenesis, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132(24)*, 8268-8269
119. Lei, B.; Wei, C.J.; Tu, S.C. *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275*, 2520-2526.
120. Amos, R.I.J.; Gourlay, B.S.; Schiesser, C.H.; Smith, J.A.; Yates, B.F. *Chem. Commun.* **2008**, 1695-1697.
121. Shoeb, H.A.; Bowman Jr., B.U.; Ottolenghi, A.C.; Merola, A.J.; *Antimicrob. Agents Ch.* **1985**, *27*, 399-403.
122. Wengenack, N.L.; Rusnak, F. *Biochemistry*, **2001**, *40*, 8990-8996.
123. Timmins, G.S.; Deretic V. Mechanisms of action of isoniazid, *Molecular Microbiology*, **2006**, *62(5)*, 1220-1227.
124. Nguyen, M.; Quemard, A.; Broussy, S.; Bernadou, J.; Meunier, B. Mn(III) pyrophosphate as an efficient tool for studying the mode of action of isoniazid on the InhA protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Ch.* **2002**, *46*, 2137-2144.
125. Broussy, S.; Coppel, Y.; Nguyen, M.; Bernadou, J.; Meunier, B. ¹H and ¹³C NMR characterization of hemiamidal isoniazid-NAD(H) adducts as possible inhibitors of InhA reductase of *Mycobacterium tuberculosis*, *Chemistry*, **2003**, *9*, 2034-2038.
126. Broussy, S.; Bernardes-Genisson, V.; Coppel, Y.; Quemard, A.; Bernadou, J.; Meunier, B. ¹H and ¹³C NMR characterization of pyridinium-type isoniazid-NAD adducts as possible inhibitors of InhA reductase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 670-673.
127. Wengenack, N.L.; Hoard, H.M.; Rusnak, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9748-9749.
128. Ghiladi, R.A.; Medzihradzsky, K.F.; Rusnak, F.M.; Ortiz de Montellano, P.R. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13428–13442.
129. Chouchane, S.; Lippai, I.; Magliozzo, R.S. *Biochemistry*, **2000**, *39*, 9975-9983.
130. Singh, R.; Switala, J.; Loewen, P.C.; Ivancich, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15954–15963.
131. Hazbon, M.H.; Brimacombe, M.; Bobadilla del Valle, M. ; Cavatore, M.; Guerrero, M.I.; Varma-Basil, M.; Billman-Jacobe, H.; Lavender, C.; Fyfe, J.; Garcia-Garcia L.; Leon, C.I.;

- Bose, M.; Chaves, F.; Murray, M.; Eisenach, K.D.; Sifuentes-Osornio, J.; Cave, M.D.; Ponce de Leon, A.; Alland, D. *Antimicrob. Agents Ch.* **2006**, *50*, 2640-2649.
132. Scior, T.; Meneses Morales, I.; Garces Eisele, S.J.; Domeyer, D.; Laufer, S. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2002**, *335*, 511-525.
133. Metcalfe, C.; Macdonald, I. K.; Murphy, E. J.; Brown, K. A.; Raven, E. L.; Moody, P. C. E. The Tuberculosis Prodrug Isoniazid Bound to Activating Peroxidases, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 6193-6200.
134. Zhao, X.; Yu, S.; Magliozzo, R. S. Characterization of the Binding of Isoniazid and Analogues to Mycobacterium Tuberculosis Catalase-Peroxidase. *Biochemistry*, **2007**, *46*, 3161-3170.
135. Pierattelli, R.; Banci, L.; Eady, N. A.; Bodiguel, J.; Jones, J. N.; Moody, P. C.; Raven, E. L.; Jamart-Gregoire, B.; Brown, K. A. Enzyme-Catalyzed Mechanism of Isoniazid Activation in Class I and Class III Peroxidases. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 39000-39009.
136. Zhao, X.; Hersleth, H. P.; Zhu, J.; Andersson, K. K.; Magliozzo, R. S. Access Channel Residues Ser315 and Asp137 in *Mycobacterium Tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG) Control Peroxidatic Activation of the Pro-Drug Isoniazid. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 11650-11652.
137. Gervasio, F. L.; Laio, A.; Parrinello, M. Flexible Docking in Solution Using Metadynamics, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2600-2607.
138. Limongelli, V.; Bonomi, M.; Marinelli, L.; Gervasio, F. L.; Cavalli, A.; Novellino, E.; Parrinello, M. Molecular Basis of Cyclooxygenase Enzymes (COXs) Selective Inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 5411-5416.
139. Narayana Swamy, B.; Suma, T.K.; Venkateswara Rao, G.; G. Chandrasekara Reddy, Synthesis of isonicotinoylhydrazones from anacardic acid and their in vitro activity against *Mycobacterium smegmatis*, *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42*, 420-424.
140. Machakanura, S.S.; Patila, B.R.; Pathana, A.H.; Naika, G.N.; Ligade b, S.G.; Gudasia, K.B. Synthesis, antimicrobial and antimycobacterial evaluation of star shaped hydrazones derived from 1,3,5-triazine. *Der Pharma Chemica*, **2012**, *4(2)*, 600-607.
