

Στα αγαπημένα μου πρόσωπα.....

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Ιωάννης Κ. Κωστάκης, Επίκουρος Καθηγητής

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Παναγιώτης Μαράκος, Καθηγητής

Νικολαΐς Πουλή, Καθηγήτρια

Ιωάννης Κ. Κωστάκης, Επίκουρος Καθηγητής

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών “Σχεδιασμός και ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών δομών” στον Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω εκ βαθέως τον επιβλέποντα καθηγητή μου Επίκουρο Καθηγητή Ι. Κ. Κωστάκη για την ανάθεση του θέματος, την καθοδήγηση, τις γνώσεις και τις ικανότητες που μου έδωσε τη δυνατότητα να αποκτήσω, την εμπιστοσύνη και τη στήριξη του όλα αυτά τα χρόνια. Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς τα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής, τον Καθηγητή Π. Μαράκο και την Καθηγήτρια Ν. Πουλή για την προσεκτική ανάγνωση της εργασίας μου και τις πολύτιμες συμβουλές τους. Επιπλέον, ευχαριστώ πολύ τον Καθηγητή Ε. Μικρό και τους Ph.D Γ. Λαμπρινίδη και Β. Μυριανθόπουλο για την πραγματοποίηση των υπολογισμών πρόσδεσης, καθώς και το χρόνο που μου αφιέρωσαν για την εκμάθηση των απαιτούμενων προγραμμάτων. Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Υ. Pommier, Διευθυντή του τμήματος Μοριακής Φαρμακολογίας του Center for Cancer Research National Cancer Institute (NIH) της Bethesda και τους συνεργάτες του για την πραγματοποίηση μέρους των φαρμακολογικών ελέγχων για την παρούσα εργασία, καθώς και τη Διευθύντρια S. Ruchaud του French National Centre for Scientific Research/Pierre and Marie Curie University του Roscoff της Γαλλίας. Ευχαριστώ επίσης, τον Επίκουρο Καθηγητή Ε. Γκίκα και την Επίκουρη Καθηγήτρια Ε. Ιωάννου για τη βοήθεια τους, καθώς και όλους τους συνεργάτες μου στο εργαστήριο για την αρμονική συνεργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες και φίλους, Χ. Ηλιόπουλο και Μ. Καρέλου για τη στήριξη τους.

Ξεχωριστά θα ήθελα να δηλώσω τις βαθύτατες ευχαριστίες και την αγάπη μου στους γονείς, Δημήτρη και Σταυρούλα και τον αδερφό μου, Ηλία για την υποστήριξη, εμπύχωση, υπομονή, τη δύναμη και εμπιστοσύνη τους. Συνάμα, ευχαριστώ ιδιαίτερω το φίλο μου Ε.-Ι. Κλήμη για την αμέριστη ηθική συμπαράσταση και παρότρυνση του.

Χωρίς τη βοήθεια και τη στήριξη όλων αυτών, η υλοποίηση αυτής της μελέτης δε θα ήταν δυνατή!

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1	ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	9
1.1.1	ΤΟΠΟΪΣΟΜΕΡΑΣΕΣ	11
1.1.2	ΤΥΡΟΣΙΝΟ-DNA ΦΩΣΦΟΔΙΕΣΤΕΡΑΣΗ	13
1.1.3	Πρωτεϊνικές κινάσες	17
1.2	ΒΑΣΙΚΕΣ ΔΟΜΕΣ ΩΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	19
1.2.1	Ινδολτο	19
1.2.2	Κιναζολίνη	23
1.3	ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΑ ΜΟΡΙΑ-ΑΝΑΛΟΓΑ ΙΝΔΟΛΙΟΥ ΚΑΙ/Η ΚΙΝΑΖΟΛΙΝΗΣ	26
1.3.1	Bis-indoles αλκαλοειδή και ανάλογα αυτών	26
1.3.2	Staurosporine και ανάλογα της	29
1.3.3	Rebeccamycin και ανάλογα της	31
1.3.4	Rutaecarpine και ανάλογα της	33
1.3.5	Evodiamine και ανάλογα της	35
2.	ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ	38
3.	ΧΗΜΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	41
3.1	ΣΥΝΘΕΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΑΛΚΑΛΟΕΙΔΩΝ ΔΙΙΝΔΟΛΙΟΥ	41
3.2	ΣΥΝΘΕΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ STAUROSPORINE ΚΑΙ RUTAECARPINE	54
4.	ΜΕΛΕΤΕΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΩΝ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΗ αξιολογηση ..	76
4.1	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ	76
4.1.1	Προετοιμασία Κρυσταλλογραφικής Δομής Πρωτεΐνης (Protein Preparation Wizard)	76
4.1.2	Υπολογισμοί Πρόσδεσης (Glide and/or Induced fit docking)	76
4.2	ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ (DOCKING)	77
5	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	84
5.1	Σύνθεση του (2EZ)-3-(διμεθυλαμινο)-2-(1H-ινδολ-3-υλ)προπ-2-ενονιτριλίου (2). 84	84
5.2	Σύνθεση της 4-(1H-ινδολ-3-υλ)-1H-πυραζολ-3-αμίνης (3)	84
5.3	Σύνθεση του 2-αμινο-N-[4- (1H-ινδολ-3-υλ)-1H-πυραζολ-5(3)-υλ]βενζαμιδίου (4a). 85	85
5.4	Σύνθεση του 2-αμινο-5-χλωρο-N-[4-(1H-ινδολ-3-υλ)-1H-πυραζολ-5(3)-υλ]βενζαμιδίου (4b)	85

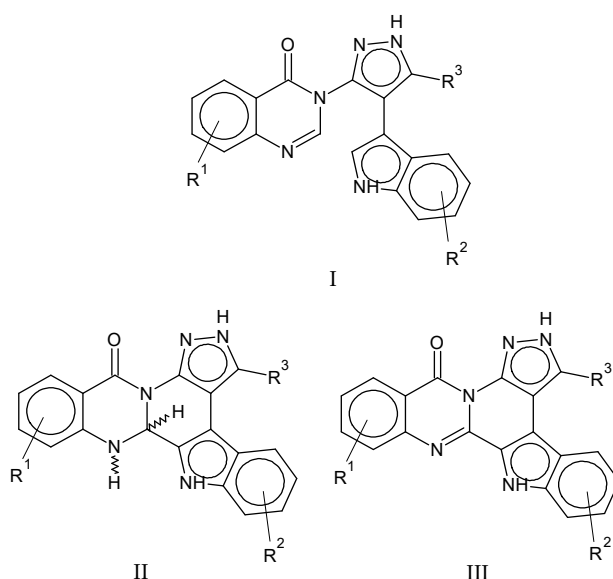
5.5	Σύνθεση του 2-αμινο-4-χλωρο-N-[4-(1H-ινδολ-3-υλ)-1H-πυραζολ-5(3)-υλ]βενζαμιδίου (4c).	85
5.6	Σύνθεση του 2-αμινο-5-μεθοξυ-N-[4-(1H-ινδολ-3-υλ)-1H-πυραζολ-5(3)-υλ]βενζαμιδίου (4d).	86
5.7	Σύνθεση του 2-αμινο-5-υδροξυ-N-[4-(1H-ινδολ-3-υλ)-1H-πυραζολ-5(3)-υλ]βενζαμιδίου (4e).	86
5.8	Σύνθεση της 3-[4-(1H-ινδολ-3-υλ)-1H-πυραζολ-5(3)-υλ]κιναζολιν-4(3H)-όνης (5a).	87
5.9	Σύνθεση της 6-χλωρο-3-[4-ινδολ-3-υλ)-1H-πυραζολ-5(3)-υλ]κιναζολιν-4(3H)όνης (5b).	88
5.10	Σύνθεση της 7-χλωρο-3-[4-ινδολ-3-υλ)-1H-πυραζολ-5(3)-υλ]κιναζολιν-4(3H)όνης (5c).	88
5.11	Σύνθεση της 6-μεθοξυ-3-[4-ινδολ-3-υλ)-1H-πυραζολ-5(3)-υλ]κιναζολιν-4(3H)όνης (5d).	89
5.12	Σύνθεση της 6-υδροξυ-3-[4-ινδολ-3-υλ)-1H-πυραζολ-5(3)-υλ]κιναζολιν-4(3H)όνης (5e).	90
5.13	Σύνθεση του 2-αμινο-5-μεθοξυβενζοϊκού οξέος (7d).	90
5.14	Σύνθεση της 6-χλωρο-2H-3,1-βενζοξαζινο-2,4(1H)-διόνης (8a).	90
5.15	Σύνθεση της 7-χλωρο-2H-3,1-βενζοξαζινο-2,4(1H)-διόνης (8b).	91
5.16	Σύνθεση της 6-μεθοξυ-2H-3,1-βενζοξαζινο-2,4(1H)-διόνης (8c).	91
5.17	Σύνθεση της 6-υδροξυ-2H-3,1-βενζοξαζινο-2,4(1H)-διόνης (8d).	91
5.18	Σύνθεση του 3-(2-αιθοξυ-2-οξοαιθυλ)-1H-ινδολο-2-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα (10).	91
5.19	Σύνθεση του 3-(καρβοξυμεθυλ)-1H-ινδολο-2-καρβοξυλικού οξέος (11)	91
5.20	Σύνθεση του 3-(2-αμινο-2-οξοαιθυλ)-1H-ινδολο-2-καρβοξυλικού οξέος (13). 92	
5.21	Σύνθεση του 3-(κυανομεθυλ)-1H-ινδολο-2-καρβοξυλικού οξέος (14).	92
5.22	Σύνθεση της 4,6-διϋδροπυραζολο[4',3':5,6]πυριδο[3,4-b]ινδολ-5(2(3)H)-όνης (16).	93
5.23	Σύνθεση του 5-χλωρο-2H(3H)-4,6-διϋδροπυραζολο[4',3':5,6]πυριδο[3,4-b]ινδολίου (17).	93
5.24	Σύνθεση του 2-[(τριφθοροακετυλο)αμινο]βενζοϊκού οξέος (19).	94
5.25	Σύνθεση της 2-(τριφθορομεθυλο)-4H-3,1-βενζοξαζιν-4-όνης (20).	94
5.26	Σύνθεση του N-[4-(1H-ινδολ-3-υλ)-1H-πυραζολ-5-υλ]-2-[(τριφθοροακετυλο)αμινο] βενζαμιδίου (21).	94
5.27	Σύνθεση του 2H(3H)-4,6-διϋδροπυραζολο[4',3':5,6]πυριδο[3,4-b]ινδολίου (22).	95

5.28	Σύνθεση της 6H(7H),15H-ινδολο[2',3':3,4]πυραζολο[4',3':5,6]πυριδο[2,1-b]κιναζολιν-9-όνης (23a).....	95
5.29	Σύνθεση της 11-χλωρο-6H(7H),15H-ινδολο[2',3':3,4]πυραζολο[4',3':5,6]πυριδο[2,1-b]κιναζολιν-9-όνης (23b).....	96
5.30	Σύνθεση της 12-χλωρο-6H(7H),15H-ινδολο[2',3':3,4]πυραζολο[4',3':5,6]πυριδο[2,1-b]κιναζολιν-9-όνης (23c).....	97
5.31	Σύνθεση της 2-μεθοξο-6H(7H),15H-ινδολο[2',3':3,4]πυραζολο[4',3':5,6]πυριδο[2,1-b]κιναζολιν-9-όνης (23d).....	97
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	99

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σχεδιασμός και Σύνθεση Υβριδίων Ινδολίου και Κιναζολίνης ως Χημικών Εργαλείων στη Μελέτη της Αντικαρκινικής Δράσης

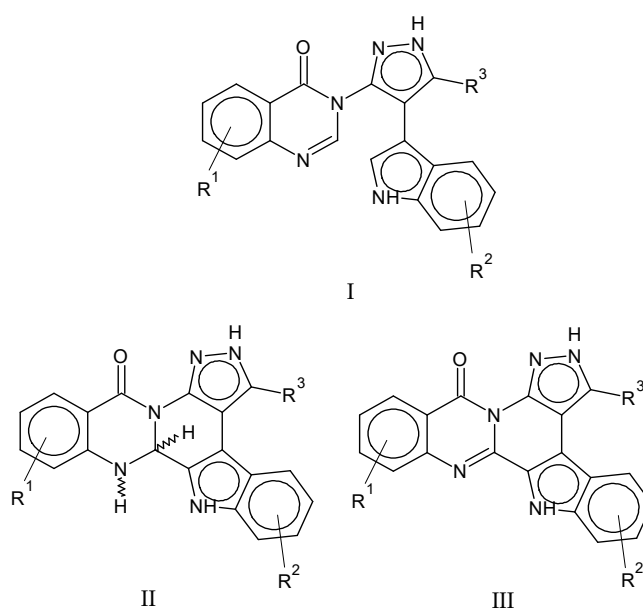
Ο καρκίνος αποτελεί τη μάλιστα της σύγχρονης εποχής. Μέσα στο 2016 πάνω από 1.7 εκατομμύρια άνθρωποι έχασαν τη ζωή τους από παθολογίες οφειλόμενες στον καρκίνο. Αυτή η κατάσταση έκανε επιτακτική την ανάγκη εύρεσης νέων φαρμάκων με βελτιστοποιημένες ιδιότητες. Κάποια πολύ γνωστά παράγωγα διαθέτουν στο βασικό τους σκελετό το δακτύλιο της κιναζολίνης ή/ και του ινδολίου, δομές που χρησιμοποιήθηκαν από την αρχή ως αντικαρκινικοί παράγοντες. Κάποια πολύ σημαντικά παράγωγα, φυσικής προέλευσης, τα οποία εμφάνισαν αυτά τα χαρακτηριστικά και αυτές τις ιδιότητες είναι η Staurosporine και η Rebeccamycin, καθώς επίσης και η Rutaecarpine και η Evodiamine και τα Bis-indole αλκαλοειδή και ανάλογα αυτών. Η Staurosporine και η Rebeccamycin αποτελούν αντιβιοτικά που ανήκουν στην κατηγορία ινδολοκαρβαζολίου, με μια ευρέως φάσματος αντινεοπλασματική δράση. Staurosporine και τα ανάλογά της αποτελούν έναν από τους πιο ισχυρούς αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών, ενώ η Rebeccamycin και ανάλογα αυτής σταθεροποιούν το σύμπλοκο DNA-τοποϊσομεράσης. Επιπλέον, τα παράγωγα με χαρακτηριστική δομή ινδολοκιναζολίνης, Rutaecarpine και Evodiamine και ανάλογα τους διαθέτουν αντικαρκινικές ιδιότητες τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό, την εισβολή και την μετάσταση μιας ποικιλίας νεοπλασματικών κυτταρικών σειρών. Ακόμα, τα Bis-indole αλκαλοειδή και παράγωγα τους αποτελούν και αυτά ισχυρότατους αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών, γνωστά για τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες, ενώ μπορούν να δράσουν και μέσω άλλων βιοχημικών μονοπατιών. Στόχος λοιπόν, της παρούσας εργασίας είναι ο σχεδιασμός και η σύνθεση νέων υβριδίων μορίων Staurosporinw/ Rebeccamycin, Rutaecarpine/ Evodiamine και Bis-indole παραγώγων, τα οποία θα περιέχουν στο βασικό τους σκελετό ινδόλιο και κιναζολιόνη. Στα νέα αυτά παράγωγα θα προστεθούν υποκαταστάτες, ώστε να μελετηθεί η επιρροή τους στη δράση έναντι τοποϊσομερασών ή/ και κινασών, καθώς και οι ανασταλτικές ιδιότητες τους στην ανάπτυξη των καρκινικών όγκων (Εικόνα κάτω).



ABSTRACT

Design and Synthesis of Indole and Quinazoline Hybrids as Chemical Tools in the Study of Anticancer Activity

Cancer is one of the major problems these days. In 2016, more than 1.7 million people died because of cancerous diseases. This made indispensable the synthesis of new drugs with intended anticancer activity. Some of the most well-known compounds include in their main domain the rings of indoles and quinazoline, which have been used as anticancer agents since the beginning. Very important compounds, secluded from plants with such characteristics and properties are Staurosporine and Rebeccamycin, as well as Rutaecarpine and Evodiamine and their analogues. Staurosporine and Rebeccamycin are indolocarbazole antibiotics with broad spectrum antitumor activity. Rebeccamycin and its analogues stabilize the DNA-topoisomerase cleavable complex and Staurosporine is one of the strongest known inhibitors of protein kinases. In addition, indoloquinazoline compounds, Rutaecarpine and Evodiamine possess anti-cancer activities both in vitro and in vivo by inhibiting proliferation, invasion and metastasis of a variety of tumor cell lines. Bis-indole derivatives have also been used for their kinases' inhibitory properties and other distinct pathways of antitumor activity. The main goal of this project is to design and synthesize novel hybrids based on Staurosporine/Rebeccamycin, Rutaecarpine/Evodiamine and Bis-indole derivatives, which will include indole and quinazolinone groups in their main structure. These new synthesized compounds will be then substituted in order to evaluate the effect of them on topoisomerases' and/or protein kinases' inhibition, as well as on the tumor cell growth inhibition (Picture above).



1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια ραγδαία εξάπλωση του καρκίνου με πάνω από 1.7 εκατομμύρια θανάτους ετησίως.¹ Αυτό δημιούργησε επιτακτική ανάγκη για τη σύνθεση νέων φαρμάκων, με απώτερο στόχο την όσο το δυνατόν καλύτερη και πιο εκλεκτική δράση. Ο καρκίνος είναι μια ομάδα ασθενειών που χαρακτηρίζονται από ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων και αδυναμία ρύθμισης της ανάπτυξης ενός ιστού. Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα τα οποία αναπτύσσονται, διαιρούνται και οδηγούνται τελικά σε κυτταρικό θάνατο με έναν αυστηρά ελεγχόμενο τρόπο, τα καρκινικά κύτταρα διαιρούνται και μεγαλώνουν ανεξέλεγκτα οδηγώντας στη συσσώρευση μιας μάζας κυττάρων που ονομάζεται όγκος. Για τη μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό πρέπει να γίνουν μία ή περισσότερες μεταλλάξεις σε πολλά γονίδια, που ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση (κυρίως στα ογκογονίδια, στα ογκοκατασταλτικά γονίδια και στα microRNA γονίδια). Οι γενετικές αλλαγές μπορεί να συμβούν σε διαφορετική κλίμακα και με διαφορετικούς μηχανισμούς.²

Τα φυσιολογικά κύτταρα (ή σύμφωνα με ορισμένες μελέτες σε ορισμένες περιπτώσεις βλαστοκύτταρα) αρχικά μετατρέπονται σε πρόιμα καρκινικά κύτταρα (πρωτο-ογκογονίδια) και στη συνέχεια σε ογκογονίδια που οδηγούν στην ανάπτυξη καρκινικών όγκων και παθολογικών ιστών. Η συμμετοχή των ογκογονιδίων στην ανάπτυξη καρκίνου οφείλεται όχι μόνο στη διαφοροποίηση των κυττάρων αλλά και στην ικανότητα τους να παρεμβαίνουν στον αναπρογραμματισμό της λειτουργίας των φυσιολογικών κυττάρων μέσω της έκφρασης τους. Η κατανόηση του μηχανισμού με τον οποίο τα φυσιολογικά κύτταρα μετατρέπονται σε καρκινικά αποτελεί κύριο στόχο της έρευνας γύρω από τον καρκίνο.³

Με βάση τα δεδομένα που υπάρχουν μέχρι σήμερα, τα αντικαρκινικά φάρμακα στοχεύουν στον περιορισμό της εξέλιξης του καρκίνου ή στη θεραπεία του. Προκαλούν αναστολή της διαίρεσης και ανάπτυξης των κυττάρων μέσω διάφορων τρόπων, όπως ο διαχωρισμός της αλυσίδας του DNA και αλλαγές στη συμπύκνωση της χρωματίνης, επάγοντας τελικά την απόπτωση. Η κυτταροτοξικότητα αυτών των φαρμάκων είναι αποτέλεσμα της ικανότητας των κυττάρων να οδηγούνται σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Τα σήματα που οδηγούν στην απόπτωση, τα γονίδια που τη ρυθμίζουν και οι βιοχημικές διαδικασίες που προκαλούνται κατά τη χορήγηση αντινεοπλασματικών φαρμάκων μπορούν να περιγραφούν τόσο για τα κυτταροτοξικά όσο και για στοχευμένα και ορμονικά φάρμακα. Ωστόσο, αυτά τα φάρμακα μπορεί να καταστρέφουν και φυσιολογικά κύτταρα που διαιρούνται και αναπτύσσονται γρήγορα, γεγονός στο οποίο αποδίδονται και οι ανεπιθύμητες ενέργειες τους σε μεγάλο βαθμό.²

Η αντικαρκινική θεραπεία μπορεί να στοχεύει σε κάποιο στάδιο της βιοσύνθεσης των νουκλεϊνικών οξέων (DNA, RNA), μπλοκάροντας τη βιοσύνθεση τους, ή μπορεί να επιδρά και άμεσα στη δομή και στη λειτουργία του DNA. Επιπλέον, μπορεί να επεμβαίνει στη μεταγραφή και να μπλοκάρει τη σύνθεση του RNA. Ορισμένα φάρμακα ασκούν τη δράση τους, επεμβαίνοντας στη σύνθεση και τη λειτουργία των πρωτεϊνών και άλλα επηρεάζοντας την ομοιόσταση των ορμονών. Ο κύριος μηχανισμός δράσης τους αποτελεί συνήθως κριτήριο για την κατηγοριοποίηση τους, ωστόσο η πλειοψηφία τους παρουσιάζει σύνθετο τρόπο δράσης, με αποτέλεσμα η απόλυτη κατάταξη τους σε κατηγορίες, να είναι όχι μόνο δύσκολη αλλά και σχετικά αυθαίρετη.⁴ Με βάση το μηχανισμό δράσης τους τα αντικαρκινικά φάρμακα μπορούν να διακριθούν στις εξής κατηγορίες:

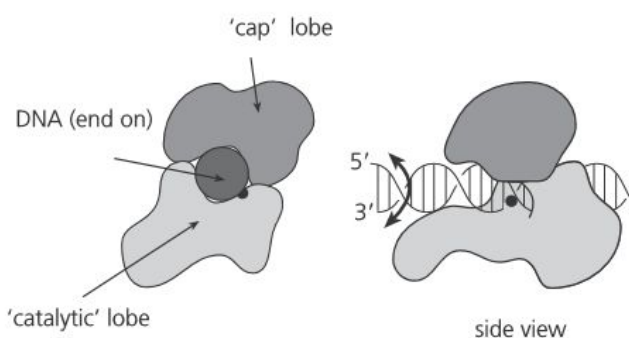
1. **Αλκυλιωτικοί παράγοντες:** Μουστάρδες αζώτου (Melphalan, Cyclophosphamide, Ifosfamide), Νιτροζουρίες, Αλκυλο-σουλφονικά παράγωγα, Αιθυλενιμίνες, Τριαζίνες, Μεθυλο-ϋδραζίνες.
2. **Σύμπλοκα πλατίνας:** Cisplatin, Carboplatin, Oxaliplatin.
3. **Αντιμεταβολίτες:** Ανταγωνιστές φυλλικού οξέος (Methotrexate), Ανταγωνιστές της Πουρίνης, Ανταγωνιστές της πυριμιδίνης (5-Fluorouracil, Cytarabine).
4. **Φάρμακα που δρουν επί των μικροσωληνίσκων:** Vincristine, Vinblastin, Paclitaxel.
5. **Αναστολείς τοποϊσομερασών:** Etoposide, Topotecan, Irinotecan.
6. **Αντιβιοτικά:** Actinomycin, Doxorubicin, Daunorubicin.
7. **Στοχευμένα φάρμακα:** Αναστολείς τυροσινικής κινάσης (Imatinib, Erlotinib), Αναστολείς αγγειογένεσης (Bevacizumab), Αναστολείς πρωτεασώματος (Bortezomib), Μονοκλωνικά αντισώματα (Rituximab).
8. **Ορμονικά φάρμακα:** Κορτικοστεροειδή (Prednisone, Dexamethasone), Οιστρογόνα: Ethinyloestradiol, Αντιοιστρογόνα (Tamoxifen), Παράγωγα Προγεστερόνης (Megestrol Acetate), Ανδρογόνα (Testosterone propionate), Αντιανδρογόνα (Flutamide, Bicalutamide), Αναστολείς της αρωματάσης (Letrozole, Anastrozole), Αναστολείς της 5-άλφα ρεδουκτάσης (Finasteride), Ανάλογα GnRH (Leuprolide, Buserelin, Growth Hormone, glucagon), Αναστολείς της ινσουλίνης (Octreotide).
9. **Διάφορα:** Hydroxyurea, Rituximab, Epirubicin, Bortezomib, Zoledronic Acid, Gefitinib, Leucovorin, Pamidronate, Gemcitabine.

Δύο πολύ σημαντικοί στόχοι γύρω από τους οποίους έχουν αναπτυχθεί πολλά φάρμακα, και αντικείμενο της έρευνας γύρω από τον καρκίνο αποτελούν οι πρωτεϊνικές κινάσες και τοποϊσομεράσες, όπως παρουσιάστηκε παραπάνω.

1.1.1 ΤΟΠΟΪΣΟΜΕΡΑΣΕΣ.

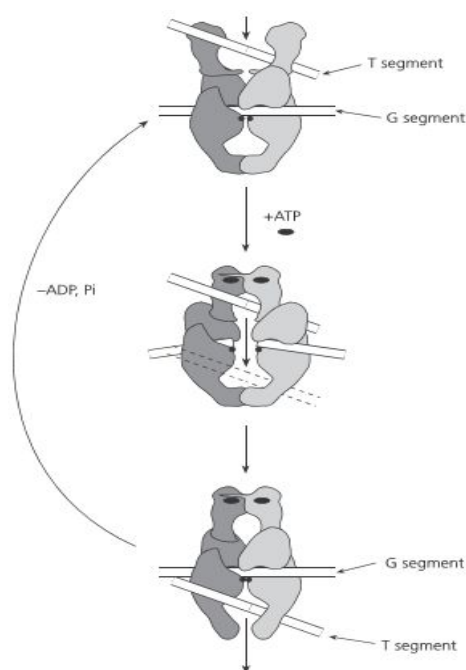
Οι τοποΐσομεράσες ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά το 1971, ως ένα ένζυμο της *E. Coli*, το οποίο μπορούσε να μετατρέψει αρνητικά υπερελικωμένο DNA στη χαλαρή του μορφή.⁵ Πρόκειται για ένζυμα που τροποποιούν και διαμορφώνουν την τοπολογία, δηλαδή την διάταξη στο χώρο του δίκλωνου DNA, χωρίς όμως να μεταβάλλουν την ακολουθία των νουκλεοτιδίων. Δρουν αρχικά διασπώντας και συνέχεια επανασχηματίζοντας το φωσφοδιεστερικό δεσμό μεταξύ των νουκλεοτιδίων στην έλικα του DNA. Με τον τρόπο αυτό είναι εφικτό το ξετύλιγμα του DNA και κατ' επέκταση η χαλάρωση της υπερελικωμένης του μορφής και τελικά η επανασύνδεση των δύο αλυσίδων. Η χαλάρωση αυτή είναι ουσιαστική για την δράση ενζύμων όπως οι DNA και RNA πολυμεράσες, καθιστώντας έτσι τις τοποΐσομεράσες απαραίτητες για τις διαδικασίες της αντιγραφής, μεταγραφής και μετάφρασης, καθώς και του ανασυνδυασμού του DNA. Κατηγοριοποιούνται με βάση τη δομή και τη λειτουργία τους σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τις τοποΐσομεράσες τύπου I και τις τοποΐσομεράσες τύπου II, χωρίς όμως να περιορίζεται εδώ αυτή η κατηγοριοποίηση. Οι τοποΐσομεράσες τύπου I προκαλούν παροδικές σχάσεις στην μία από τις δύο αλυσίδες του DNA και ανάλογα με το αν σχηματίζουν ομοιοπολικό δεσμό με την 5' ή την 3' φωσφορική ομάδα, διαιρούνται στις υποοικογένειες IA και IB αντίστοιχα. Αντίθετα, οι τοποΐσομεράσες τύπου II προκαλούν παροδικές σχάσεις και στις δύο αλυσίδες του DNA, ενώ οι δύο ισομορφές του ενζύμου, IIα και IIβ εκφράζονται σε διαφορετικά γονίδια και συμμετέχουν σε διαφορετικές λειτουργίες. Εκτός της φυσιολογικής τους λειτουργίας, τα ένζυμα αυτά έχουν την ικανότητα να τεμαχίζουν το DNA και να αναστέλλουν τις βασικές λειτουργίες του, επάγοντας μεταλλάξεις, χρωμοσωμικές μεταθέσεις και άλλες εκτροπές στο γενετικό υλικό, ως μονοπάτια επιδιόρθωσης, οδηγώντας τα κύτταρα σε απόπτωση. Οι λειτουργίες τους αυτές διαφοροποιούνται ακόμα και από είδος σε είδος, γεγονός που οδηγεί και σε περαιτέρω κατηγοριοποίηση τους.⁶

Η σταθεροποίηση του σχηματιζόμενου συμπλόκου ενζύμου-DNA πραγματοποιείται με τη δημιουργία ενός ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ ενός τυροσινικού υδροξυλίου που διαθέτει το ένζυμο και της φωσφορικής ομάδας του γενετικού υλικού στο σημείο του σπασίματος. Ανάλογα με το είδος της τοποΐσομεράσης μπορούν να πραγματοποιηθούν κοψίματα είτε σε ένα μόριο DNA στον ένα ή στους δύο κλώνους του είτε μεταξύ διαφορετικών μορίων γενετικού υλικού, λόγω της διαμόρφωσης του ενεργού τους κέντρου. Επιπλέον, το τυροσινικό υδροξύλιο, το οποίο συμμετέχει στο σχηματισμό του ομοιοπολικού δεσμού, βρίσκεται σε διαφορετική περιοχή των εκάστοτε ενζύμων. Οι τοποΐσομεράσες τύπου IA και II δημιουργούν ομοιοπολικό δεσμό με την 5' φωσφορική ομάδα, ενώ οι τοποΐσομεράσες τύπου IB με την 3'. Οι τοποΐσομεράσες τύπου I διαθέτουν μια μεγάλη κοιλότητα, το τυροσινικό ενεργό τους κέντρο, που μπορεί να φιλοξενήσει τμήμα και τους δύο κλώνους του DNA, δημιουργώντας όμως κοψίματα μόνο στον έναν από αυτούς (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Μηχανισμός δημιουργίας συμπλόκου τοποϊσομεράσης τύπου I.

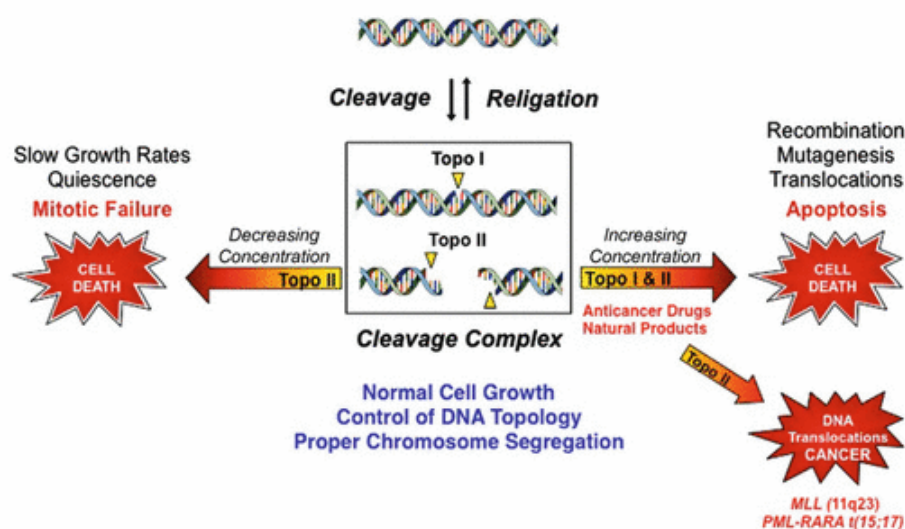
Οι τοποϊσομεράσες II διαθέτουν και αυτές μια μεγάλη ενεργή κοιλότητα που μπορεί να φιλοξενήσει και τους δύο κλώνους του DNA. Αντίθετα όμως με τις τοποϊσομεράσες I, διαθέτουν δύο θέσεις πρόσδεσης για το γενετικό υλικό. Η μια αφορά ένα G τμήμα που διασπάται για τη δημιουργία του 5'-φωσφοτυροσινικού δεσμού. Μετά την πρόσδεση του πρώτου κομματιού, επιτρέπεται η σύνδεση ενός T τμήματος στο άλλο σημείο του ενζύμου, η οποία είναι ATP εξαρτώμενη και προκύπτει μετά από το διμερισμό της τοποϊσομεράσης (Εικόνα 2).^{6,7}



Εικόνα 2: Μηχανισμός δημιουργίας συμπλόκου τοποϊσομεράσων II.

Εξαιτίας της άμεσης εμπλοκής τους στην επίλυση των τοπολογικών προβλημάτων, όπως η υπερελίκωση, η συμπύκνωση και το ξεδίπλωμα του DNA, που υπάρχουν σε όλες τις διαδικασίες που συμμετέχουν τα νουκλεϊκά οξέα, τα ένζυμα αυτά έχουν αποτελέσει μοριακούς στόχους πολλών αντιβιοτικών και αντικαρκινικών φαρμάκων. Υπάρχουν

διάφοροι μηχανισμοί που μπορεί να δρουν αυτά τα φάρμακα με πλέον κυρίαρχο τη σταθεροποίηση του συμπλόκου του ενζύμου (συνήθως με σχηματισμό διάφορων τύπων δεσμών με αυτό) με το DNA (συνήθως με παρεμβολή σε αυτό) ή επεμβαίνοντας στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Γενικά, οι αναστολείς των τοποϊσομεράσεων διακρίνονται σε δύο ευρύτερες κατηγορίες, τους αναστολείς/καταστολείς και στα δηλητήρια αυτών. Και οι δύο ομάδες ενώσεων αναστέλλουν την δράση αυτών των ενζύμων. Τα δηλητήρια θανατώνουν τα καρκινικά κύτταρα δεσμεύοντας τα σύμπλοκα τοποϊσομεράσης/DNA παρά αναστέλλοντας το ένζυμο, ενώ οι καταστολείς δρουν απευθείας στο ένζυμο αναστέλλοντας τις αντιδράσεις αποσύζευξης και επανασύνδεσης του DNA χωρίς να επηρεάζουν τη σταθερότητα του συμπλόκου. Έτσι, κύτταρα στα οποία παρατηρείται υπερέκφραση του ενζύμου είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα σε δηλητήρια, ενώ κύτταρα με μειωμένα επίπεδα τοποϊσομερασών είναι ευαίσθητα σε καταστολείς και σε δηλητήρια τοποϊσομερασών (Εικόνα 3).^{6,7}

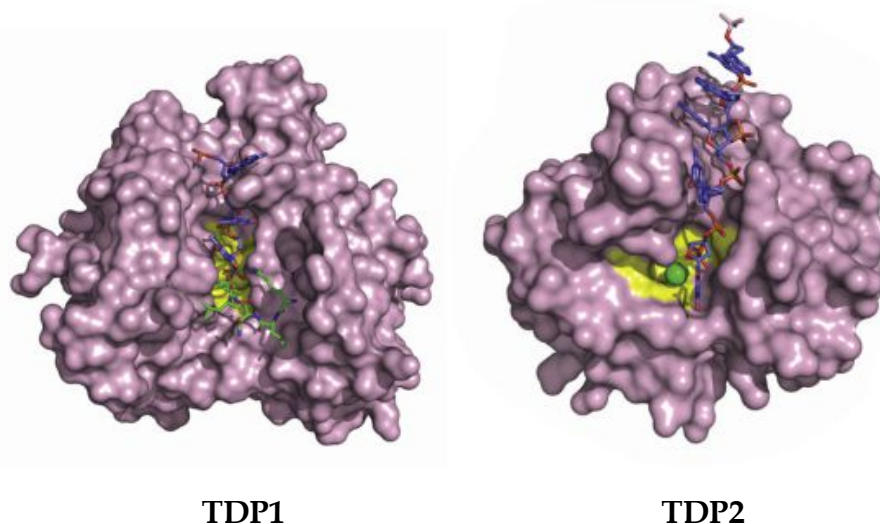


Εικόνα 3: Αναστολείς τοποϊσομερασών.

1.1.2 ΤΥΡΟΣΙΝΟ-DNA ΦΩΣΦΟΔΙΕΣΤΕΡΑΣΗ.

Το σύμπλοκο των τοποϊσομερασών με το DNA φυσιολογικά έχει πολύ μικρό χρόνο ζωής (milliseconds) και εξαρτάται από την πυρηνόφιλη προσβολή ενός σακχαρικού υδροξυλίου του τελικού ελεύθερου άκρου του γενετικού υλικού, το οποίο έχει κοπεί από τις τοποϊσομεράσες μόλις τα ένζυμα ολοκληρώσουν τις λειτουργίες τους. Αυτό εξηγεί γιατί βλάβες στη συμπληρωματικότητα και την αλκυλίωση των βάσεων, οξειδωτικές βλάβες του DNA, η δράση ορισμένων ραδιομημητικών φαρμάκων και ορισμένων αναστολέων τοποϊσομερασών επί του συμπλόκου ενζύμου-DNA οδηγούν σε σταθεροποίηση του συμπλόκου. Οι τυροσινο-DNA φωσφοδιεστεράσες λοιπόν, επιδιορθώνουν αυτή την παρατεταμένη σύνδεση πρωτεΐνης-DNA, αποτρέποντας περαιτέρω βλάβες στη λειτουργία των φυσιολογικών κυττάρων.^{8,9}

Οι τυροσινο-DNA φωσφοδιεστεράσες (TDP 1 και TDP 2) (Εικόνα 4) αποτελούν τα πιο πρόσφατα ανακαλυφθέντα επιδιορθωτικά ένζυμα. Πιο συγκεκριμένα, τα ένζυμα αυτά απομακρύνουν τυροσινικά υπολείμματα του συμπλόκου DNA- τοποϊσομερασών, τα οποία και αποσπούν, απελευθερώνοντας μια φωσφορική ομάδα στο τελικό άκρο του γενετικού υλικού, έτοιμη για επανασύνδεση. Η TDP 1 υδρολύει αυτό το φωσφοτυροσινικό δεσμό στο 3' άκρο του DNA, ενώ η TDP 2 στο 5' φωσφορικό άκρο.^{9,10}

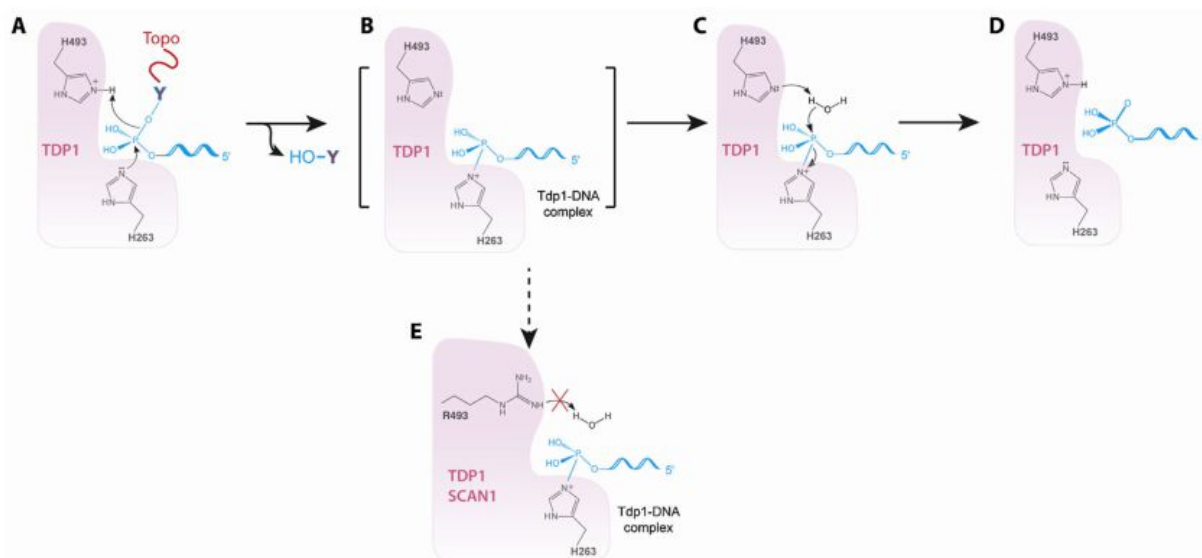


Εικόνα 4: Αναπαράσταση κρυσταλλικών δομών των ενζύμων TDP1 και TDP2.

Η TDP1 είναι ένα πολυπεπτιδίο 68 KDa με 608 αμινοξέα, που αποτελείται από δύο δομές. Το αμινοτελικό άκρο δεν παίζει ρόλο στη δράση του ενζύμου, ωστόσο έχει μεγάλη σημασία για τη σταθερότητα του. Το καρβοξυτελικό άκρο σχηματίζει την καταλυτική περιοχή με δομή που προσομοιάζει στην οικογένεια των D φωσφολιπασών (PLD). Η διαφοροποίηση της από αυτές είναι αποτέλεσμα της αντικατάστασης των ασπαρτικών με ασπαραγίνες στο ενεργό κέντρο της TDP1. Το σημείο πρόσδεσης του γενετικού υλικού είναι θετικά φορτισμένο και μπορεί να προσδέσει μόνο τον ένα κλώνο του DNA. Η σταθεροποίηση αυτού του συμπλόκου γίνεται μέσω υδρόφοβων και πολικών αλληλεπιδράσεων και για αυτό το λόγο η αναγνώριση του υποστρώματος από το ένζυμο δε μπορεί να γίνει για όλες τις αλληλουχίες βάσεων. Η TDP1 αναγνωρίζει σαν υπόστρωμα μόνο τα σύμπλοκα της τοποϊσομεράσης I και για να επιτελέσει το “ξेमπλοκάρισμα” τους απαιτείται επιπλέον σύζευξη με πολυνουκλεοτιδικές φωσφορικές κινάσες (PNKP) (Εικόνα 5).

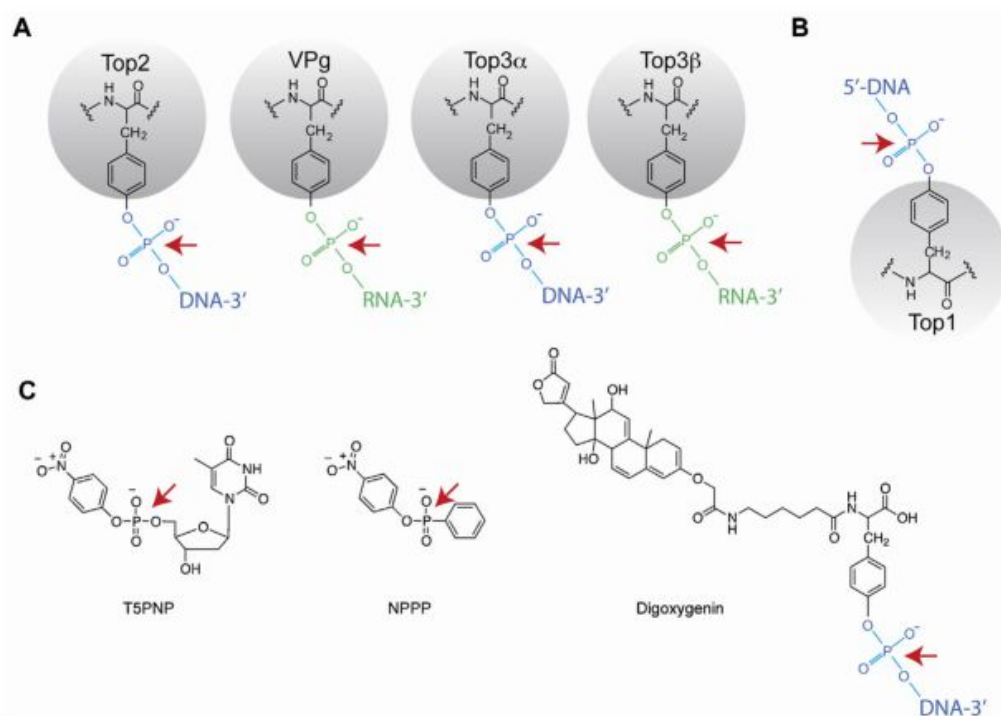
Υπάρχει σχεδόν σε όλους τους οργανισμούς και δρα τόσο στον πυρήνα όσο και στα μιτοχόνδρια. Το ένζυμο εκτός από τη φυσιολογική του λειτουργία, δηλαδή της επιδιόρθωση των “μπλοκαρισμένων” συμπλόκων της τοποϊσομεράσης I, μπορεί να υδρολύσει και 5' φωσφοτυροσινικούς δεσμούς με πολύ μικρότερη όμως αποτελεσματικότητα από την TDP2. Επιπλέον, μπορεί να απομακρύνει και 3' τελικά δεοξυριβο- και ριβο-νουκλεοτίδια, τα οποία δεν έχουν φωσφορυλιωθεί στο 3' άκρο τους. Αυτή της η δράση συμβάλλει και στην απομάκρυνση πολλών αντικών και αντικαρκινικών φαρμάκων, επιδιορθώνοντας τα λάθη της αντιγραφής. Τέλος, η δράση της ως φωσφοδιεστεράσης συμπληρώνεται με την

απομάκρυνση άλλων αλκυλιωτικών παραγόντων και προσκολλητών, όπως η βιοτίνη και διάφορα φθορισμοφόρα.¹⁰



Εικόνα 5: Καταλυτικός μηχανισμός δράσης TDP1.

Η TDP2 είναι αρκετά μικρότερη (41 kDa) από την TDP1 με 362 αμινοξέα, αποτελούμενη και αυτή από δύο δομές. Στο καρβοξυτελικό της άκρο βρίσκεται το ενεργό της κέντρο, ενώ το αμινοτελικό άκρο φέρει μια δομή σχετιζόμενη με την ουμπικουτίνη και μάλλον έχει ρυθμιστικό ρόλο. Το σημείο πρόσδεσης του DNA είναι αρκετά μεγάλο, ώστε να μπορεί να φιλοξενήσει και τις δύο έλικες του. Η TDP2 αρχικά ονομαζόταν TTRAP (σχετιζόμενη με τον TRAF και τον TNF υποδοχέα πρωτεΐνη) και ήταν γνωστή ως ένας νεκρωτικός παράγοντας συνδεδεμένος με τον TNF υποδοχέα που σχετίζεται με τους TRAF παράγοντες σε καρκινικούς όγκους.¹¹ Παρουσιάζει μεγάλη δομική ομοιότητα με την οικογένεια των Mg^{2+}/Mn^{2+} εξαρτώμενων φωσφοδιεστερασών, την DNase I, ενώ μοιράζεται ομοιότητες ως προς το μηχανισμό με την APE 1. Στη συνέχεια, ονομάστηκε EAPII (ETS1-σχετιζόμενη πρωτεΐνη 2) και παρουσιάστηκε η δράση της ως αρνητικός ρυθμιστής της ETS1 και της AP1 στη μεταγραφή του γενετικού υλικού. Επίσης, φάνηκε να προάγει τον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από τον TGF- β . Σε ορισμένες μορφές καρκίνου των πνευμόνων φάνηκε να υπερεκφράζεται και να συμβάλλει στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και την ανάπτυξη όγκων μέσω ενεργοποίησης πολλών βιοχημικών μονοπατιών. Σε αντίθεση με την TDP1, η δράση της TDP2 ως φωσφοδιεστεράσης περιορίζεται μόνο στην υδρόλυση των 5' φωσφοτυροσινικών δεσμών και όχι σε άλλου είδους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς, ενώ έχει πολύ μικρή ικανότητα υδρόλυσης των 3' φωσφοτυροσινικών δεσμών. Επιπλέον, δεν διαθέτει καμία δράση ως νουκλεάση, όπως η TDP1 και δεν απαιτεί μακριές αλυσίδες DNA για να υδrolύσει τα 5' τελικά τυροσινικά τμήματα του γενετικού υλικού. Πρόσφατα, αποδείχθηκε και ο ρόλος της ως μια από τις βασικές VPg αποελκασές των Πικορναϊών, σημαντικά ένζυμα για την αντιγραφή τους (Εικόνα 6).¹⁰



Εικόνα 6: Πιθανά ενδογενή και εξωγενή υποστρώματα για την TDP2.

Η εύρεση αναστολέων των ενζύμων TDP1 και TDP2 θα μπορούσε να αναστείλει τη δράση των καρκινικών κυττάρων και σε συνδυασμό με αναστολείς των τοποϊσομερασών να οδηγήσει σε ανεπανόρθωτες βλάβες του DNA των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, στα καρκινικά κύτταρα εκλείπουν οι πολύπλοκες λειτουργίες επιδιόρθωσης του γενετικού τους υλικού και υπάρχουν γενικές ανεπάρκειες σε σημαντικά σημεία ελέγχου τους. Αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα, η ανεπάρκεια των κυττάρων στα ένζυμα να αυξήσει την ευαισθησία τους προς τους αναστολείς τοποϊσομερασών και σε ενίσχυση της δράσης τους. Επιπλέον, αναστολείς των TDP ενζύμων θα μπορούσαν να συνδυαστούν με αλκυλιωτικούς παράγοντες, καθώς και με αναστολείς της επιδιόρθωσης του DNA βελτιώνοντας τα αποτελέσματα της χημειοθεραπείας.¹²

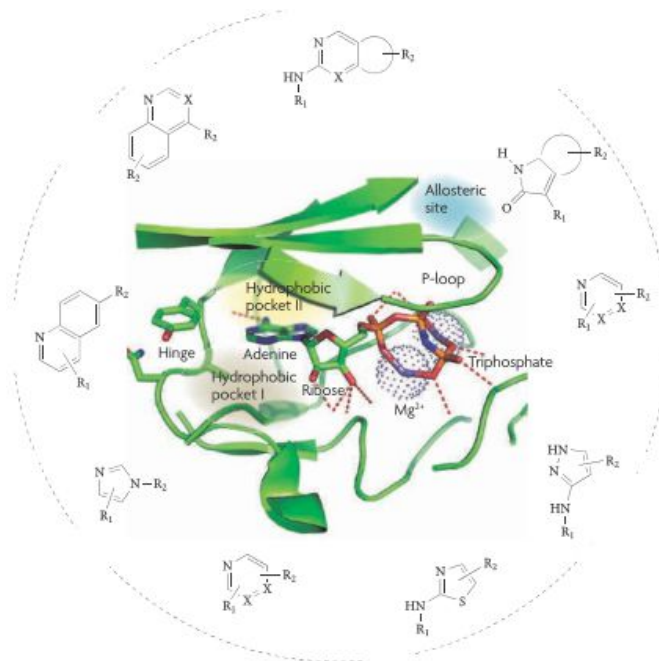
Σε πρόσφατες μελέτες μάλιστα, παρατηρήθηκε ότι σε TDP1 και TDP2 knockout κύτταρα θηλαστικών δεν προκαλούνταν προβλήματα βιωσιμότητας και φαινοτυπικές αλλαγές, γεγονός που παρουσιάζει πιθανή ανεκτικότητα σε αναστολείς των ενζύμων. Αυτό κάνει κατανοητό ότι **η εύρεση αναστολέων των TDP1 και TDP2 ενζύμων με εκλεκτική και ισχυρή δράση, σε συνδυασμό πιθανόν με αναστολείς των τοποϊσομερασών μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο των καρκινικών κυττάρων και εξάλειψη των καρκινικών όγκων.** Οι αναστολείς αυτοί θα μπορούσαν να προσομοιάζουν με τα φυσικά υποστρώματα ή να διαθέτουν δομές που θα παρεμβάλλονται στο υπόστρωμα του συμπλόκου και δε θα επιτρέπουν το σχηματισμό του ομοιοπολικού συμπλόκου. Τέλος, η πρόσφατη ανακάλυψη της δράσης της TDP2 στην κατηγορία των Πικορναϊών θέτει την αρχή για την εύρεση πιθανών αντικών παραγώγων για τη θεραπεία πολλών νόσων.¹⁰

1.1.3 ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ

Οι πρωτεϊνικές κινάσες αποτελούν έναν άλλο στόχο φαρμάκων για αντικαρκινική θεραπεία. Γενικότερα, οι κινάσες ή φωσφοτρανσφεράσες είναι ένζυμα που καταλύουν την μεταφορά φωσφορικών ομάδων από μόρια δότες όπως η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) σε υποστρώματα όπως λιπίδια, υδατάνθρακες, αμινοξέα και νουκλεοτίδια με σκοπό τη μεταγωγή σήματος ή τη συμμετοχή σε μεταβολικά μονοπάτια. Ειδικότερα, οι πρωτεϊνικές κινάσες, μια από τις σημαντικότερες ομάδες κυτταρικών κινασών, αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένες πρωτεΐνες και τροποποιούν την δράση τους φωσφορυλιώνοντας ορισμένα αμινοξέα. Διαθέτουν μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων, όπως δομικές πρωτεΐνες, μεταβολικά ένζυμα και παράγοντες μεταγραφής και συμμετέχουν στη μεταγωγή σήματος, ελέγχοντας πολύπλοκες κυτταρικές διαδικασίες όπως η διαφοροποίηση, η μεταβολική συμπεριφορά, ο κυτταρικός κύκλος, η ικανότητα μετάστασης, αγγειογένεσης, απόπτωσης κ.α.¹³

Μέχρι σήμερα έχουν αποκωδικοποιηθεί από το ανθρώπινο γονιδίωμα 518 πρωτεϊνικές κινάσες, οι οποίες, με βάση το υπόστρωμα που φωσφορυλιώνεται, διακρίνονται σε τρεις ευρείες κατηγορίες: τις κινάσες τυροσίνης που φωσφορυλιώνουν το φαινολικό υδροξύλιο της τυροσίνης, τις κινάσες σερίνης/θρεονίνης που φωσφορυλιώνουν τα αλειφατικά υδροξύλια των αντίστοιχων αμινοξέων και τις κινάσες ιστιδίνης που φωσφορυλιώνουν το ιμιδαζολικό άζωτο της ιστιδίνης.

Οι πρωτεϊνικές κινάσες διαθέτουν μια δομή που αποτελείται συνήθως από 12 υπομονάδες, οι οποίες οργανώνονται σε δύο λοβούς που σχηματίζουν το ενεργό τους κέντρο. Μεταξύ των δύο λοβών υπάρχει μια θέση πρόσδεσης για το ATP ιδιαίτερα σημαντική για το ενεργό κέντρο και για τη ρύθμιση της λειτουργίας και της δράσης του ίδιου του ενζύμου. Υπάρχουν και πολλές διαμορφώσεις των ενζύμων, με πλέον σημαντικότερες αυτήν που είναι καταλυτικά εξαρτώμενη και συνήθως φωσφορυλιωμένη και την ανενεργή, που μπλοκάρει το ενεργό κέντρο και δεν επιτρέπει τη σύνδεση του υποστρώματος (Εικόνα 7).¹⁴



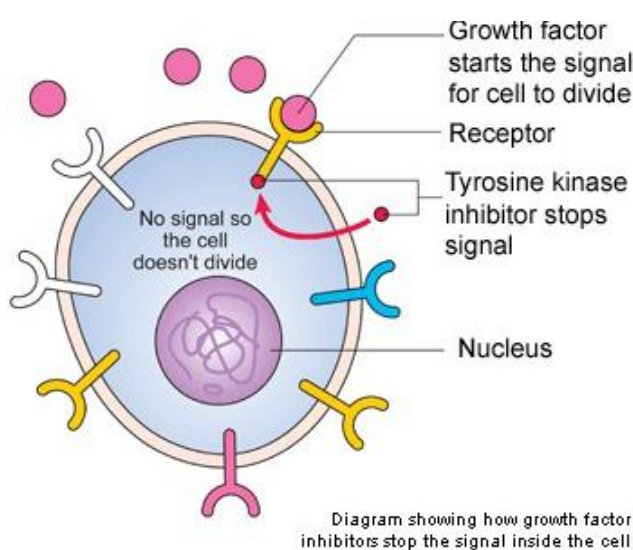
Εικόνα 7: Χαρακτηριστική δομή κινασών.

Όπως είναι φυσικό, η απώλεια αυστηρού ελέγχου της ενεργότητας των πρωτεϊνικών κινασών οδηγεί σε σοβαρή διαταραχή των κυτταρικών λειτουργιών και συνδέεται με την εμφάνιση σοβαρών νοσημάτων, μεταξύ αυτών και του καρκίνου. Πρέπει να αναφερθεί ότι όλες οι χαρακτηριστικές ιδιότητες του καρκινικού κυττάρου όπως η ανεξέλεγκτη διαίρεση, η ικανότητα διήθησης και μετάστασης και η ικανότητα αγγειογένεσης σχετίζονται με την διαταραχή λειτουργίας των πρωτεϊνικών κινασών. Η διαταραχή αυτή μπορεί να αποδοθεί σε διάφορες αιτίες όπως:

- Χρωμοσωμικές μετατοπίσεις που οδηγούν στην γένεση υβριδικών κινασών οι οποίες διατηρούν τις καταλυτικές ιδιότητες του ενζύμου αλλά όχι και τον ελεγκτικό μηχανισμό αυτού. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η υβριδική κινάση Bcr-Abl η οποία είναι συνεχώς ενεργή και ευθύνεται για την εμφάνιση χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας.¹⁵
- Γονδιακές μεταλλάξεις που καθιστούν την αντίστοιχη κινάση ανεξέλεγκτα ενεργή, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την κινάση c-Kit.¹⁶
- Αυξημένη ή πλήρη απώλεια ελέγχου της έκφρασης της κινάσης, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τον ενδοθηλιακό αγγειακό αυξητικό παράγοντα αλλά και τον υποδοχέα του που προκαλούν αγγειογένεση.¹⁷
- Ενεργοποίηση ογκογονιδίου ή απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικού γονιδίου με άμεσο αποτέλεσμα την τροποποίηση της λειτουργικότητας της κινάσης, όπως παρατηρείται στην περίπτωση της φωσφατάσης PTEN και τον έλεγχο της επί της PI3K/Akt κινάσης.¹⁸

Ο ρόλος που διαδραματίζουν οι κινάσες στην κυτταρική διαίρεση, τη μεταβίβαση του σήματος και γενικότερα στην ομοιόσταση του κυττάρου, αλλά και το γεγονός ότι η απορρύθμιση τους εμπλέκεται στην ανάπτυξη του καρκίνου, τις έχουν καταστήσει ως έναν πολύ σημαντικό στόχο για την έρευνα και την ανάπτυξη νέων φαρμάκων.¹³ Οι προσπάθειες

εντοπίζονται κυρίως στην ανάπτυξη μορίων που ανταγωνίζονται την πρόσδεση του ATP στο ενεργό κέντρο της κινάσης, αναστέλλοντας τη λειτουργία της, αλλά και της εύρεσης μεγαλομοριακών ανταγωνιστών του φυσιολογικού υποστρώματος της κινάσης. Επιπλέον, έχουν αναπτυχθεί πιο σπάνιοι αναστολείς που μπορεί να δημιουργούν μη αντιστρεπτό, ομοιοπολικό με το ενεργό κέντρο του ενζύμου αλληλεπιδρώντας με πυρηνόφιλα υπολείμματα κυστεΐνης, καθώς επίσης και αλλοστερικοί αναστολείς που δρουν εκτός του ενεργού κέντρου.¹⁴ Γενικότερα, ο μηχανισμός δράσης αυτών των φαρμάκων εξαρτάται από το είδος της κινάσης και την παθοφυσιολογία με την οποία αυτή συνδέεται για την εμφάνιση ενός συγκεκριμένου καρκίνου. Οι αναστολείς μπορεί να εμφανίζουν εκλεκτικότητα προς συγκεκριμένες κινάσες ή να ασκούν μη εκλεκτική ευρεία δράση (Εικόνα 8).¹³



Εικόνα 8: Μηχανισμός αναστολής κινασών.

1.2 ΒΑΣΙΚΕΣ ΔΟΜΕΣ ΩΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

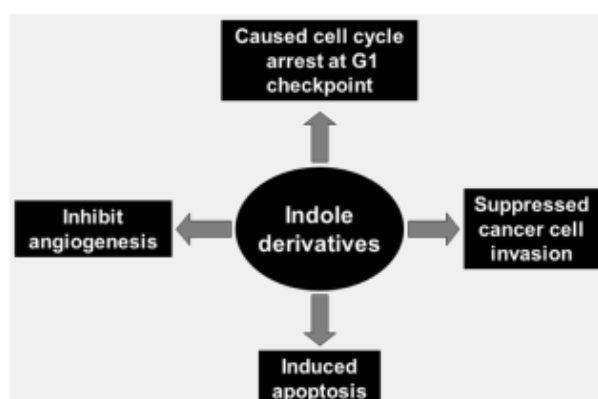
Στην προσπάθεια εύρεσης νέων δομών για την πληθώρα των στόχων που σχετίζονται με τον καρκίνο δύο δακτύλιοι εμφάνισαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, το ινδόλιο και η κιναζολίνη. Οι δύο αυτοί δακτύλιοι έχουν χρησιμοποιηθεί σαν ενώσεις οδηγό για τη σύνθεση πλήθους παραγώγων που σχετίζονται με την αντικαρκινική θεραπεία. Πολλά από αυτά αποτελούν αναστολείς κινασών και τοποϊσομερασών και φέρουν στο βασικό σκελετό τους ινδόλιο ή κιναζολίνη (ή κιναζολινόνη συχνά). Κάποια μάλιστα αποτελούν πλέον γνωστά φάρμακα της αντικαρκινικής χημειοθεραπείας. Επιπλέον, διάφορα παράγωγα ινδολίου και κιναζολίνης (ή κιναζολινόνης) έχουν βρεθεί και απομονωθεί σε πολλά προϊόντα διατροφής και έχουν μελετηθεί τόσο για τις προφυλακτικές όσο και για τις θεραπευτικές αντικαρκινικές ιδιότητες, ενώ κάποιοι από τους μεταβολίτες τους έχουν δείξει ακόμα πιο αξιολογη δράση.

1.2.1 ΙΝΔΟΛΙΟ

Τα ινδόλια αποτελούν ετεροκυκλικούς αρωματικούς δακτυλίους και υπάρχουν σε διάφορα φυτά και λαχανικά ή στο έντερο μέσω της βακτηριακής αποσύνθεσης της τρυπτοφάνης.

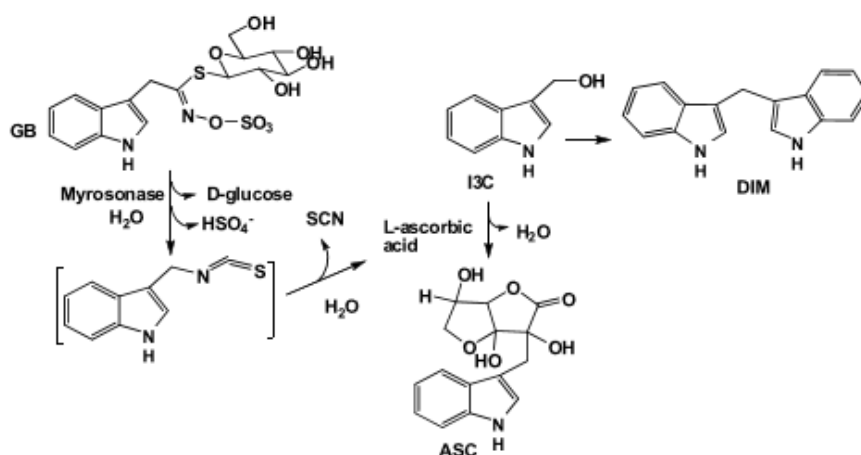
Επίσης, αποτελούν πρώτες ύλες για τη σύνθεση βιοχημικών και συνθετικών παραγώγων και παίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία των κυττάρων. Στο εργαστήριο μπορούν να παρασκευαστούν με πολλούς τρόπους με πλέον γνωστότερο αυτόν της σύνθεσης ινδολίων κατά Fisher.

Ανήκουν στην κατηγορία των φυτοθεραπευτικών παραγώγων και έχει αποδειχθεί ότι πολλά παράγωγα τους, προερχόμενα από τη διατροφή και το μεταβολισμό, έχουν αντιμεταλλαξιογόνες και αντικαρκινικές ιδιότητες (Εικόνα 9), χωρίς όμως αυτό να περιορίζει και την πληθώρα άλλων δράσεων, όπως η αντιφλεγμονώδης με χαρακτηριστικά τα γνωστά παράγωγα της ινδομεθακίνης, η αντιοξειδωτική, η αντιμικροβιακή, η αναλγητική, η δράση στο καρδιαγγειακό και άλλες.



Εικόνα 9: Δράση παραγώγων ινδολίου.

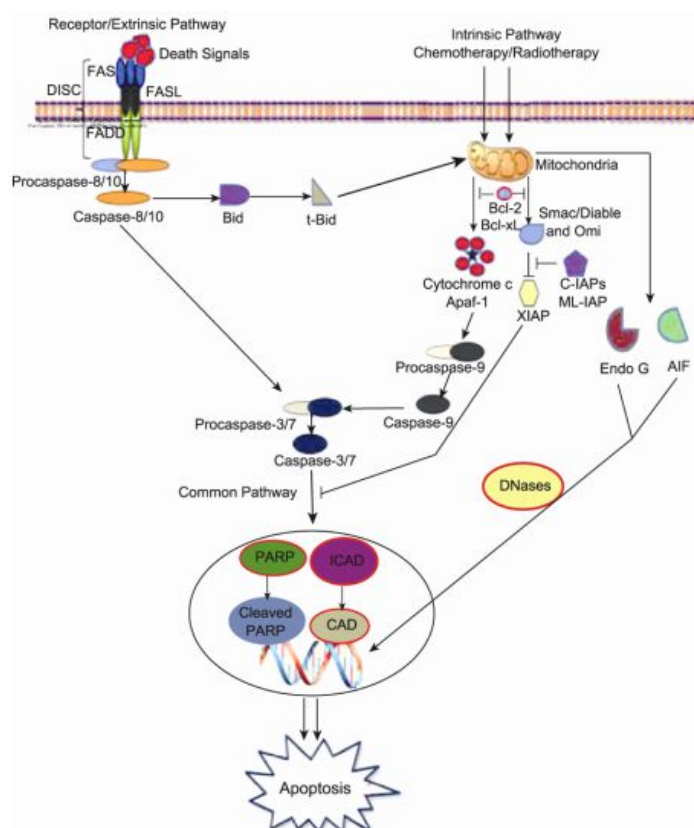
Φυτά, όπως το μπρόκολο, τα ραπανάκια, το λάχανο, κ.ά. περιέχουν γλυκομπρασικίνες και νεογλυκομπρασικίνες, οι οποίες όταν το λαχανικό μασηθεί ή κοπεί υδρολύονται προς σχηματισμό της ινδολο-3-καρβινόλης (I3C). Αυτή στη συνέχεια, σε όξινο περιβάλλον πολυμερίζεται σε δινδολομεθάνιο (DIM) και ασκορβιγένιο (ASC) (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Βιοσύνθεση φυσικών ινδολίων.

Η I3C και το DIM έχουν μελετηθεί εκτενώς για τις αντικαρκινικές και κατά τις ογκογένεσης ιδιότητες τους, ενώ έχει αποδειχθεί ότι διαταράσσουν το φυσιολογικό πολλαπλασιασμό των

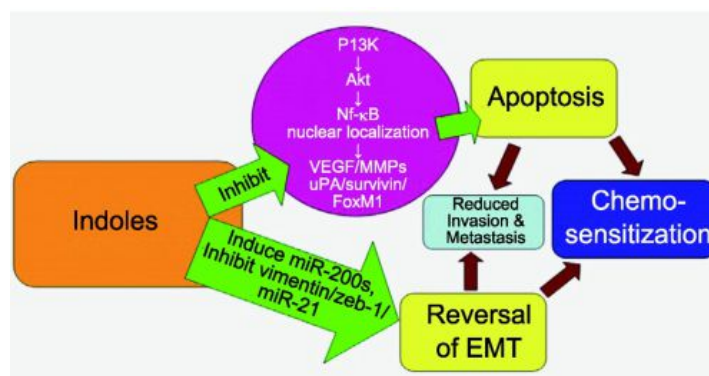
κυττάρων, εμποδίζοντας την G1 φάση του κυτταρικού κύκλου, οδηγώντας σε απόπτωση. Επιπλέον, φαίνεται να επηρεάζουν και να ρυθμίζουν τη λειτουργία πολλών γονιδίων που σχετίζονται με τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, επηρεάζοντας έτσι όχι μόνο τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση, αλλά και τη μεταγωγή σημάτων, την αγγειογένεση και την προσβολή των κυττάρων από εξωγενείς παράγοντες. Σημαντική έχει αποδειχθεί επίσης, η συμβολή τους ως προφυλακτικών και προληπτικών παραγόντων στον καρκίνο του μαστού, των ωθηκών, του προστάτη, του κόλονος και της ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας (Εικόνα 11).^{19,20}



Εικόνα 11: Εξωτερικό και εσωτερικό βιοχημικό μονοπάτι δράσης ινδολίων.

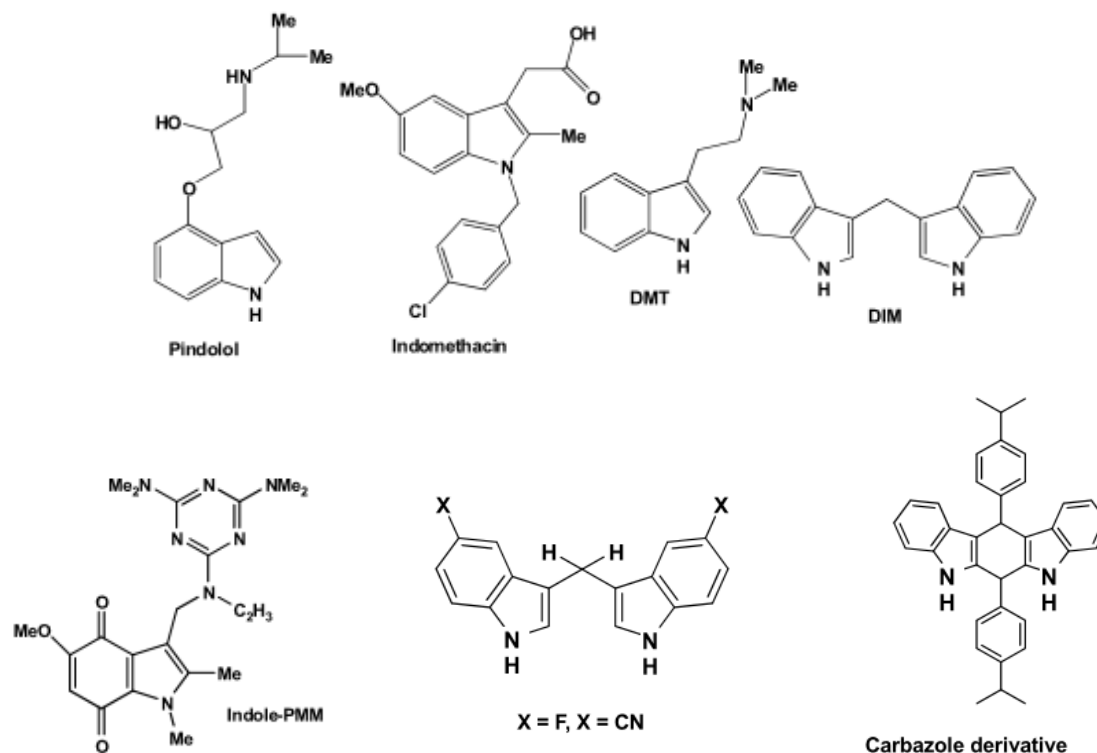
Εκτός όμως από τα ιδολικά παράγωγα μεταβολισμού, έχουν αναφερθεί πολλοί μηχανισμοί με τους οποίους μια ποικιλία αναλόγων ινδολίου μπορούν να προάγουν τη απόπτωση των καρκινικών κυττάρων, εμποδίζοντας την έκφραση σημαντικών γονιδίων, αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό τους και τις βασικές κυτταρικές λειτουργίες. Επιπλέον, διάφορα παράγωγα ινδολίου έχουν την ικανότητα να μέσω πολύπλοκων μηχανισμών ή των προϊόντων μεταβολισμού τους να προκαλούν αναστολή της αγγειογένεσης και της μετάστασης των καρκινικών κυττάρων και συνεπώς αναστολή της εξάπλωση των καρκινικών όγκων. Εξαιτίας της ικανότητας αυτών των παραγώγων να επεμβαίνουν σε πολλά βιοχημικά μονοπάτια και να επηρεάζουν τη λειτουργία τόσο των φυσιολογικών όσο και των καρκινικών κυττάρων, έχει αναφερθεί ότι μπορούν να συμβάλλουν στην ανάπτυξη χημειο- και ανασο-αντοχής πολλών αντικαρκινικών φαρμάκων. Αυτό είναι αποτέλεσμα της παρεμβολής σε κάποια μονοπάτια μεταγωγής σημάτων που σχετίζονται με την απόπτωση,

συμβάλλοντας έτσι στην αντιμετώπιση ακόμα και ανθεκτικών σε φάρμακα καρκινικών όγκων (Εικόνα 12).



Εικόνα 12: Σύνοψη μηχανισμών αντικαρκινικής δράσης ινδολίων.

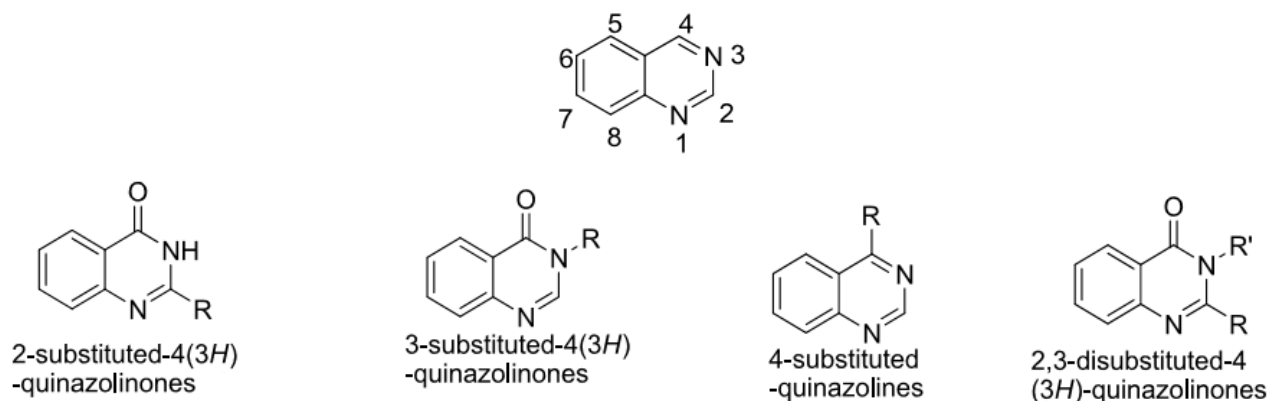
Πλήθος άλλων παραγώγων βιοσυντίθενται από παράγωγα ινδολίου και είναι γνωστές οι βοηθητικές και προφυλακτικές τους δράσεις για τον οργανισμό, όπως η σεροτονίνη, η ψιλοχιμπίνη, οι φυσικά προερχόμενες β-καρβολίνες και διάφορα μονοτερπενικά και εργοτινικά αλκαλοειδή. Έτσι λοιπόν, διακρίνεται ο σημαντικός ρόλος αυτού του δακτυλίου στην έρευνα για την ανακάλυψη και σύνθεση νέων φαρμάκων. Μέσα στα χρόνια έχει συντεθεί μεγάλος αριθμός παραγώγων ινδολίου με αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές, αντιμικροβιακές, αντιρευματικές, αντιφλεγμονώδεις, αναλγητικές, αντιπυρετικές, αντισπασμωδικές, ανθελμινθικές και άλλες ιδιότητες. Από αυτές πολλές έχουν φτάσει να αποτελούν σήμερα σημαντικές φαρμακευτικές ουσίες όπως η αντιφλεγμονώδης ινδομεθακίνη (Indocin®), η πινδολόλη ως β-αποκλειστής-αντιυπερτασικό (Viskin®), η ψυχεδελική διμεθυλτροπιταμίνη (DMT), η BioResponse DIM® με οιστρογονική δράση για άντρες και γυναίκες, το Indole-PMM ως προφάρμακο και 2^η θεραπεία εκλογής στον καρκίνων των ωοθηκών. Λόγω του ενδιαφέροντος αυτού του δακτυλίου και την εύρεση παραγώγων φυσικής, αλλά και συνθετικής προέλευσης με πολύ καλή αντικαρκινική δράση έχουν αναπτυχθεί ποικιλία νέων παραγώγων με ακόμα καλύτερες αντικαρκινικές ιδιότητες, πολλά από τα οποία βρίσκονται ήδη σε κλινικές (Εικόνα 13).²⁰



Εικόνα 13: Εμπορικά διαθέσιμα και άλλα παράγωγα ινδολίου.

1.2.2 ΚΙΝΑΖΟΛΙΝΗ.

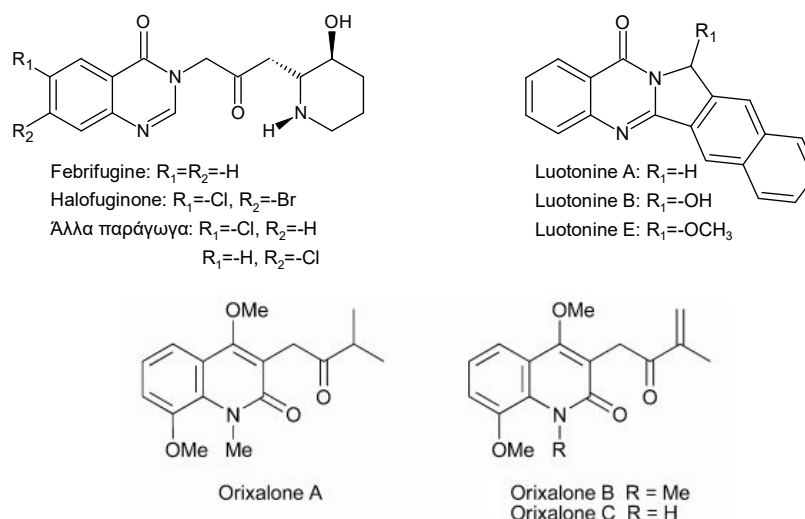
Οι κιναζολίνες είναι ετεροκυκλικοί δακτύλιοι, αποτελούμενοι από το βενζολικό δακτύλιο και πυριμιδίνη. Η μελέτη τους ξεκίνησε ύστερα από την ταυτοποίηση του αλκαλοειδούς *Febrifugine*, παράγωγο με πολύ καλή ανθελονοσιακή δράση, από το κινέζικο φυτό *Dichroa Febrifuga Lour.* Το παράγωγο αυτό και το ανάλογο του *Halofuginone*, μελετήθηκαν και για τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες, με σημαντικότερες αυτές της καταστολής της αγγειογένεσης και της αναστολής ανάπτυξης μεταστάσεων σε όγκους στον εγκέφαλο. Αυτό οδήγησε στην ανακάλυψη πολλών νέων μορίων που διαθέτουν ως κιναζολίνη ως βασικό κομμάτι του σκελετού τους. Τα νέα αυτά παράγωγα εμφάνιζαν μια ποικιλία δράσεων, με την αντικαρκινική, αντιβακτηριακή, αντική, αντιφλεγμονώδη, αντιδιαβητική, αντιοξειδωτική, αντισπασμωδική, αντιμυκητιασική και σχετιζόμενη με διαταραχές του κεντρικού νευρικού συστήματος να ξεχωρίζουν. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα και την αναζήτηση νέων χημικά συντιθέμενων δομών με βελτιστοποιημένη δράση. Αξιοσημείωτο είναι να αναφερθεί ότι έχουν απομονωθεί και φυσικά παράγωγα που φέρουν το δακτύλιο της κιναζολινόνης, που αποτελεί και αυτός παράγωγο της κιναζολίνης με εξίσου σημαντικές δράσεις. Διαθέτει δύο ισομερείς δομές, τη 2-κιναζολινόνη και την 4-κιναζολινόνη, με την τελευταία να είναι συνήθως επικρατέστερη. Έτσι λοιπόν, η κιναζολίνη και η κιναζολινόνη μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε 4 ομάδες ανάλογα με τον αριθμό και τη θέση των υποκαταστατών τους, όπως περιγράφεται στην Εικόνα 14:



Εικόνα 14: Κατηγοριοποίηση κιναζολίνης και κιναζολινόνης.

Από αυτές, ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τις φαρμακολογικές τους ιδιότητες έναντι ποικιλίας μοριακών στόχων εμφανίζουν τα 2,3,6-τρις-υποκατεστημένα ανάλογα. Για τη σύνθεση του βασικού σκελετού με τις υποκαταστάσεις του έχουν προταθεί πολλοί τρόποι σύνθεσης, ενώ και πολλά από τα φυσικά αλκαλοειδή παράγωγα κιναζολίνης και ανάλογα αυτών έχουν συντεθεί χημικά.²¹

Από τα φυσικά απομονωμένα αλκαλοειδή, εκτός του Febrifugine και Halofugine, ξεχωρίζουν πολλά για τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες και με βάση αυτά έχουν συντεθεί πληθώρα συνθετικών αναλόγων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η λουτονίνη και τα παράγωγα της, τα οποία είναι ισχυροί αναστολείς της τοποϊσομεράσης I μέσω σταθεροποίησης του σύμπλοκου τους με το DNA. Επίσης, το Orixalone A και τα ανάλογα του, απομονωμένα από το φυτό *O. Japonica*, χωρίς να εμφανίζουν μεγάλη κυτταροτοξικότητα, αναστέλλουν την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO), με κλινική σημασία ως προστατευτικοί- προληπτικοί παράγοντες έναντι του καρκίνου (Εικόνα 15).²²

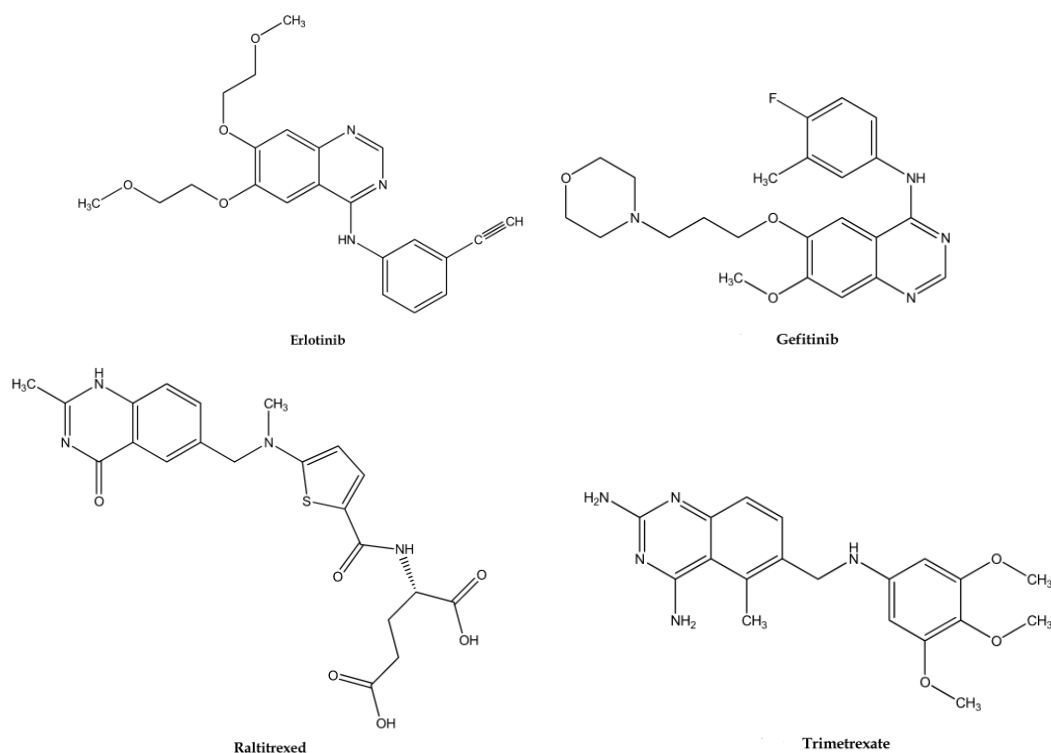


Εικόνα 15: Φυσικά απομονωμένα αλκαλοειδή, παράγωγα κιναζολίνης με ενδεδειγμένες αντικαρκινικές ιδιότητες.

Με έναυσμα την πληθώρα φυσικά απομονωμένων παραγώγων με ενδεδειγμένες δράσεις έναντι του καρκίνου έχουν συντεθεί πολλά νέα ανάλογα κιναζολίνης με ενισχυμένες

αντικαρκινικές ιδιότητες. Η δραστηριότητα αυτών των παραγώγων δεν οφείλεται μόνο στην ικανότητα του δακτυλίου να αλληλεπιδρά με τους μοριακούς στόχους, αλλά και συχνά είναι αποτέλεσμα της δημιουργίας ανόργανων και άλλων συμπλόκων στον οργανισμό. Πολλά νέα παράγωγα δρουν ως αναστολείς του EGF υποδοχέα, ή μπορούν να αναστέλλουν την ενεργοποίηση του NF-κB παράγοντα και άλλων ανθρώπινων παραγόντων ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων. Η δράση τους οφείλεται στην ενεργοποίηση πολύπλοκων βιοχημικών μονοπατιών και ενζύμων, όπως οι κασπάσες, μέσω ενός εσωτερικού (μιτοχονδριακά) ή ενός εξωτερικού (μέσω του TNF υποδοχέα) μηχανισμού. Ανεξάρτητα από το μηχανισμό δράσης των παραγώγων, τα καρκινικά κύτταρα οδηγούνται τελικά σε απόπτωση μέσω σύντηξης των κυτταρικών τους μεμβρανών, συμπυκνώσεις χρωμοσωμάτων, κ.ά..^{23,24}

Πολλά από αυτά τα νέα παράγωγα αποτελούν πλέον φαρμακευτικές ουσίες που κυκλοφορούν ευρέως στην αγορά. Το Erlotinib είναι γνωστό χημειοθεραπευτικό φάρμακο ως αναστολείς του EGF υποδοχέα και χρησιμοποιούνται σε πολλά θεραπευτικά σχήματα. Επίσης, το Iressa (Gefitinib) αποτελεί και αυτό ισχυρό αναστολέα του υποδοχέα EGF με αποτελεσματικότητα στον καρκίνο του μαστού και στην ανθρώπινη λευχαιμία. Το Vandetanib αποτελεί και αυτό γνωστό αναστολέα τυροσινικών κινασών, ανταγωνιζόμενο τους VEGF και EGF υποδοχείς και χρησιμοποιείται έναντι κάποιων μορφών καρκίνου του θυρεοειδούς. Το Laratiniib ανήκει στα εμπορικά διαθέσιμα φάρμακα, με χαρακτηριστικό δισυποκατεστημένο δακτύλιο κιναζολίνης στο μόριο του και λειτουργεί ως αναστολέας κινασών. Το Raltitrexed είναι παράγωγο της κιναζολινόνης και αποτελεί αναστολέας της θυμιδικής σύνθεσης έναντι του καρκίνου του παχέος εντέρου (Εικόνα 16).^{21,25}



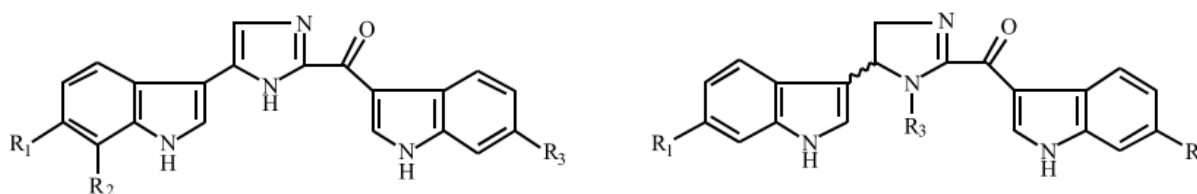
Εικόνα 16: Εμπορικά διαθέσιμα φάρμακα, παράγωγα κιναζολίνης.

1.3 ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΑ ΜΟΡΙΑ-ΑΝΑΛΟΓΑ ΙΝΔΟΛΙΟΥ ΚΑΙ/Η ΚΙΝΑΖΟΛΙΝΗΣ

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω, τα ανάλογα ινδολίου και κιναζολίνης εμφανίζουν μεγάλη ποικιλία δομών και δράσεων ανάλογα με το μοριακό στόχο. Οι φυτικοί οργανισμοί αποτελούσαν επί αρχαιοτάτων χρόνων αντικείμενο αναζήτησης και μελέτης για την αντιμετώπιση διάφορων ασθενειών. Γρήγορα παρατηρήθηκε ότι πολλά μόρια που απομονώθηκαν από φυτά χαρακτηρίζονται από ήπιες ή και εντονότερες αντικαρκινικές ιδιότητες. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν κάποια αλκαλοειδή με δράση έναντι τοποϊσομερασών ή κινασών και χαρακτηριστική δομή ινδολοπυριδοκιναζολινόνης, όπως είναι η *Rutaecarpine* και η *Evodiamine* και ινδολο[2,3-α]καρβαζολίου, όπως είναι η *Staurosporine* και η *Rebeccamycin*, αλλά και τα *Bis-indoles* αλκαλοειδή με χαρακτηριστική δομή δινδολίου, τα οποία έχουν ληφθεί από διάφορες φυσικές πηγές. Παρακάτω θα δοθούν κάποια βασικά χαρακτηριστικά και ιδιότητες των μορίων αυτών για να γίνει κατανοητός ο μηχανισμός με τον οποίο δρουν έναντι του καρκίνου, χωρίς να απουσιάζουν και πληθώρα άλλων παράλληλων δράσεων.

1.3.1 BIS-INDOLES ΑΛΚΑΛΟΕΙΔΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΟΓΑ ΑΥΤΩΝ.

Τα παράγωγα δινδολίου (*bis-indoles*) διαθέτουν ένα βασικό σκελετό αποτελούμενο από δύο ινδόλια που ενώνονται μεταξύ τους είτε με αλειφατικό είτε με ετεροκυκλικό τμήμα. Είναι δομές με μεγάλη ποικιλία αναλόγων, συνθετικών και φυσικών (αλκαλοειδών). Τα παράγωγα δινδολίου απομονώνονται κατά κύριο λόγο από το θαλάσσιο περιβάλλον και πιο συγκεκριμένα παρουσιάζουν ραγδαία εξάπλωση στα φίκη. Μάλιστα, το είδος και η δράση των αλκαλοειδών διαφέρουν ανάλογα με το βάθος που βρίσκεται το φίκος, καθώς αναπτύσσονται διαφορετικοί μεταβολίτες. Το ενδιαφέρον γύρω από αυτά τα παράγωγα ξεκίνησε το 1987 όταν ανακαλύφθηκε αρχικά το αλκαλοειδές *Topsentin* και ανάλογα αυτού, όπως το *Bromotopsentin* και το *Deoxytopsentin* από το φίκος *Topsentia genitrix*, *Halichondriidae* (Εικόνα 17).