141. Foss, M. H.; Pou, S.; Davidson, P.M.; Dunaj, J. L.; Winter, R. W.; Licon, M. H.; Doh, J. K.; Li, Y.; Kelly, J.X.; Dodean, R. A.; Koop, D.R.; Riscoe, M.K.; Purdy, G.E. Diphenylether-Modified 1,2-Diamines with Improved Drug Properties for Development against *Mycobacterium tuberculosis*, *ACS Infect. Dis.*, **2016**, *2(7)*, 500-508.
142. Protopopova, M.; Hanrahan, C.; Nikonenko, B.; Samala, R.; Chen, P.; Gearhart, J.; Einck, L.; Nacy, C.A. Identification of a new antitubercular drug candidate, SQ109, from a combinatorial library of 1,2-ethylenediamines, *J. Antimicrob. Chemoth.* **2005**, *56*, 968-974.

143. Lee, R.E.; Protopopova, M.; Crooks, E.; Slayden, R.A.; Terrot, M.; Barry, C.E. Combinatorial lead optimization of [1,2]-diamines based on ETH as potential anti-tuberculosis preclinical candidates, *J. Comb. Chem.* **2003**, *5*, 172-187
144. Jia, L.; Coward, L.; Gorman, G. S.; Noker, P. E.; Tomaszewski, J. E. Pharmacoproteomic effects of isoniazid, ethambutol, and N-geranyl-N-(2-adamantyl)ethane-1,2-diamine (SQ109) on *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *315*, 905-911.
145. Chen, P.; Gearhart, J.; Protopopova, M.; Einck, L.; Nacy, C.A. Synergistic interactions of SQ109, a new ethylene diamine, with front-line antitubercular drugs in vitro, *J. Antimicrob. Ch.* **2006**, *58*, 332-337.
146. Foscolos, A.S.; Papanastasiou, I.; Tsotinis, A.; Kolocouris, N.; Foscolos, G.B.; Vocat, A.; Cole, S.T. Synthesis of Adamantane Aminoethers with Antitubercular Potential, *Med. Chem.* **2017**, *13(8)*, 1-12.
147. Vlachou, M.; Siamidi, A.; Diamantidi, E.; Iliopoulou, A.; Papanastasiou, I.; Ioannidou, V.; Kourbeli, V.; Foscolos, A.S.; Vocat, A.; Cole, S.T.; Karalis, V.; Kellici, T.; Mavromoustakos, T. In Vitro Controlled Release from Solid Pharmaceutical Formulations of two new Adamantane Aminoethers with Antitubercular Activity, *Drug. Res.* **2017**, *67*, 1-4.
148. Hearn, M.J.; Cynamon, M.H. Design and synthesis of antituberculars: preparation and evaluation against *Mycobacterium tuberculosis* of an isoniazid Schiff base, *J. Antimicrob. Ch.* **2004**, *53*, 185-191.
149. Rastogi, N.; Goh, K.S. Action of 1-isonicotinyl-2-palmitoyl hydrazine against the *Mycobacterium avium* complex and enhancement of its activity by m-fluorophenylalanine, *Antimicrob. Agents Ch.* **1990**, *34*, 2061-2064.
150. Rastogi, N.; Moreau, B.; Capmau, M.L.; Goh, K.S.; David, H. Antibacterial action of amphipathic derivatives of isoniazid against the *Mycobacterium avium* complex, *Zentralbl. Bakteriол. Mikrobiol. Hyg.* **1988**, *268*, 456-462.
151. Stetter, H.; Schwarz, M.; Hirschhorm, A. Monofunktionelle Adamantan-Derivate, *Chem. Ber.* **1959**, *92*, 1629-1635.
152. Ταταρίδης, Δ. Σύνθεση αζωτούχων ετεροκυκλικών παραγώγων του αδαμαντανίου χημειοθεραπευτικού ενδιαφέροντος, Διδακτορική Διατριβή, **2000**.
153. Takeuchi, K.; Kitagawa, I.; Akiyana, F.; Shibata, T.; Kato, M.; Okamoto, K. Ring-expansion of bridgehead aldehyde with 1-adamantanebarbonyl cation or benzoyl trifluoromethanesulfonate: A new route to bicyclic and tricyclic 1,2-diols, *Synthesis*, **1987**, 612-614.
154. Foscolos, G. B.; Vamvakides, A.; Fytas, G.; Kolocouris, N. Synthèse et étude pharmacologique de quelques adamantylcyclopentanamines, *Eur. J. Med. Chem.* **1991**, *26*, 563-566.

155. Fytas, G.; Marakos, P.; Kolocouris, N.; Foscolos, G. B.; Pouli, N.; Vamvakides, A.; Ikeda, S.; De Clercq, E. 3-Cyclopentyl-1-adamantanamines and adamantanemethanamines. Antiviral activity evaluation and convulsions studies, *Il Farmaco*, **1994**, 641-647.