- 1 $R_1 = R_2 = H, R_3 = OH$ **topsentin**
 2 $R_1 = Br, R_2 = H, R_3 = OH$ **bromotopsentin**
 3 $R_1 = R_2 = R_3 = H$ **deoxytopsentin**
 6 $R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = Br$ **isobromotopsentin**
 7 $R_1 = Br, R_2 = R_3 = H$ **bromodeoxytopsentin**
 8 $R_1 = R_2 = H, R_3 = Br$ **isobromodeoxytopsentin**

- 4 $R_1 = Br, R_2 = R_3 = H$
 5 $R_1 = R_2 = Br, R_3 = Me$ **Topsentin C**

Εικόνα 17: Αλκαλοειδή δινδολίου των *Spongosorites sp.*

Τα παράγωγα αυτά παρουσίαζαν αρκετά μεγάλη τοξικότητα της τάξης των μM , έναντι πολλών καρκινικών κυτταρικών σειρών, καθώς επίσης και σημαντική αντιμικροβιακή δράση. Φαίνεται να είναι δραστικά σε κάποια είδη λευχαιμίας και μελανώματος, αναστέλλοντας των πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Ωστόσο, παρά την ικανότητα πρόσδεσης στο γενετικό υλικό, δεν εμπλέκονται στους μηχανισμούς πολλαπλασιασμού τους. Τέλος, τα αλκαλοειδή αυτά, παρουσίαζαν μικρή αναστολή της φωσφολιπάσης A_1 , εκφράζοντας έτσι και μια αντιφλεγμονώδη δράση.²⁶ Μετά από αυτή την ανακάλυψη ακολούθησαν πολλές μελέτες για την απομόνωση κι άλλων δομών παρόμοιας δομής με ανάλογες δράσεις, τα περισσότερα από τα οποία προκύπτουν βιοσυνθετικά από την τρυπταμίνη.²⁷

Τα αλκαλοειδή της μορφής δινδολίου μπορούν να διακριθούν σε τέσσερις κατηγορίες, ανάλογα με το είδος του συνδετικού τμήματος μεταξύ των δύο ινδολίων:

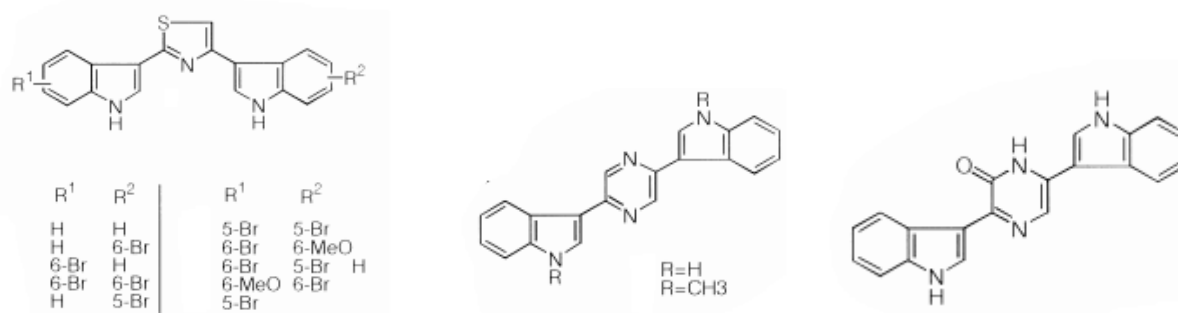
- Τα ανάλογα Toposentin, τα οποία φέρουν ως συνδετικό τμήμα των δύο ινδολίων ένα ακυλιμιδαζόλιο.
- Τα ανάλογα του Nortoposentin, τα οποία φέρουν ως συνδετικό τμήμα ένα ιμιδαζόλιο, χωρίς την κετο-ομάδα των παραγώγων της πρώτης κατηγορίας.
- Τα ανάλογα Dragmacidins, τα οποία φέρουν ως συνδετική ομάδα πιπεραζίνη ή πιπεραζινόνη.
- Τα ανάλογα Hamacanthins, τα οποία φέρουν ως συνδετική ομάδα πυραζινόνη.

Εκτός της αντικαρκινικής, κυτταροτοξικής δράσης τους, πολλοί από αυτούς τους μεταβολίτες εμφάνισαν και αξιοσημείωτες αντιμικροβιακές, αντιακές, αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, καθώς και ικανότητα αναστολής των α_1 -αδρενεργικών υποδοχέων. Οι μεταβολίτες των ειδών Hamacanthins sp. και Dragmacidins sp. παρουσιάζουν ανάλογη δράση με αυτούς του Toposentin. Μόνη εξαίρεση είναι ότι κανένα από τα ανάλογα του Nortoposentin, δεν παρουσίαζαν αντιακή δράση παρά την πολύ μικρή δομική διαφορά που παρουσιάζουν με τα ανάλογα του Toposentin.²⁶

Σημαντικά αλκαλοειδή αυτής της δομής είναι και τα παράγωγα του είδους *Catharanthus roseus* G. Don (*Vinca rosea* L.), που αποτέλεσαν έναυσμα για την εισαγωγή των φυτικών εκχυλισμάτων στην χημειοθεραπεία. Γνωστά παράγωγα, που χρησιμοποιούνται σήμερα στη θεραπεία του καρκίνου και ανήκουν στα αλκαλοειδή της *Vinca* είναι τα Vincristine, Leurosine, Leurosidine. Τα πολύπλοκα αυτά διμερή ινδολίου εμφανίζουν ογκολυτική δράση και φαίνεται να αναστέλλουν την ανάπτυξη λευχαιμικών καρκινικών κυττάρων που έχουν αναπτύξει ανοχή στον συγκεκριμένο κάθε φορά κυτταρικό τύπο. Μηχανιστικά, φαίνεται να επεμβαίνουν στις διαδικασίες συσσωμάτωσης της τουμπουλίνης και συνεπώς στη μίτωση και στη σύνθεση του γενετικού υλικού ή σε άλλες δραστηριότητες, παρεμβαλλόμενα στο DNA, εμποδίζοντας την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Η χρήση τους σε κακοήθεις διαταραχές, όπως η λεμφοκυτταρική νόσος, συμπεριλαμβανομένου των λεμφωμάτων Hodgkin's και non-Hodgkin's, της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας, του καρκίνου του Wilms', του εμβρυικού ραβδομυοσαρκώματος, του σαρκώματος Ewing's, καθώς και άλλων όχι τόσο συχνών περιπτώσεων, όπως ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα, είναι αποτέλεσμα τόσο της

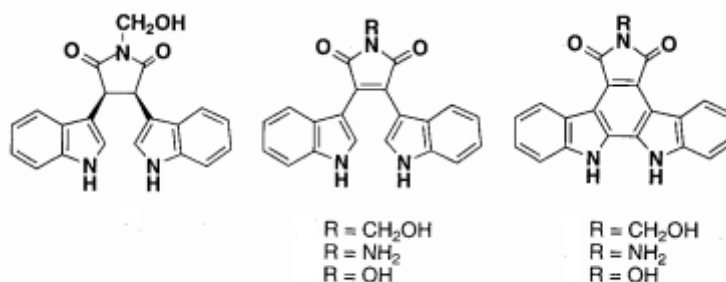
μοναδικής τους δράσης όσο και της τοξικότητας τους. Επίσης, σε μη ιάσιμες περιπτώσεις, σε καρκίνο του μαστού, μελάνωμα ή μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, αυτά τα φάρμακα προσφέρουν βελτίωση των συμπτωμάτων. Επιπλέον, αλκαλοειδή της Vinca, έχουν χρησιμοποιηθεί και είναι αποτελεσματικά σε αιμοπεταλιακές και θρομβωτικές διαταραχές, πολλές φορές θανατηφόρες. Τα παράγωγα αυτά σχετίζονται συχνά όμως και με ανεπιθύμητες ενέργειες, κυρίως νευρολογικές (σχιζοφρένεια, ψυχωτικά επεισόδια, κτλ), κ.ά., γεγονός που υποδεικνύει την ανάγκη για στοχευμένη και εκλεκτικότερη δράση.²⁸

Τα αλκαλοειδή αυτά λόγω του ενδιαφέροντος που προκαλεί η ποικιλία των δράσεων τους, έχουν αποτελέσει ενώσεις- οδηγούς για τη σύνθεση νέων παραγώγων με πιο εκλεκτική και ισχυρή δράση. Στόχος αποτελεί η σύνθεση παραγώγων ως εκλεκτικών αναστολέων κινασών για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων και την εξάλειψή τους. Έτσι, λοιπόν, συνθετικά παράγωγα ανάλογα του Nortopsentin, που φέρουν αντί του ιμιδαζολικού δακτυλίου, θειαζόλιο, πυραζινόνη ή πυραζίνη έδειξαν πολύ καλή αναστολή διάφορων καρκινικών κυτταρικών σειρών (του στήθους, των ωοθηκών, των νεφρών, του κόλονος, μη-μικροκυτταρικού καρκίνου των πνευμόνων, του προστάτη και του μελανώματος) της τάξης μM - nM (Εικόνα 18).^{29,30}



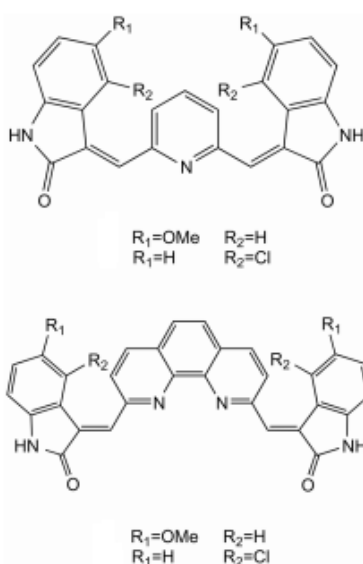
Εικόνα 18: Συνθετικά ανάλογα του Nortopsentin με αντικαρκινικές ιδιότητες.

Αντίθετα, άλλα παράγωγα που φέρουν μεταξύ των δύο ινδολίων μαλεϊμίδιο, υποκατεστημένο στο ιμιδικό άζωτο του, δρουν ως αναστολείς των πρωτεϊνικών κινασών A και C (PKA και PKC αντίστοιχα), εμφανίζοντας όμως αντιμικροβιακές ιδιότητες. Ανάλογες ιδιότητες παρουσίασαν και τα παρόμοιας δομής υποκατεστημένα ινδολοκαρβαζόλια (Εικόνα 19).³¹



Εικόνα 19: Αναστολείς PKC και PKA με αντιμικροβιακή δράση.

Αντίστοιχης δομής συνθετικά ανάλογα που πλέον φέρουν υποκατάσταση, μακριές αμινικές αλυσίδες, στο ένα ή και στα δύο άζωτα των ινδολίων ή στο βενζολικό δακτύλιο των ινδολίων, όπως -OH, -Cl, -NO₂ φαίνεται να αναστέλλουν στην κλίμακα των nM την GSK-3α και GSK-3β και την PKC. Η δράση αυτών των κινασών σχετίζεται με πολλά βιοχημικά μονοπάτια και διαταραχή της φυσιολογικής λειτουργίας τους μπορεί να οδηγήσει σε πολλές ασθένειες.³² Κάποια άλλα παράγωγα που φέρουν ως συνδετικό κομμάτι πυριδίνη ή φαινανθρολίνη φαίνεται να αναστέλλουν την ανάπτυξη καρκινικών όγκων με ένα τελείως διαφορετικό μηχανισμό. Συνδεόμενα στο G- τετράπολο (G-quadruplex), το οποίο αποτελείται από τέσσερις όξινες νουκλεϊνικές αλυσίδες, πλούσιες σε γουανίνη παρουσία κατιόντων, αναστέλλουν την τελομεράση, ένζυμο το οποίο υπερεκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα, και στο οποίο φυσιολογικά οφείλεται η γήρανση των κυττάρων (Εικόνα 20). Η αναστολή του ενζύμου οδηγεί σε βλάβες στο DNA και απόπτωση.³³



Εικόνα 20: Αναστολείς της τελομεράσης με αντικαρκινική δράση.

1.3.2 STAUROSPORINE ΚΑΙ ΑΝΑΛΟΓΑ ΤΗΣ.

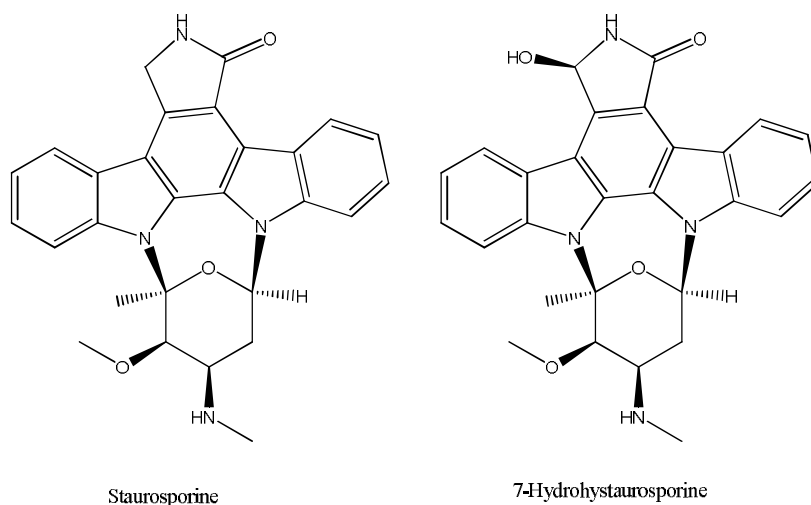
Η Staurosporine ανακαλύφθηκε το 1977, όταν απομονώθηκε για πρώτη φορά από τον *Streptomyces staurosporeus* και είναι ένας ATP-συναγωνιστικός αναστολέας. Αρχικά ταυτοποιήθηκε ως ένας πολύ ισχυρός αναστολέας της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC, IC₅₀=2 nM), όμως γρήγορα ανακαλήφθηκε ότι παρουσιάζει μη εκλεκτική ανασταλτική δράση έναντι πολλών κινασών και ειδικότερα έναντι των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (CDK1 IC₅₀=3.2 nM, CDK2 IC₅₀=7 nM, CDK4 IC₅₀=3-10 μM).³⁴ Διαθέτει χαρακτηριστική δομή ινδολο[2,3-*a*]καρβαζολίου που είναι απαραίτητη για τη δράση της, με τους δύο ινδολικούς δακτυλίους να συνδέονται με ένα σάκχαρο με δομή λουτήρα που είναι και η δραστική διαμόρφωση, ενώ ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο παίζει και το C-5 καρβονύλιο. Σύμφωνα με κρυσταλλογραφικά δεδομένα η Staurosporine ανταγωνίζεται το ATP στη θέση πρόσδεσης του στην καταλυτική περιοχή σύνδεσης του ενζύμου. **Κατά την αλληλεπίδραση αυτή**

ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο παίζει το αμινοσάκχαρο το οποίο καταλαμβάνει την κοιλότητα της ριβόζης, ενώ ο πυρρολικός δακτύλιος και πιο ειδικά το C-5 καρβονύλιο και το γειτονικό άζωτο αναπτύσσει δεσμούς υδρογόνου ανάλογους με αυτούς της αδενυλομάδας του ATP. Στις αλληλεπιδράσεις δεν θα πρέπει να ξεχνιούνται και αυτές του ετεροκυκλικού σκελετού, ο οποίος καταλαμβάνει την θέση της αδενυλομάδας του ATP.³⁵

Η βιοσύνθεση του ελέγχεται από μια ομάδα 18 γονιδίων και περιλαμβάνει πλήθος ενζύμων με αποτέλεσμα ο δακτύλιος του ινδολοκαρβαζολίου να προέρχεται από δυο μόρια τρυπτοφάνης, ενώ το σάκχαρο να συντίθεται από γλυκόζη και μεθειονίνη.

Εκτός της αντινεοπλασματικής του δράσης έναντι διάφορων μορφών καρκίνου, το μόριο διαθέτει και κάποιες άλλες δράσεις όπως αντιμυκητιστακή, αγγειοδιασταλτική, υποτασική, ενώ σύμφωνα με διάφορες μελέτες μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη συμπτωματική θεραπεία έναντι της νόσου Alzheimer και άλλων νευροεκφυλιστικών διαταραχών πιθανώς μέσω αναστολής της ακετυλο- ή/και της βουτυλο-χοληνεστεράσης, όπως επίσης και λόγω της ισχυρής αντιφλεγμονώδους δράσης του.³⁵

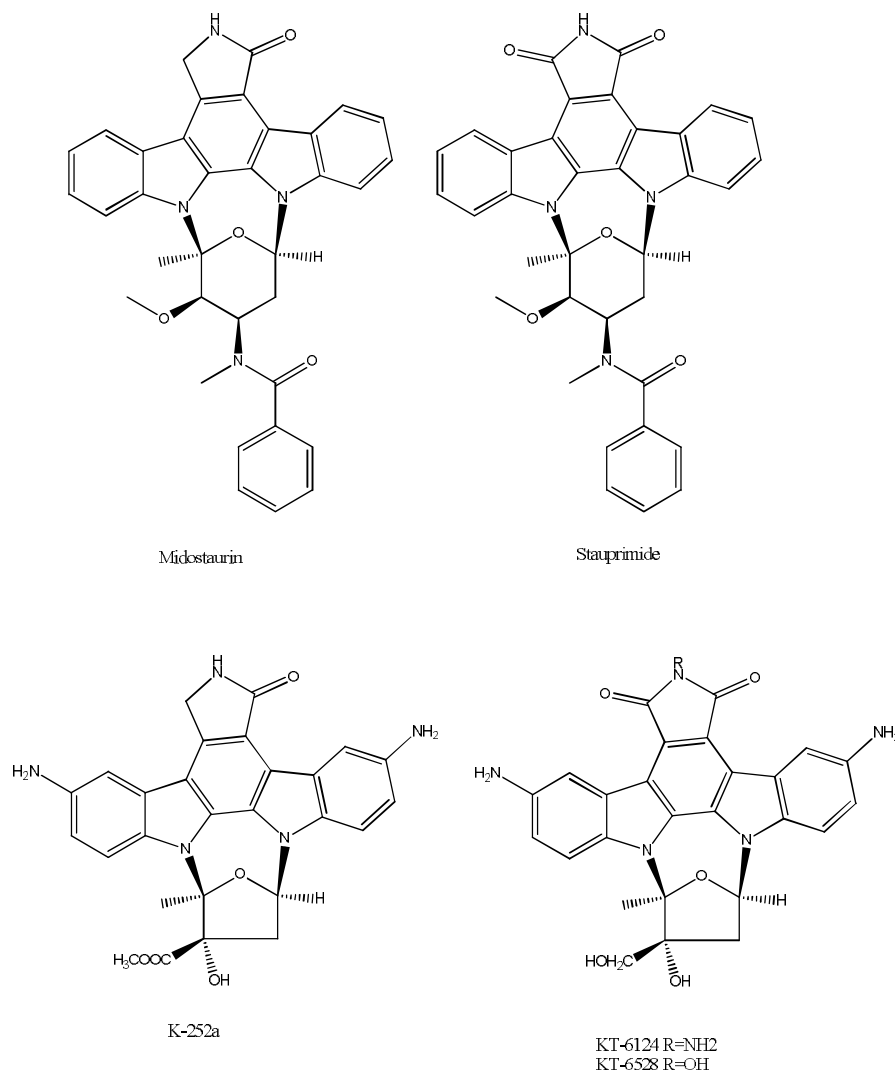
Εκτός της Staurosporine έχουν απομονωθεί και πολλά άλλα φυσικά προϊόντα που φέρουν τον σκελετό του ινδολο[2,3-*a*]καρβαζολίου, όπως η 7-Hydroxystaurosporine, η οποία βρίσκεται σε κλινικές δοκιμές φάσης II (Εικόνα 21).^{35,36}



Εικόνα 21: Δομή Staurosporine και 7-Hydroxystaurosporine.

Τόσο η Staurosporine όσο και η 7-Hydroxystaurosporine έχουν αποτελέσει ενώσεις οδηγούς για την ανάπτυξη νέων αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών.³⁵ Οι προσπάθειες έχουν επικεντρωθεί στην ανάπτυξη παραγώγων με τροποποιημένο σάκχαρο ή τροποποιημένο τον πυρρολικό δακτύλιο. Μεταξύ αυτών ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα K-252a, KT6124 και KT6528 που αποτελούν μη εκλεκτικούς αναστολείς της PKC, με δράση έναντι πολλών καρκινικών κυτταρικών σειρών καθώς και ανασταλτική δράση έναντι της τοποϊσομεράσης I. Επίσης, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν το Stauprimide³⁷, το οποίο περιγράφηκε για πρώτη φορά στην βιβλιογραφία το 1994 ως μέρος ενός προγράμματος για την ανάπτυξη εκλεκτικών αναστολέων της PKC ως πιθανών αντικαρκινικών παραγόντων

και το Midostaurin, ένα μη εκλεκτικό αναστολέα πρωτεϊνικών κινασών που βρίσκεται σε κλινικές μελέτες φάσης III για την θεραπεία οξείας μυελογενούς λευχαιμίας (Εικόνα 22).³⁸

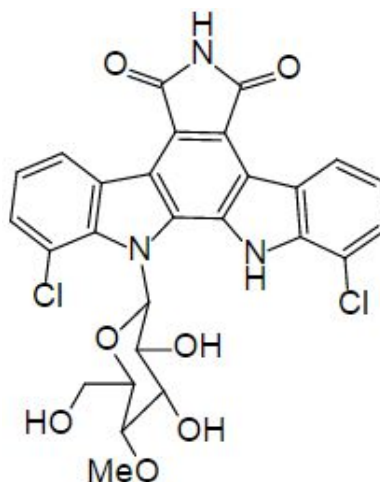


Εικόνα 22: Δομικά ανάλογα Staurosporine.

1.3.3 REBECCAMYCIN ΚΑΙ ΑΝΑΛΟΓΑ ΤΗΣ.

Η Rebeccamycin, μεταβολίτης του *Saccharothrix aerocolonigenes* με δομή ινδολο[2,3-a]καρβαζολίου, απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1985 (Εικόνα 23). Χημικώς σχετίζεται με τη Staurosporine και τα ανάλογα της, όμως παρουσιάζει βασικές δομικές διαφορές οι οποίες καθορίζουν και τα φαρμακολογικά της χαρακτηριστικά. Οι διαφορές αυτές επικεντρώνονται στο γεγονός ότι η ομάδα του σακχάρου συνδέεται μόνο στο ένα ινδολικό άτομο αζώτου και ο ανώτερος ετεροκυκλικός δακτύλιος είναι ένα μίδιο, ενώ στη Staurosporine αμίδιο. Οι διαφορές αυτές είναι πολύ σημαντικές για την δράση της ένωσης. Έτσι ενώ η Staurosporine είναι ένας μη εκλεκτικός αναστολέας πρωτεϊνικών κινασών, η Rebeccamycin εμφανίζει εκλεκτικότητα έναντι της τοποϊσομεράσης I, χωρίς δράση έναντι

της PKC ή άλλων κινασών. Απουσία ή αλλαγή της θέσης του σακχάρου καθιστά το μόριο ανενεργό, ενώ σύνδεση με τα άζωτα και των δύο ινδολικών δακτυλίων μειώνει σημαντικά την ανασταλτική της δράση.³⁹

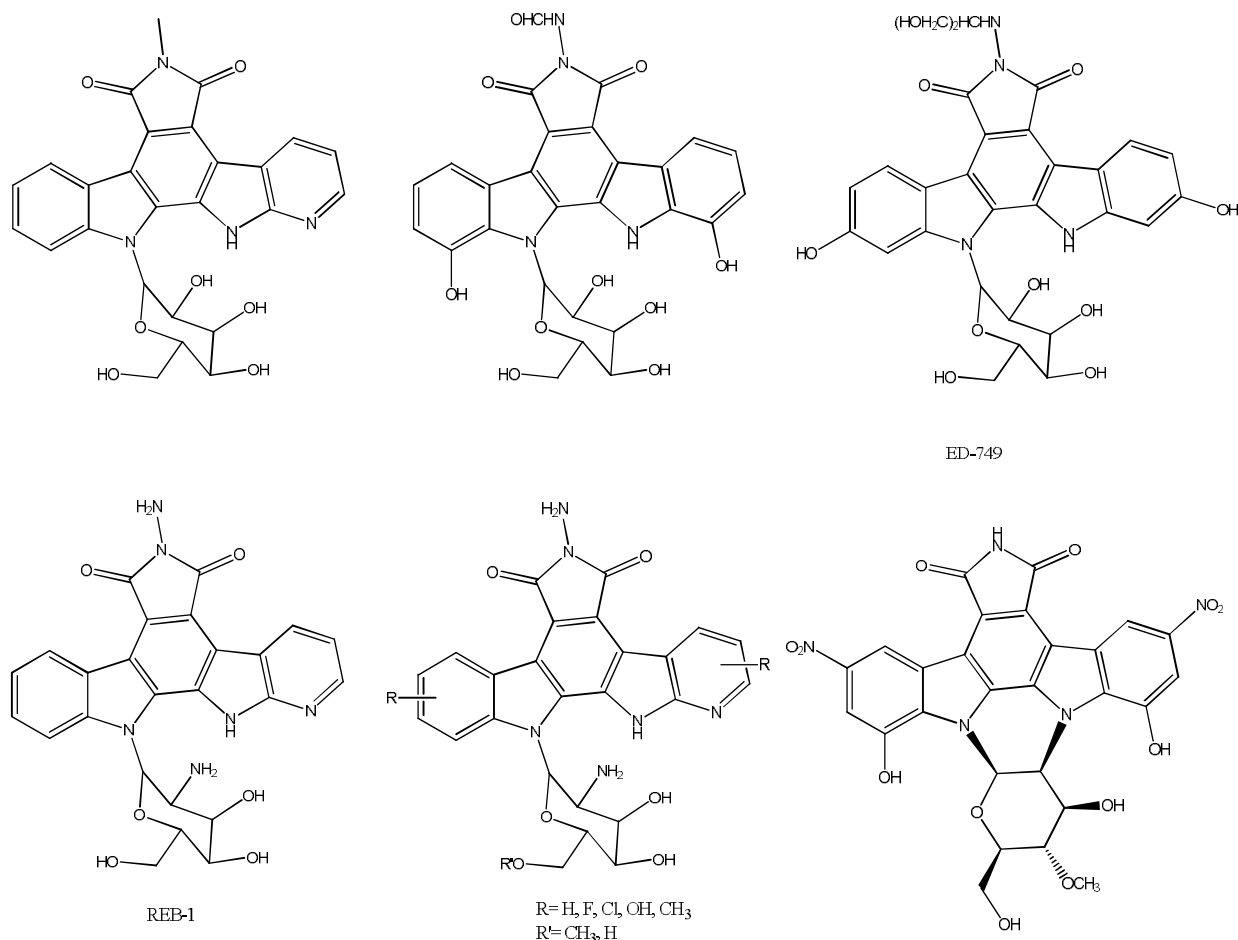


Εικόνα 23: Δομή Rebeccamycin.

Έχει τη δυνατότητα να ενδοπαραμεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του ευκαρυωτικού DNA σχηματίζοντας σταθερά σύμπλοκα και να δημιουργεί σπασίματα, όμως η μικρή διαλυτότητα της στο νερό δημιουργεί προβλήματα στην περαιτέρω ανάπτυξη και αξιολόγηση της. Εκτός αυτής, έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί πολλά άλλα παράγωγα όπως το μη χλωριωμένο παράγωγο, αλλά και το αντίστοιχο διβρωμο παράγωγο το οποίο παρουσιάζει καλύτερη υδατοδιαλυτότητα από την Rebeccamycin.^{39,40}

Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες σύνθεσης αναλόγων της Rebeccamycin με βελτιωμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά αλλά και καλύτερη δράση. Από τις προσπάθειες αυτές έχει γίνει φανερό ότι:^{40,41}

- Ο β-γλυκοζιτικός δεσμός είναι απαραίτητος για την αναστολή της τοποϊσομεράσης I χωρίς όμως να υπάρχει κάποια προτίμηση ως προς το είδος του σακχάρου. Έτσι, το β-ριβοφουρανόζυλο παράγωγο είναι πιο αποτελεσματικός αναστολέας της τοποϊσομεράσης I, ενώ το β-ξυλοφουρανόζυλο ανάλογο παρουσιάζει την ισχυρότερη κυτταροτοξικότητα.
- Η σύνδεση του σακχάρου και στα δύο άζωτα των ινδολίων επιφέρει μείωση της ανασταλτικής δράσης επί της τοποϊσομεράσης I, όμως η αντικαρκινική δράση διατηρείται ή και βελτιώνεται. Η παρατήρηση αυτή, αθροιστικά με την παραπάνω, προφανώς υποδεικνύουν την ύπαρξη και άλλων μηχανισμών δράσης των παραγώγων αυτών.



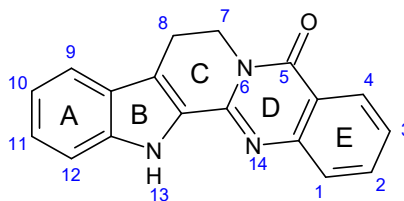
Εικόνα 24: Δομικά ανάλογα της *Rebecamycin*.

- Διάφοροι υποκαταστάτες είναι ανεκτοί επί του ιμιδικού αζώτου χωρίς να επηρεάζουν ιδιαίτερα την ανασταλτική δράση επί της τοποϊσομεράσης I, η επίδραση τους όμως στην διαλυτότητα των ενώσεων αυτών μπορεί να είναι ιδιαίτερα σημαντική. **Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα παράγωγα που φέρουν υποκαταστάτη αμινομάδα, υποκατεστημένη ή μη, και υδροξυλομάδα, υποκατεστημένη ή μη, επί του ιμιδικού αζώτου** τα οποία ενδοπαραεμβάλλονται μέσω του ινδολοκαρβαζολικού σκελετού στο DNA, ενώ το τμήμα του σακχάρου ενισχύει τη συγγένεια τους με το DNA.
- **Διάφοροι υποκαταστάτες όπως φθόρια, μεθύλια, υδροξύλια κ.α. επηρεάζουν την ανασταλτική δράση επί της τοποϊσομεράσης I αλλά και την κυτταροτοξικότητα τους.** Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν τα 3,9-δίφθορο και 3,9 διϋδρόξυ παράγωγα της Εικόνας 24.

1.3.4 RUTAECARPINE ΚΑΙ ΑΝΑΛΟΓΑ ΤΗΣ.

Η Rutaecarpine είναι αλκαλοειδές που απομονώθηκε για πρώτη φορά από τον καρπό του φαρμακευτικού φυτού *Evodia rutaecarpa* (οικ. *Rutaceae*). Διαθέτει χαρακτηριστική δομή

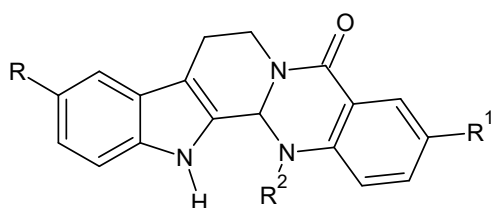
ινδολοπυριδοκιναζολινόνης, η οποία μπορεί να υφίσταται σε δυο μορφές ανάλογα με τη διευθέτηση των δακτυλίων του μορίου (Εικόνα 25).⁴²



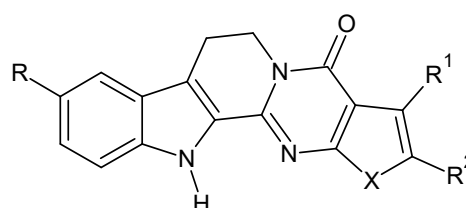
Εικόνα 25: Δομή Ruteacarpine.

Ο μεταβολισμός της γίνεται από την ομάδα CYP του ηπατικού κυτοχρώματος P450 προς μονοϋδροξυλιωμένα και διϋδροξυλιωμένα παράγωγα, καθώς και σουλφονικά και γλυκουρονικά παράγωγα. Οι αντικαρκινικές ιδιότητες του μορίου φαίνεται να οφείλονται στην αναστολή της δράσης των τοποϊσομερασών I και II, προάγοντας έτσι την απόπτωση των κυττάρων. Ωστόσο, αυτή της η δράση δεν είναι τόσο ισχυρή, παρά την κυτταροτοξικότητα που παρουσιάζει και για αυτό δε χρησιμοποιείται ως αντινεοπλασματικό φάρμακο. **Μεγάλης σημασίας για την εκδήλωση της δράση έναντι της τοποϊσομεράσης I είναι η π-π αλληλεπίδρασης του ινδολικού δακτυλίου με το DNA.**⁴²

Η παρουσία υποκαταστατών στο μόριο της Ruteacarpine φαίνεται να ενισχύει την κυτταροτοξικότητα της έναντι ποικιλίας καρκινικών κυττάρων.⁴³ Ανάλογα με το είδος του υποκαταστάτη και τη θέση του στο μόριο εμφανίζεται εκλεκτικότητα έναντι συγκεκριμένων μορφών καρκίνου. **Ειδικότερα, υποκατάσταση στον E δακτύλιο χωρίς ταυτόχρονη υποκατάσταση σε κάποιον άλλο (ειδικά στον A) οδήγησε σε παράγωγα με εκλεκτικότερη δράση έναντι των τοποϊσομερασών I και II.**



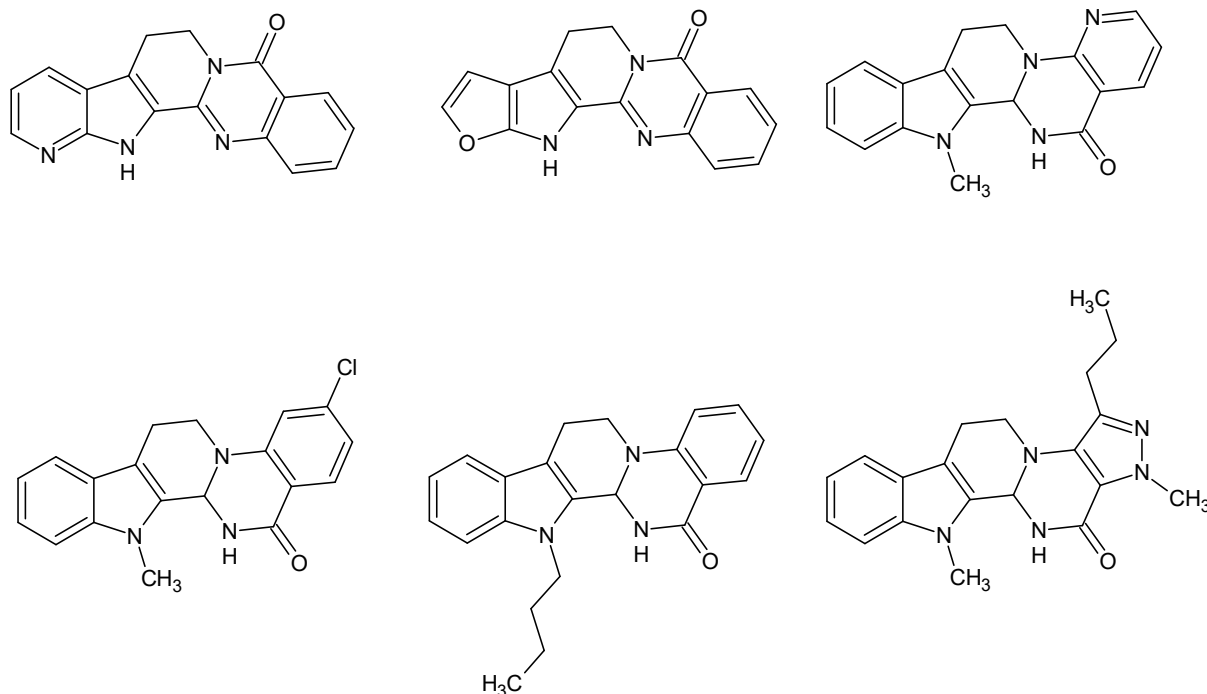
1. $R=R_1=R_2=H$
2. $R=Cl, R_1=R_2=H$
3. $R=Cl, R_1=H, R_2=CH_3$
4. $R=Br, R_1=H, R_2=CH_3$
5. $R=OCH_3, R_1=R_2=H$



1. $X=S, R=R_1=R_2=H$
2. $X=S, R=Cl, R_1=R_2=H$
3. $X=S, R=F, R_1=R_2=H$
4. $X=N, R=Br, R_1=CH_3, R_2=H$
5. $X=O, R=Cl, R_1=i\text{-Butyl}, R_2=H$

Εικόνα 26: Δομικά ανάλογα της Ruteacarpine.

Χαρακτηριστικότερη είναι η προσθήκη χλωρίου στη θέση 2 του μορίου, ενώ δραστικά εμφανίστηκαν και τα παράγωγα με άλκυλο, αλόγονο, υδρόξυ και αλκόξυ υποκατάσταση (Εικόνα 26).



Εικόνα 27: Δομικά ανάλογα της *Rutaecarpine*.

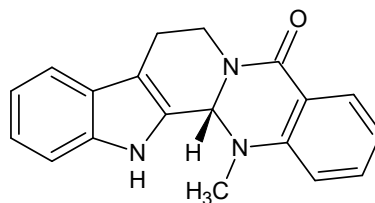
Εκτός των παραγώγων αυτών ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν και παράγωγα στα οποία ο ένας από τους δύο βενζολικούς δακτυλίους έχει αντικατασταθεί με ετερόκυκλο (Εικόνα 26 και 27), όπως και παράγωγα στα οποία ο δακτύλιος C έχει συμπυκνωθεί σε άλλη θέση του σκελετού της κιναζολίνης (Εικόνα 27).

Εκτός της αντικαρκινικής του δράσης, το αλκαλοειδές αυτό παρουσιάζει αξιοσημείωτη αντιφλεγμονώδη και αναλγητική δράση. Συνάμα, εμφανίζει και θερμορρυθμιστικές ιδιότητες, ανορεξιογόνο και αντιανοξική δράση. Σημαντική είναι και η επίδραση του στο καρδιαγγειακό σύστημα, παρουσιάζοντας αντιθρομβωτική, υποτασική και αγγειοχαλαρωτική δράση. Επίδραση φαίνεται να εμφανίζει και στο ενδοκρινικό σύστημα, ρυθμίζοντας οιστρογονικούς και άλλους υποδοχείς. Επιπλέον, στην παραδοσιακή θεραπευτική έχει χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση γυναικολογικών διαταραχών, ενώ πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν την επίδραση του στο μεταβολισμό της καφεΐνης και την απομάκρυνση της από τον οργανισμό, λειτουργώντας ως αποτοξινωτικός παράγοντας.⁴²

1.3.5 EVODIAMINE ΚΑΙ ΑΝΑΛΟΓΑ ΤΗΣ.

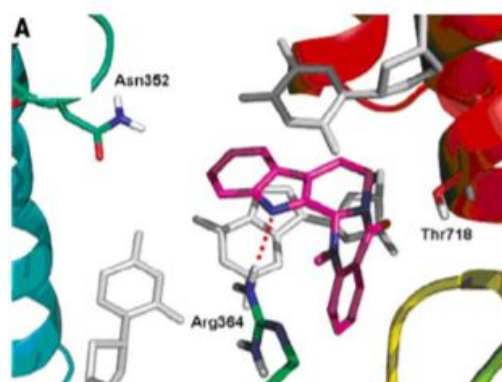
Η Evodiamine είναι συγγενές αλκαλοειδές της *Rutaecarpine* που απομονώνεται από το ίδιο φυτό (Εικόνα 28). Διαθέτει τη χαρακτηριστική δομή ινδολοπυριδοκιναζολινόνης και παρουσιάζει μικρή ή ελάχιστη διαλυτότητα στο νερό και άλλους διαλύτες γεγονός που

δημιουργεί προβλήματα βιοδιαθεσιμότητας με αποτέλεσμα το μόριο να μην έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα σε κλινικές μελέτες.⁴⁴



Εικόνα 28: Δομή Evodiamine.

Παρουσιάζει ισχυρότερη αντικαρκινική δράση^{44,45} σε σχέση με τη Rutaecarpine, δρώντας ως αναστολέας της τοποϊσομεράσης I (Εικόνα 29), αλλά και διάφορων πρωτεϊνικών κινασών (MAPK, Raf1, PI3K),⁴⁶ επάγοντας έτσι την απόπτωση των κυττάρων. Ο κυτταρικός θάνατος φαίνεται να επέρχεται μέσω της επίδρασης του αλκαλοειδούς σε διάφορες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην διαδικασία της απόπτωσης.⁴⁶ Επιπλέον, η Evodiamine φαίνεται να προκαλεί αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων και μάλιστα με σχετική εκλεκτικότητα, μεταβάλλοντας έτσι τον κυτταρικό κύκλο και αναστέλλοντας την ανάπτυξη. Συγκεκριμένα, αναστέλλει τη G2/M φάση του κυτταρικού κύκλου με χρονική και σχετιζόμενη με τη δόση εξάρτηση, ενώ με επιμήκυνση του χρόνου επώασης, η ένωση παρουσιάζει επίδραση και στην G2 φάση. Ειδικότερα, η Evodiamine είναι δραστική έναντι πολλών καρκινικών κυτταρικών σειρών όπως τραχήλου της μήτρας, παχέως εντέρου, πνεύμονα, μελανώματος, προστάτη και μαστού. Το μόριο εμφανίζει δράση και στην καθυστέρηση της μετάστασης και της εισβολής των καρκινικών κυττάρων σε υγιή ιστούς, καθυστερώντας έτσι την εξάπλωση τους. Συνάμα, μπλοκάρει την αγγειογένεση και την εισβολή στα ενδοθηλιακά κύτταρα, μέσω επίδρασης στον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF), πιθανώς μέσω καταστολής της φωσφορυλίωσης της ERK.⁴⁷

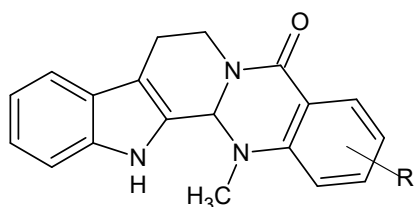


Εικόνα 29: Σύνδεση Evodiamine με την τοποϊσομεράση I.

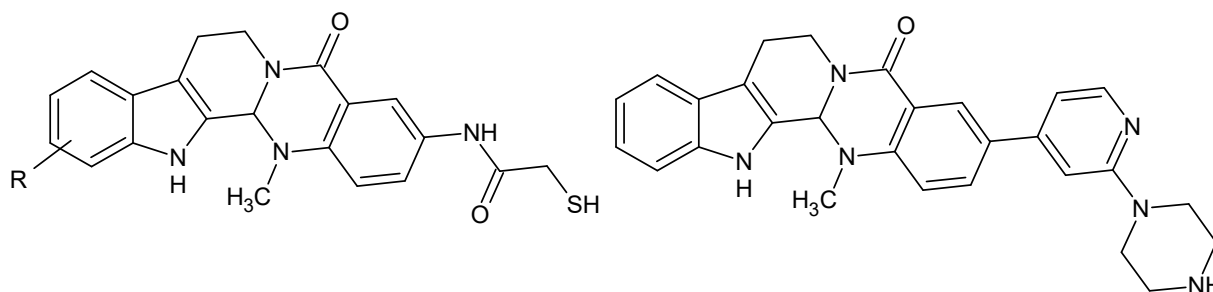
Εκτός της αντικαρκινικής δράσης, η Evodiamine, όπως και η Rutaecarpine, διαθέτει και άλλες σημαντικές βιολογικές δράσεις όπως αντιφλεγμονώδη (μέσω συμμετοχής στο μεταβολισμό του NO και αναστολής της COX-2), αναλγητική, ρυθμιστική της πέψης και της όρεξης, αγγειοχαλαρωτική και διουρητική. Επιπλέον, λειτουργεί ως παράγοντας κατά της

αθηροσκλήρωσης, ενώ εμφανίζει και θετική ινóτροπο και χρονóτροπο δράση. Οι αντιμολυσματικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι πολλών βακτηρίων, πρωτόζωων και φυκών έχουν περιγραφεί εκτεταμένα, ενώ εμφανίζονται και δράσεις όπως η θερμορυθμιστική, αντιανοξική και βρογχοσυσταλτική.⁴⁵

Στην προσπάθεια βελτιστοποίησης των αντικαρκινικών ιδιοτήτων του παραγώγου έχουν συντεθεί πολλά δομικά ανάλογα, από την μελέτη των οποίων έχουν βγει πολλά συμπεράσματα όσον αφορά τις σχέσεις δομής δράσης. **Υποκατάσταση στο άζωτο του ινδολίου της Evodiamine φαίνεται να δίνει παράγωγα με βελτιωμένες ιδιότητες, χωρίς όμως να επηρεάζεται ιδιαίτερα από το είδος τους. Αισθητά καλύτερη δράση εμφάνισαν τα παράγωγα με νιτρο-υποκατάσταση.** Η προσθήκη υποκαταστατών στους βενζολικούς δακτυλίους του μορίου έδωσε ανάλογα, αποτελεσματικότερα και πιο τοξικά έναντι των καρκινικών κυττάρων (Εικόνα 30).⁴⁸



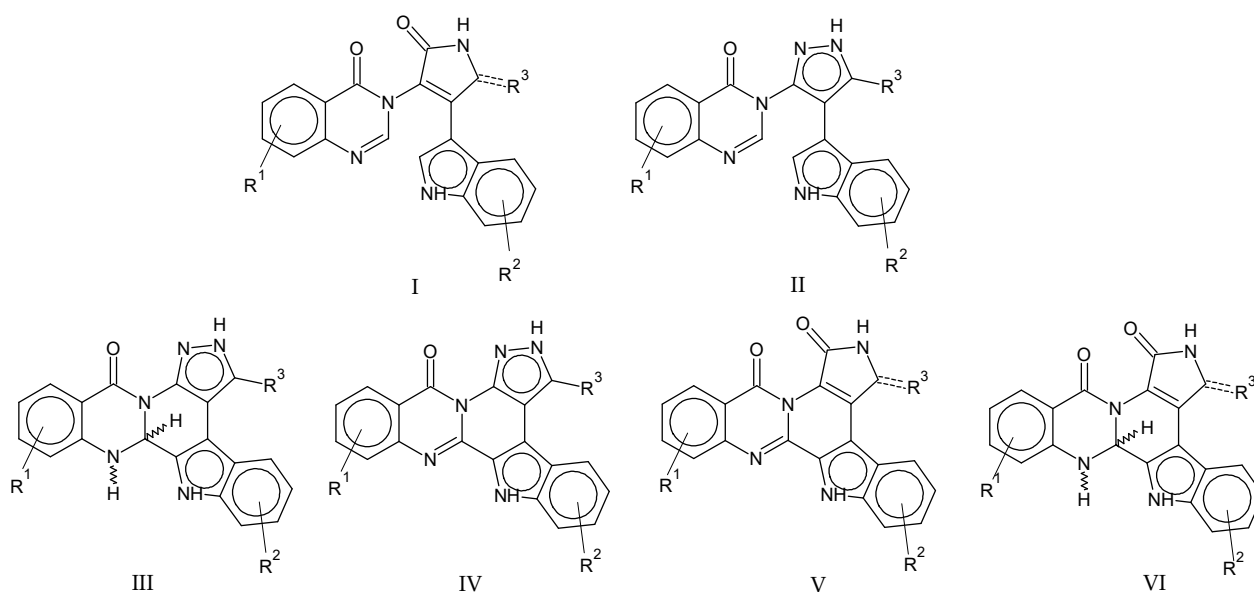
R= Cl, I, NH₂, NO₂ in various positions



Εικόνα 30: Δομικά ανάλογα της Evodiamine.

2. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

Με βάση τα στοιχεία και τα δεδομένα που έχουν συλλεχθεί για όλα τα προαναφερθέντα, θεωρήθηκε ενδιαφέρουσα η σύνθεση νέων παραγώγων που θα φέρουν και τους δύο σημαντικούς σκελετούς, αυτούς του ινδολίου και της κιναζολίνης. Μάλιστα τα νέα αυτά ανάλογα θα αποτελούν υβρίδια των σημαντικών δομών της Staurosporine-Rebeccamycin, Rutaecarpine-Evodiamine και Bis-indoles αλκαλοειδών (Εικόνα Χ).



Εικόνα 31: Τελικοί στόχοι-υβρίδια.

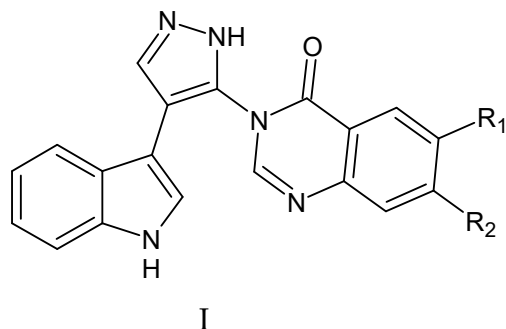
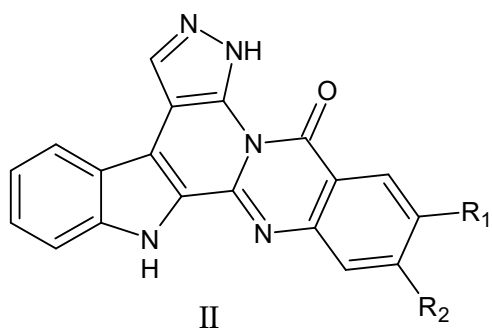
Στην κατηγορία των αναλόγων δινδολίου (I-II) έχει αντικατασταθεί ο ένας ινδολικός δακτύλιος με δακτύλιο κιναζολινόνης. Ως συνδετικό τμήμα μεταξύ των δύο αυτών τμημάτων μπορεί να βρίσκεται πυραζολικός ή πυρρολικός δακτύλιος. Στα δε δομικά ανάλογα της Staurosporine, της Rebeccamycin, της Rutaecarpine, του Evodiamine, έχει αντικατασταθεί επίσης ο ένας δακτύλιος ινδολίου με αυτόν της κιναζολινόνης και σε ορισμένα από αυτά (III-IV) ο δακτύλιος του πυρρολίου με αυτόν του πυραζολίου. Κάθε δομικός σκελετός αποτελεί και μια διαφορετική κατηγορία μορίων, καθώς μια ποικιλία κατάλληλων κάθε φορά υποκαταστάσεων επί ενός, δύο ή και όλων των δακτυλίων ταυτόχρονα μπορούν να συντεθούν πληθώρα νέων αναλόγων

Οι αλλαγές στα μόρια αυτά σχεδιάστηκαν ώστε να μελετηθεί κατά πόσο επηρεάζεται η δράση από την αντικατάσταση του ενός ινδολικού δακτυλίου με αυτόν της κιναζολινόνης, καθώς και κατά πόσο συμβάλλει στην εκλεκτικότητα των ανωτέρω μορίων η αντικατάσταση του πυρρολικού δακτυλίου από αυτόν του πυραζολίου. Επίσης, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη της ύπαρξης ποικιλίας υποκαταστάσεων σε μία ή περισσότερες θέσεις είτε του ινδολικού είτε του κιναζολικού δακτυλίου, καθώς και η ύπαρξη υδροξυλομάδας ή

άλλης υποκατάστασης επί του ελεύθερου άνθρακα του πυραζολίου και η επίδραση τους στη δράση. Συνάμα, αξιόλογη διερεύνηση για τη δραστικότητα των μορίων αποτελεί η ύπαρξη σακχάρου στο βασικό σκελετό αυτών των δομών, είτε συνδεδεμένο στο ινδολικό είτε στο βασικό άζωτο της κιναζολινόνης ή ταυτόχρονα και στα δύο άζωτα.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία επιλέξαμε τη σύνθεση δύο σειρών μορίων, η μία αποτελεί ανάλογα μόρια της μορφής δινδολίου (I) και η άλλη υβρίδια της Staurosporine και της Rutaecarpine (III-IV). Και στις δύο κατηγορίες επιλέχθηκαν τα παράγωγα εκείνα που φέρουν πυραζολικό δακτύλιο χωρίς υποκατάσταση και υποκαταστάτες σε διαφορετικές θέσεις του δακτυλίου της κιναζολινόνης (Εικόνα 31). Πιο συγκεκριμένα, στα ανάλογα δινδολίου επιλέχθηκαν ως υποκαταστάτες το χλώριο σε δύο διαφορετικές θέσεις του δακτυλίου, μεθοξύλιο και υδροξυλομάδα (I), ενώ στη δεύτερη κατηγορία επιλέχθηκαν οι ίδιο υποκαταστάτες εκτός του υδροξυλίου (II) (Εικόνα 32). Για την επιλογή των υποκαταστατών σημαντική ήταν και η μελέτη των βιβλιογραφικών δεδομένων για παρόμοιες δομές. Οι αλλαγές αυτές πραγματοποιήθηκαν για την ανάπτυξη νέων σχέσεων δομής-δράσης και για τη σύνθεση νέων βελτιστοποιημένων παραγώγων.

Λόγω της μεγάλης δραστικότητας και της ποικιλίας κυτταρικών στόχων των ενώσεων-οδηγών, όπως έγινε εμφανές από τη βιβλιογραφία, τα νέα υβρίδια μόρια μπορούν να δοκιμαστούν σε διάφορους μοριακούς στόχους και για μια ευρεία ποικιλία παθολογιών, ανάλογα με το είδος και τη θέση των υποκαταστατών που φέρουν. Στη παρούσα εργασία δοκιμάσαμε μια σειρά κινασών, καθώς και τη δραστικότητα τους έναντι των τοποϊσομερασών και ορισμένων ενζύμων που εμπλέκονται στη λειτουργία τους. Πρέπει να τονιστεί ότι η συγκεκριμένη μελέτη αφορά το άγλυκο τμήμα των μορίων, ώστε να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για περαιτέρω βελτιστοποίηση του βασικού σκελετού τους. Με τη βοήθεια αυτών των δεδομένων, καθώς και υπολογισμών πρόσδεσης (Docking), τόσο η επιλογή των ομάδων υποκατάστασης όσο και η αλλαγή κάθε φορά της θέσης αυτής στα νέα παράγωγα, έχει σκοπό τη μελέτη της επίδρασης στη δράση και πιθανόν στην εκλεκτικότητα προς συγκεκριμένο στόχο, και έτσι την ανάπτυξη ασφαλέστερων σχέσεων δομής-δράσης. Συνοπτικά, τα νέα παράγωγα μπορούν να χωριστούν σε δύο σειρές, τα ανάλογα των αλκαλοειδών δινδολίου (Σειρά 1), τα οποία και θα μελετηθούν κυρίως για τη δράση τους ως πιθανών αναστολέων κινασών και τα υβρίδια της Staurosporine και της Rutaecarpine (Σειρά 2) ως πιθανόν αναστολέων τοποϊσομερασών (Εικόνα 32).

Σειρά 1:
 $R_1 = -H, R_2 = -H$
 $R_1 = -Cl, R_2 = -H$
 $R_1 = -H, R_2 = -Cl$
 $R_1 = -OCH_3, R_2 = -H$
 $R_1 = -OH, R_2 = -H$
Σειρά 2:
 $R_1 = -H, R_2 = -H$
 $R_1 = -Cl, R_2 = -H$
 $R_1 = -H, R_2 = -Cl$
 $R_1 = -OCH_3, R_2 = -H$

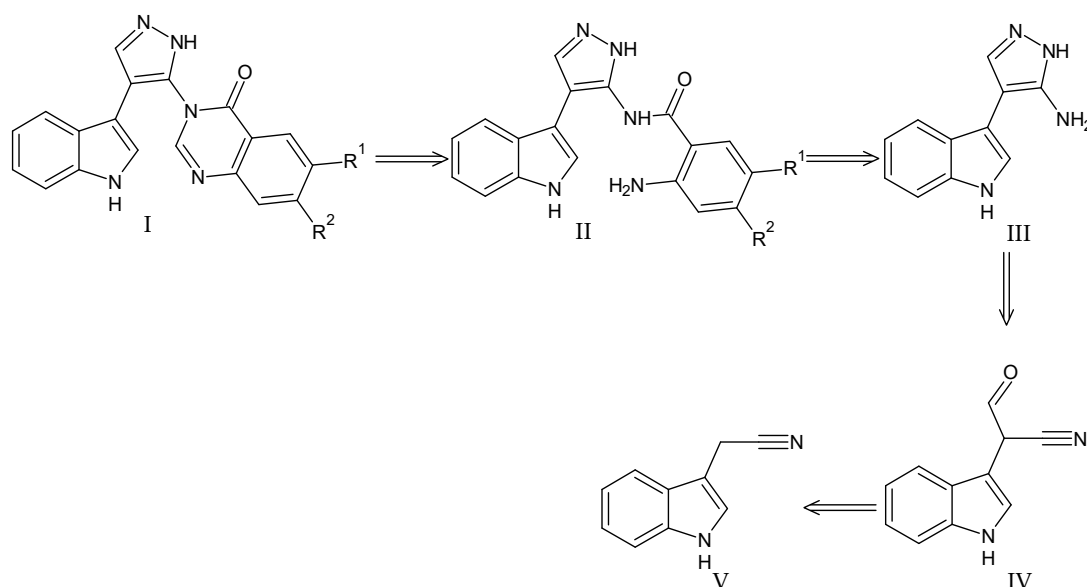
Εικόνα 32: Τελικά μόρια-στόχοι παρούσας διπλωματικής εργασίας.

3. ΧΗΜΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Στη συνέχεια ακολουθούν οι συνθετικές πορείες, από τις οποίες προκύπτουν τα τελικά μόρια- στόχοι της παρούσας διπλωματικής εργασίας, δηλαδή τόσο αυτά της μορφής των αλκαλοειδών δινδολίου I όσο και των αναλόγων Staurosporine και Rutaecarpine II (Εικόνα 32).

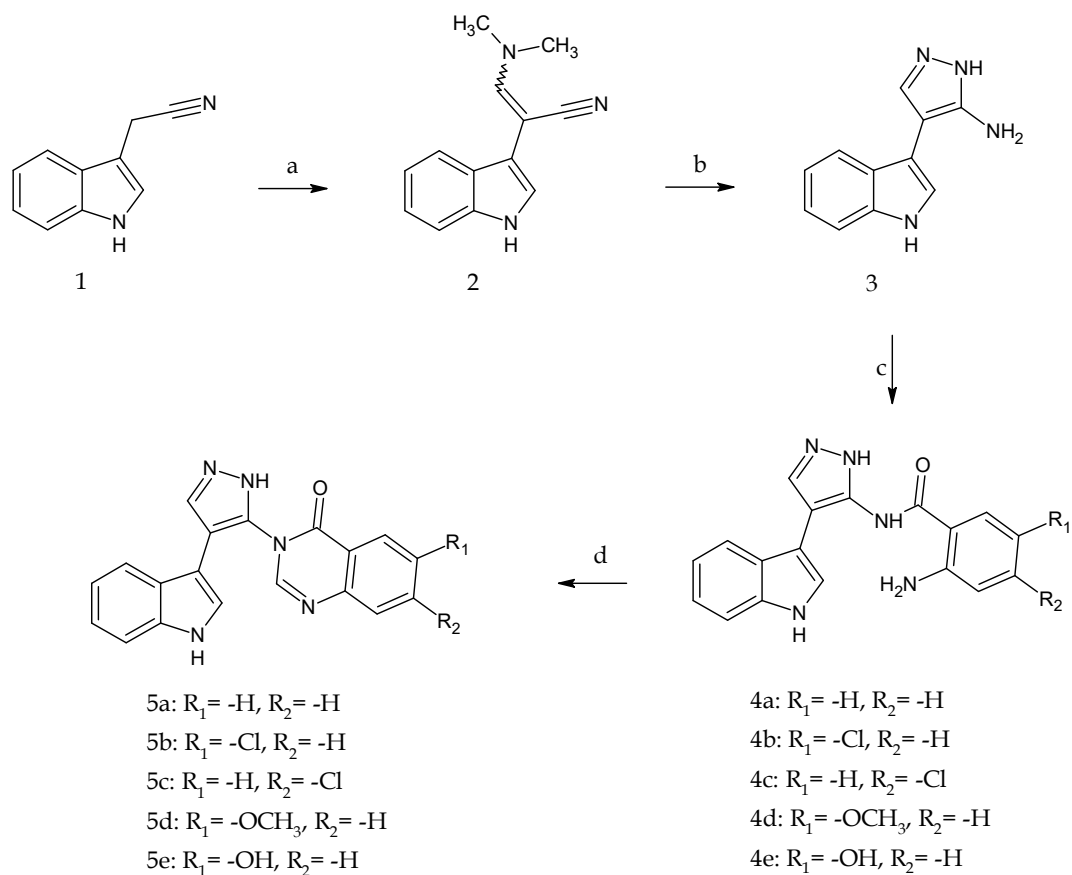
3.1 ΣΥΝΘΕΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΑΛΚΑΛΟΕΙΔΩΝ ΔΙΠΝΔΟΛΙΟΥ

Σύμφωνα με το ρετροσυνθετικό σχήμα (Σχήμα 1), οι τελικοί στόχοι του γενικού τύπου I μπορούν να συντεθούν ύστερα από φορμυλίωση και ενδομοριακή κύκλωση του παραγώγου II, το οποίο λαμβάνεται μετά από αμιδοποίηση του αμινοπυραζολίου III με τον κατάλληλο δότη ακυλίου. Η σύνθεση του αμινοπυραζολίου III θα μπορούσε να γίνει με επίδραση υδραζίνης επί της αλδεΐδης IV, η οποία μπορεί να παρασκευαστεί μέσω του εμπορικά διαθέσιμου νιτριλίου V.



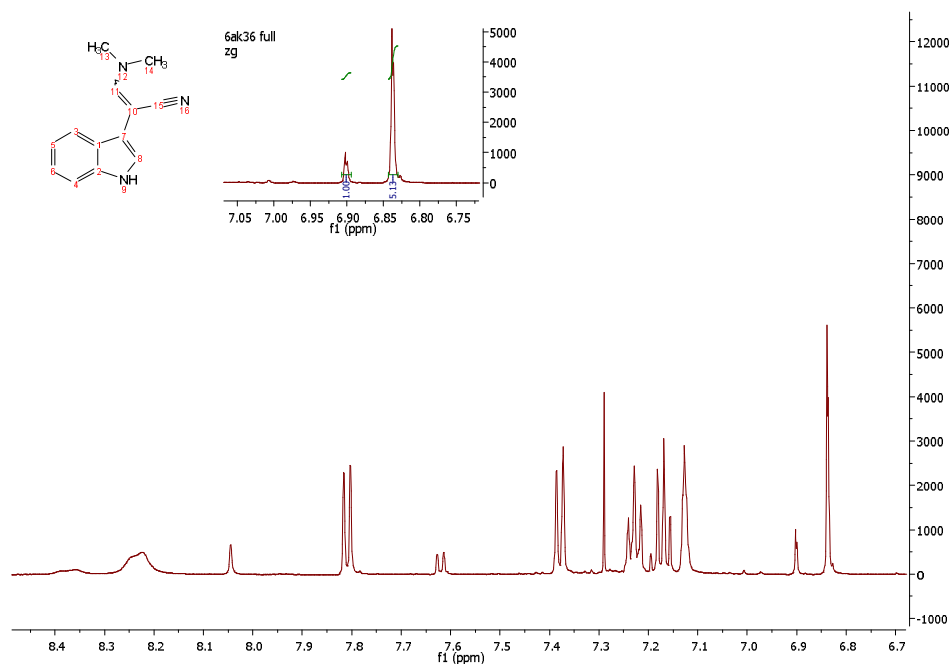
Σχήμα 1: Ρετροσύνθεση τελικών μορίων- στόχων αναλόγων δινδολίου.

Αρχικά λοιπόν, με επίδραση *N,N*-διμεθυλακετάλης του *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιου (DMF-DMA) επί του 3-ινδολοακετονιτριλίου (**1**) προκύπτει το παράγωγο **2** ως μίγμα ισομερών Z και E σε αναλογία 5/1 (Σχήμα 2).



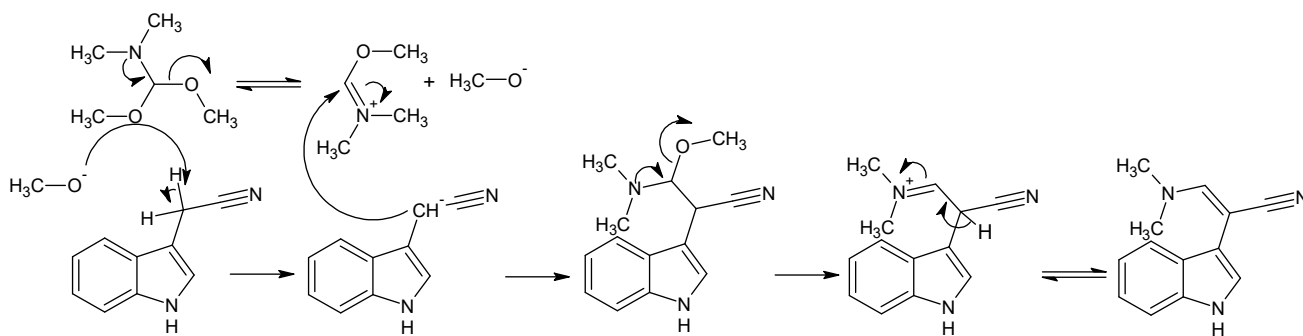
Σχήμα 2: Αντιδραστήρια και συνθήκες: a. DMF-DMA, DMF, βρασμός, b. 64% sol. NH₂NH₂, diethyleneglycol, βρασμός, c. κατάλληλα υποκατεστημένο ισατοϊκό ανυδρίτη, DMF, βρασμός, d. (EtO)₃CH, p-TsOH, άνυδροTHF, 25 °C.

Με τη λήψη φάσματος ¹H NMR έγινε εμφανής η ύπαρξη των δύο ισομερών. Χαρακτηριστικές είναι οι δύο απλές κορυφές στα 6.83 και 6.90 ppm σε αναλογία 5/1, που αντιστοιχούν στην απορρόφηση των μεθινίων του διπλού δεσμού (Εικόνα 33).



Εικόνα 33: Φάσμα ^1H NMR ισομερών Z και E παραγώγου **2** σε CDCl_3 .

Σύμφωνα με το μηχανισμό της αντίδρασης, το DMF-DMA βρίσκεται σε ισορροπία με την πρωτονιωμένη του μορφή, η οποία λειτουργεί ως πολύ καλό ηλεκτρονιόφιλο.⁴⁹ Έτσι, με επίδραση του 3-ινδολοακετονιτρίλιου (**1**) λαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **2** ως μίγμα των δύο ισομερών (Σχήμα 3).

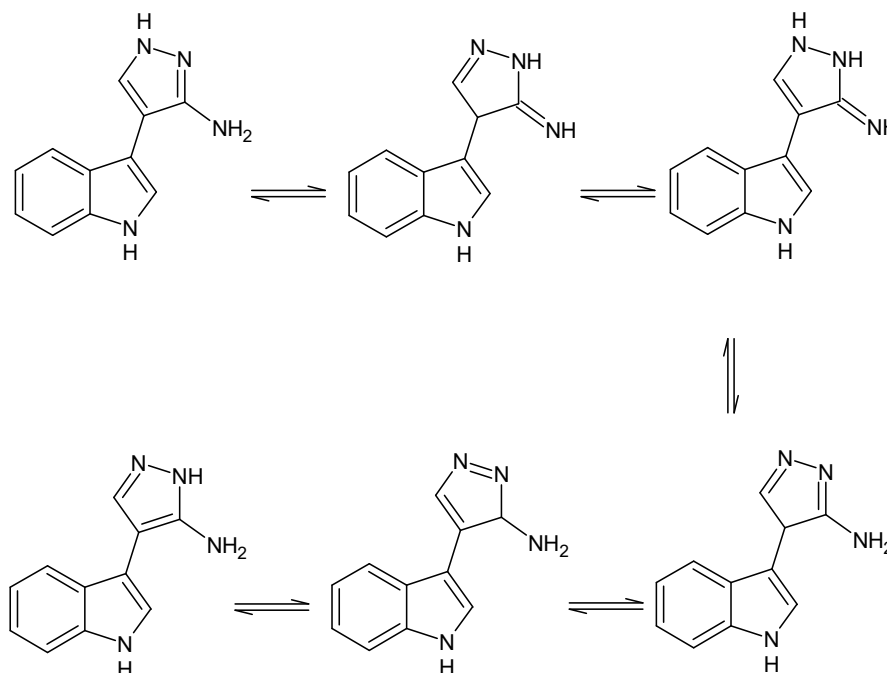


Σχήμα 3: Μηχανισμός φορμυλίωσης μέσω του DMF-DMA.

Ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση των δύο ισομερών δεν πραγματοποιήθηκε, καθώς από την επόμενη αντίδραση της συνθετικής πορείας με επίδραση υδραζίνης λαμβάνεται και από τα δύο ισομερή το αντίστοιχο πυραζολικό παράγωγο. Για την αντίδραση απαιτείται βρασμός σε διαιθυλενογλυκόλη, ενώ όπως έγινε εμφανές με τη βοήθεια χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC), τα δύο ισομερή αντιδρούν με διαφορετική ταχύτητα.

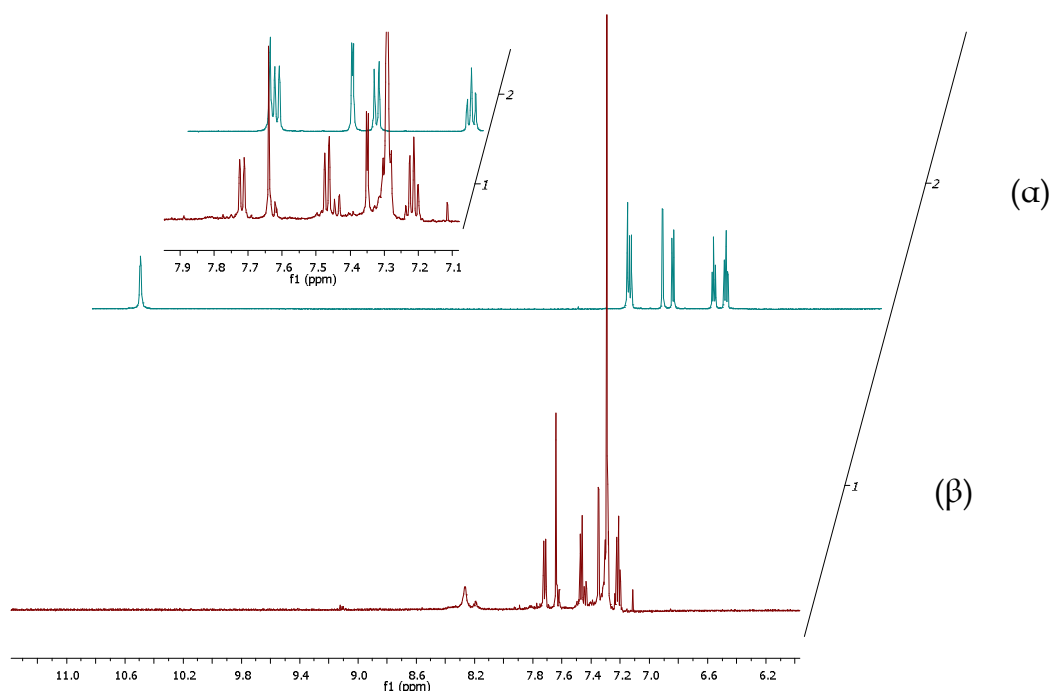
Το παράγωγο **3** μπορεί να βρίσκεται υπό την μορφή των 6 ταυτομερών δομών⁵⁰ του σχήματος 4, η ύπαρξη των οποίων μπορεί να επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, ο διαλύτης και οι άλλοι υποκαταστάτες του δακτυλίου. Ειδικότερα, στα

αμινοπυραζόλια, η αμινομάδα βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ της αμίνης και της ιμίνης, με την ισορροπία να είναι σαφώς μετατοπισμένη προς την μορφή της αμίνης.⁵¹



Σχήμα 4: Πιθανές ταυτομερείς δομές παραγώγου 3.

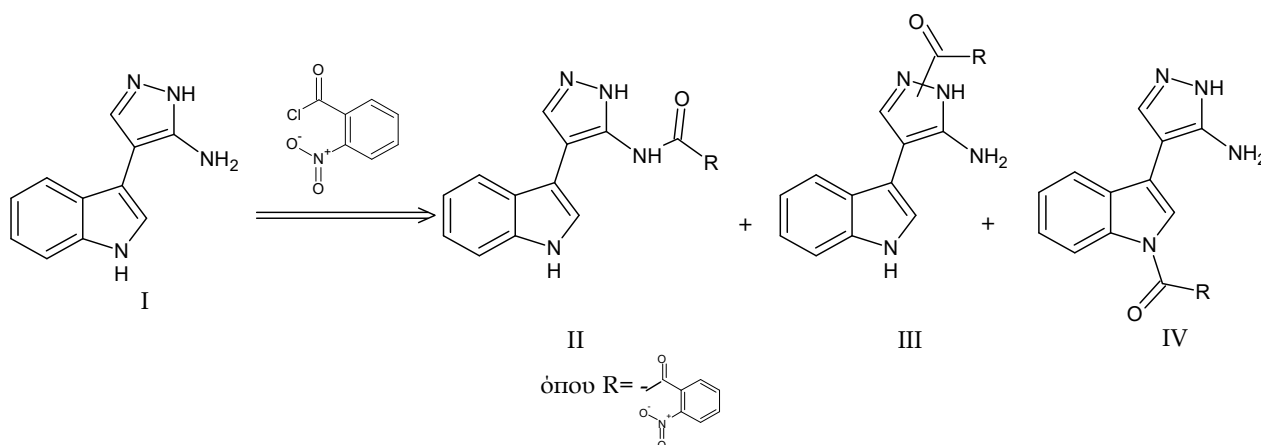
Η παρουσία των ταυτομερών επιβεβαιώθηκε με την βοήθεια φασματοσκοπίας ^1H NMR. Συγκεκριμένα, ελήφθησαν φάσματα ^1H NMR του παραγώγου 3 σε CDCl_3 και $\text{DMSO}-d_6$ και σε διάφορες θερμοκρασίες. Από τα ανωτέρω πειράματα φαίνεται ότι η αναλογία των ταυτομερών δεν επηρεάζεται ιδιαίτερα από την θερμοκρασία, όμως η επίδραση των διαλυτών είναι σημαντική (Εικόνα 34).



Εικόνα 34: Φάσμα ^1H NMR του παραγώγου **3** σε $\text{DMSO}-d_6$ (α) και CDCl_3 (β).

Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 34, η ύπαρξη των ταυτομερών δομών δεν γίνεται αντιληπτή στην περίπτωση του $\text{DMSO}-d_6$, ενώ στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε το CDCl_3 είναι σαφής η ύπαρξη τους. Χαρακτηριστικά στο φάσμα του μορίου σε CDCl_3 παρουσιάζονται δύο διπλές κορυφές στα 7.46 και 7.43 ppm, σε διαφορετική αναλογία, που αντιστοιχούν στα ίδια αρωματικά πρωτόνια του ινδολικού δακτυλίου, ενώ στο φάσμα του μορίου σε $\text{DMSO}-d_6$ εμφανίζεται μια απλή κορυφή στα 7.71 ppm χαρακτηριστική για το μεθίνιο του πυραζολικού δακτυλίου.

Το επόμενο στάδιο της συνθετικής πορείας αφορά τη σύνθεση του ενδιάμεσου αμιδίου II (Σχήμα 5). Αρχικά, η σύνθεση του επιθυμητού παραγώγου επιχειρήθηκε με επίδραση του 2-νιτροβενζόυλο χλωριδίου επί του αμινοπυραζολίου **3**. Δυστυχώς όμως, παρότι η αντίδραση επιχειρήθηκε σε διάφορες συνθήκες, παρελήφθησαν πολύπλοκα μίγματα προϊόντων τα οποία δεν κατέστη δυνατό να απομονωθούν σε καθαρή μορφή.

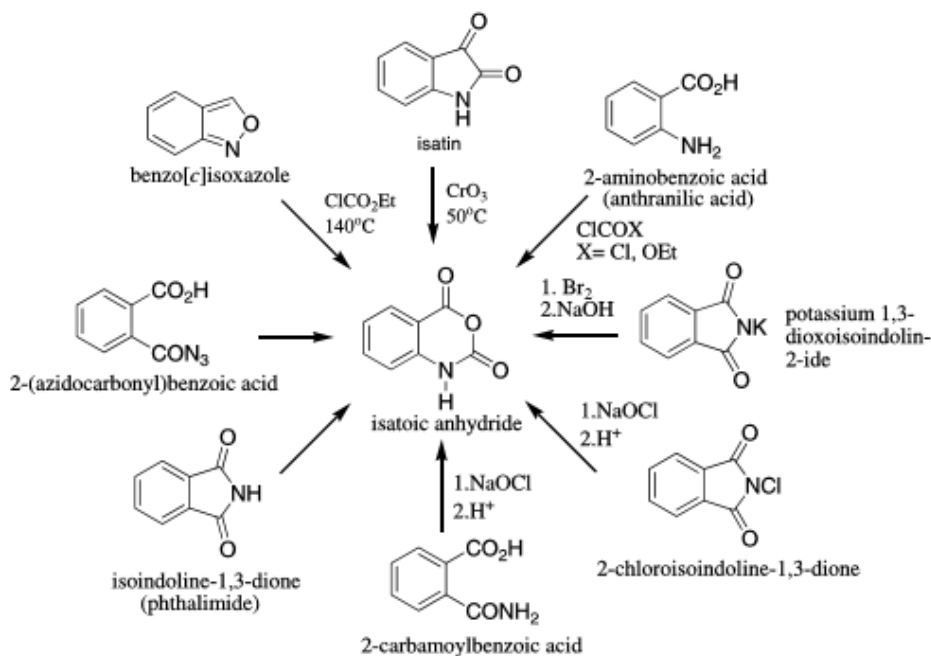


Σχήμα 5: Πιθανά προϊόντα αμιδοποίησης με 2-νιτροβενζόυλο χλωρίδιο.

Πιθανόν, αυτό συμβαίνει αφενός λόγω της μεγάλης δραστηριότητας του χλωριδίου και αφετέρου λόγω της ύπαρξης πολλών πυρηνόφιλων κέντρων στο αμινοπυραζόλιο (Σχήμα 5). Για τον λόγο αυτό, αποφασίστηκε να επιχειρηθεί η αντίδραση με ήπιες συνθήκες και πιο συγκεκριμένα μέσω του αντίστοιχου οξέος παρουσία N,N' -δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμιδίου (DCC) ή 1,1'-καρβονυλοδιιμιδαζόλιο (CDI), πάλι όμως χωρίς επιτυχία.⁵²

Τελικά, η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με επίδραση του αμινοπυραζολίου **3** επί του κατάλληλα υποκατεστημένου ισατοϊκού ανυδρίτη⁵³ (Σχήμα 2). Το παράγωγο αυτό παρουσιάζει υψηλή ηλεκτρονιοφιλία, σαφώς όμως μικρότερη από αυτή των αντίστοιχων χλωριδίων, ενώ ταυτόχρονα είναι και πιο σταθερό από αυτά. Επιπλέον, λόγω του μεγαλύτερου όγκου του, η αντίδραση παρουσιάζει μεγαλύτερη εκλεκτικότητα. Σημαντικό επίσης κρίνεται και το γεγονός ότι είναι εφικτή η σύνθεση ενός μεγάλου αριθμού ισατοϊκών ανυδριτών από τα αντίστοιχα ανθρανλικά οξέα και συνεπώς ενός μεγάλου αριθμού τελικών παραγώγων. Αυτό μπορεί να συμβάλει στην εξαγωγή ασφαλέστερων σχέσεων Δομής- Δράσης και κατ' επέκταση στη βελτιστοποίηση της δράσης των τελικών μορίων-στόχων.

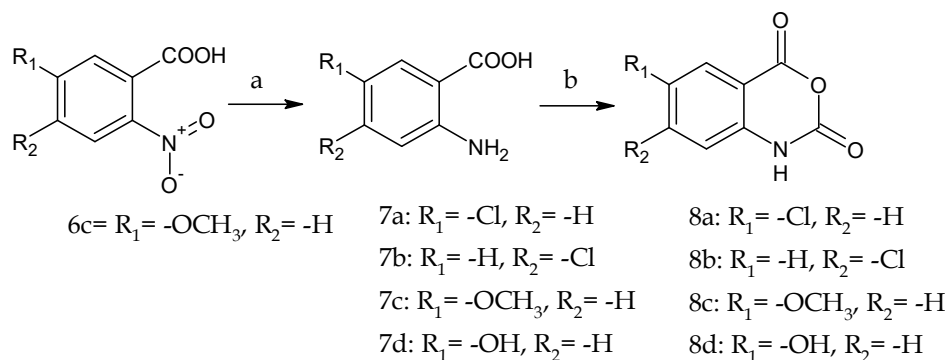
Λόγω του ιδιαίτερου ενδιαφέροντος που παρουσιάζουν οι ισατοϊκοί ανυδρίτες για τη σύνθεση δομικών ενδιαμέσων, στη διεθνή βιβλιογραφία έχουν αναπτυχθεί πολλοί τρόποι σύνθεσής τους. Μερικοί από αυτούς περιγράφονται στην παρακάτω Εικόνα 35.



Εικόνα 35: Τρόποι σύνθεσης ισατοϊκών ανυδριτών.

Ένας κλασικός τρόπος σύνθεσης είναι μέσω του κατάλληλου φθαλιμιδίου ή του αντίστοιχου καρβαμυλοβενζοϊκού οξέος παρουσία κάποιου ήπιου οξειδωτικού μέσου όπως του NaOCl. Χαρακτηριστικές είναι και οι αντιδράσεις με ισατίνη παρουσία τριοξειδίου του χρωμίου (CrO_3) ή μέσω βενζοϊσοξασζολίου παρουσία χλωρομυρμηκικού αιθυλεστέρα. Ο συνηθέστερος και ίσως ο πιο απλός τρόπος για τη σύνθεση των επιθυμητών κάθε φορά ισατοϊκών ανυδριτών αφορά τη χρήση του κατάλληλου ανθρανιλικού οξέος παρουσία ενός δότη καρβονυλίου όπως το φωσγένιο ή ο μυρμηκικός αιθυλεστέρας. Δεδομένου ότι υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός εμπορικά διαθέσιμων υποκατεστημένων ανθρανιλικών οξέων, ενώ ταυτόχρονα και η σύνθεση των ισατοϊκών ανυδριτών με χρήση του φωσγενίου είναι ιδιαίτερα απλή, επιλέχθηκε αυτός ο τρόπος σύνθεσης.^{53,54}

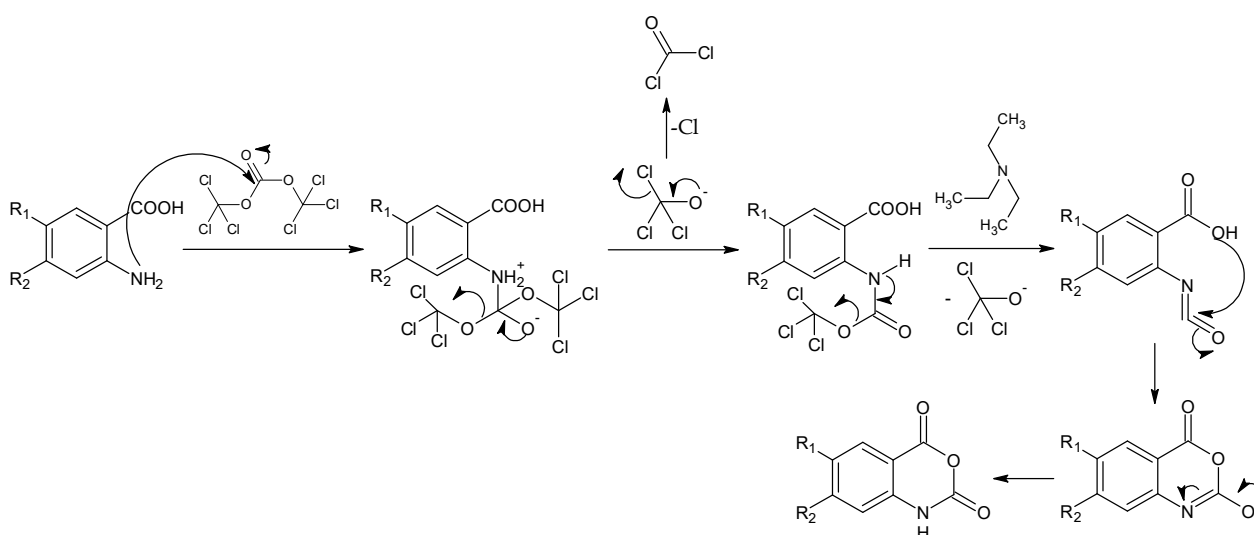
Όπως προαναφέρθηκε απαιτείται φωσγένιο για την πραγματοποίηση της αντίδρασης, όμως λόγω της μεγάλης τοξικότητας και αστάθειας του, η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με επίδραση τριφωσγενίου. Έτσι λοιπόν, με επίδραση τριφωσγενίου επί του κατάλληλου ανθρανιλικού οξέος (σε ορισμένες περιπτώσεις η σύνθεση αυτού μπορεί να γίνει μετά από αναγωγή του κατάλληλου 2-νιτροβενζοϊκού οξέος) λαμβάνεται ο αντίστοιχος ισατοϊκός ανυδρίτης, ο οποίος χρησιμοποιείται απευθείας για το επόμενο στάδιο της συνθετικής πορείας χωρίς κάποιο άλλο καθαρισμό, λόγω της σχετικής αστάθειας του (Σχήμα 6).⁵⁴



Σχήμα 6: Αντιδραστήρια και συνθήκες: a. H_2 , Pd/C, 50 psi, θερμοκρασία περιβάλλοντος, b. τριφωσγένιο, Et_3N , άνυδρο THF, $0\text{ }^\circ\text{C}$.

Το τριφωσγένιο είναι κρυσταλλικό στερεό και αποτελείται από τρία μόρια φωσγενίου και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πληθώρα αντιδράσεων υποκαθιστώντας το φωσγένιο. Είναι λιγότερο τοξικό και υγροσκοπικό από το φωσγένιο, ενώ εμφανίζει και μεγαλύτερη σταθερότητα.

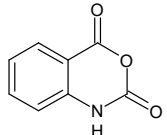
Σύμφωνα με το μηχανισμό της αντίδρασης, επίδραση τριφωσγενίου επί του κατάλληλου ανθρανιλικού οξέος οδηγεί στη δημιουργία ισοκυανικού εστέρα. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται πυρηνόφιλη αντίδραση προς παραλαβή του κατάλληλου ισατοϊκού ανυδρίτη. Για την αντίδραση απαιτείται τριμοριακή ποσότητα ανθρανιλικού οξέος, ώστε να αντιδράσουν και τα τρία μόρια φωσγενίου που απελευθερώνονται, ενώ απαιτείται και η παρουσία βάσης (στη συγκεκριμένη περίπτωση επιλέχθηκε τριαιθυλαμίνη) για τη δέσμευση του εκλυόμενου χλωρίου (Σχήμα 7).⁵⁵



Σχήμα 7: Μηχανισμός δράσης τριφωσγενίου προς σχηματισμό ισατοϊκών ανυδριτών.

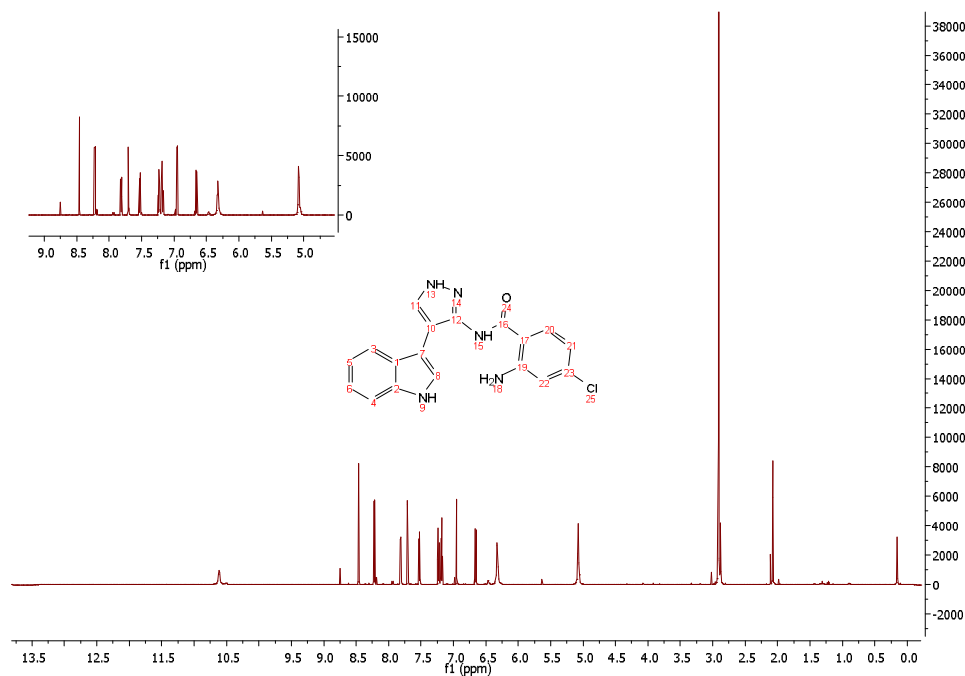
Το επόμενο στάδιο της συνθετικής πορείας αφορά την αμιδοποίηση του παραγώγου **3** με τον κατάλληλα υποκατεστημένο ισατοϊκό ανυδρίτη, η οποία αποδείχθηκε ιδιαίτερα επίπονη διαδικασία. Η αντίδραση επιχειρήθηκε με πολλούς τρόπους, όπως με την κλασική χρήση θέρμανσης ή με χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας. Συνοπτικά, παρουσιάζονται

στον παρακάτω Πίνακα (Εικόνα 36) οι διάφορες προσπάθειες. Όπως φαίνεται οι πρώτες προσπάθειες ήταν ιδιαίτερα αποθαρρυντικές, καθώς είτε η αντίδραση δεν γινόταν (απλά υδρολύοταν ο ισοτιϊκός ανυδρίτης), είτε λαμβάνονταν πολύπλοκα μίγματα. Τελικά, η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με τη θέρμανση μίγματος του παραγώγου **3** και ισοτιϊκού ανυδρίτη, σε αναλογία 1/1, εντός *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιου (DMF), οπότε και παρελήφθη το αντίστοιχο επιθυμητό αμίδιο σε απόδοση της τάξης του 62.4%.

$\text{Ar-NH}_2 + $ 		
1.	AcONa, AcOH, βρασμός	Ημιτελής αντίδραση, μίγματα προϊόντων, χαμηλή απόδοση
2.	AcONa, AcOH, MW, 80 °C	Ημιτελής αντίδραση, μίγματα προϊόντων, χαμηλή απόδοση
3.	DMAP, CH ₂ Cl ₂ , THF, βρασμός	Μίγματα προϊόντων
4.	DMAP, THF, βρασμός	Ημιτελής αντίδραση

Εικόνα 36: Προσπάθειες αντιδράσεων σύζευξης για παραλαβή του προϊόντος **4a**.

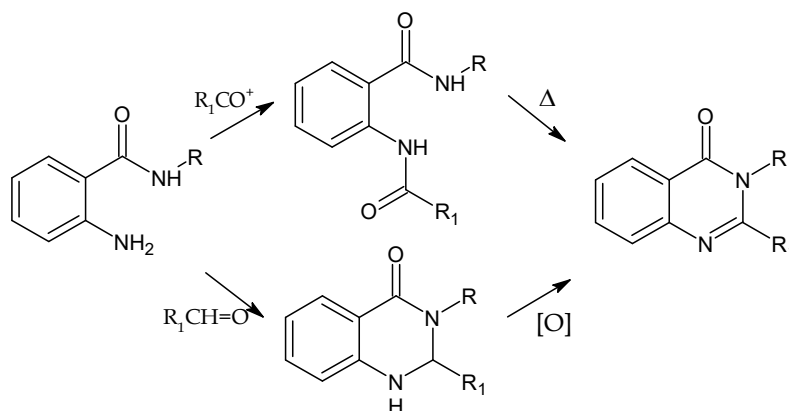
Στο φάσμα ¹H NMR του παραγώγου **4c** είναι χαρακτηριστικές δύο ευρείες απλές κορυφές στα 5 ppm και 6.32 ppm που αντιστοιχούν στα ευκίνητα πρωτόνια της αμινομάδας και της αμιδικής ομάδας αντίστοιχα, καθώς και η χαρακτηριστική για το είδος της υποκατάστασης διπλή διπλών στα 6.67 ppm του H-2 της κιναζολινόνης (Εικόνα 37).



Εικόνα 37: Φάσμα ¹H NMR του παραγώγου **4c** σε Acetone-d₆.

Η συνέχεια της συνθετικής πορείας αφορά την παρασκευή των τελικών μορίων- στόχων της μορφής I (Σχήμα 1) της παρούσας εργασίας. Στη βιβλιογραφία, έχουν αναφερθεί πολλοί τρόποι σύνθεσης του δακτυλίου της κιναζολινόνης, οι οποίοι συνήθως γίνονται σε δύο

στάδια: είτε με επίδραση του κατάλληλου δότη ακυλίου και αφυδάτωση του ενδιάμεσου αμιδίου προς τον δακτύλιο της κιναζολινόνης, είτε με επίδραση της κατάλληλης αλδεΐδης και αφυδάτωση της ενδιάμεσης διϋδροκιναζολίνης (Σχήμα 8).