156. Kontonassios, D.; Sandris, G.; Tsatsas, G. *J. Med. Chem.* **1969**, *12*, 170
157. Koch, H.; Haaf, W. *Angew Chem.* **1960**, *72*, 628.
158. Stetter, H.; Mayer, J. Über Verbindungen mit Urotropin-Struktur, XXI. Herstellung und Eigenschaften von in 3-Stellung substituierten Adamantan-carbonsäuren-(1), *Chem. Ber.* **1962**, 66-672.
159. Koperniku, A.; Foskolos, A. S.; Papanastasiou, I.; Foscolos, G. B.; Tsotinis, A.; Schols, I. 4-(1-Adamantyl)phenylalkylamines with Potential Antiproliferative Activity, *Lett. Org. Chem.* **2016**, *13(3)*, 171-176.
160. Corey, E. J.; Chaykovsky, M. Dimethylsulfoxonium Methylide, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 866-867.
161. House, H. O. The Acid-catalyzed Rearrangement of the Stilbene Oxides, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 3070-3075.
162. Reif, D. J.; House, O. H., Diphenylacetaldehyde, *Org. Synth.* **1963**, Coll. Vol. IV, 375.
163. Fărcașiu, D. Synthesis of 2-epoxymethyleneadamantans and adamantane-2-carboxylic acid, *Synthesis*, **1972**, 615-616.
164. Erokhina, E. V.; Shokova, E.A.; Luzikov, Y. N.; Kovalev, V. V. Dichlorophosphorylation of adamantanol and 1-adamantylcarbinols in trifluoroacetic acid, *Synthesis*, **1995**, *7*, 851-854.
165. Papanastasiou, I.; Riganas, S.; Foscolos, G. B.; Tsotinis, A.; Akhtarb, S. A.; Khanb, M. A.; Rahmanb, K. M.; Thurstonb, D. E., Synthesis and Cytotoxicity of 4-(2-Adamantyl)phenylalkylamines, *Lett. Org. Chem.* **2015**, *12*, 319-323.
166. Foscolos, A. S.; Papanastasiou, I.; Foscolos, G. B.; Tsotinis, A.; Kellici, T. F.; Mavromoustakos, T.; Taylor, M. C.; Kelly, J. M. New hydrazones of 5-nitro-2-furaldehyde with adamantanealkanohydrazides: synthesis and *in vitro* trypanocidal activity. *Med. Chem. Commun.* **2016**, *7*, 1229-1236.
167. Stetter, H.; Ruschen, E. I., Zur Kenntnis des β -[Adamanyl-(1)]- β -oxopropionsäure äthylesters, *Chem. Ber.* **1960**, *93*, 2054-2057.
168. Narayanan, V. L.; Setescak, L. Synthesis of 1-methyladamantano[1,2-b]pyrrolidine, a novel heterocyclic system, *J. Org. Chem.* **1971**, *36(26)*, 4127-4129.
169. Zhang, X.; Breslav, M.; Grimm, J.; Guan, K.; Huang, A.; Liu, F.; Maryanoff, C. A.; Palmer, D.; Patel, M.; Qian, Y.; Shaw, C.; Sorgi, K.; Stefanick, S.; Xu, D., A New Procedure for Preparation of Carboxylic Acid Hydrazides, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 9471-9474.
170. Synthesis on the basis of carbon monoxide "Khimia", *Publ. USSR Leningrad*, **1971**.
171. Butenko, L. N.; Khardia, A. P. Synthesis of functional derivatives of tricycle hydrocarbons, *Synth. Commun.* **1984**, *14(2)*, 113-119.

172. Vocat, A.; Hartkoorn, R. C.; Lechartier, B.; Zhang, M.; Dhar, N.; Cole, S. T.; Sala, C. Bioluminescence for assessing drug potency against nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Ch.* **2015**, *59*, 4012-19.
173. Zhang, M.; Sala, C.; Hartkoorn, R. C.; Dhar, N.; Mendoza-Losana, A.; Cole, S. T. Streptomycin-Starved *Mycobacterium tuberculosis* 18b, a drug discovery tool for latent Tuberculosis, *Antimicrob. Agents Ch.* **2012**, *56*, 5782-89.
174. Schrödinger Release 2015-2: LigPrep, version 3.4, Schrödinger, LLC, New York, NY, **2015**.
175. Schrödinger Release 2015-2: MacroModel, version 10.8, Schrödinger, LLC, New York, NY, **2015**.
176. Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug Deliver. Rev.* **1997**, *23*, 3-25.
177. Lipinski, C.A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, **2000**, *44*, 235-249.
178. Duffy, E.M.; Jorgensen, W.L. Prediction of Properties from Simulations: Free Energies of Solvation in Hexadecane, Octanol, and Water, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 2878-2888.
179. Jorgensen, W.L.; Duffy, E.M. Prediction of Drug Solubility from Monte Carlo Simulations, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 1155-1158.