Σχήμα 8: Τρόποι σχηματισμού κιναζολινόνης.

Στον παρακάτω πίνακα (Εικόνα 38) παρουσιάζονται κάποιοι από αυτούς τους τρόπους. Σύμφωνα με τον πρώτο τρόπο σύνθεσης, απαιτούνται έντονες συνθήκες και βρασμός σε υψηλές θερμοκρασίες. Αντίθετα, στο δεύτερο τρόπο και τα δύο στάδια απαιτούν ήπιες συνθήκες, όμως η χρήση του κατάλληλου χλωριδίου περιορίζει τη χρηστικότητα της αντίδρασης.⁵⁶

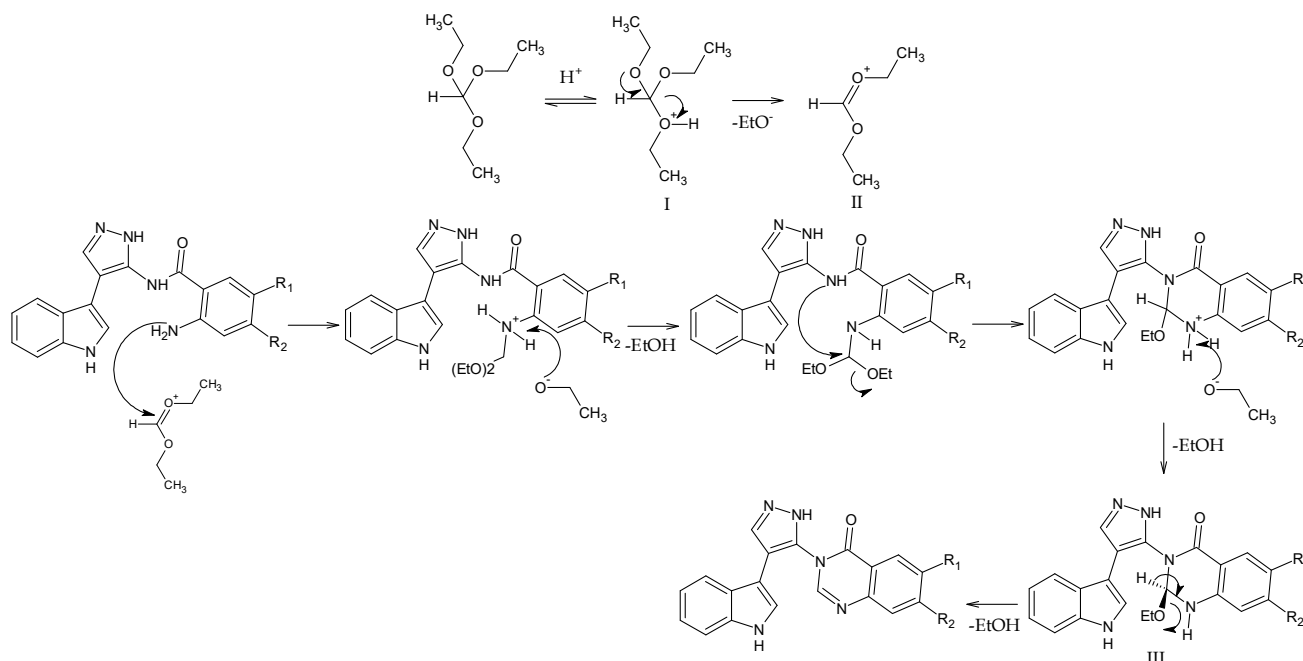
	4.	RCHO, CH ₃ COOH, EtOH/MeOH, βρασμός	
	5.	i. RCOCl, βενζόλιο, θ.π., ii. H ₂ O ₂ , NaOH, EtOH	
	6.	Diethyl oxalate, βρασμός	
	7.	, MeOH, 80 °C	
	8.	Μυρμηκικός τριαιθυλεστέρας, AcONH ₄ , MW/ βρασμός	

Εικόνα 38: Τρόποι σύνθεσης κιναζολινόνης.

Αρχικά, η σύνθεση των επιθυμητών παραγώγων **5a-e** επιχειρήθηκε με θέρμανση των αντίστοιχων αμιδίων **4a-e** εντός άνυδρου μυρμηκικού οξέος, το οποίο αποτελεί το δότη ακυλίου αλλά και το μέσο αφυδάτωσης του ενδιάμεσου διαμιδίου που σχηματίζεται. Δυστυχώς, τα αποτελέσματα της παραπάνω αντίδρασης ήταν ιδιαίτερα αποθαρρυντικά, αφού σε όλες τις προσπάθειες παρατηρούνταν πλήρης αποσύνθεση της πρώτης ύλης. Για τον λόγο αυτό, κρίθηκε απαραίτητη η χρήση πιο ήπιων συνθηκών. Ειδικότερα, η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με ανάδευση μίγματος του κατάλληλου αμιδίου **4a-e** και μυρμηκικού τριαιθυλεστέρα παρουσία καταλυτικής ποσότητας π-τολουολοσουλφονικού οξέος, αυστηρά σε θερμοκρασία 25 °C.

Σύμφωνα με το μηχανισμό της αντίδρασης, αρχικά πραγματοποιείται πρωτονίωση του μυρμηκικού τριαιθυλεστέρα παρουσία του οξέος προς το δραστικό ενδιάμεσο II, από το οποίο με επίδραση της κατάλληλης αμίνης λαμβάνεται μετά αποσπάσεις αιθόξυ ομάδων το

ενδιάμεσο III από το οποίο στη συνέχεια με αρωματικοποίηση παρασκευάζεται το επιθυμητό παράγωγο (Σχήμα 9).⁵⁷

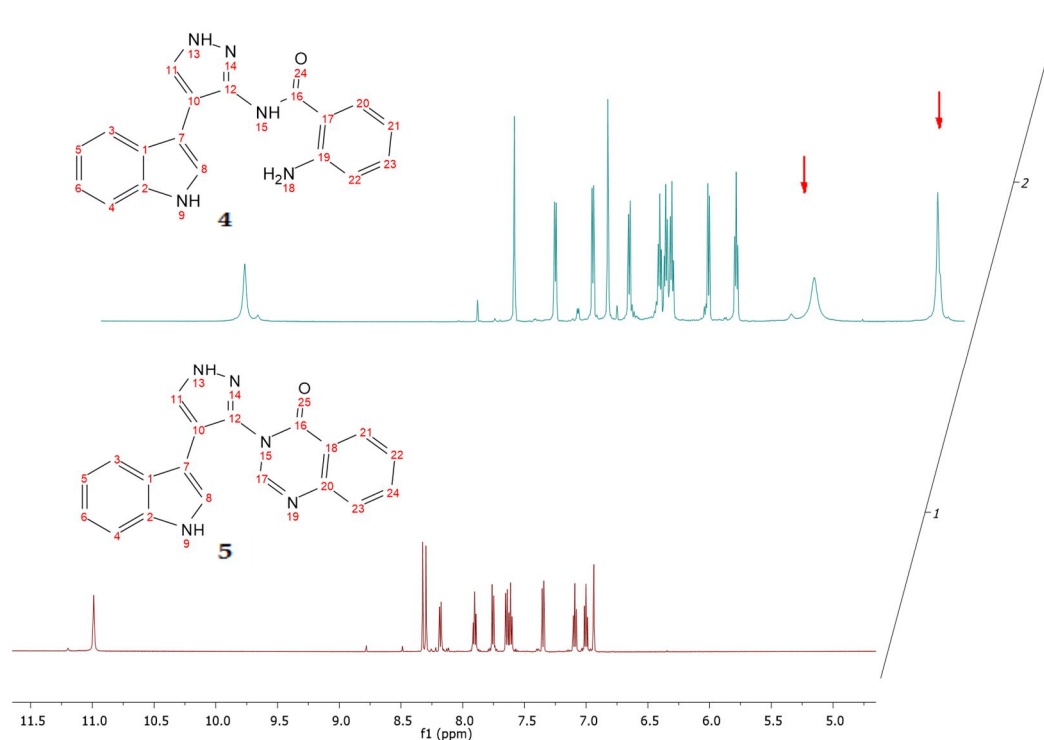


Σχήμα 9: Μηχανισμός σχηματισμού κιναζολινόνης μέσω του μυρμηκικού τριαιθυλεστέρα.

Πρέπει να τονιστεί ότι στη βιβλιογραφία αντίστοιχες αντιδράσεις γίνονται με παρατεταμένη θέρμανση του ανωτέρω μίγματος σε υψηλή θερμοκρασία. Παρόλα αυτά, η εφαρμογή αυτών των συνθηκών στην αντίδραση είχε ως αποτέλεσμα την παραλαβή πολύπλοκων μιγμάτων προϊόντων, τα οποία ήταν δύσκολο να απομονωθούν και να ταυτοποιηθούν. Η βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης ήταν ιδιαίτερα επίπονη, καθώς τόσο το είδος του διαλύτη και η θερμοκρασία όσο και η ποσότητα του καταλύτη και η αναλογία του μυρμηκικού τριαιθυλεστέρα, επηρεάζουν ιδιαίτερα την επιτυχή ολοκλήρωση της. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι ο βέλτιστος διαλύτης είναι το τετραϋδροφουράνιο (THF), καθώς άλλοι διαλύτες όπως το τολουόλιο ή το βενζόλιο δεν επέτρεπαν την ολοκλήρωση της. Επιπροσθέτως, η προσθήκη του π -τολουουλοσουλφονικού οξέος πρέπει να γίνεται καταλυτικά, καθώς επιπλέον ποσότητες οδηγούν επίσης σε πολύπλοκα μίγματα που δεν ήταν εφικτή η ταυτοποίησή τους. Επίσης, ο μυρμηκικός τριαιθυλεστέρας προστίθεται σε ποσότητα τριπλάσια από αυτή της πρώτης ύλης, διαφορετικά η μικρότερη περίσσεια δεν επιτρέπει την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ενώ η μεγαλύτερη περίσσεια οδηγεί σε πολύπλοκα μίγματα προϊόντων που είναι δύσκολο να απομονωθούν. Τέλος, σημαντικό ρόλο παίζει ο χρόνος περάτωσης της αντίδρασης, αφού ο επιπλέον χρόνος οδηγεί σε άγνωστης δομής παραπροϊόντα.

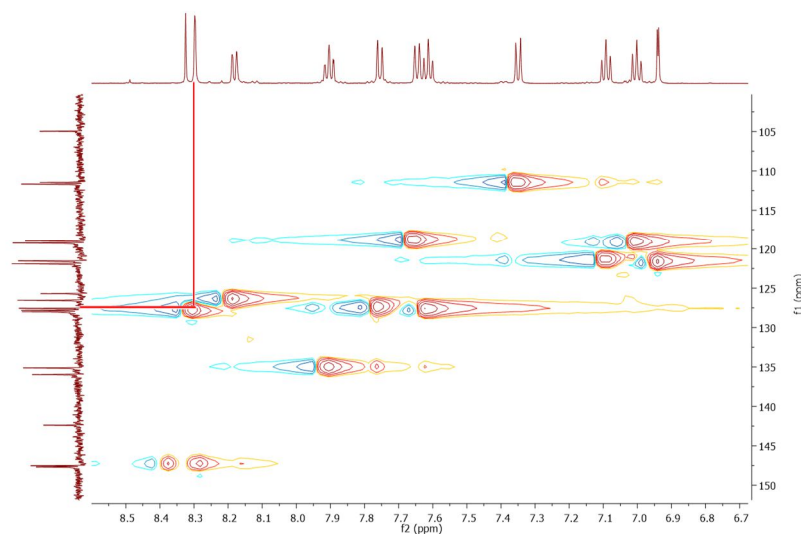
Η πλήρης απόδοση της δομής του μορίου έγινε με τη βοήθεια φασματοσκοπίας NMR μίας και δύο διαστάσεων (^1H NMR, ^{13}C NMR, HMBC, HMQC και COSY), καθώς και της φασματομετρίας μάζας. Όπως φαίνεται στο φάσμα ^1H NMR του παραγώγου **5a** δεν παρατηρούνται πλέον οι απορροφήσεις των πρωτονίων της αμινομάδας και του αμιδικού αζώτου του αντίστοιχου αμιδίου (δύο χαρακτηριστικές ευρείες απλές κορυφές στα 5 ppm

και 6.32 ppm αντίστοιχα), αλλά πλέον εμφανίζεται μια απλή κορυφή στα 8.30 ppm που αντιστοιχεί στο H-2 του δακτυλίου της κιναζολινόνης (Εικόνα 39).



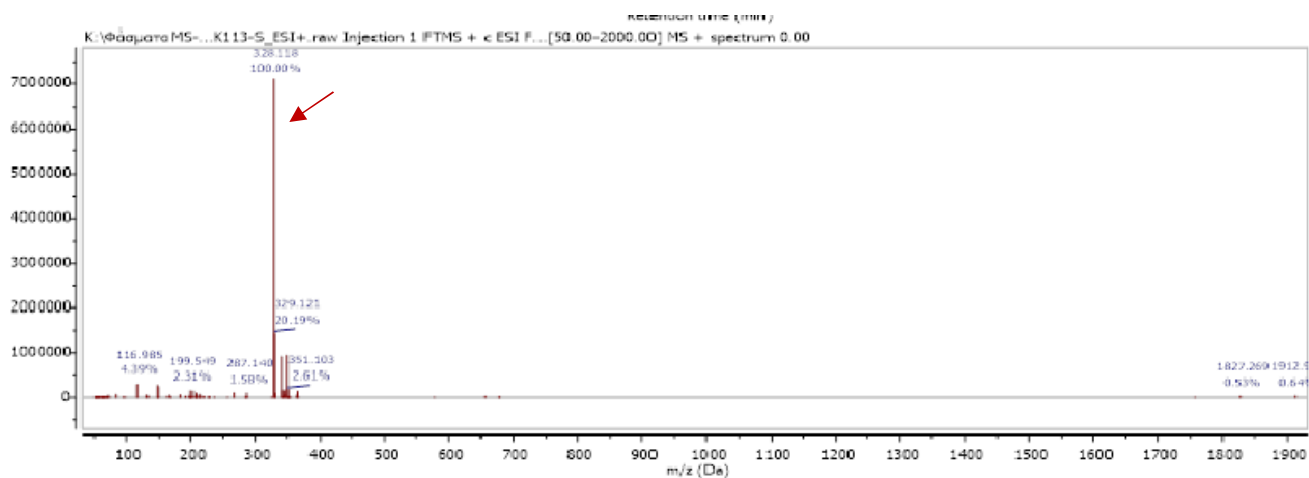
Εικόνα 39: Φάσματα ^1H NMR παραγώγων **4a** και **5a** σε $\text{Acetone-}d_6$ και $\text{DMSO-}d_6$ αντίστοιχα.

Από την αντίδραση ήταν πιθανό να παραληφθεί το αντίστοιχο φορμαμίδιο, το οποίο δεν έχει κυκλώσει προς το επιθυμητό παράγωγο. Όπως φαίνεται όμως και στο φάσμα δύο διαστάσεων HMQC του παραγώγου **5a**, η χαρακτηριστική κορυφή στα 8.30 ppm του H-2 μεθινίου της κιναζολινόνης παρουσιάζει σύζευξη με άνθρακα στα 127.73 ppm. Στην περίπτωση σχηματισμού του αντίστοιχου φορμαμιδίου θα αναμενόταν σύζευξη με άνθρακα σε υψηλότερες τιμές, γεγονός που επιβεβαιώνει τη σύνθεση του επιθυμητού προϊόντος (Εικόνα 40).

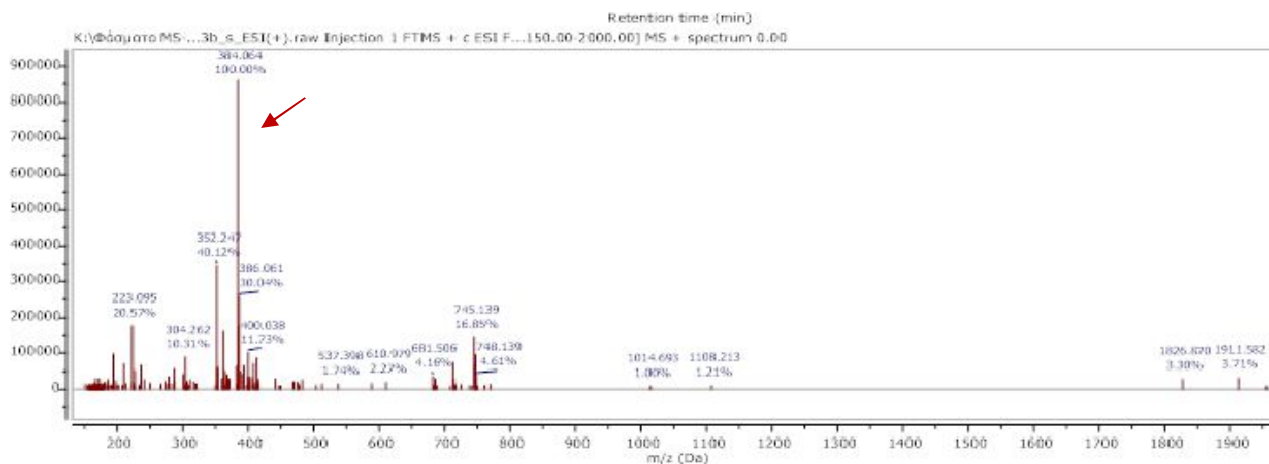


Εικόνα 40: Φάσμα HMQC παραγώγου **5a** σε DMSO- d_6 .

Η πλήρης κύκλωση επιβεβαιώνεται και με τη βοήθεια φασματομετρίας μάζας υψηλής απόδοσης (HRMS). Ενδεικτικά, παρουσιάζονται τα φάσματα μάζας των παραγώγων **5a** (Εικόνα 41) και **5b** (Εικόνα 42) με χαρακτηριστικές ευρεθείσες κορυφές στα 326.12 και 384.06 αντίστοιχα.

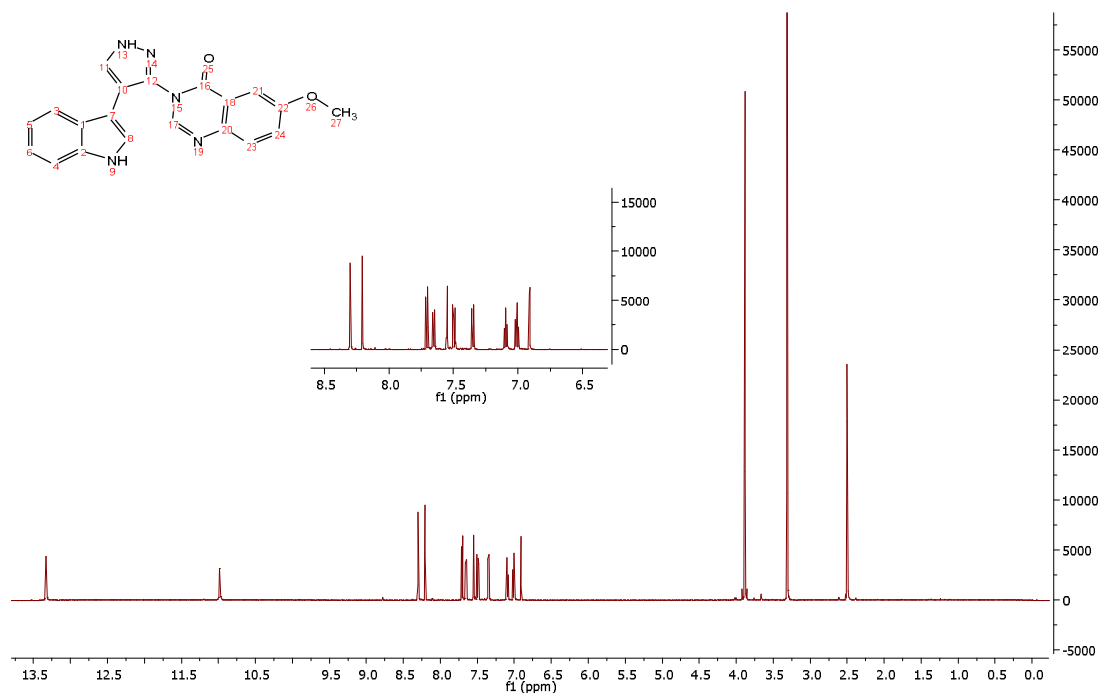


Εικόνα 41: Φάσμα μάζας τελικού μορίου **5a** ESI - HRMS, υπολογισθέν ως προς $C_{19}H_{14}N_5O$ [MH]⁺: 326.3320, ευρεθέν 326.1180.



Εικόνα 42: Φάσμα μάζας τελικού μορίου **5b** ESI-HRMS, υπολογισθέν ως προς $C_{19}H_{12}N_5ClNaO^+[MH^+Na]$: 384.7737, ευρεθέν 384.0639.

Από τη μελέτη των αντιδράσεων της συνθετικής πορείας για την παραλαβή των προϊόντων του γενικού τύπου I, παρατηρήθηκε ότι τα χλώρο υποκατεστημένα παράγωγα σχηματίστηκαν σε μικρότερο χρονικό διάστημα και σε καλύτερες αποδόσεις από το αντίστοιχο μη υποκατεστημένο παράγωγο. Η παραλαβή του υποκατεστημένου τελικού μορίου- στόχου **5d** αποδείχθηκε πιο δύσκολη, πιθανόν λόγω της ύπαρξης της μεθόξυ ομάδας. Στο φάσμα 1H NMR του μορίου εμφανίζεται μια απλή κορυφή στα 3.88 ppm που αντιστοιχεί στο μεθύλιο της μεθόξυ υποκατάστασης και δύο διπλές κορυφές με $J = 1.5$ Hz στα 6.90 ppm και 8.30 ppm του H-2' του ινδολικού δακτυλίου και H-2 της κιναζολινόνης αντίστοιχα (Εικόνα 43).

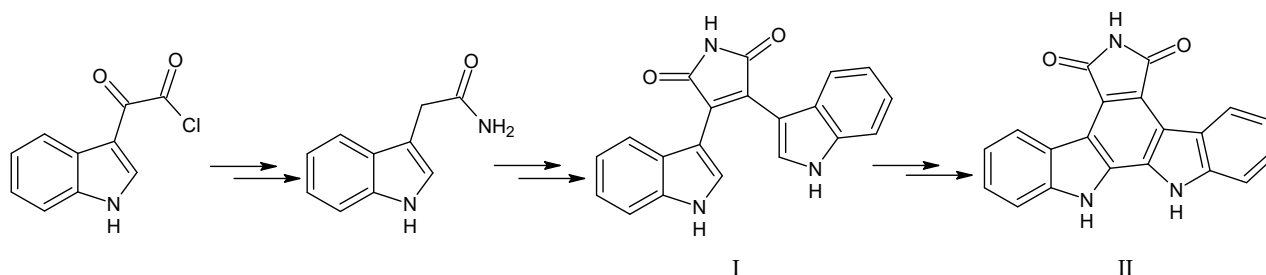


Εικόνα 43: Φάσμα 1H NMR παραγώγου **5d** σε $DMSO-d_6$.

3.2 ΣΥΝΘΕΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ STAUROSPORINE ΚΑΙ RUTAECARPINE.

Λόγω του μεγάλου ενδιαφέροντος των ινδολοκαρβαζολίων, Rutaecarpine και Evodiamine, αλλά και των αναλόγων της Staurosporine και Rebeccamycin, στην βιβλιογραφία έχουν περιγραφεί πολλοί τρόποι σύνθεσης.

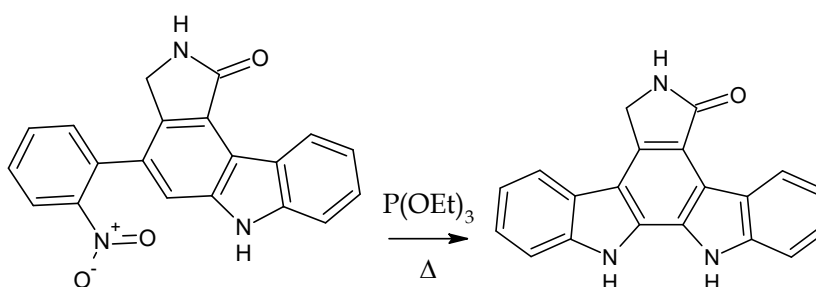
Όσον αφορά τα ανάλογα της Staurosporine, ο σχεδιασμός της συνθετικής πορείας βασίζεται στην σύνθεση του ενδιάμεσου δινδολίου και τη μετέπειτα κύκλωση αυτού προς τον κεντρικό σκελετό της Staurosporine (Σχήμα 10).⁵⁸



Σχήμα 10: Γενικός τρόπος σύνθεσης Staurosporine και αναλόγων της.

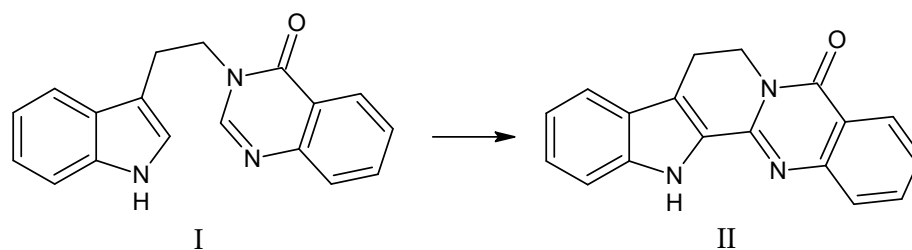
Ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την παρούσα εργασία παρουσιάζουν οι τρόποι κύκλωσης του ενδιάμεσου I προς το άγλυκο τμήμα II της Staurosporine. Οι τρόποι αυτοί συνήθως αναφέρονται σε οξειδωτική κύκλωση με χρήση διαφόρων αντιδραστηρίων όπως η 2,3-διχλωρο-5,6-δικυανο-1,4-βενζοκινόνη (DDQ) και το χλωριούχο παλλάδιο (PdCl₂) (Σχήμα 10).⁵⁸

Λόγω του ενδιαφέροντος των δομών αυτών, αναπτύχθηκαν και άλλοι τρόποι σύνθεσης για την παρασκευή αναλόγων τα οποία φέρουν σάκχαρο και υποκαταστάτες σε διάφορες θέσεις του βασικού τους σκελετού. Ενδεικτικά, παρουσιάζεται στο Σχήμα 11 ένας από αυτούς, όπου με επίδραση τριαιθυλοφωσφίνης επί του κατάλληλου νίτρο παραγώγου πραγματοποιείται πάλι κύκλωση προς το τελικό προϊόν.⁵⁸



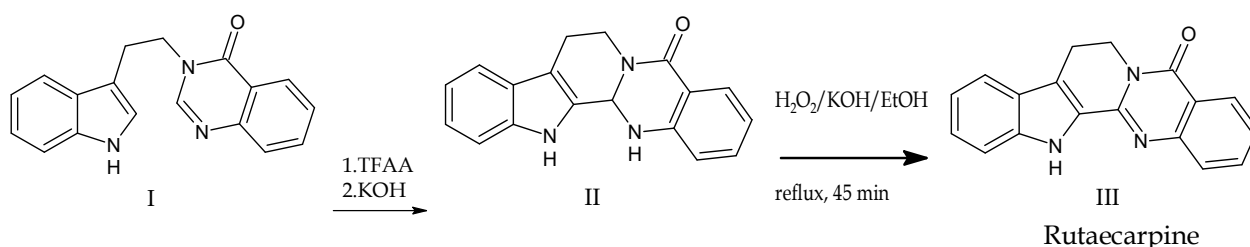
Σχήμα 11: Τρόπος σύνθεσης άγλυκου τμήματος Staurosporine.

Όσον αφορά τη σύνθεση της Rutaecarpine και των αναλόγων της, η πλειονότητα των τρόπων σύνθεσης αφορά την κύκλωση της κατάλληλης ινδολοκιναζολίνης προς το τελικό παράγωγο (Σχήμα 12).



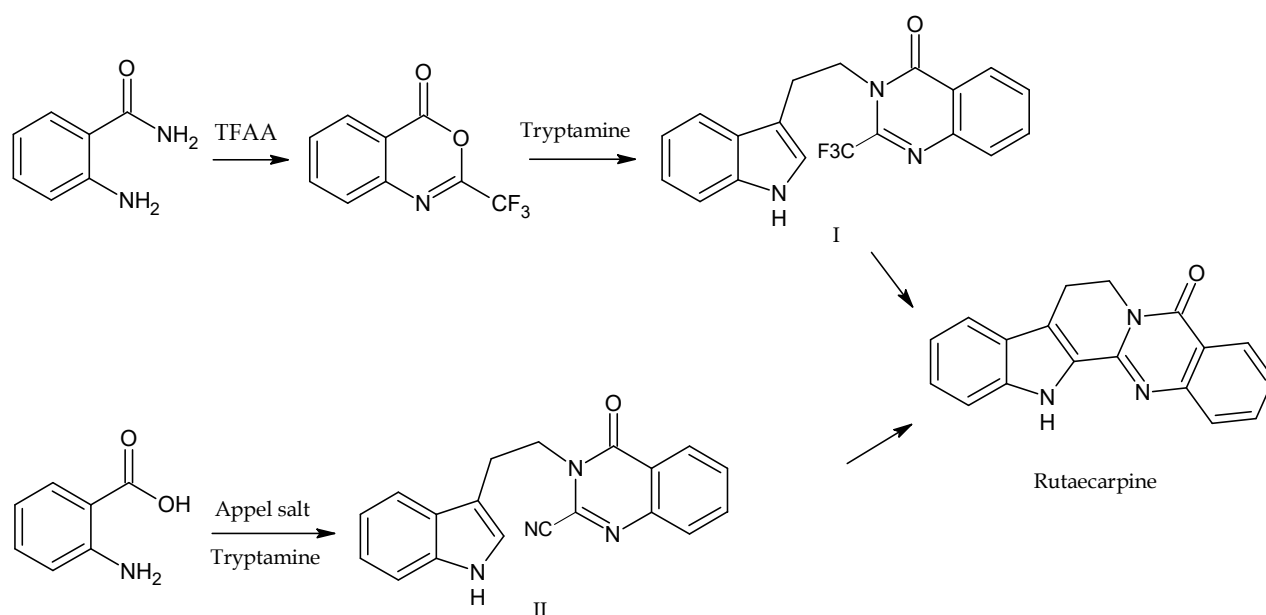
Σχήμα 12: Γενικός τρόπος σύνθεσης της *Rutaecarpine* και των αναλόγων της.

Πιο συγκεκριμένα, από το παράγωγο I αρχικά λαμβάνεται το ενδιάμεσο II (ανάλογο *Enodiamine*), η σύνθεση του οποίου έχει περιγραφεί με πολλούς τρόπους. Ακολούθως, από το ενδιάμεσο II με επίδραση του κατάλληλου οξειδωτικού μέσου (π.χ. υπεροξειδίου του υδρογόνου) λαμβάνεται το επιθυμητό ανάλογο της *Rutaecarpine* (Σχήμα 13).⁵⁹



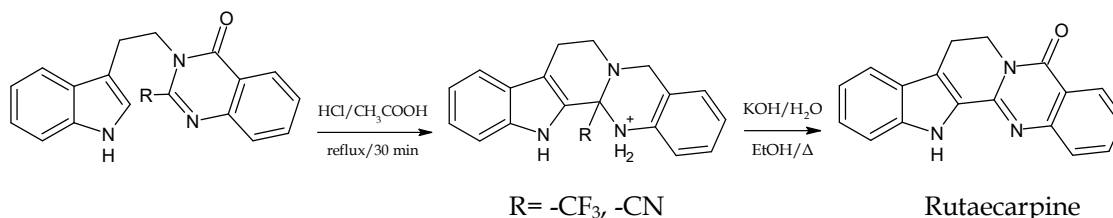
Σχήμα 13: Τρόπος σύνθεσης *Rutaecarpine* μέσω οξειδωτικού μέσου.

Ωστόσο, η συγκεκριμένη μεθοδολογία παρουσιάζει πρόβλημα κυρίως στο πρώτο της στάδιο, το οποίο οφείλεται στην ιδιαίτερα χαμηλή απόδοση και την παραλαβή ποικιλίας παραπροϊόντων. Οι δυσκολίες αυτές έχουν εν μέρη αντιμετωπιστεί με την χρήση αντιδραστηρίων που φέρουν κατάλληλες αποχωρούσες ομάδες με αποτέλεσμα η αντίδραση να γίνεται σε ηπιότερες συνθήκες και σε καλύτερες αποδόσεις (Σχήμα 14).⁶⁰



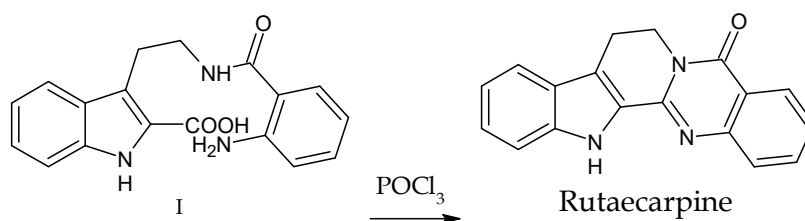
Σχήμα 14: Σχηματισμός αναλόγων *Rutaecarpine*.

Ειδικότερα, με την χρήση τριφθοροξικού ανυδρίτη ή του άλατος του Appel είναι εφικτή η σύνθεση των ενδιάμεσων I και II αντίστοιχα, που φέρουν στη θέση δύο του σκελετού της κιναζολίνης την τριφθορομέθυλο ομάδα ή την ομάδα του νιτριλίου. Με την προσθήκη των ομάδων αυτών, η τελική αντίδραση κύκλωσης γίνεται σε πολύ καλύτερες αποδόσεις, αφού ο ιμινικός δεσμός είναι πλέον ιδιαίτερα πολωμένος, ενώ οι τριφθορομέθυλο ομάδα και η ομάδα νιτριλίου είναι σαφώς καλύτερες αποχωρούσες ομάδες (Σχήμα 15).⁶⁰



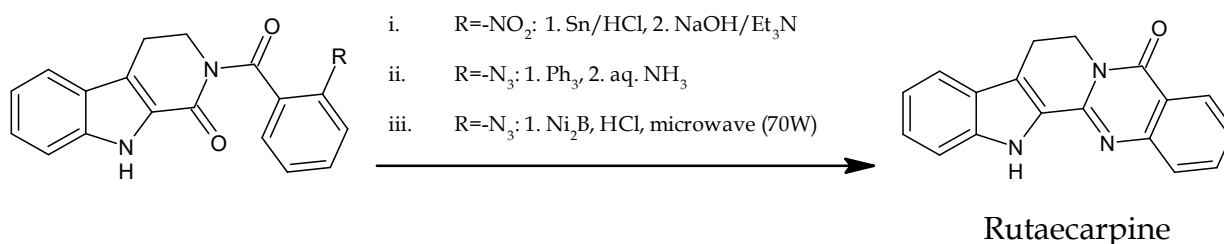
Σχήμα 15: Τρόπος σύνθεσης αναλόγων Rutaeacarpine.

Εκτός από τους γενικούς αυτούς τρόπους σύνθεσης έχουν περιγραφεί και αρκετοί άλλοι. Ενδεικτικά, παρουσιάζεται η σύνθεση του σχήματος 16, όπου λαμβάνεται σε ένα στάδιο η Rutaeacarpine με θέρμανση του οξέος I εντός οξυχλωριούχου φωσφόρου.⁶¹



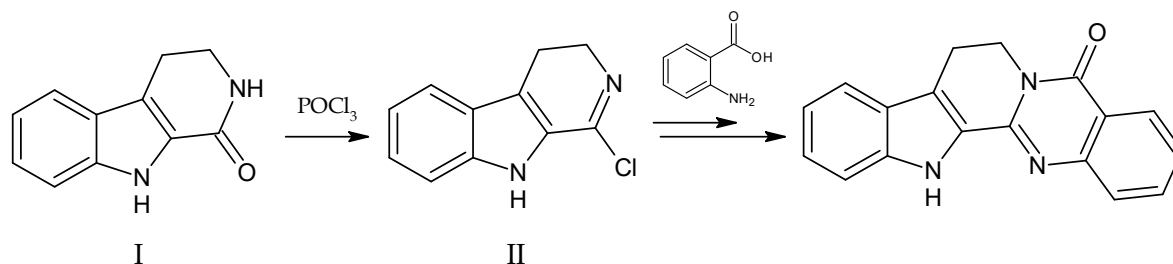
Σχήμα 16: Τρόπος σύνθεσης αναλόγων Rutaeacarpine παρουσία οξυχλωριούχου φωσφόρου.

Επίσης, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η σύνθεση του σχήματος 17, που από το ιμιδικό παράγωγο I λαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν με τη χρήση των κατάλληλων αντιδραστηρίων.⁶²



Σχήμα 17: Σύνθεση αναλόγων Rutaeacarpine από ιμιδικά παράγωγα.

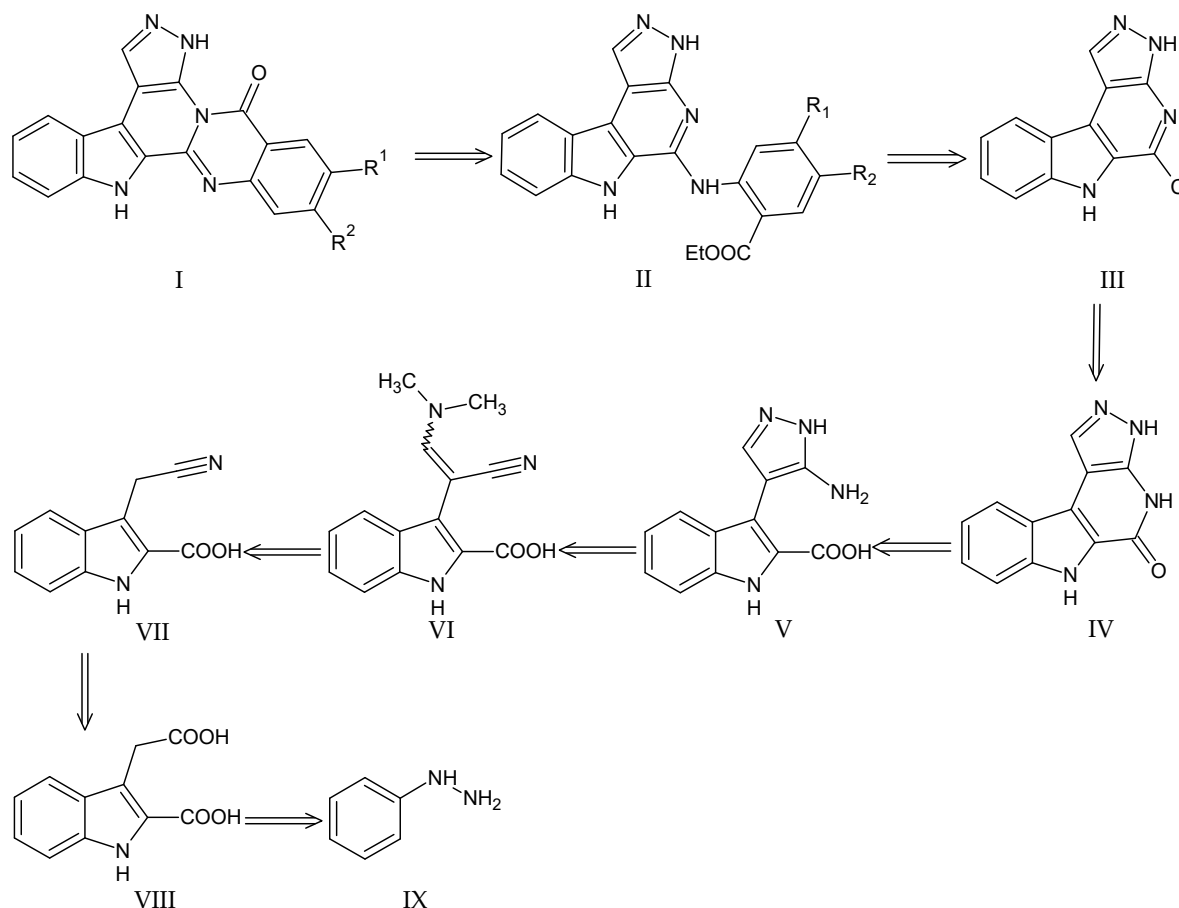
Τέλος, με επίδραση οξυχλωριούχου φωσφόρου επί του ινδολίου I λαμβάνεται το ασταθές χλωρίδιο II, από το οποίο στη συνέχεια με επίδραση του κατάλληλα υποκατεστημένου ανθρανιλικού οξέος και ενδομοριακή κύκλωση της ενδιάμεσης ιμίνης παρασκευάζεται το επιθυμητό ανάλογο της Rutaeacarpine (Σχήμα 18).⁶²



Rutaecarpine

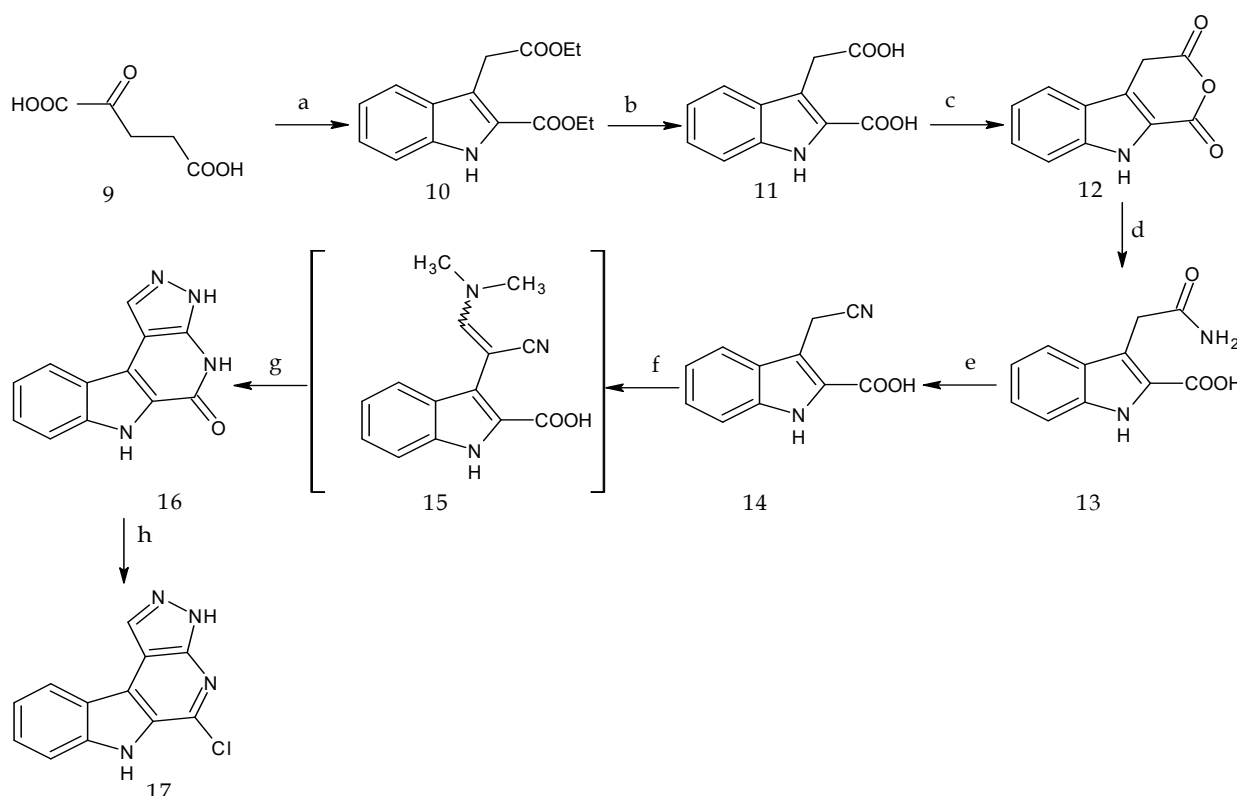
Σχήμα 18: Σύνθεση αναλόγων Rutaecarpine από ινδολοκαρβαζόλια.

Λόγω της απλότητας των δύο τελευταίων τρόπων σύνθεσης που περιγράφηκαν παραπάνω (Σχήμα 17 και 18), αποφασίστηκε η σύνθεση των επιθυμητών μορίων-στόχων της παρούσας εργασίας να γίνει σύμφωνα με αυτούς. Έτσι λοιπόν, η σύνθεση των επιθυμητών παραγώγων του γενικού τύπου I θα μπορούσε να γίνει μετά από ενδομοριακή κύκλωση του παραγώγου II, το οποίο μπορεί να ληφθεί με επίδραση του κατάλληλου ανθρανιλικού εστέρα επί του χλωριδίου III. Το παράγωγο III μπορεί να ληφθεί μετά από ενδομοριακή κύκλωση του οξέος V και αλογόνωση του ενδιάμεσου μορίου IV. Τέλος, το παράγωγο V μπορεί να παρασκευαστεί από το ινδολοακετονιτρίλιο VII μετά από φορμυλίωση και επίδραση υδραζίνης επί του ενδιάμεσου VI. Αξίζει να αναφερθεί επίσης, ότι με εφαρμογή της κλασικής Fisher-Indole σύνθεσης μπορεί να παρασκευαστεί μία μεγάλη ποικιλία υποκατεστημένων ινδολοακετονιτριλίων του τύπου VII (Σχήμα 19).



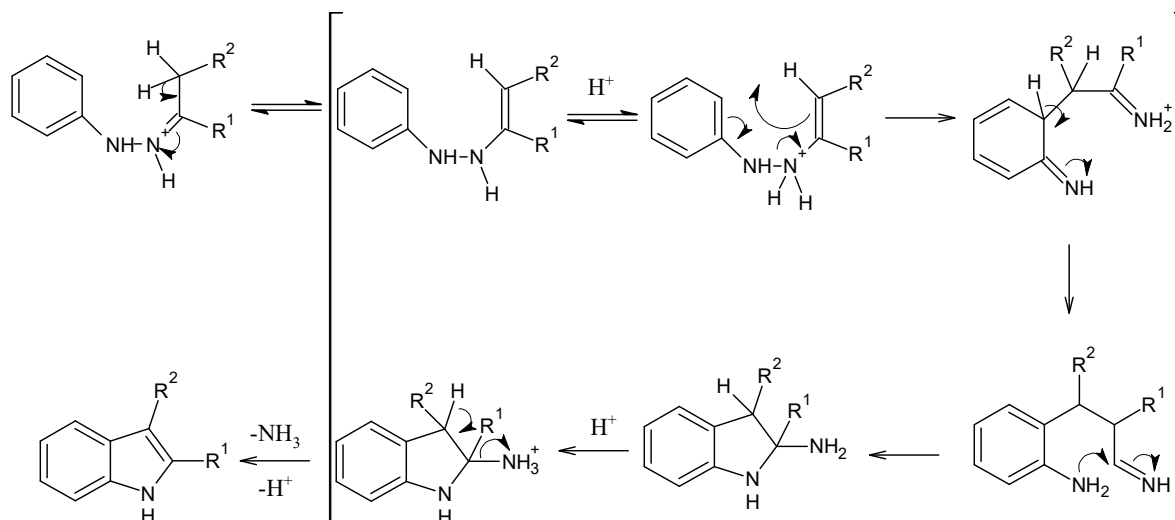
Σχήμα 19: Ρετροσυνθετικό σχήμα τελικών μορίων- στόχων της μορφής I.

Αρχικά, με επίδραση 2-κετογλουταρικού οξέος (**9**) επί της φαινυλοϋδραζίνης σε όξινο περιβάλλον παρασκευάστηκε ο διεστέρας **10** (Σχήμα 20). Η αντίδραση πραγματοποιείται σε πολύ καλή απόδοση και μεγάλη κλίμακα, δίνοντας το παράγωγο ινδολίου σε μεγάλες ποσότητες. Αποτελεί μια κλασική κατά Fischer σύνθεση ινδολίων, ο μηχανισμός της οποίας παρουσιάζεται παρακάτω (Σχήμα 21).



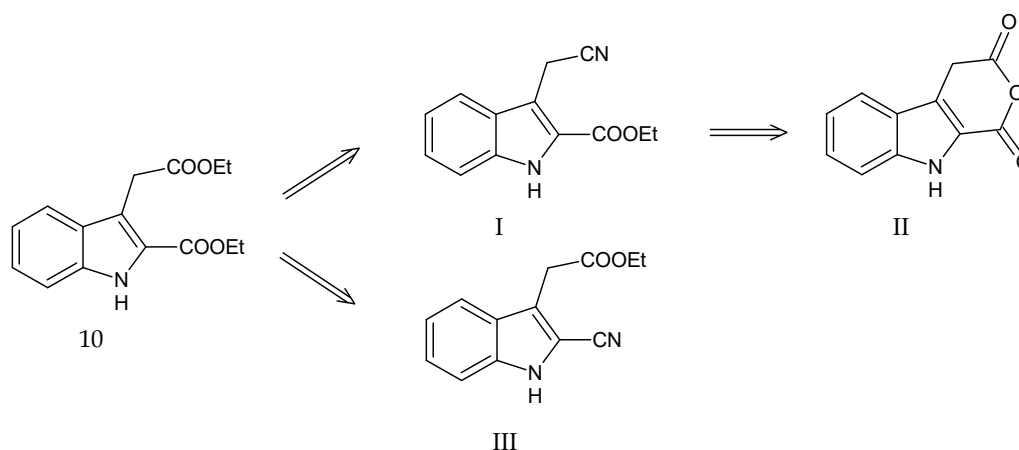
Σχήμα 20: Αντιδραστήρια και συνθήκες: a) PhNHNH₂, CH₃SO₃H, EtOH, 80 °C, b) 30% NaOH, EtOH, 80°C, c) DCC, άνυδρο THF, θερμοκρασία περιβάλλοντος, d) g. NH₃, άνυδρο THF, θερμοκρασία περιβάλλοντος, e) PdCl₂, MeCN, H₂O, 50 °C, f) DMF-DMA, DMF, βρασμός, g) 80% NH₂NH₂, DMF, βρασμός, h. POCl₃, N-αιθυλοδισοπροπολυαιθυλαμίνη, 110 °C.

Σύμφωνα λοιπόν με το μηχανισμό της αντίδρασης, ο πυρήνας του ινδολίου σχηματίζεται με αναδιάταξη του μορίου και απόσπαση αμμωνίας. Σημαντικότερο από τα στάδια θεωρείται ο σχηματισμός του δεσμού C-C, ο οποίος παρουσιάζει ομοιότητες με τη μετάθεση Claisen των αλλυλοφαινυλαιθέρων.⁶³



Σχήμα 21: Μηχανισμός Fischer-Indole σύνθεσης.

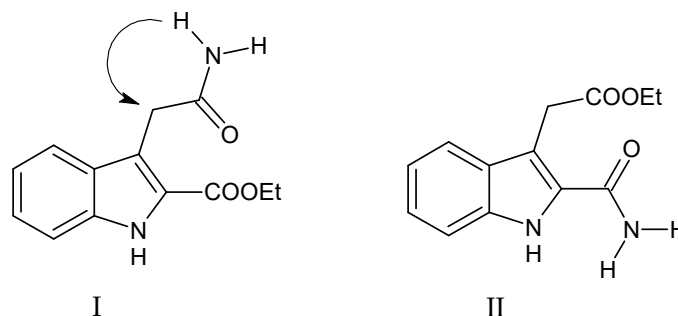
Το επόμενο στάδιο της συνθετικής πορείας αφορά την σύνθεση του κατάλληλου ινδολοακετονιτριλίου. Για τον σκοπό αυτό, από τον εστέρα **10** πρέπει να παρασκευαστεί εκλεκτικά το νιτριλίο I και όχι το νιτριλίο III (Σχήμα 22). Η σύνθεση του νιτριλίου αυτού θα μπορούσε να γίνει απευθείας μέσω αφυδάτωσης του αντίστοιχου πρωτοταγούς αμιδίου, η εκλεκτική σύνθεση του οποίου είναι ιδιαίτερα δύσκολη καθώς το αρωματικό καρβονύλιο του παράγωγο **10** εμφανίζει αυξημένη δραστηριότητα σε σχέση με το καρβονύλιο τύπου οξικού οξέος. Παρόλα αυτά, η σύνθεση του επιθυμητού πρωτοταγούς νιτριλίου I μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω σχηματισμού του ανυδρίτη II και στη συνέχεια με αφυδάτωση αυτού, καθώς η στερεοχημική παρεμπόδιση που εμφανίζει επιτρέπει μόνο την παραλαβή του επιθυμητού προϊόντος (Σχήμα 23).



Σχήμα 22: Σχηματισμός επιθυμητού νιτριλίου **14**.

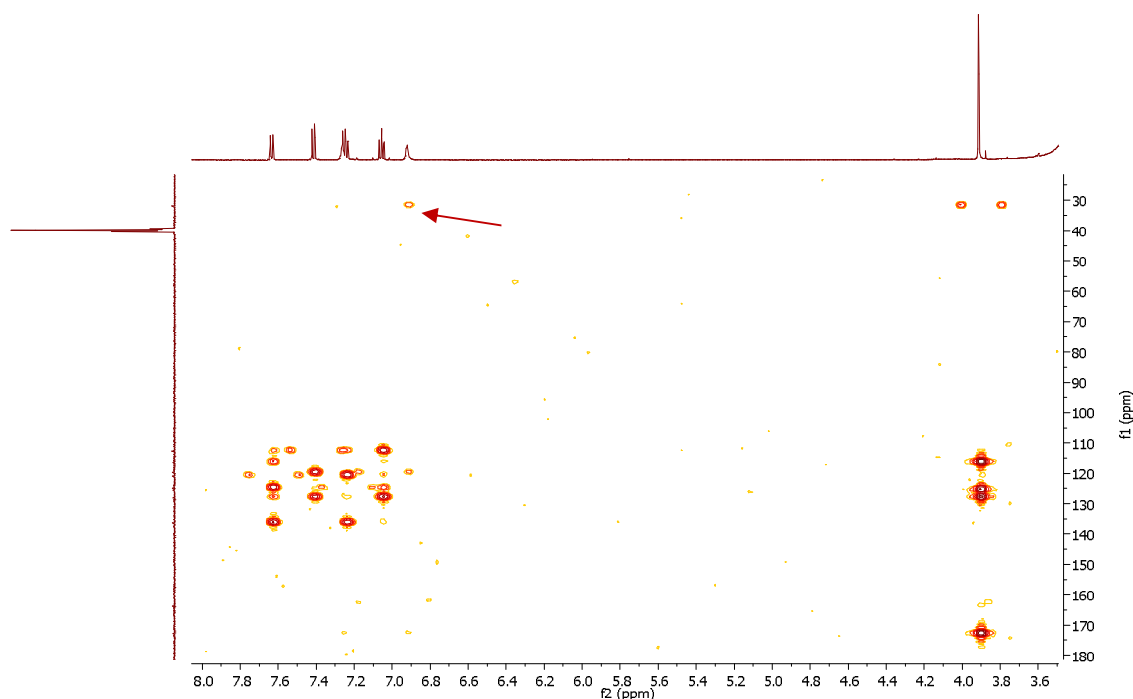
Έτσι λοιπόν, μετά από υδρόλυση του διεστέρα **10** λαμβάνεται το αντίστοιχο διοξύ **11**, από το οποίο με επίδραση *N,N'*-δικυκλοεξυλκαρβοδιιμιδίου (DCC) παρασκευάζεται ο ανυδρίτης **12**. Το παράγωγο αποδείχθηκε ιδιαίτερα ασταθές και έτσι χωρίς καμία κατεργασία και με επίδραση αέριας αμμωνίας συντίθεται το επιθυμητό πρωτοταγές αμίδιο

13. Από το τρόπο αυτό σύνθεσης θεωρητικά είναι δυνατό να συντεθούν τα δύο ισομερή πρωτοταγή αμίδια των γενικών τύπων I και II (Σχήμα 23).



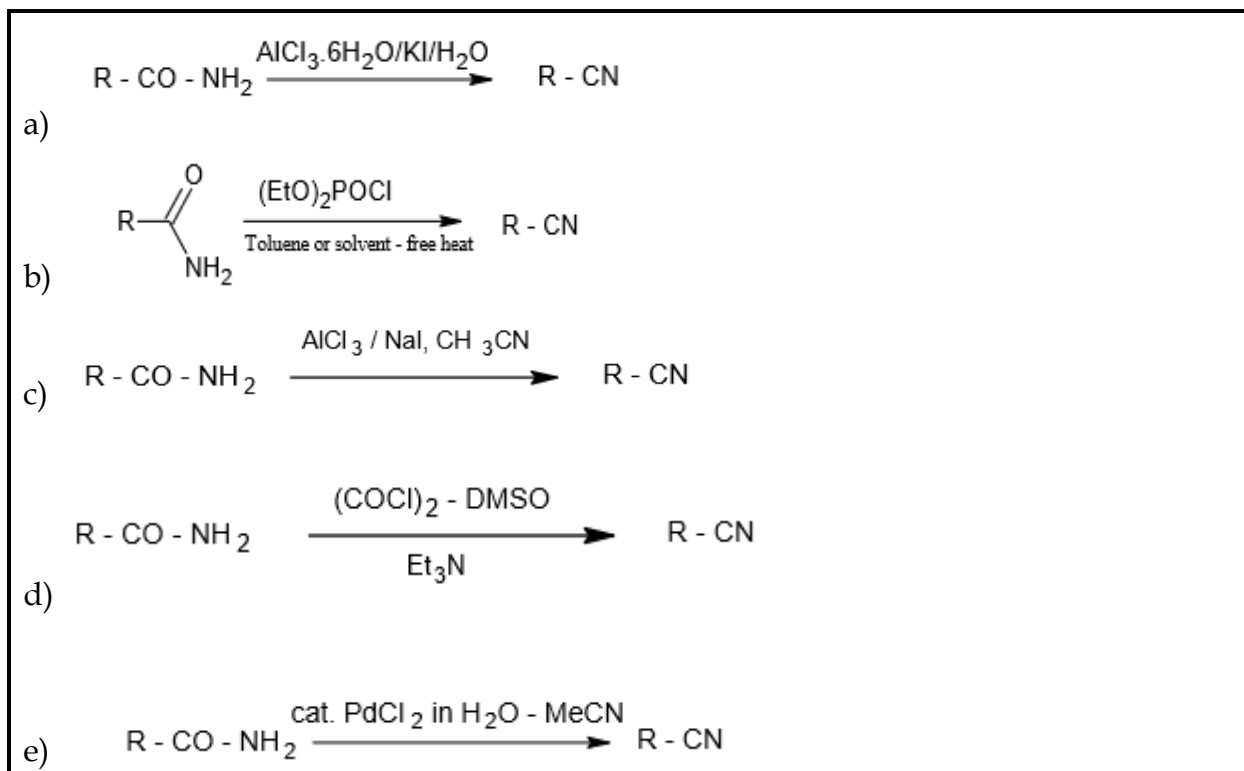
Σχήμα 23: Σχηματισμός επιθυμητού αμιδίου 13.

Η ταυτοποίηση της δομής του αμιδίου 13 έγινε με τη βοήθεια φασματοσκοπίας NMR μίας και δύο διαστάσεων (^1H NMR, ^{13}C NMR, HMBC, HMQC και COSY). Στο φάσμα HMBC (Εικόνα 44) είναι εμφανής η σύζευξη του ενός αμιδικού υδρογόνου στα 6.9 ppm με το μεθυlenικό άνθρακα, κάτι που είναι εφικτό μόνο στο επιθυμητό αμίδιο I και όχι στο αμίδιο II που θα μπορούσε επίσης να σχηματιστεί (Σχήμα 23).



Εικόνα 44: Φάσμα HMBC μορίου 13 σε DMSO- d_6 .

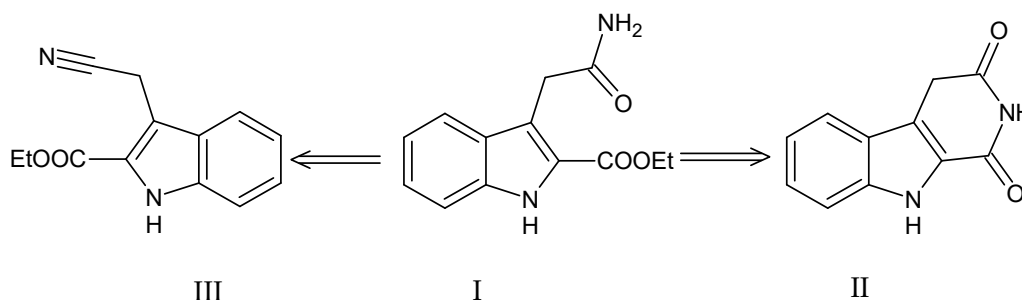
Ακολούθως, πρέπει να παρασκευαστεί το επιθυμητό νιτρίλιο 14. Στη διεθνή βιβλιογραφία περιγράφονται πολλοί τρόποι αφυδάτωσης πρωτοταγών αμιδίων στα αντίστοιχα τους νιτρίλια μερικοί από τους οποίους παρουσιάζονται στον πίνακα της εικόνας 45. Μεταξύ αυτών, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο βρασμός εντός οξυχλωριούχου φωσφόρου ή άλλων αφυδατικών μέσων όπως το αντιδραστήριο Eaton ή το πεντοξείδιο του φωσφόρου.⁶⁴



Εικόνα 45: Μέθοδοι παρασκευής πρωτοταγών αμιδίων.

Εκτός των μεθόδων αυτών, έχουν αναπτυχθεί και διάφορες άλλες που χαρακτηρίζονται από τη χρήση πιο ήπιων αντιδραστηρίων και συνθηκών, όπως η σύνθεση με επίδραση $PdCl_2$, $AlCl_3/KI$, $COCl_2$ /τριαθιλαμίνης/ $DMSO$ (οξειδωση Swern), $(EtO)_2POCl$. κ.α..

Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η αντίδραση αφυδάτωσης είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη, καθώς κάτω από έντονες συνθήκες μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό του αντίστοιχου γλουταριμιδίου II (Σχήμα 24). Τελικά, η αντίδραση επιλέχθηκε να γίνει με τη χρήση χλωριούχου παλλαδίου σε σύστημα διαλυτών H_2O - $MeCN$, οποίος αποτελεί έναν ιδιαίτερα ήπιο τρόπο αφυδάτωσης.

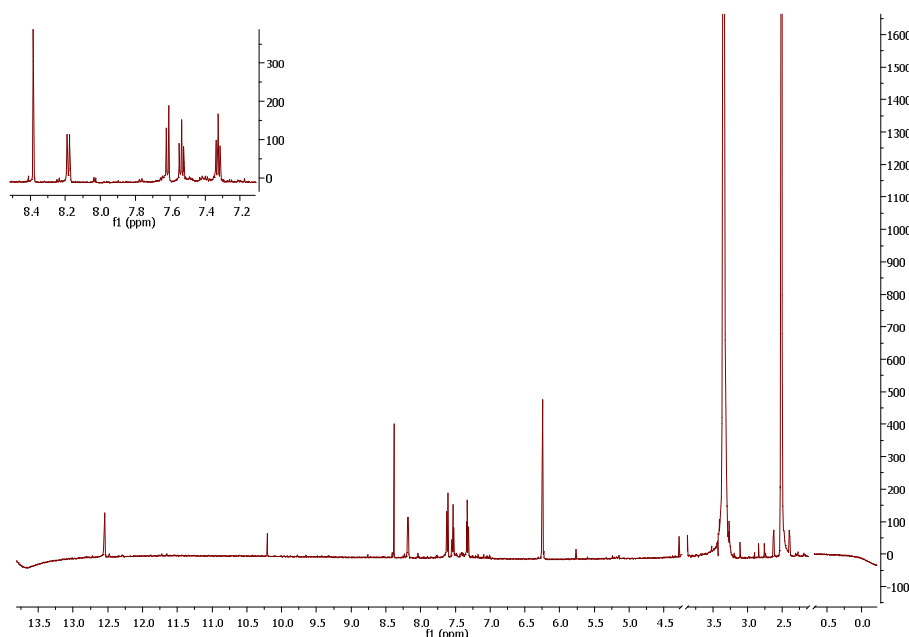


Σχήμα 24: Σχηματισμός γλουταριμιδίου.

Στη συνέχεια, με επίδραση DMF-DMA επί του νιτριλίου **14** λαμβάνεται μίγμα των ισομερών E και Z του παραγώγου **15**. Αξίζει να αναφερθεί ότι κατά την ανωτέρω αντίδραση παραλήφθηκαν σε μικρές αποδόσεις και οι αντίστοιχοι μεθυλεστέρες E και Z του παραγώγου **15** (μέσω προσθήκης της μεθύλυ ομάδας από την διάσταση του DMF-DMA), η ύπαρξη των οποίων διαπιστώθηκε και με τη βοήθεια φασματομετρίας μάζας. Ο καθαρισμός

του μίγματος αυτού δεν κρίθηκε σκόπιμος, καθώς με επίδραση υδραζίνης παρασκευάστηκε το επιθυμητό παράγωγο **16**, η απομόνωση του οποίου αποδείχθηκε εξαιρετικά εύκολη, αφού μετά το τέλος της αντίδρασης λαμβάνεται ένα και μόνο προϊόν σχετικά καθαρό.

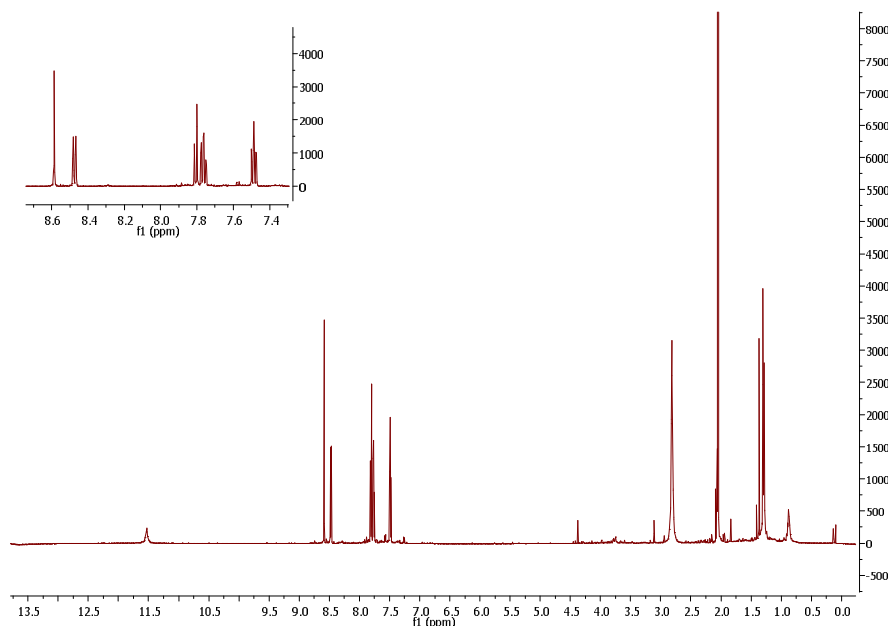
Στο φάσμα ^1H NMR του παραγώγου **16** παρατηρούνται μία απλή, αποθωρακισμένη κορυφή, στα 8.5 ppm περίπου που αντιστοιχεί στο H-1 του πυραζολικού δακτυλίου, καθώς και δύο επιπλέον απλές κορυφές, μία ιδιαίτερα αποθωρακισμένη στα 12.5 ppm και μία θωρακισμένη στα 6.3 ppm περίπου, που αντιστοιχούν στα ευκίνητα υδρογόνα του ινδολίου και της πυριδινόνης αντίστοιχα (Εικόνα 46).



Εικόνα 46: Φάσμα ^1H NMR μορίου **16** σε $\text{DMSO}-d_6$.

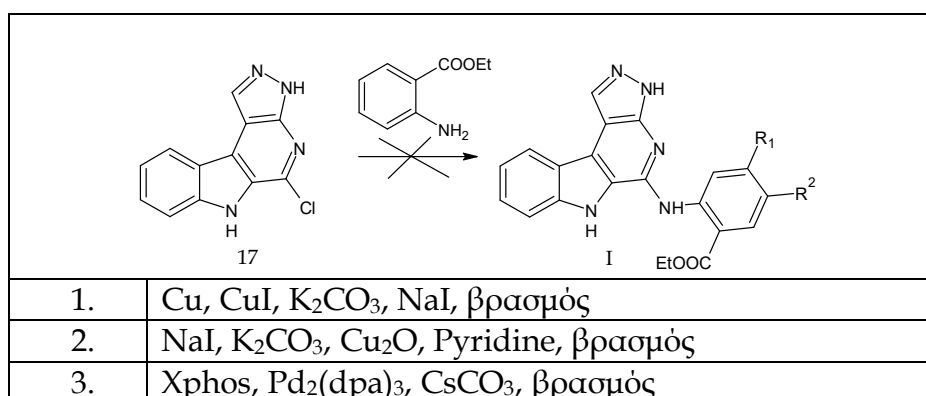
Το επόμενο βήμα της συνθετικής πορείας αφορά τη σύνθεση του χλώρο ή βρώμο υποκατεστημένου παραγώγου **16**, ώστε στη συνέχεια να πραγματοποιηθεί η αντίδραση αρωματικής πυρηνόφιλης υποκατάστασης με τον κατάλληλο ανθρανλικό εστέρα προς παραλαβή του ενδιάμεσου τύπου II (Σχήμα 19). Αρχικά δοκιμάστηκε η παρασκευή του βρωμο-υποκατεστημένου παραγώγου χωρίς καμία επιτυχία, πιθανόν λόγω της δυσδιαλυτότητας του ενδιάμεσου προϊόντος **16** στα συνήθη αντιδραστήρια. Παρόλα αυτά, με επίδραση οξυχλωριούχου φωσφόρου παρελήφθη το χλώρο υποκατεστημένο παράγωγο **17** σε απόδοση της τάξεως 25%.

Στο φάσμα ^1H NMR του παραγώγου **17** εμφανίζονται δυο διπλές και δυο τριπλές κορυφές που αντιστοιχούν στις απορροφήσεις των αρωματικών πρωτονίων του ινδολικού δακτυλίου και μια απλή περίπου στα 8.6 ppm, που αντιστοιχεί στο μεθίνιο του πυραζολίου (Εικόνα 47).



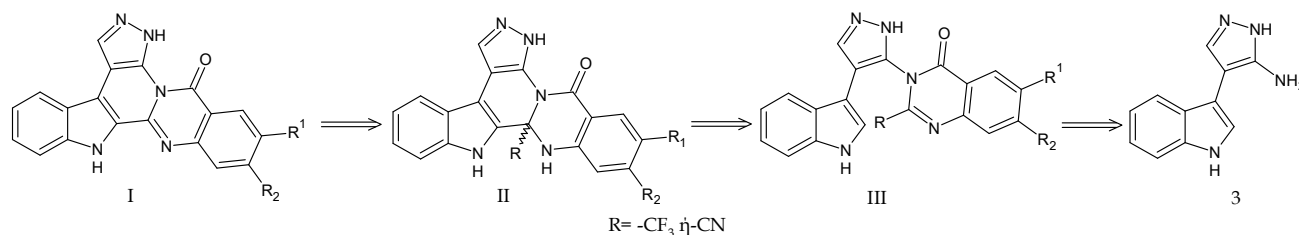
Εικόνα 47: Φάσμα ^1H NMR παραγώγου **17** σε $\text{Acetone-}d_6$.

Το επόμενο στάδιο της συνθετικής πορείας, δηλαδή η αντίδραση αρωματικής πυρηνόφιλης υποκατάστασης επί του παραγώγου **17** από τον κατάλληλα υποκατεστημένο ανθρανιλικό εστέρα επιχειρήθηκε με διάφορους τρόπους χωρίς όμως επιτυχία (Εικόνα 48).



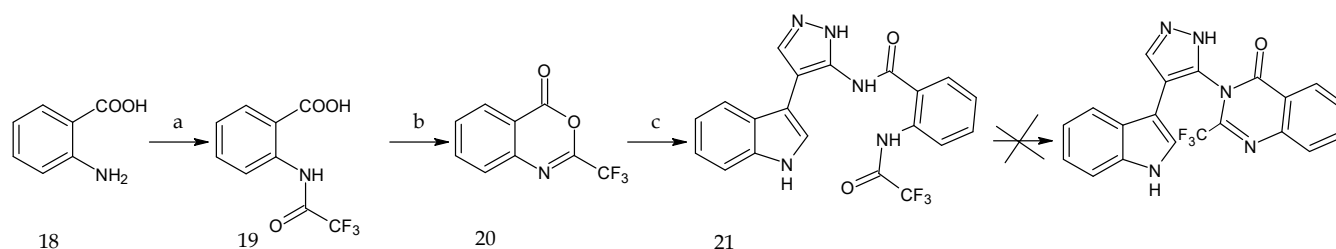
Εικόνα 48: Προσπάθειες σύζευξης για παραλαβή του παραγώγου **II**.

Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τις χαμηλές αποδόσεις μέχρι το χλώρο παράγωγο **17**, μας ανάγκασε να στραφούμε στην ανάπτυξη μιας νέας συνθετικής πορείας και όχι στην εύρεση βέλτιστων συνθηκών για την αντίδραση της πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης. Θεωρήσαμε λοιπόν, ότι η σύνθεση των επιθυμητών παραγώγων του γενικού τύπου **I** θα μπορούσε να γίνει μέσω ενδομοριακής κύκλωσης των ενδιαμέσων του γενικού τύπου **III** (Σχήμα 25), κατά αναλογία με τον τρόπο σύνθεσης της Rutaecarpine (Σχήμα 14 και 15). Η παρουσία τριφθορομεθυλομάδας ή ομάδας νιτριλίου αυξάνει δραματικά την απόδοση της αντίδρασης ενδομοριακής κύκλωσης τόσο λόγω της πόλωσης του ιμινικού δεσμού στο σκελετό της κιναζολινόνης όσο και λόγω του γεγονότος ότι και οι δύο είναι καλύτερες αποχωρούσες ομάδες. Αρχικά λοιπόν, αποφασίστηκε να αναπτυχθεί η μέθοδος με τη χρήση της τριφθορομέθυλο ομάδας.



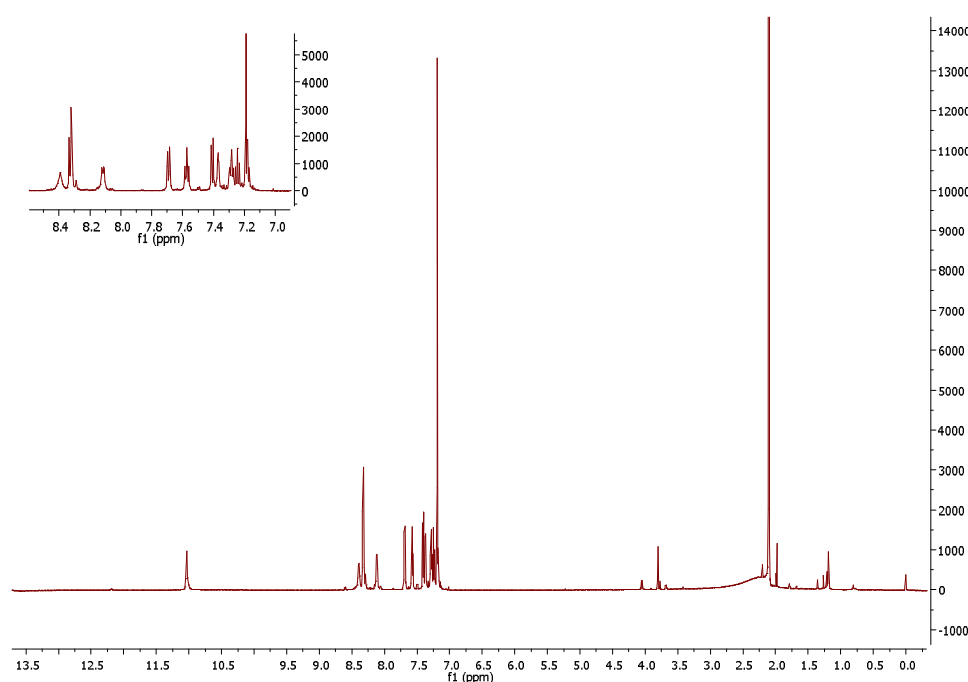
Σχήμα 25: Ρετροσυνθετικό σχήμα παρασκευής τελικών παραγώγων της μορφής I.

Έτσι, με επίδραση τριφθοροξικού ανυδρίτη επί του ανθρανιλικού οξέος (**18**) εντός άνυδρου διχλωρομεθανίου, παραλαμβάνεται το αμίδιο **19**, από το οποίο στη συνέχεια με επίδραση οξικού ανυδρίτη συντίθεται η αντίστοιχη βενζοξαζινόνη **20** (Σχήμα 26).



Σχήμα 26: Αντιδραστήρια και συνθήκες: a. (CF₃CO)₂O, άνυδρο CH₂Cl₂, θερμοκρασία περιβάλλοντος, b. (CH₃CO)₂O, θερμοκρασία περιβάλλοντος, c. Παράγωγο **3**, DMAP, άνυδρο THF, 55 °C.

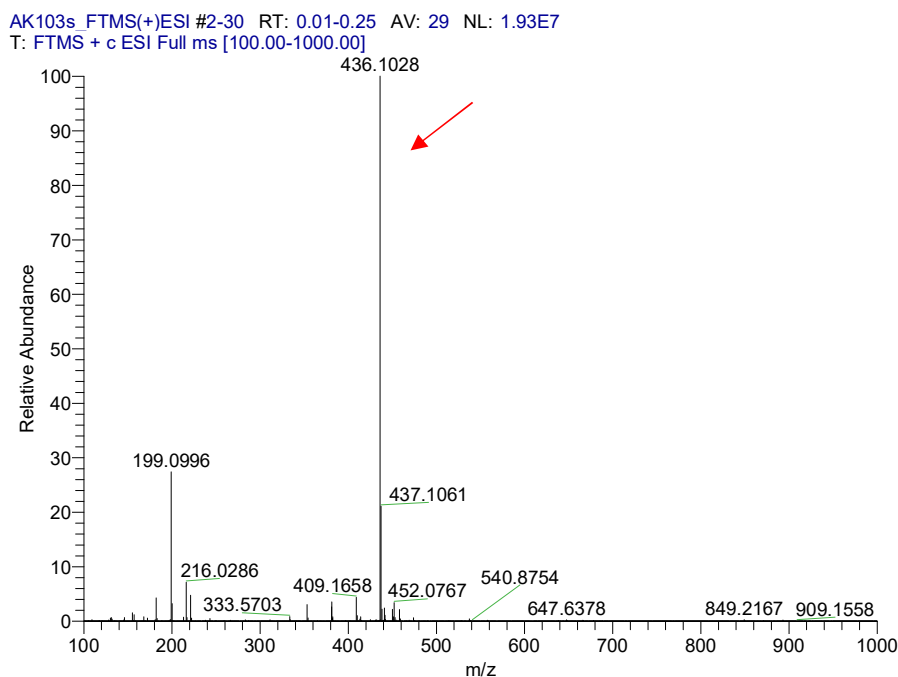
Το επόμενο στάδιο της συνθετικής πορείας αφορά την αντίδραση σύζευξης του αμινοπυραζολίου **3** επί της βενζοξαζινόνης **20**, με αποτέλεσμα να παρασκευάζεται εύκολα και σε υψηλή απόδοση το αμίδιο **21**. Στο φάσμα ¹H NMR του παραγώγου **21** παρατηρείται η χαρακτηριστική κορυφή απορρόφησης του πυραζολικού πρωτονίου σαν μία ευρεία απλή κορυφή στα 8.4 ppm περίπου που οφείλεται στο φαινόμενο της ταυτομέρειας (Εικόνα 49).



Εικόνα 49: Φάσμα ^1H NMR παραγώγου **21** σε Acetone- d_6 .

Γενικά, το φάσμα αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με το αντίστοιχο φάσμα του παραγώγου **4a**, όμως οι κορύφες είναι μετατοπισμένες σε υψηλότερες τιμές πεδίου λόγω της παρουσίας της τριφθορομεθυλομάδας στο μόριο.

Δεδομένου ότι στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί πολλές περιπτώσεις απευθείας κυκλοποίησης διαμιδίων αντίστοιχων με αυτά του παραγώγου **21** προς την αντίστοιχη κιναζολινόνη του γενικού τύπου III (Σχήμα 26) χρειάστηκε επιβεβαίωση της δομής του παραγώγου **21** με βοήθεια φασματομετρίας μάζας υψηλής απόδοσης (HRMS). Στο φάσμα είναι εμφανής η ύπαρξη του μοριακού ιόντος στα 436.1028 (Εικόνα 50).

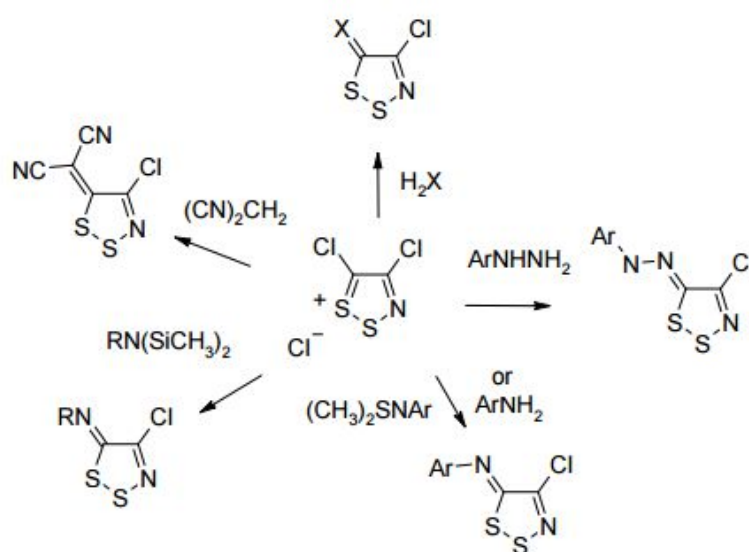


Εικόνα 50: Φάσμα μάζας παραγώγου **21**, ESI - HRMS υπολογισθέν ως προς $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_5\text{NaO}_2$ $[\text{MH}^+\text{Na}]$: 436.3419, ευρεθέν 436.1028.

Στη συνέχεια, ακολουθεί το επόμενο στάδιο της ενδομοριακής κύκλωσης προς την αντίστοιχη κιναζολίνη. Παρόλο όμως που η αντίδραση επιχειρήθηκε με πολλούς τρόπους, δυστυχώς δεν κατέστη δυνατή, καθώς σε ήπιες συνθήκες δεν γινόταν καμία αντίδραση, ενώ σε έντονες (θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία ή παρουσία αφυδατικών μέσων), παρατηρούνταν πλήρης αποσύνθεση της πρώτης ύλης.

Για το λόγο αυτό, αποφασίστηκε η χρήση του νιτριλίου ως αποχωρούσας ομάδας. Στη βιβλιογραφία, η σύνθεση των 2-κάνο υποκατεστημένων κιναζολινών έχει περιγραφεί με τη χρήση του αλάτος του Appel.⁶⁵ Το αλάτι του Appel αποτελεί ένα χλωριούχο 4,5-διχλωρο-1,2,3-διθειάζολιο και παρασκευάζεται πολύ εύκολα και σε πολύ καλές αποδόσεις από κατάλληλα μονοϋποκατεστημένα ακετονιτρίλια με επίδραση διχλωροδισουλφιδίου σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Όπως αποδείχθηκε, η θέση 5 του πενταμελούς δακτυλίου είναι ιδιαίτερα ενεργοποιημένη για πυρηνόφιλη υποκατάσταση. Συνεπώς, ανάλογα με την

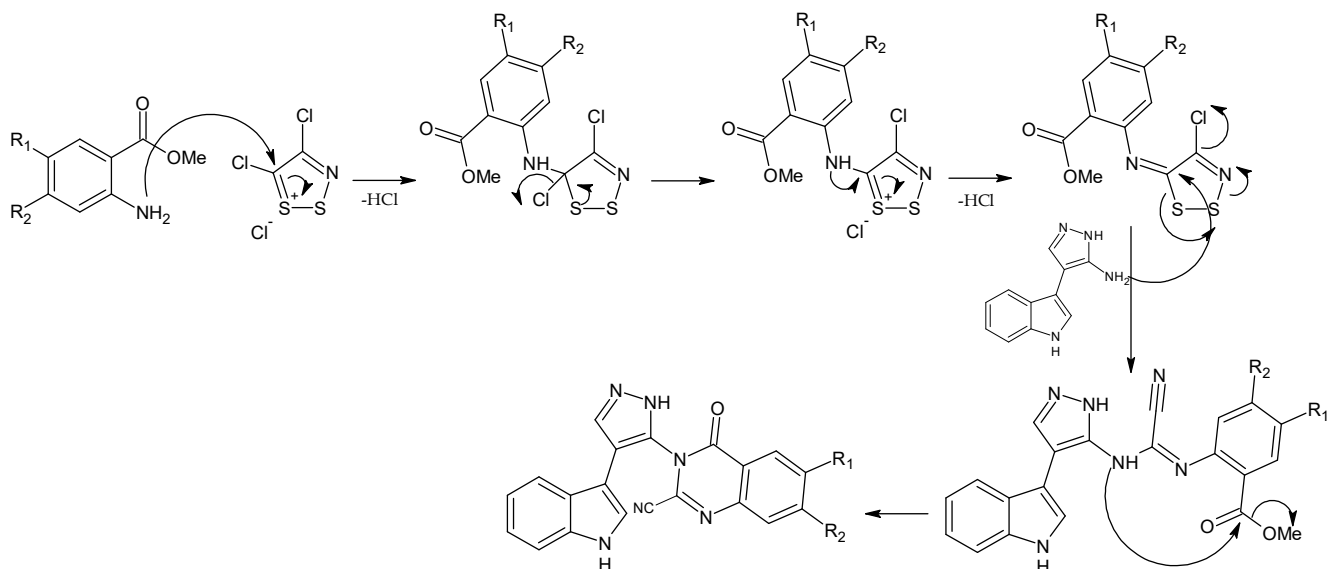
ποικιλία των πυρηνόφιλων κέντρων και τις συνθήκες των αντιδράσεων μπορούν να προκύψουν πλήθος παραγώγων (Εικόνα 51).⁶⁵



Εικόνα 51: Ποικιλία πυρηνόφιλων κέντρων προς αντίδραση με το άλας του Appel.

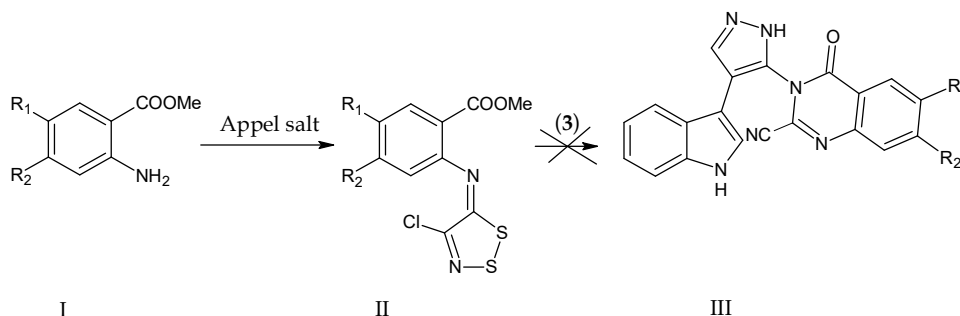
Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα 5-υποκατεστημένα παράγωγα με ανιλίνες, τα οποία μπορούν να δώσουν ποικιλία διαφορετικών αντιδράσεων και πολλών προϊόντων όπως κιναζολίνες, πυριμιδινόνες και κυανοθειοφορμαμίδια. Τα νέα αυτά παράγωγα αποτελούν υποστρώματα πυρηνόφιλης προσβολής είτε στον άνθρακα της θέσης 5 είτε στο θείο του πενταμελούς δακτυλίου ανάλογα με τα αντιδραστήρια και τις συνθήκες της αντίδρασης, οδηγώντας σε μετασχηματισμό του διθειαζολικού δακτυλίου και σε κύκλωση με γειτονικούς δακτύλιους.^{65,66}

Αρχικά λοιπόν, πραγματοποιείται συμπύκνωση του κατάλληλου ανθρανλικού μεθυλεστέρα με την αμινομάδα του άλατος του Appel. Σε επόμενο στάδιο, πραγματοποιείται μια ακόμα συμπύκνωση, αυτή της επιθυμητής αμίνης επί του ιμινικού δεσμού του σχηματιζόμενου διθειαζολίου και τελικά κύκλωση προς το παράγωγο κιναζολινόνης, ο μηχανισμός της οποίας φαίνεται στο σχήμα 27.⁶⁶



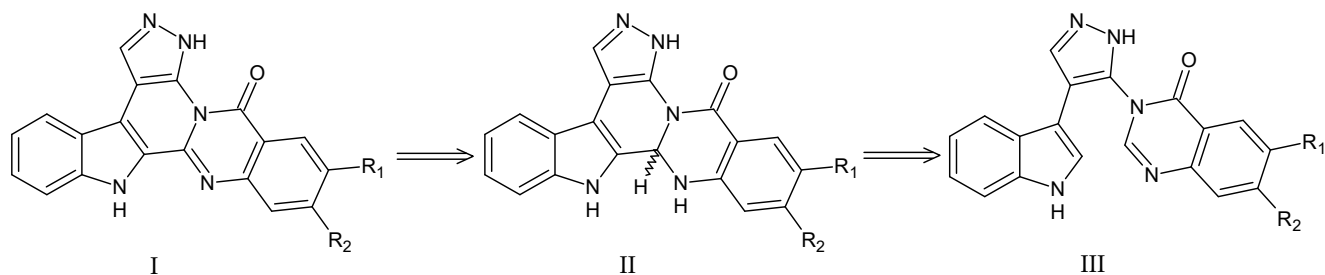
Σχήμα 27: Μηχανισμός πυρηνόφιλης υποκατάστασης επί του άλατος του Appel.

Δυστυχώς όμως, όλες οι δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν για το σχηματισμό του επιθυμητού παραγώγου κιναζολινόνης III, δεν είχαν αποτέλεσμα (Εικόνα 28).



Σχήμα 28: Σχηματισμός επιθυμητών μορίων IV μέσω άλατος του Appel.

Δεδομένης της αποτυχίας σύνθεσης των επιθυμητών παραγώγων με τη χρήση των τριφθομέθυλο- ή κβανο-υποκαταστατών, αποφασίστηκε η σύνθεση των επιθυμητών μορίων να γίνει με τον κλασικό τρόπο σύνθεσης της Rutaecarpine, που πραγματοποιείται χωρίς την ύπαρξη αποχωρούσας ομάδας (Σχήμα 13). Σύμφωνα λοιπόν με το ρετροσυνθετικό σχήμα, η σύνθεση των τελικών μορίων- στόχων του γενικού τύπου I θα μπορούσε να γίνει μέσω ενδομοριακής κύκλωσης του παραγώγου III προς το παράγωγο II (δομικό ανάλογο της Evodiamine) από το οποίο μέσω οξειδωσης θα παραληφθούν τα επιθυμητά παράγωγα I της παρούσας εργασίας (Σχήμα 29).



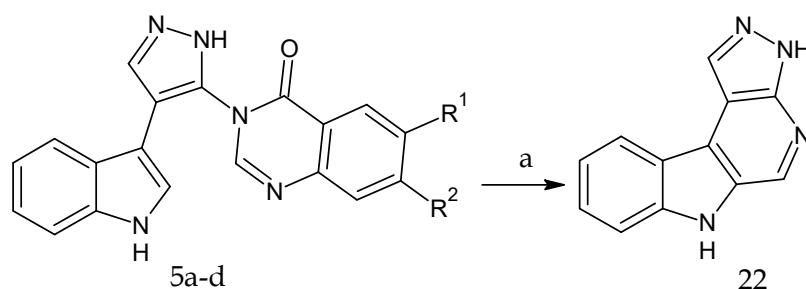
Σχήμα 29: Σχηματισμός τελικών μορίων I.

Η συγκεκριμένη μέθοδος, παρόλο που ο ιμινικός δεσμός της κιναζολίνης δεν είναι ιδιαίτερα ενεργοποιημένος, επιλέχθηκε καθώς μπορεί να πραγματοποιηθεί από τα παράγωγα του γενικού τύπου III, η σύνθεση των οποίων έχει ήδη περιγραφεί και αναπτυχθεί στην παράγραφο 3.1. Η αντίδραση στηρίζεται στην πόλωση του ιμινικού δεσμού μέσω πρωτονίωσης του με τη χρήση ισχυρού οξέος, όπως το αέριο υδροχλώριο ή το τριφθοροξικό οξύ παρουσία ή όχι κάποιου ανυδρίτη.⁶⁰

Η σύνθεση αυτή περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Bergman και τους συνεργάτες του⁶⁰ και αποτέλεσε την βιβλιογραφία αναφοράς για τις υπόλοιπες μελέτες. Σύμφωνα με αυτές, το συγκεκριμένο στάδιο είναι και το περιοριστικό της συνθετικής πορείας, καθώς με μικρές τροποποιήσεις διαλυτών και θερμοκρασίας λαμβάνονται διάφορα παραπροϊόντα, ενώ η απόδοση για την παραλαβή της Rutaecarpine ποικίλει.

Αρχικά λοιπόν, επιχειρήθηκε ο κλασικός τρόπος ενδομοριακής κύκλωσης με θέρμανση εντός διαλύματος τριφθοροξικού οξέος. Δυστυχώς όμως, παρελήφθη πολύπλοκο μίγμα προϊόντων από το οποίο δεν κατέστη δυνατό να απομονωθεί ακόμα και σε ελάχιστη ποσότητα το επιθυμητό προϊόν.

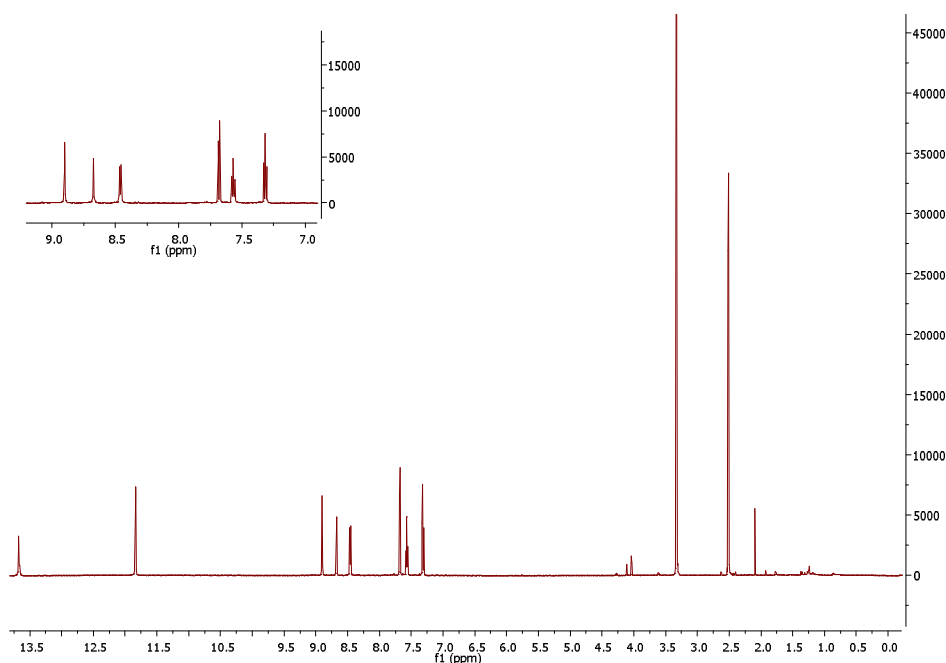
Δεδομένης της αποτυχίας αυτής, αποφασίστηκε η αντίδραση να επιχειρηθεί εντός καθαρού τριφθοροξικού οξέος και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Με τον τρόπο αυτό, παρελήφθη ένα και μόνο προϊόν, σε σχετικά καλή απόδοση, το παράγωγο **22**, στο οποίο λείπει το τμήμα του ανθρανιλικού οξέος (Σχήμα 30). Αξιοσημείωτο είναι να αναφερθεί ότι η παρουσία καθαρού τριφθοροξικού οξέος ή περίσσειας αυτού επί όλων των παραγώγων **5a-d** οδηγεί στο ίδιο προϊόν, στο ανάλογο **22** του οποίου ο μηχανισμός σύνθεσης δεν έχει γίνει ακόμα σαφής.



Σχήμα 30: Συνθετική οδός παραπροϊόντος **22**: a. CF_3COOH (περ.), 25 °C.

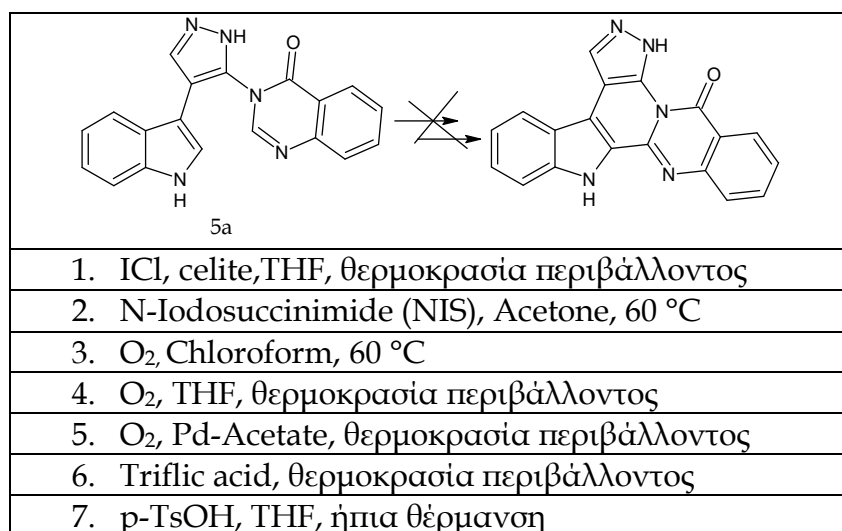
Η επιβεβαίωση της δομής του μορίου πραγματοποιήθηκε με πειράματα φασματοσκοπίας NMR μίας και δύο διαστάσεων (^1H NMR, ^{13}C NMR, HMBC, HMQC και COSY) και με

φασματομετρία μάζας υψηλής απόδοσης (HRMS). Στο φάσμα ^1H NMR του παραγώγου **22** εμφανίζεται μια χαρακτηριστική αποθωρακισμένη απλή κορυφή στα 8.91 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του πυριδινικού δακτυλίου, καθώς και δύο απλές κορυφές στα 11.85 και 13.68 ppm που αντιστοιχούν στις απορροφήσεις των ευκίνητων πρωτονίων του πυραζολικού και ινδολικού δακτυλίου αντίστοιχα (Εικόνα 52).



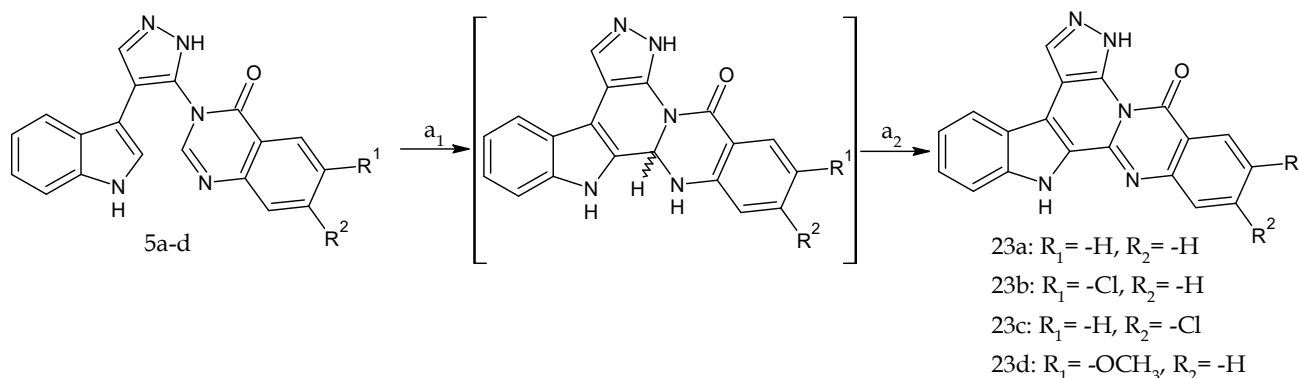
Εικόνα 52: Φάσμα ^1H NMR παραγώγου **22** σε $\text{DMSO}-d_6$.

Η χρήση ακόμα πιο ισχυρού οξέος στην αντίδραση, όπως το τριφθορομεθανοσουλφονικό οξύ, οδήγησε σε καταστροφή της πρώτης ύλης, ενώ και προσπάθειες που έγιναν υπό την επίδραση οξικού παλλαδίου ($\text{Pd}(\text{OAc})_2$) ή άλλων καταλυτών δεν είχαν αποτέλεσμα. Αντίθετα, με χρήση πιο ασθενούς οξέος, όπως το π-τολουολοσουλφονικό οξύ λαμβάνεται πίσω η πρώτη ύλη χωρίς να γίνεται καμία αντίδραση, πιθανώς γιατί δεν είναι δυνατή η πρωτονίωση του αζώτου του ιμινικού δεσμού. Εν συνεχεία, η αντίδραση κύκλωσης δοκιμάστηκε και με διάφορους άλλους τρόπους, χωρίς όμως καμία επιτυχία (Εικόνα 53).



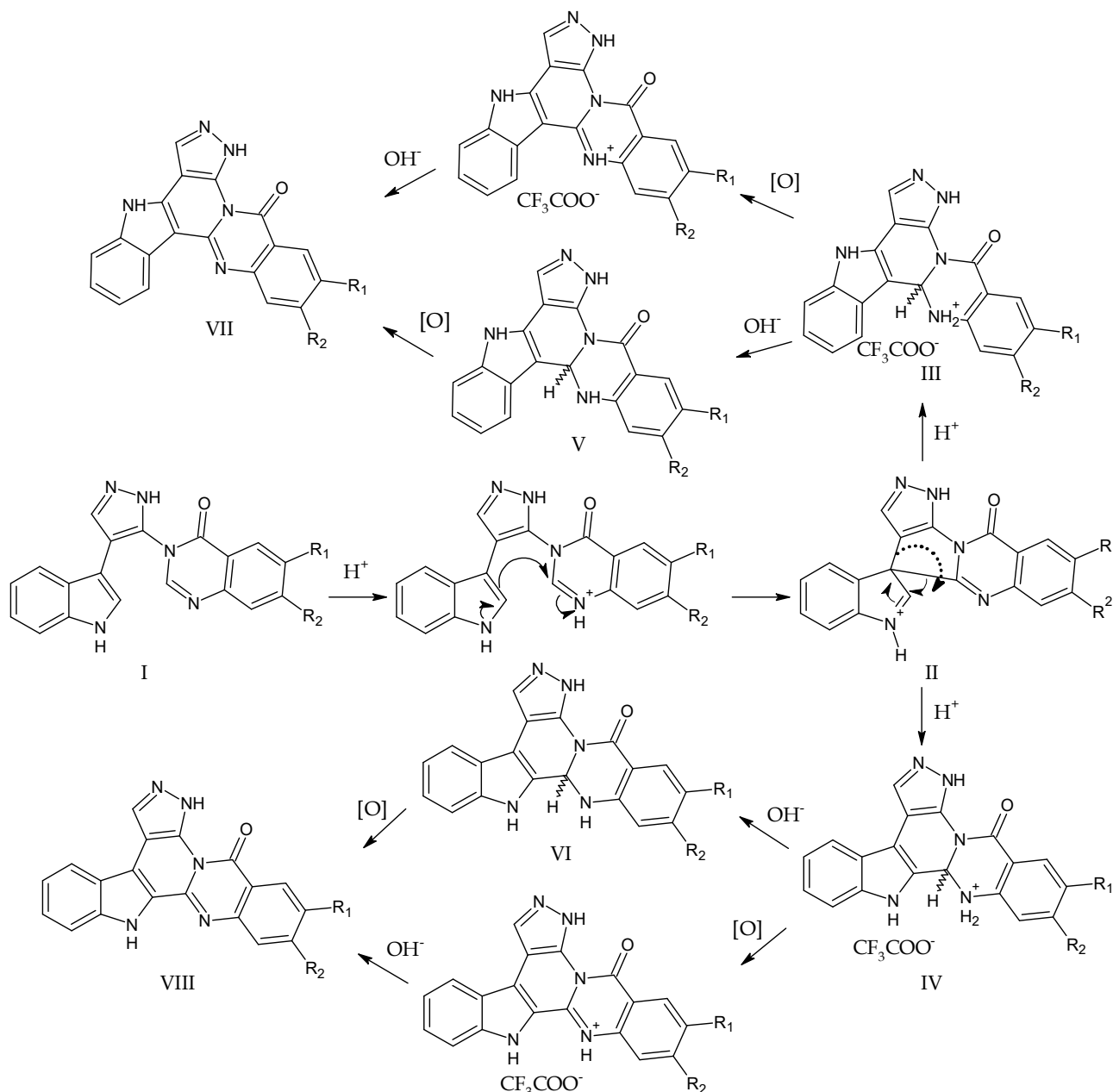
Εικόνα 53: Προσπάθειες κύκλωσης παραγώγων 5a προς το τελικό μόριο.

Τελικά, σε αντίθεση με την βιβλιογραφία που απαιτεί έντονες συνθήκες, η αντίδραση έγινε με ανάδευση των παραγώγων 5a-d σε άνυδρο χλωροφόρμιο, αυστηρά στους 25 °C, παρουσία διμοριακής ποσότητας τριφθοροξικού οξέος. Από την αντίδραση λαμβάνονται απευθείας τα παράγωγα 23a-d, ενώ τα μόρια με δομή ανάλογη της Enodiamine δεν απομονώνονται ούτε σε ελάχιστες αποδόσεις. Πιθανόν αυτό οφείλεται σε οξείδωση τους από το οξυγόνο της ατμόσφαιρας και αρωματοποίηση τους προς τα επιθυμητά παράγωγα τα οποία διαθέτουν εκτεταμένο αρωματικό σύστημα και είναι σταθερότερα (Σχήμα 31).



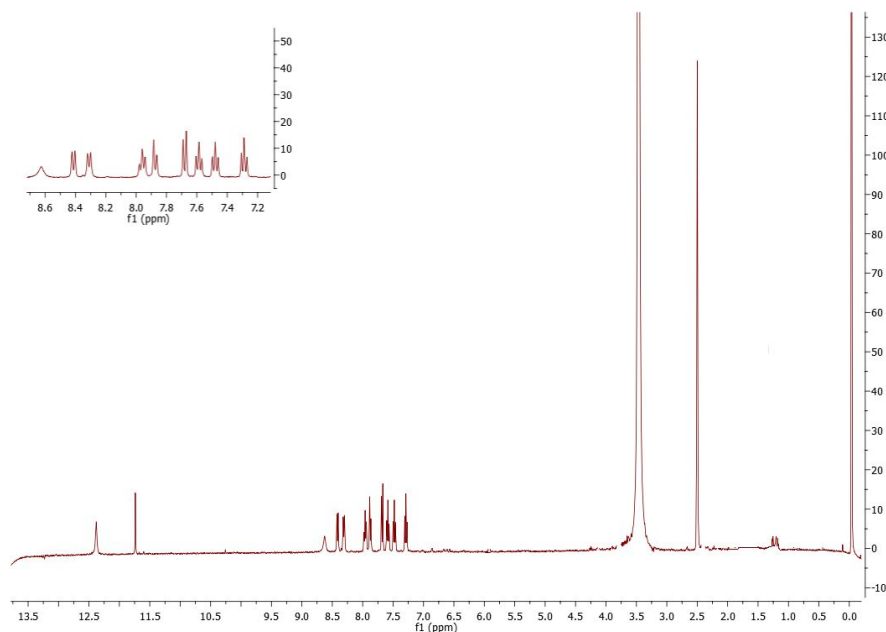
Σχήμα 31: Αντιδραστήρια και συνθήκες: a. 1) CF₃COOH, chloroform, 25 °C, 2) KOH/H₂O, EtOH, 25°C.

Ο προτεινόμενος μηχανισμός της αντίδρασης φαίνεται στο σχήμα 32. Μετά από πρωτονίωση του αζώτου του ιμινικού δεσμού λαμβάνεται το ενδιάμεσο σπυροινδολοπαράγωγο II, από το οποίο με διάνοιξη του σπυρανικού δακτυλίου είναι δυνατό να παραληφθούν τα παράγωγα του τύπου III και IV. Τα παράγωγα αυτά, στις συνθήκες της αντίδρασης είναι πρωτονιωμένα και με προσθήκη καυστικού νατρίου ελευθερώνονται οι βάσεις V και VI αντίστοιχα, από τις οποίες εύκολα με αρωματικοποίηση λαμβάνονται τα παράγωγα VII και VIII. Το τελευταίο στάδιο της ελευθέρωσης της βάσης και μετέπειτα αρωματικοποίησης μπορεί να γίνει και αντίστροφα.



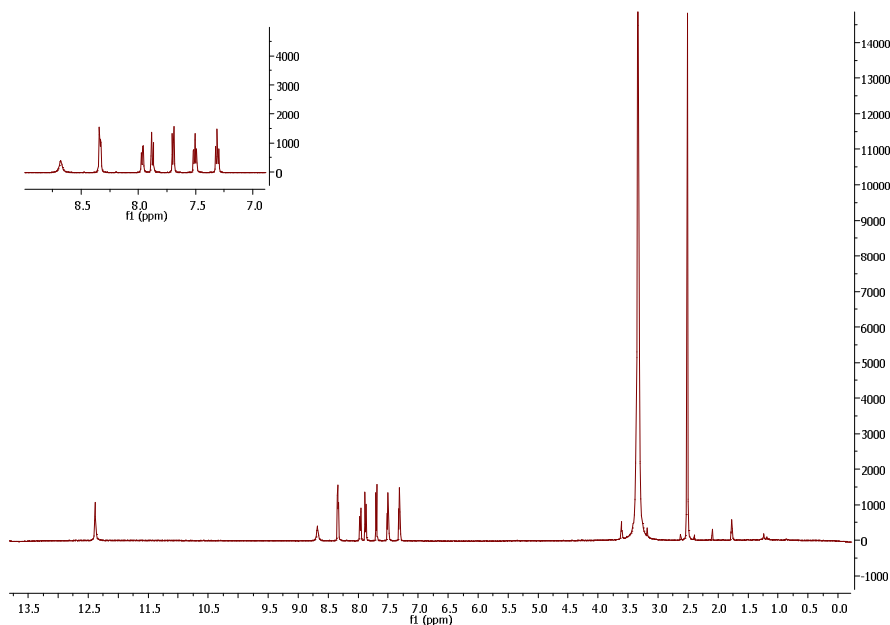
Σχήμα 32: Μηχανισμός αντίδρασης κύκλωσης προς τα τελικά παράγωγα.

Από τον μηχανισμό της αντίδρασης είναι φανερό ότι είναι δυνατή η σύνθεση τόσο των παραγώγων των γενικών τύπων V και VI, όσο και των αντίστοιχων πλήρως ακόρεστων δομών VII και VIII αντίστοιχα (Σχήμα 32). Η απόδειξη της δομής έγινε με τη βοήθεια φασματοσκοπίας NMR μίας και δύο διαστάσεων (1H NMR, ^{13}C NMR, HMBC, HMQC, COSY και NOE), καθώς και φασματομετρίας μάζας υψηλής απόδοσης (HRMS). Ενδεικτικά, στο φάσμα 1H NMR του παραγώγου **23a** φαίνονται χαρακτηριστικά δύο τριπλές κορυφές στα 7.29 και 7.48 ppm και δύο διπλές στα 7.69 και 8.33 ppm του βενζολικού δακτυλίου του ινδολίου, ενώ έχει εξαφανιστεί η διπλή κορυφή που αντιστοιχεί στο H-2 του σκελετού του ινδολίου, ένδειξη της κύκλωσης του αντίστοιχου παραγώγου **5a** (Εικόνα 54).



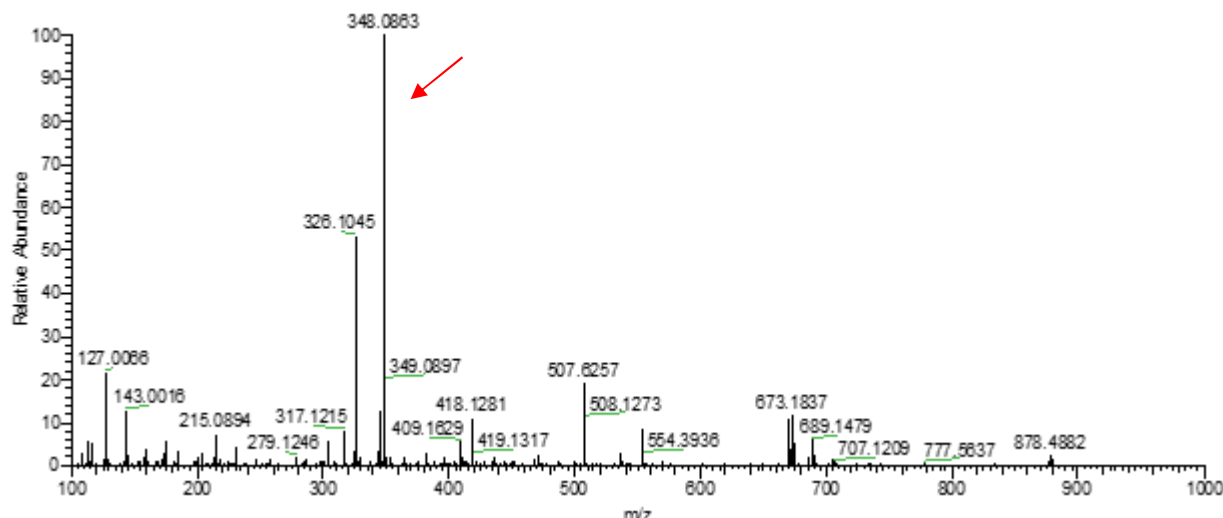
Εικόνα 54: Φάσμα ^1H NMR παραγώγου **23a** σε $\text{DMSO}-d_6$.

Χαρακτηριστικό είναι και το φάσμα ^1H NMR του χλώρο υποκατεστημένου κυκλωμένου παραγώγου **23b** στο οποίο εμφανίζονται μια διπλή διπλών στα 7.95 ppm και δύο διπλές στα 8.33 και 7.86 ppm του βενζολικού δακτυλίου της κιναζολινόνης, χαρακτηριστικές για την υποκατάσταση του δακτυλίου (Εικόνα 55).



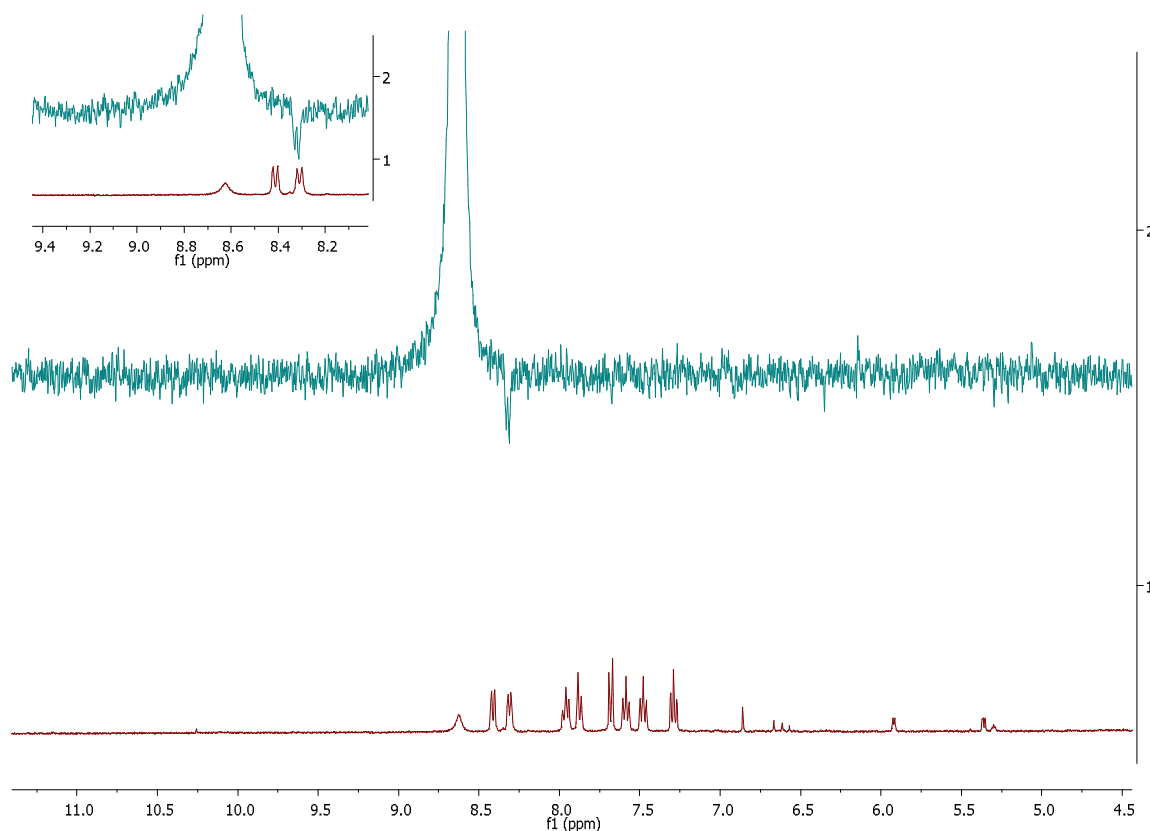
Εικόνα 55: Φάσμα ^1H NMR παραγώγου **23b** σε $\text{DMSO}-d_6$.

Επίσης, στο φάσμα ESI - HRMS του παραγώγου **23a** είναι εμφανής η παρουσία μοριακού ιόντος στα 348.0863, στο οποίο μπορεί να αντιστοιχεί μόνο σε κάποια από τις πλήρως ακόρεστες δομές VII και VIII και όχι στις δομές του τύπου V και VI (Σχήμα 32 και Εικόνα 56).



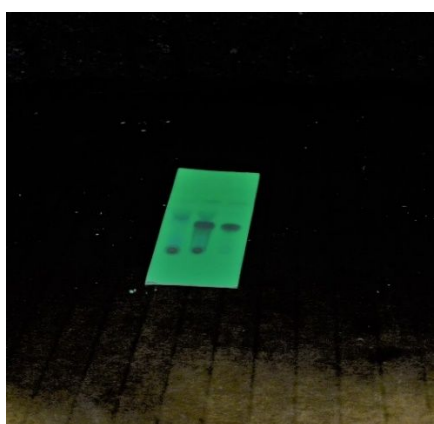
Εικόνα 56: Φάσμα μάζας τελικού μορίου **23a**, ESI – HRMS υπολογισθέν ως προς $C_{19}H_{11}N_5NaO$ $[MH^+Na]$: 348.3127, ερρεθέν 348.0863.

Ωστόσο, για την επιβεβαίωση της δομής των επιθυμητών τελικών παραγώγων ήταν απαραίτητη η λήψη φάσματος NOE (Πυρηνικό φαινόμενο Overhauser). Στο φάσμα NOE (Nuclear Overhauser effect difference spectra) του παραγώγου **23a** (+NOE) είναι εμφανής η συσχέτιση του H-5 του πυραζολίου με αρωματικό πρωτόνιο (το H-4) το οποίο είναι εφικτό μόνο στο επιθυμητό παράγωγο **23a** και όχι στο ισομερές θέσεως του (Εικόνα 57).



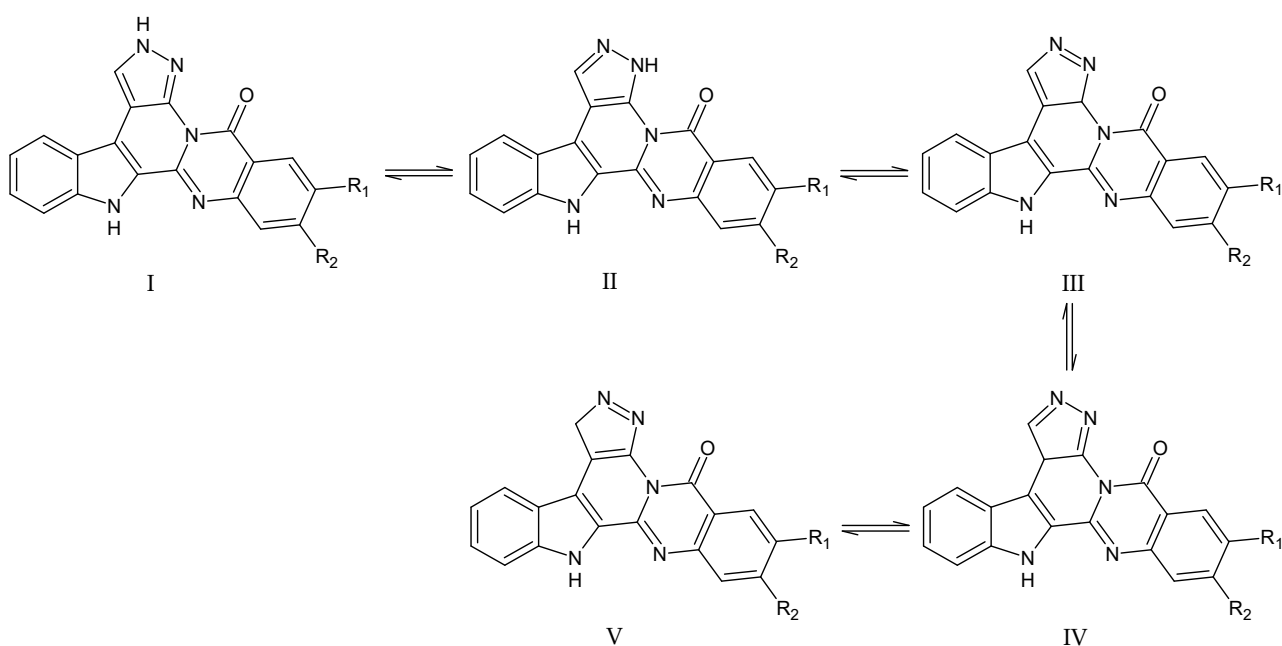
Εικόνα 57: Φάσμα NOE (+) μιας διάστασης του παραγώγου **23a**.

Αξιοσημείωτο είναι να αναφερθεί ότι η παρουσία υποκαταστατών επηρεάζει την ταχύτητα και την απόδοση της αντίδρασης. Πιο συγκεκριμένα, η σύνθεση του παραγώγου **23b** πραγματοποιήθηκε πολύ γρήγορα και σε αρκετά υψηλές αποδόσεις, ενώ η αντίστοιχη αντίδραση κύκλωσης προς το τελικό παράγωγο **23d** αποδείχθηκε ιδιαίτερα δύσκολη. Η παρουσία της μεθύξυ ομάδας (ηλεκτρονιοδότης) έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ικανότητας πόλωσης του ιμινικού δεσμού, δυσκολεύοντας έτσι την ολοκλήρωση της αντίδρασης, αφού μόνο για το πρώτο στάδιο απαιτήθηκαν 7 μέρες. Επιπλέον, αξίζει να αναφερθεί ότι παρά το εκτεταμένο αρωματικό σύστημα που διαθέτουν τα τελικά παράγωγα **23a-d**, η απορρόφηση τους στα 256 nm ήταν ιδιαίτερα μικρή. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 58, το παράγωγο **23b** δε φαίνεται να απορροφά στο υπεριώδες (UV lamp) (Αριστερά φαίνεται η απορρόφηση του παραγώγου **23b** και δεξιά η πρώτη του ύλη).



Εικόνα 58: Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας παραγώγου **23b**.

Τέλος, πρέπει να τονιστεί ότι τα τελικά μόρια- στόχοι αυτής της κατηγορίας είναι δυνατό να συνυπάρχουν πέντε ταυτομερείς δομές, εκ των οποίων οι πλέον πιθανές φαίνεται να είναι οι I και II (Σχήμα 33).



Σχήμα 33: Πιθανές ταυτομερείς δομές τελικών μορίων-στόχων.

Συνοπτικά, στην παρούσα διπλωματική εργασία συντέθηκαν 23 νέα μόρια, εκ των οποίων τα 9 αποτελούν τελικά παράγωγα προς φαρμακολογικό έλεγχο και εξαγωγή συμπερασμάτων για την περαιτέρω βελτιστοποίηση των ενώσεων- οδηγών. Επίσης, αναπτύχθηκαν δύο συνθετικές οδοί, από τις οποίες μπορούν να παρασκευαστούν πλήθος υποκατεστημένα παράγωγα επί του δακτυλίου της κιναζολινόνης, καθώς και του ινδολικού δακτυλίου που επιτρέπουν την ανάπτυξη σχέσεων δομής δράσης για τους επιθυμητούς στόχους. Μέσω των δύο αυτών τρόπων είναι δυνατό να επιτευχθεί η σύνθεση αναλόγων που φέρουν αλυσίδες επί του μεθινίου του πυραζολικού δακτυλίου, καθώς και σάκχαρα σε επιλεγμένες θέσεις των μορίων. Τέτοιους είδους νέα παράγωγα μπορούν να συντεθούν και για τις δύο σειρές μορίων που παρουσιάστηκαν και να συμβάλλουν στην περαιτέρω βελτιστοποίηση της δράσης και εκλεκτικότητας προς τους επιθυμητούς στόχους.

4. ΜΕΛΕΤΕΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΩΝ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

4.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ.

4.1.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΗΣ ΔΟΜΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ (PROTEIN PREPARATION WIZARD)

Αποτελεί λογισμικό της εταιρείας Schrödinger το οποίο προετοιμάζει την πρωτεΐνη για υπολογισμούς πρόσδεσης. Προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για *in silico* μελέτες μία πρωτεΐνη πρέπει να υποβληθεί σε επεξεργασία. Συγκεκριμένα, εισάγει άτομα υδρογόνου, διορθώνει και εισάγει δεσμούς ανάμεσα στα άτομα, όπου αυτό κρίνεται αναγκαίο, συμπληρώνει φορτία στα αμινοξέα που απαιτείται και ελαχιστοποιεί την ενέργεια του συστήματος, οδηγώντας σε μια σταθερή διαμόρφωση. Τέλος, όλα τα κρυσταλλογραφικά μόρια νερού σε ακτίνα 4Å από το ενεργό κέντρο διατηρήθηκαν, ενώ τα υπόλοιπα μόρια νερού διαγράφηκαν.

4.1.2 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ (GLIDE AND/OR INDUCED FIT DOCKING)

Το Glide docking στηρίζεται στη βασική παραδοχή ενός άκαμπτου υποδοχέα. Σε πρότυπες μελέτες εικονικής σύνδεσης, οι προσδέτες συνδέονται στη θέση δέσμευσης ενός υποδοχέα, ο οποίος είναι άκαμπτος και ο προσδέτης είναι ελεύθερος να κινηθεί. Η υπόθεση ενός άκαμπτου υποδοχέα μπορεί να δώσει παραπλανητικά αποτελέσματα, αφού στην πραγματικότητα πολλές πρωτεΐνες κινούν την πλευρική αλυσίδα ή τον σκελετό, ή και τα δύο, προς επίτευξη σύνδεσης. Η κλιμάκωση των ακτίνων van der Waals των μη πολικών ατόμων, η οποία μειώνει τις ποινές για κοντινές επαφές, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να διαμορφώσει μια μικρή ευχέρεια του υποδοχέα ή του προσδέτη ή και των δύο, ενώ και σε συγκεκριμένες ομάδες υδροξυλίου μπορεί να επιτραπεί να αναπροσανατολιστούν για τη βελτιστοποίηση δεσμών υδρογόνου. Αυτό όμως, μπορεί να μην είναι αρκετό για συστήματα όπου η δέσμευση του συνδέτη επάγει ουσιαστικές αλλαγές στη διαμόρφωση του υποδοχέα («επαγόμενη προσαρμογή»). Αυτές οι αλλαγές επιτρέπουν στο δέκτη να αλλάξει τις θέσεις σύνδεσης, έτσι ώστε να αλληλεπιδρά καλύτερα με τον συνδέτη. Αυτό συχνά αναφέρεται ως «επαγόμενο συνταίριασμα» (induced fit).

Το λογισμικό της εταιρείας Schrödinger έχει αναπτύξει μια διαδικασία για τις περιπτώσεις αυτές που χρησιμοποιεί το Prime και το Glide για την εκτέλεση σύνδεσης επαγόμενης προσαρμογής, τα οποία εξετάζουν διεξοδικά τους δυνατούς τρόπους δέσμευσης και τις σχετικές αλλαγές διαμόρφωσης μέσα στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα.

Η δυνατότητα για επαγόμενο συνταίριασμα έχει δύο κύριες εφαρμογές:

- Δημιουργία μιας ακριβούς, πολύπλοκης δομής για ένα πρόσδεμα που είναι γνωστό ότι είναι ενεργό, αλλά ότι δεν μπορεί να συνδεθεί στην υπάρχουσα (άκαμπτη) δομή του υποδοχέα.
- Ψευδώς χαμηλή βαθμολογία σε καλούς συνδέτες σε πειράματα εικονικής σάρωσης.

Το πρωτόκολλο του IFD των συνδετών ακολουθεί τα παρακάτω βήματα:

Α. **Μία προαιρετική ελαχιστοποίηση του υποδοχέα** (protein preparation) με σημείο αποκοπής RMSD 0.18 Å. Κανονικά αυτό γίνεται κατά την προετοιμασία της πρωτεΐνης με το protein preparation wizard.

Β. **Σύνδεση με χρήση του αλγόριθμου Glide του κάθε προσδέτη** με προαιρετική απομάκρυνση των πλευρικών αλυσίδων και εφαρμογή περιορισμών. Από προεπιλογή, διατηρούνται 20 πόζες ανά συνδέτη, και εξ ορισμού οι πόζες που θα διατηρηθούν πρέπει να έχουν έναν Coulomb-VDW βαθμό λιγότερο από 100 και σκορ δεσμών υδρογόνου λιγότερο από -0.05.

Γ. **Πρόβλεψη μέσω του Prime της διαμόρφωσης της πλευρικής αλυσίδας για κάθε σύμπλοκο πρωτεΐνης- συνδέτη**, για τα υπολείμματα που βρίσκονται σε δεδομένη προεπιλεγμένη απόσταση 5 Å από τον συνδέτη, με προαιρετική ένταξη ή αποκλεισμό άλλων υπολειμμάτων.

Δ. **Ελαχιστοποίηση μέσω του Prime του ίδιου συνόλου υπολειμμάτων και προσδέματος για κάθε σύμπλοκο πρωτεΐνης- συνδέτη**. Η δομή του υποδοχέα σε κάθε στάση τώρα αντανακλά μια επαγόμενη σύνδεση που ταιριάζει με τη δομή του συνδέτη και τη διαμόρφωση του.

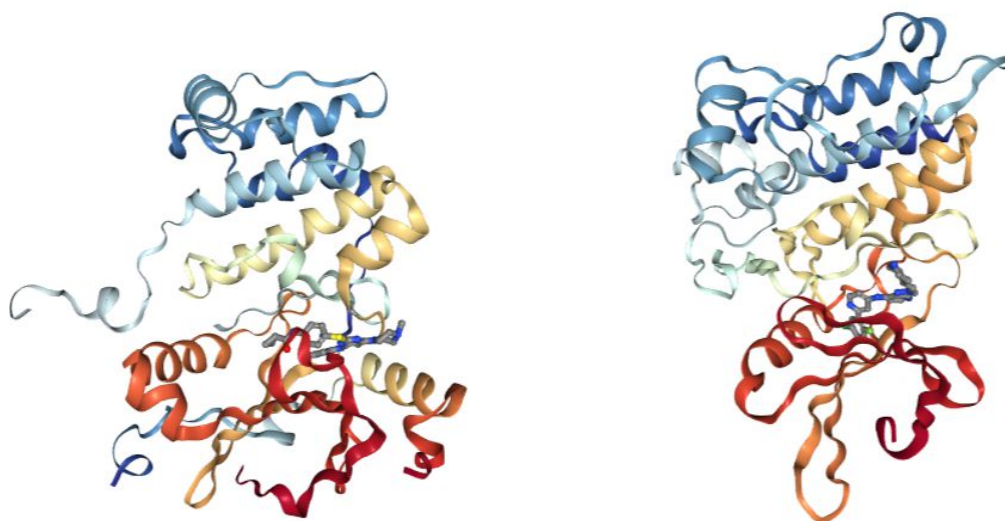
Ε. **Glide redocking** κάθε περίπλοκης δομής του συμπλόκου πρωτεΐνης-συνδέτη εντός συγκεκριμένης ενέργειας της δομής χαμηλότερης ενέργειας (προεπιλογή 30 kcal/mol). Ο συνδέτης είναι πλέον αυστηρά συνδεδεμένος, χρησιμοποιώντας προεπιλεγμένες ρυθμίσεις Glide στη δομή του υποδοχέα που προέκυψε από το induced fit.

Στ. **Τέλος εκτιμάται η ενέργεια πρόσδεσης (IFDScore)** για κάθε εξαγόμενο πρόσδεμα.

4.2 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ (DOCKING).

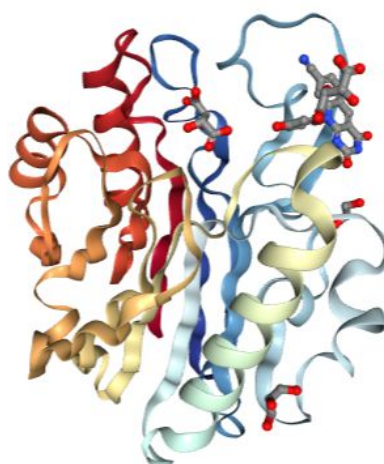
Για τον σχεδιασμό των νέων ενώσεων χρησιμοποιήσαμε κρυσταλλογραφικές δομές συγκεκριμένων κινασών και ενός ενζύμου σχετιζόμενου με την τοποϊσομεράση 2, οι οποίες αποτελούν ορισμένους από τους φαρμακολογικούς στόχους της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Επειτα από οπτική παρατήρηση του τρόπου σύνδεσης των ενώσεων και αξιολογώντας την θεωρητική εμπειρική ενέργεια σύνδεσης έγινε, ο σχεδιασμός των νέων ενώσεων και εκτιμήθηκαν τα αρχικά βιολογικά αποτελέσματα. Ενδεικτικά, παρουσιάζονται στη συνέχεια ορισμένα αποτελέσματα και συγκρίνονται με τα πρώτα φαρμακολογικά αποτελέσματα.

Για τους θεωρητικούς υπολογισμούς πρόσδεσης έναντι κινασών επιλέχθηκε η κρυσταλλογραφική δομή της "human Aurora B Kinase" σε σύμπλοκο με την *N*-[4-[4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλ)-6-[(5-μεθυλο-2*H*-πυραζολ-3-υλ)αμινο]πυριμιδιν-2-υλ]σουλφανυλοφαινυλο]κυκλοπροπανοκαρβοξαμίδιο (κωδικός PDB: 4AF3)⁷⁵ και η TGFRβ (ALK-5)⁷⁶ κινάση σε σύμπλοκο με την *N*-[2-(5-χλωρο-2-φθοροφαινυλο)πυριδιν-4-υλ]-2-[(πιπεριδιν-4-υλ)μεθυλο]-2*H*-πυραζολο[4,3-*b*]πυριδιν-7-αμίνη (κωδικός PDB: 5USQ)⁷⁷ (Εικόνα 59).



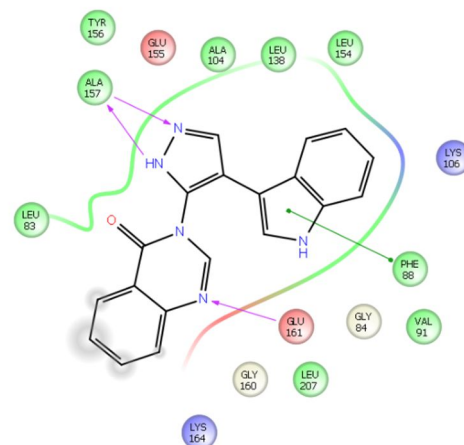
Εικόνα 59: Κρυσταλλογραφική δομή *Hm_Aurora B* και *Hm_TGFRβ* κινασών.

Για τους θεωρητικούς υπολογισμούς πρόσδεσης έναντι της TDP2 επιλέχθηκε η Tyrosyl-DNA-phosphodiesterase 2 σύμπλοκο με τον αναστολέα 10-(4-υδροξυφαινυλο)-2,4-διοξο-2,3,4,10-τετραϋδροπυριδινό[4,5- b]κινολινο-8-καρβονιτρίλιο (κωδικός PDB: 5J42) (Εικόνα 60). Το ενεργό κέντρο του ενζύμου είναι ρηχό και βρίσκεται στην εξωτερική μεριά του, ενώ έρχεται σε επαφή και με την υδατική περιοχή.



Εικόνα 60: Κρυσταλλογραφική δομή TDP2 ενζύμου.

Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 61, το παραγώγο **5a** διευθετείται στο ενεργό κέντρο της ανθρώπινης κινάσης Aurora B, λαμβάνοντας διαμόρφωση που δεν αποκλίνει ιδιαίτερα από το επίπεδο. Το συγκεκριμένο ανάλογο σταθεροποιείται, σχηματίζοντας τρεις αλληλεπιδράσεις με αμινοξικά κατάλοιπα: π-π αλληλεπίδραση του ινδολικού δακτυλίου με τη Phe 88, δεσμό υδρογόνου του πυριμιδινικού αζώτου της κιναζολινόνης με την Glu 161 και δεσμούς υδρογόνου με το σύστημα δότη- δέκτη του πυραζολικού δακτυλίου.



Εικόνα 61: Διαμοριακές αλληλεπιδράσεις του παραγώγου **5a** με το ενεργό κέντρο της ανθρώπινης κινάσης Aurora B.

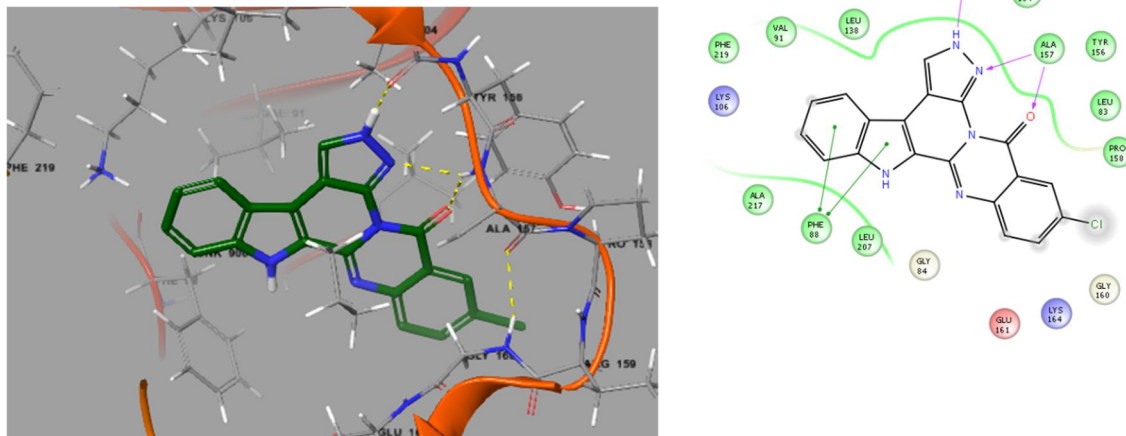
Το παράγωγο **5a** αξιολογήθηκε για την ανασταλτική του ικανότητα έναντι μιας ομάδας 11 κινασών (Εικόνα 62).

Hs_CDK2/ CyclinA	Hs_CDK 5/p25	Hs_CDK9/ CyclinT	Hs_ RIPK3	Hs_Ha spin	Hs_Aur oraB	Ld_T LK	Hs_PI M1	Ssc_GSK 3 a/b	Lm_ CK1	Rn_Dyrk1 A
101	97	96	109	99	73	91	87	101	71	96

Εικόνα 62: % υπολειπόμενη ενζυμική δραστηριότητα σε τελική συγκέντρωση 10 μ M.

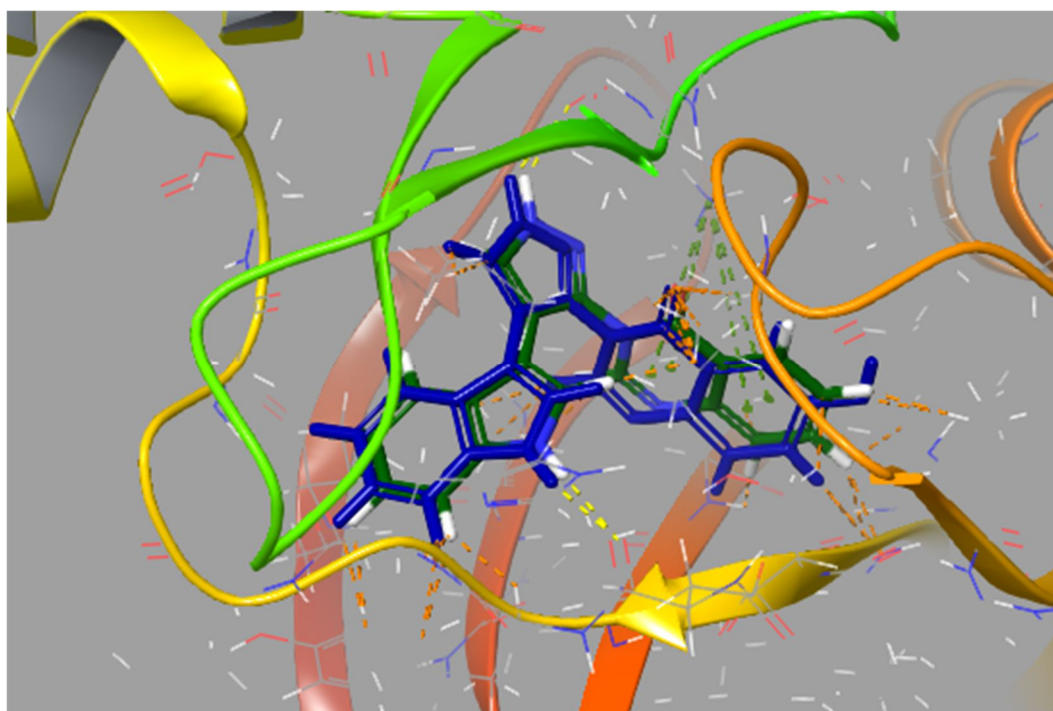
Όπως αποδείχθηκε το παράγωγο **5a** εμφάνισε μια μικρή, αλλά ικανοποιητική αναστολή της Aurora B, της τάξης του 27%, γεγονός που επιβεβαιώνει τα δεδομένα της βιβλιογραφίας και καθιστά το παράγωγο αυτό ως πιθανώς ενδιαφέρουσα ένωση-οδηγό. Σύμφωνα λοιπόν με τις μελέτες πρόοδσης, μελλοντική προσθήκη μικρών υποκαταστατών στον ινδολικό δακτύλιο, διατηρώντας τους μικρούς υποκαταστάτες του δακτυλίου της κιναζολινόνης, μπορεί να αυξήσει τη δράση και την εκλεκτικότητα των αναλόγων αλκαλοειδών δινδολίου **5a-5e** έναντι της συγκεκριμένης κινάσης.

Σε παρόμοια μελέτη που πραγματοποιήθηκε για τα κυκλωμένα παράγωγα **23a-d**, παρατηρείται ότι και αυτά προσδένονται ικανοποιητικά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Πιο συγκεκριμένα, στη γεωμετρία αλληλεπίδρασης του παραγώγου **23b** παρατηρείται ότι σχηματίζεται δεσμός υδρογόνου μεταξύ του καρβονυλίου της κιναζολινόνης και του αζώτου-δέκτη και της Ala 157, καθώς επίσης και του αζώτου-δότη με το Glu 155, ενώ συνεχίζουν να υπάρχουν και οι π-π αλληλεπιδράσεις του ινδολικού δακτυλίου με την Phe 88 (Εικόνα 63). Και στη συγκεκριμένη περίπτωση, υποδεικνύονται οι ίδιες αλλαγές για τη βελτιστοποίηση των δομών, όπως και για το παράγωγο **5a**.



Εικόνα 63: Διαμοριακές αλληλεπιδράσεις του παραγώγου **23b** με το ενεργό κέντρο της ανθρώπινης κινάσης Aurora B.

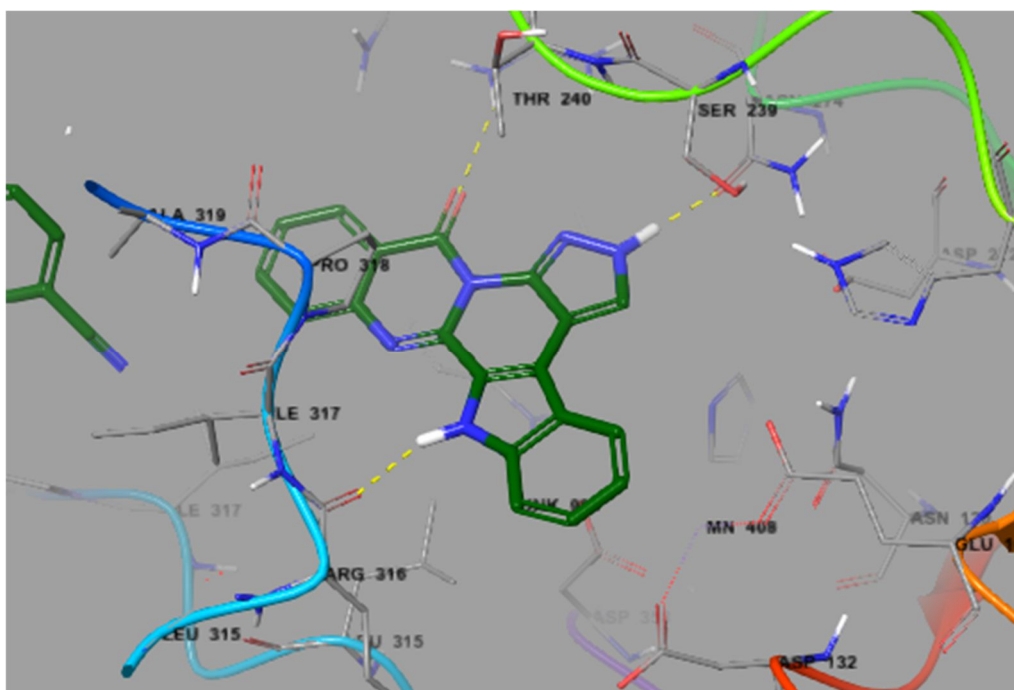
Οι υπολογισμοί πρόσδεσης με την TGFRβ κινάση (κωδικός BDB: 5USQ) όλων των τελικών μορίων, **5a-e** απέδειξαν ότι υποκατάσταση υδρόφιλου χαρακτήρα πάνω στο δακτύλιο της κιναζολινόνης πιθανώς θα ευνοούσε την πρόσδεση των μορίων με την πρωτεΐνη, επιτυγχάνοντας έτσι εκλεκτικότητα των παραγώγων αυτών έναντι άλλων κινασών. Οι προβλέψεις αυτές επιβεβαιώνουν και τις αρχικές εικασίες σχεδιασμού των μορίων, που υποκατάσταση του βασικού σκελετού σε διαφορετικές θέσεις μπορεί να προσδώσει εκλεκτικότητα στα μόρια έναντι συγκεκριμένων στόχων. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 64, οι γεωμετρικές αλληλεπιδράσεις των παραγώγων **5a** και **5e** φαίνεται να διευθετούνται με παρόμοιο τρόπο στο ενεργό κέντρο της κινάσης, σχηματίζοντας σημαντικές αλληλεπιδράσεις με τις πλευρικές αλυσίδες των Asp 251, Asp 281 και Lys 232, ενώ ο δακτύλιος της κιναζολινόνης βρίσκεται στο εσωτερικό του ενεργού κέντρου.



Εικόνα 64: Διαμοριακές αλληλεπιδράσεις του παραγώγου **5a** και **5e** με το ενεργό κέντρο της ανθρώπινης κινάσης TGFRβ.

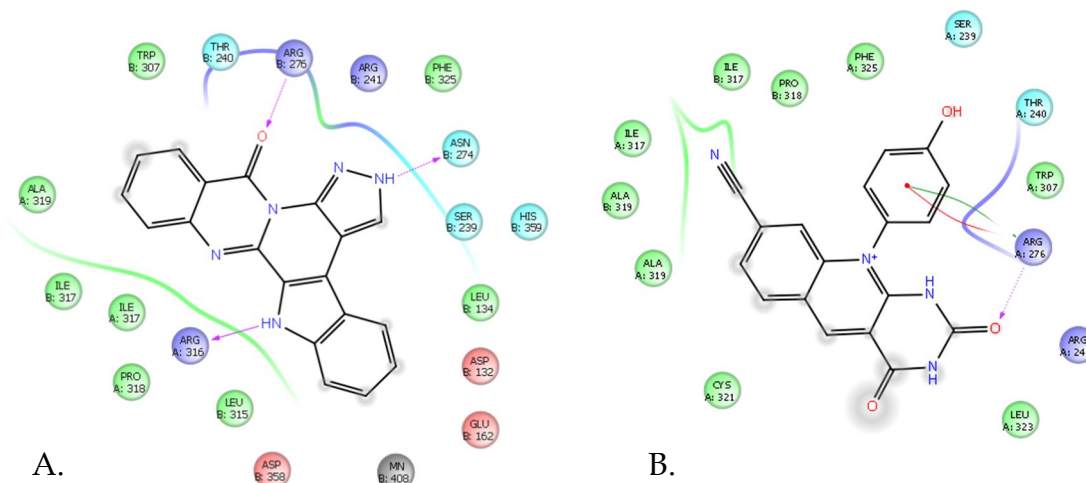
Αντίθετα με την Aurora B, τα κυκλωμένα παράγωγα δεν έδειξαν καθόλου καλά αποτελέσματα ως προς τις γεωμετρικές και ενεργειακές τους αλληλεπιδράσεις με την TGFRβ κινάση. Αυτό αναμένεται να επιβεβαιωθεί και από τα φαρμακολογικά αποτελέσματα, επιδεικνύοντας μια σχετική εκλεκτικότητα των αναλόγων αλκαλοειδών δινδολίου ως προς αυτό το στόχο.

Από την άλλη μεριά, από τα πειράματα που έγιναν στα παράγωγα **5a** και **23a** για τη μελέτη της ανασταλτικής τους δράσης έναντι των τοποϊσομερασών I και II, καθώς και έναντι των TDP1 και TDP2 ενζύμων, το τελικό παράγωγο **5a** δεν εμφάνισε αξιόλογη αναστολή κανενός από τους παραπάνω στόχους. Αντίθετα, το παράγωγο **23a** εμφάνισε εκλεκτική δράση της τάξεως των **70 μM** έναντι της TDP2, γεγονός που ήρθε να επιβεβαιώσει και τις προβλέψεις των υπολογισμών πρόοδσης (Εικόνα 65).



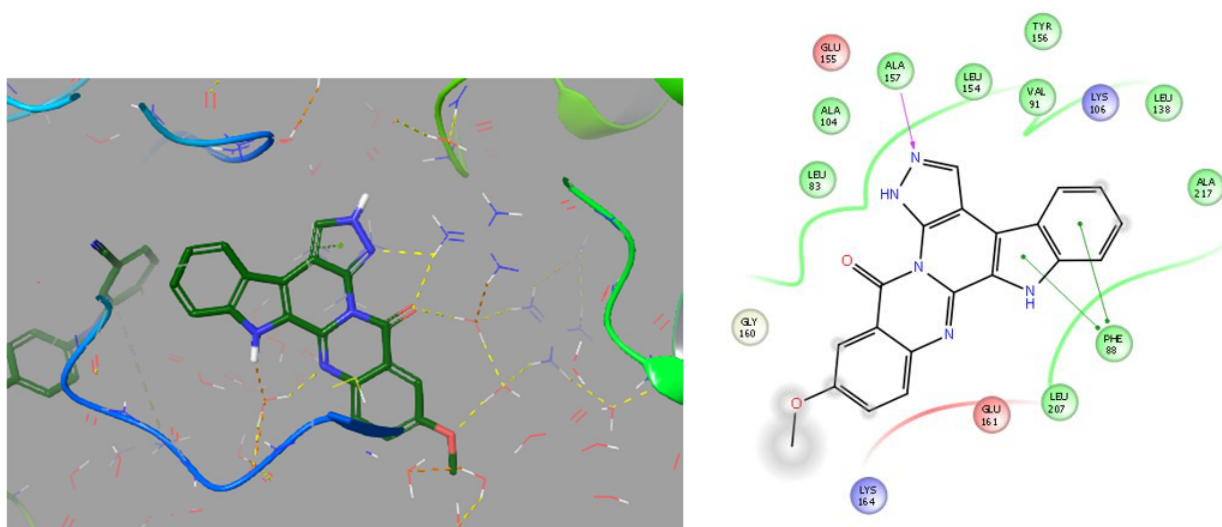
Εικόνα 65: Διαμοριακές αλληλεπιδράσεις του παραγώγου **23a** με το ενεργό κέντρο του ανθρώπινου ενζύμου TDP2.

Το τελικό μόριο **23a** φαίνεται να αλληλεπιδρά με το στόχο σχηματίζοντας παρόμοιες αλληλεπιδράσεις με αυτές του κρυσταλλογραφημένου προσδέτη, όπως με την Arg 276 και την Arg 278 (Εικόνα 66). Επιπλέον, φαίνεται να παρουσιάζει αλληλεπιδράσεις με πολλά κρυσταλλογραφικά μόρια νερού, δεδομένου ότι το ενεργό κέντρο βρίσκεται στην εξωτερική επιφάνεια της πρωτεΐνης και έρχεται σε άμεση επαφή με το υδατικό περιβάλλον.



Εικόνα 66: Διαμοριακές αλληλεπιδράσεις του παραγώγου **23a** (A) και του κρυσταλλογραφημένου προσδέτη (B) με το ενεργό κέντρο του ανθρώπινου ενζύμου TDP2.

Αξιόλογο είναι να παρατηρηθεί ότι το παράγωγο αυτό αποτελεί το άγλυκο κομμάτι των τελικών βελτιστοποιημένων αναλόγων που θα προσομοιάζουν με τα ανάλογα των Staurosporine και Rebeccamycin, τα οποία έμφανίζουν ισχυρή, αλλά όχι εκλεκτική δράση έναντι κινασών και της τοποϊσομεράσης I, αντίστοιχα. Επιπλέον, από τις μελέτες πρόσδεσης και την αξιολόγηση των αντίστοιχων ενεργειών ήδη φαίνεται ότι και τα υποκατεστημένα παράγωγα στο δακτύλιο της κιναζολινόνης, εμφανίζουν επιπλέον αλληλεπιδράσεις με το συγκεκριμένο στόχο. Ενδεικτικά, παρουσιάζεται η σύνδεση του παραγώγου **23d** (Εικόνα 67).



Εικόνα 67: Διαμοριακές αλληλεπιδράσεις του παραγώγου **23d** με το ενεργό κέντρο του ανθρώπινου ενζύμου TDP2.

Παρά τη μεγάλη δραστηριότητα των τελικών παραγώγων και την ποικιλία των στόχων των αρχικών ενώσεων-οδηγών με την παρούσα εργασία έγινε κατανοητό ότι ανάλογα με το είδος και τη θέση των υποκαταστατών στο βασικό σκελετό των μορίων είναι

δυνατό πιθανόν να επιτευχθεί εκλεκτική δράση. Στην παρούσα εργασία επιλέχθηκε η παρουσία μικρών υποκαταστατών στο δακτύλιο της κινάζολιनोंης, όπως δικαιολογείται από τα βιβλιογραφικά δεδομένα που περιγράφηκαν παραπάνω. Οι συγκεκριμένες αλλαγές στα μόρια- οδηγούς έγιναν ώστε να εξαχθούν κάποιες πρώιμες σχέσεις δομής- δράσης που σε συνδυασμό με τα επερχόμενα δεδομένα της φαρμακολογικής αξιολόγησης θα συμβάλλουν στην εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων και θα οδηγήσουν στη σύνθεση νέων βελτιστοποιημένων παραγώγων με ισχυρή και εκλεκτική δράση.

5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η παρακολούθηση των αντιδράσεων έγινε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) Silica gel 60_{F254}. Οι χρωματογραφικές στήλες πραγματοποιήθηκαν με Silica gel 60 AC (SDS35-70 mm) ή Silica gel 200 mm. Τα φάσματα ¹H NMR και ¹³C NMR λήφθηκαν σε φασματοφωτόμετρο Bruker Avance 400 στα 400 MHz και Bruker Avance III στα 600 MHz. Ως διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl₃), ακετόνη (Acetone-*d*₆) και διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO-*d*₆). Το φάσμα μάζας λήφθηκε σε φασματοφωτόμετρο μαζών LTQ Orbitrap Discovery με πηγή ιονισμού Ionmax. Τα σημεία τήξεως λήφθηκαν σε συσκευή Büchi και δεν είναι διορθωμένα.

5.1 Σύνθεση του (2EZ)-3-(διμεθυλαμινο)-2-(1H-ινδολ-3-υλ)προπ-2-ενονιτριλίου (2).

Σε διάλυμα 3-ινδολοακετονιτριλίου (7.0 g, 0.045 mol, **1**) σε άνυδρο DMF (5 mL) προστίθεται DMF-DMA (8.93 mL, 0.067 mol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία βρασμού, υπό ατμόσφαιρα αργού για 36 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης, η περίσσεια του διαλύτη απομακρίνεται υπό ελαττωμένη πίεση και στο ελαιώδες υπόλειμμα που λαμβάνεται προστίθεται νερό (100 mL) και εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα (3X 100 mL). Η οργανική στιβάδα ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου Na₂SO₄ και συμπυκνώνεται υπό κενό και το ελαιώδες υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλουσης κυκλοεξανίου/οξικού αιθυλεστέρα 9/1- 2/1. Λαμβάνεται μίγμα των ισομερών E και Z του παραγώγου **2** (8.54 g, 89.8 %), το οποίο χρησιμοποιείται ως έχει στο επόμενο στάδιο.

5.2 Σύνθεση της 4-(1H-ινδολ-3-υλ)-1H-πυραζολ-3-αμίνης (3).

Σε διάλυμα του παραγώγου **2** (23.53 g, 0.11 mol) σε διαιθυλενογλυκόλη (58 mL) προστίθεται υδραζίνη 64% (11.78 mL, 0.38 mol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία βρασμού για 30 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα αποχύνεται σε πάγο και το στερεό που καθιζάνει διηθείται υπό κενό και ξηραίνεται, οπότε λαμβάνονται 6.66 g του παραγώγου **3** πρακτικά καθαρού. Το υδατικό διήθημα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα (3 X 35 mL), τα οργανικά εκχυλίσματα συνενώνονται, ξηραίνονται υπεράνω άνυδρου Na₂SO₄, συμπυκνώνονται υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με διαλύτες έκλουσης σύστημα διχλωρομεθανίου/μεθανόλης αναλογίας 50/1. Λαμβάνονται 15.7 g του παραγώγου **3**. Συνολικά παραλαμβάνονται 22.36 g (98.9 %) υποκίτρινου στερεού.

Σ.τ.: >237°C (Dec.) (Ακετόνη).

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 11.56 (s, D₂O exchang., 1H, NHN), 11.03 (s, D₂O exchang., 1H, H-1), 7.69 (s, 1H, C-5'), 7.67 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-4), 7.45 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H-2), 7.38 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-7), 7.12 - 7.08 (t, 1H, H-5), 7.03 - 6.99 (t, 1H, H-6), 3.32 (s, D₂O exchang., 2H, NH₂).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 150.72 (C-3'), 136.08 (C-7α), 125.91 (C-3α), 121.44 (C-2), 121.04 (C-6), 119.41 (C-4 και C-5'), 118.62 (C-5), 111.35 (C-7), 107.41 (C-3), 100.31 (C-4').

5.3 Σύνθεση του 2-αμινο-N-[4-(1H-ινδολ-3-υλ)-1H-πυραζολ-5(3)-υλ]βενζαμιδίου (4a).

Μίγμα αμινοπυραζολίου **3** (200 mg, 1.01 mmol) και ισοτοϊκού ανυδρίτη (198 mg, 1.21 mmol) σε άνυδρο DMF (3 mL), υπό ατμόσφαιρα αργού, αναδεύεται σε θερμοκρασία βρασμού για 3 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης, η περίσσεια του διαλύτη απομακρύνεται υπό κενό, το ελαιώδες υπόλειμμα που λαμβάνεται, διαλύεται σε οξικό αιθυλεστέρα, πλένεται με 10% διάλυμα ανθρακικού νατρίου (3X 15 mL) και νερό (15 mL), ξηραίνεται (με άνυδρο Na₂SO₄) και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το υπόλειμμα που λαμβάνεται καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλουσης κυκλοεξανίου/οξικού αιθυλεστέρα 3/1 και λαμβάνονται 200 mg (62.4 %) του επιθυμητού προϊόντος **4a**.

Σ.τ.: 202- 203 °C (EtOAc).

¹H NMR (600 MHz, Acetone-*d*₆) δ (ppm): 10.62 (s, D₂O exchange, 1H, H-1''), 8.73 (d, D₂O exchange, *J* = 4.4 Hz, 1H, NHN), 8.43 (s, 1H, H-3'), 8.10 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-6), 7.80 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-4''), 7.67 (d, *J* = 2.15 Hz, 1H, H-2''), 7.50 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-7''), 7.25 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-4), 7.21 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-6''), 7.16 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H, H-5''), 6.87 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-3), 6.63 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-5), 6.00 (s, D₂O exchange, 1H, NHCO), 5.00 (s, D₂O exchange, 1H, NH₂).

¹³C NMR (151 MHz, Acetone-*d*₆) δ (ppm): 166.59 (CO), 157.99 (C-5'), 151.98 (C-2), 137.70 (C-7a''), 134.39 (C-6), 133.74 (C-4), 127.44 (C-3'), 127.08 (C-3a''), 124.26 (C-2''), 123.02 (C-6''), 120.66 (C-5''), 120.20 (C-4''), 117.25 (C-3), 115.62 (C-5), 114.65 (C-1), 112.60 (C-7''), 110.91 (C-4''), 106.34 (C-3'').

5.4 Σύνθεση του 2-αμινο-5-χλωρο-N-[4-(1H-ινδολ-3-υλ)-1H-πυραζολ-5(3)-υλ]βενζαμιδίου (4b).

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού γίνεται με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του παραγώγου **4a** χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το αμινοπυραζόλιο **3** (547 mg, 2.76 mmol) και τον ισοτοϊκό ανυδρίτη **8a** (600 mg, 3.04 mmol). Λαμβάνονται 510 mg (52.5%) του επιθυμητού παραγώγου **4b**.

Σ.τ.: 215- 216 °C (MeOH).

¹H NMR (600 MHz, Acetone-*d*₆) δ (ppm): 10.58 (s, D₂O exchange, 1H, H-1''), 8.74 (s, D₂O exchange, 1H, NHN), 8.46 (s, 1H, H-3'), 8.22 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H-6), 7.80 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-4''), 7.70 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-2''), 7.51 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-7''), 7.25 (dd, *J* = 8.8, 2.1 Hz, 1H, H-4), 7.22 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-6''), 7.16 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, H-5''), 6.89 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H-3), 6.16 (s, D₂O exchange, 2H, NH₂), 5.13 (s, D₂O exchange, 1H, NHCO).

¹³C NMR (151 MHz, Acetone-*d*₆) δ (ppm): 165.21 (CO), 158.31 (C-5'), 150.84 (C-2), 137.70 (C-7a''), 133.52 (C-4), 133.43 (C-6), 127.35 (C-3'), 127.07 (C-3a'), 124.37 (C-2''), 123.00 (C-6''), 120.73 (C-5''), 120.20 (C-4''), 119.50 (C-1), 118.88 (C-3), 115.26 (C-5), 112.61 (C-7''), 111.46 (C-3''), 106.19 (C-4'').

5.5 Σύνθεση του 2-αμινο-4-χλωρο-N-[4-(1H-ινδολ-3-υλ)-1H-πυραζολ-5(3)-υλ]βενζαμιδίου (4c).

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού γίνεται με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του παραγώγου **4a** χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το αμινοπυραζόλιο **3**

(693 mg, 3.50 mmol) και τον ισοτοϊκό ανυδρίτη **8b** (760 mg, 3.85 mmol). Λαμβάνονται 850 mg (69%) του επιθυμητού παραγώγου **4c**.

Σ.τ.: 148- 149 °C (EtOAc).

¹H NMR (600 MHz, Acetone-*d*₆) δ (ppm): 10.59 (s, D₂O exchang., 1H, H-1''), 8.44 (s, 1H, H-3'), 8.20 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-6), 7.80 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-4''), 7.68 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H-2''), 7.50 (dt, *J* = 10.0, 1.8 Hz, 1H, H-7''), 7.21 (td, *J* = 8.1, 7.1, 1.1 Hz, 1H, H-6''), 7.16 (td, 1H, H-5''), 6.93 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H-3), 6.64 (dd, *J* = 8.8 Hz, *J* = 2.18 Hz, 1H, H-5), 6.30 (s, D₂O exchang., 2H, NH₂), 5.06 (s, D₂O exchang., 1H, NHCO).

¹³C NMR (151 MHz, Acetone-*d*₆) δ (ppm): 165.70 (CO), 158.24 (C-5'), 153.31 (C-2), 139.23 (C-1), 137.68 (7a''), 136.44 (C-6), 127.37 (C-3'), 127.11 (C-3a''), 124.33 (C-2''), 123.08 (C-6''), 120.84 (C-5''), 120.30 (C-4''), 116.25 (C-3), 115.63 (C-5), 113.02 (C-4), 112.61 (C-7''), 111.33 (C-4'), 106.21 (C-3'').

5.6 Σύνθεση του 2-αμινο-5-μεθοξυ-N-[4-(1H-ινδολ-3-υλ)-1H-πυραζολ-5(3)-υλ]βενζαμιδίου (4d).

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού γίνεται με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιείται για την σύνθεση του παραγώγου **4a** χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το αμινοπυραζόλιο **3** (373 mg, 1.88 mmol) και τον ισοτοϊκό ανυδρίτη **8c** (400 mg, 2.07 mmol). Λαμβάνονται 330 mg (49.1%) του επιθυμητού παραγώγου **4d**.

Σ.τ.: 190- 191 °C (EtOAc).

¹H NMR (600 MHz, Acetone-*d*₆) δ (ppm): 10.56 (s, D₂O exchang., 1H, H-1''), 8.45 (s, 1H, H-3'), 7.81 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-4'), 7.79 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, H-6), 7.68 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H-2''), 7.50 (d, 1H, H-7''), 7.21 (td, 1H, H-6''), 7.16 (td, 1H, H-5''), 6.96 (dd, *J* = 8.9, 3.0 Hz, 1H, H-4), 6.82 (d, 1H, H-3), 5.63 (s, D₂O exchang., 2H, NH₂), 5.05 (s, D₂O exchang., 1H, NHCO), 3.76 (s, 3H, OCH₃).

¹³C NMR (151 MHz, Acetone-*d*₆) δ (ppm): 166.29 (CO), 158.05 (C-5'), 150.58 (C-5), 146.37 (C-2), 137.67 (C-7a''), 127.43 (C-3'), 127.16 (C-3a''), 124.28 (C-2''), 123.05 (C-6''), 122.07 (C-4), 120.73 (C-5''), 120.25 (C-4''), 118.65 (C-3), 117.70 (C-6), 115.04 (C-1), 112.77 (C-7''), 111.06 (C-4'), 106.47 (C-3''), 56.20 (OCH₃).

5.7 Σύνθεση του 2-αμινο-5-υδροξυ-N-[4-(1H-ινδολ-3-υλ)-1H-πυραζολ-5(3)-υλ]βενζαμιδίου (4e).

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού γίνεται με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του παραγώγου **4a** χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το αμινοπυραζόλιο **3** (523 mg, 2.64 mmol) και τον ισοτοϊκό ανυδρίτη **8d** (520 mg, 2.92 mmol). Λαμβάνονται 480 mg (54.5%) του επιθυμητού παραγώγου **4e**.

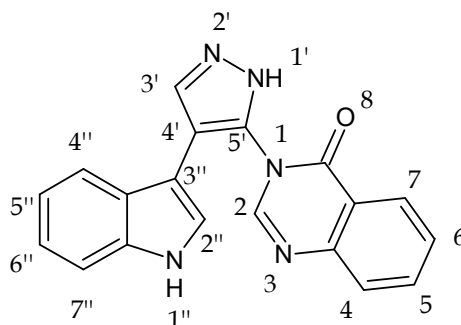
Σ.τ.: 224- 225 °C (THF).

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 11.41 (s, D₂O exchang., 1H, H-1''), 8.69 (s, D₂O exchang., 1H, NHN), 8.35 (s, 1H, H-3'), 7.72 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-4''), 7.72 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H, H-2''), 7.45 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-7''), 7.18 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-6''), 7.18 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H-6), 7.12 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-5''), 6.77 (dd, *J* = 8.8, 2.8 Hz, 1H, H-4), 6.68 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H-

3), 5.65 (s, D₂O exchang., 1H, NHCO), 5.59 (s, D₂O exchang., 1H, NH₂), 5.41 (s, D₂O exchang., 1H, OH).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 165.16 (CO), 157.13 (C-5'), 146.65 (C-5), 142.74 (C-2), 136.23 (C-7a''), 125.68 (C-3a''), 125.53 (C-3'), 123.83 (C-2''), 121.72 (C-6''), 121.15 (C-4), 119.57 (C-5''), 119.11 (C-4''), 117.52 (C-3), 117.30 (C-6), 115.15 (C-1), 111.87 (C-7''), 110.22 (C-4'), 104.38 (C-3'').

5.8 Σύνθεση της 3-[4-(1H-ινδολ-3-υλ)-1H-πυραζολ-5(3)-υλ]κιναζολιν-4(3H)-όνης (5a).



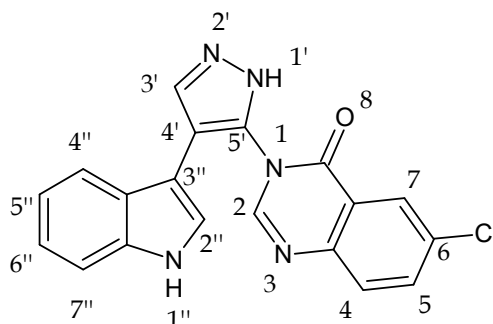
Σε διάλυμα του παραγώγου **4a** (956 mg, 3 mmol) σε άνυδρο THF (5 mL) προστίθεται μυρμηκικός τριαθυλεστέρας (1.50 mL, 9 mmol) και π-τολουολοσουλφονικό οξύ (29 mg, 0.15 mmol) και το μίγμα που λαμβάνεται αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 24 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση, διαλύεται σε οξικό αιθυλεστέρα (30 mL) και πλένεται με νερό (3X 15 mL). Η οργανική στιβάδα ξηραίνεται (άνυδρο Na₂SO₄), συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα που λαμβάνεται καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλουσης κυκλοεξανίου/οξικού αιθυλεστέρα 1/1- 1/5. Τελικά λαμβάνονται 596 mg (60.7 %) του παραγώγου **5a** ως λευκό στερεό.

Σ.τ.: >250 °C (THF).

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 13.35 (s, D₂O exchang., 1H, NHN), 10.99 (s, D₂O exchang., 1H, H-1''), 8.33 (s, 1H, H-5'), 8.30 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H-2), 8.18 (d, *J* = 7.9, 1H, H-5), 7.91 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-7), 7.75 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H, H-8), 7.65 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-4''), 7.61 (t, *J* = 11.2, 4.0 Hz, 1H, H-6), 7.35 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-7''), 7.09 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-6''), 7.00 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-5''), 6.94 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H-2'').

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 159.84 (C-4), 147.40 (C-8a), 147.24 (C-3'), 142.10 (C-5'), 135.70 (C-7), 134.83 (C-7a''), 127.73 (C-2), 127.53 (C-6), 127.28 (C-8), 126.26 (C-5), 125.43 (C-3a''), 121.61 (C-2''), 121.31 (C-6''), 121.24 (C-4α), 118.95 (C-5''), 118.69 (C-4''), 111.38 (C-7''), 111.16 (C-4'), 104.68 (C-3'').

ESI - HRMS υπολογισθέν ως προς C₁₉H₁₄N₅O⁺ [MH⁺]: 328.3468, ευρεθέν 328.118.

5.9 Σύνθεση της 6-χλωρο-3-[4-ινδολ-3-υλ]-1H-πυραζολ-5(3)-υλ]κιναζολιν-4(3H)όνης (5b).

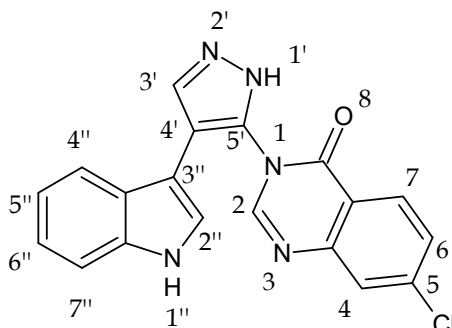
Η σύνθεση του παραγώγου αυτού γίνεται με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του παραγώγου **5a**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το παράγωγο **4b** (330 mg, 0.91 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 48 ώρες, ενώ το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλουσης κυκλοεξανίου/ οξικού αιθυλεστέρα 7/1-1/4. Λαμβάνονται 210 mg του επιθυμητού παραγώγου (63.8%).

Σ.τ.: >250 °C (THF- πετρελαϊκός αιθέρας- κυκλοεξάνιο).

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 13.38 (s, D₂O exchang., 1H, NHN), 10.99 (s, D₂O exchang., 1H, H-1''), 8.39 (s, 1H, H-2), 8.31 (s, 1H, H-3'), 8.13 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H-5), 7.93 (dd, *J* = 8.6, 2.2 Hz, 1H, H-7), 7.79 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-8), 7.64 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-4''), 7.36 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-7''), 7.10 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-6''), 7.00 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-5''), 6.97 (s, 1H, H-2'').

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 159.07 (C-4), 147.96 (C-2), 146.42 (C-8α), 142.04 (C-5'), 135.98 (C-7a''), 135.16 (C-7), 132.09 (C-6), 129.82 (C-8), 128.06 (C-3'), 125.67 (C-3''), 125.51 (C-5), 122.85 (C-4a), 122.01 (C-2''), 121.47 (C-6''), 119.20 (C-5''), 118.89 (C-4''), 111.69 (C-7''), 111.40 (C-4'), 104.78 (C-3'').

ESI - HRMS υπολογισθέν ως προς C₁₉H₁₂ClN₅NaO⁺ [MNa⁺]: 384.774, ευρεθέν 384.064.

5.10 Σύνθεση της 7-χλωρο-3-[4-ινδολ-3-υλ]-1H-πυραζολ-5(3)-υλ]κιναζολιν-4(3H)όνης (5c).

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού γίνεται με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του παραγώγου **5a**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το παράγωγο **4c** (850 mg, 2.41 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 4 ημέρες, ενώ το προϊόν καθαρίζεται με

χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλουσης κυκλοεξανίου/ οξικού αιθυλεστέρα 3/1-1/1. Λαμβάνονται 720 mg του επιθυμητού προϊόντος (82.6%).

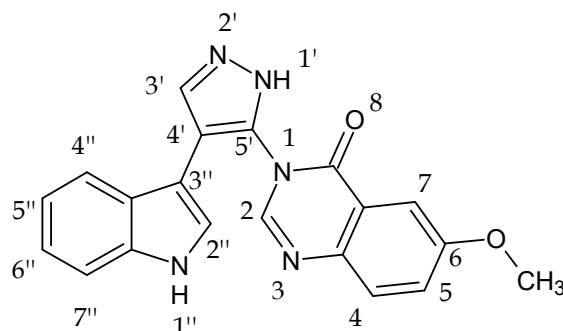
Σ.τ.: >250 °C (THF).

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 13.37 (s, D₂O exchang., 1H, NHN), 10.99 (s, D₂O exchang., 1H, H-1''), 8.41 (s, 1H, H-2), 8.30 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H-3'), 8.17 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-5), 7.84 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H-8), 7.65 (dd, *J* = 11.5, 1H, H-6), 7.63 (d, 5.0 Hz, 1H, H-4'') 7.35 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-7''), 7.09 (td, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-6''), 7.00 (td, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-5''), 6.96 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H-2'').

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 159.56 (CO), 149.01 (C-2), 148.99 (C-8a), 142.04 (C-5'), 139.71 (C-7), 135.96 (C-7a), 128.65 (C-5), 128.06 (C-6 και C-3'), 126.78 (C-8), 125.65 (C-4a''), 122.95 (C-3a), 121.96 (C-2''), 121.48 (C-6''), 119.19 (C-5''), 118.91 (C-4''), 111.65 (C-7''), 111.38 (C-4'), 104.86 (C-3'').

ESI - HRMS υπολογισθέν ως προς C₁₉H₁₂ClN₅NaO⁺ [MNa⁺]: 384.774, ευρεθέν 384.064.

5.11 Σύνθεση της 6-μεθοξυ-3-[4-ινδολ-3-υλ]-1H-πυραζολ-5(3)-υλ]κινναζολιν-4(3H)όνης (5d).



Η σύνθεση του παραγώγου αυτού γίνεται με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του παραγώγου **5a**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το παράγωγο **4d** (300 mg, 0.81 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 4 ημέρες, ενώ το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλουσης κυκλοεξανίου/ οξικού αιθυλεστέρα 5/1-1/1. Λαμβάνονται 180 mg (62.2%) του επιθυμητού προϊόντος.

Σ.τ.: >250 °C (THF).

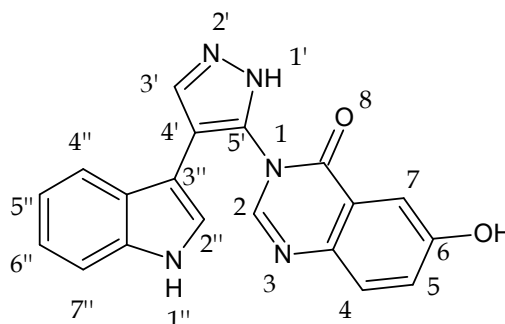
¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 13.33 (s, D₂O exchang., 1H, NHN), 10.98 (s, D₂O exchang., 1H, H-1''), 8.30 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, H-3'), 8.21 (s, 1H, H-2), 7.71 (d, 1H, H-8), 7.65 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-4''), 7.55 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, H-5), 7.49 (dd, *J* = 8.9, 3.0 Hz, 1H, H-7), 7.35 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-7''), 7.09 (t, 1H, H-6''), 7.01 (td, *J* = 7.5, 0.9 Hz, 1H, H-5''), 6.91 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H-2''), 3.88 (s, 3H, OCH₃).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 159.87 (CO), 158.54 (C-6), 145.28 (C-2), 142.48 (C-5'), 142.11 (C-8a), 135.92 (C-7a''), 129.28 (C-8), 127.92 (C-3'), 125.76 (C-3a''), 124.34 (C-7),

122.52 (C-4a''), 121.86 (C-2''), 121.50 (C-6''), 119.29 (C-5''), 118.93 (C-4''), 111.69 (C-7''), 111.42 (C-4'), 106.59 (C-5), 105.04 (C-3''), 56.24 (OCH₃).

ESI - HRMS υπολογισθέν ως προς C₂₀H₁₅N₅NaO₂⁺ [MNa⁺]: 380.3546, ευρεθέν 380.113.

5.12 Σύνθεση της 6-υδροξυ-3-[4-ινδολ-3-υλ]-1H-πυραζολ-5(3)-υλ]κινναζολιν-4(3H)όνης (5e).



Η σύνθεση του παραγώγου αυτού γίνεται με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του παραγώγου **5a** χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το παράγωγο **4e** (200 mg, 0.60 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 2 ώρες, ενώ το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλουσης κυκλοεξανίου/ οξικού αιθυλεστέρα 3/1- 1/3. Λαμβάνονται 120 mg (57.4%) του επιθυμητού προϊόντος.

Σ.τ.: >250 °C (MeOH- n-πεντάνιο).

¹H NMR (600 MHz, Acetone-*d*₆) δ (ppm): 12.54 (s, D₂O exchang., 1H, NHN), 10.21 (s, D₂O exchang., 1H, H-1''), 9.21 (s, 1H, OH), 8.26 (s, 1H, H-3'), 8.00 (s, 1H, H-2), 7.70 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-5''), 7.62 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H-5), 7.61 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H, H-8), 7.39 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-8''), 7.37 (dd, *J* = 8.8, 2.8 Hz, 1H, H-7), 7.12 (s, 1H, H-2''), 7.11 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, H-7''), 7.04 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H, H-6'').

¹³C NMR (151 MHz, Acetone-*d*₆) δ (ppm): 161.56 (CO), 157.67 (C-6), 145.41 (C-2), 144.25 (C-5'), 141.37 (C-8a), 137.45 (C-7a''), 130.41 (C-8), 128.57 (C-3'), 127.60 (C-3a''), 124.55 (C-7), 123.29 (C-4a), 122.46 (C-2'' και C-6''), 120.16 (C-5''), 119.05 (C-4''), 112.79 (C-4'), 112.42 (C-7''), 111.11 (C-5), 104.76 (C-3'').

5.13 Σύνθεση του 2-αμινο-5-μεθοξυβενζοϊκού οξέος (7d).

Μίγμα του 5-μεθοξυ-2-νιτροβενζοϊκού οξέος (530 mg, 2.69 mmol, **6c**) και Pd/C 10% (20 mg) σε απόλυτη αιθανόλη (10 mL) υδρογονώνεται υπό πίεση 50 psi σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5.5 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το μίγμα διηθείται υπό κελίτη και το διήθημα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Λαμβάνονται 450 mg (99%) του παραγώγου **7c** πρακτικά καθαρού, το οποίο χρησιμοποιείται χωρίς κάποια άλλη κατεργασία στο επόμενο στάδιο της συνθετικής πορείας.⁶⁷

5.14 Σύνθεση της 6-χλωρο-2H-3,1-βενζοξαζινο-2,4(1H)-διόνης (8a).

Σε διάλυμα του 5-χλωρο-2-αμινοβενζοϊκού οξέος (416 mg, 2.43 mmol, **7a**) και τριαιθυλαμίνης (0.68 mL, 4.86 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (5 mL) υπό

ατμόσφαιρα αργού, στους $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$, προστίθεται τριαιθυλαμίνη (0.68 mL, 4.86 mmol) και η κατάλληλη ποσότητα τριφωσγένιο (240 mg, 0.81 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται στη θερμοκρασία αυτή για 10 λεπτά. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, στο μίγμα προστίθεται πεντάνιο και το στερεό που καθιζάνει απομακρύνεται με διήθηση. Το διήθημα συμπυκνώνεται υπό κενό και το παραλαμβανόμενο στερεό (600 mg, 62.5%), πρακτικά καθαρό, χρησιμοποιείται ως έχει στο επόμενο στάδιο της συνθετικής πορείας.^{68,69}

5.15 Σύνθεση της 7-χλωρο-2H-3,1-βενζοξαζινο-2,4(1H)-διόνης (8b).

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού γίνεται κατά ανάλογο τρόπο με αυτόν που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του παραγώγου **8a**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το 4-χλωρο-2-αμινοβενζοϊκό οξύ (692 mg, 4.03 mmol, **7b**). Λαμβάνονται 760 mg (95.4%) του επιθυμητού παραγώγου **8b**, πρακτικά καθαρού, το οποίο χρησιμοποιείται ως έχει στο επόμενο στάδιο της συνθετικής πορείας.^{68,70}

5.16 Σύνθεση της 6-μεθοξυ-2H-3,1-βενζοξαζινο-2,4(1H)-διόνης (8c).

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού γίνεται με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του παραγώγου **8a**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το 2-αμινο-5-μεθοξυβενζοϊκό οξύ (450 mg, 2.69 mmol, **7c**). Λαμβάνονται 400 mg (75%) του επιθυμητού παραγώγου **8c** πρακτικά καθαρού, το οποίο χρησιμοποιείται ως έχει στο επόμενο στάδιο της συνθετικής πορείας.^{68,71}

5.17 Σύνθεση της 6-υδροξυ-2H-3,1-βενζοξαζινο-2,4(1H)-διόνης (8d).

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού γίνεται με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του παραγώγου **8a**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το 2-αμινο-5-υδροξυβενζοϊκό οξύ (465 mg, 2.69 mmol, **7d**). Λαμβάνονται 520 mg (96%) του επιθυμητού παραγώγου **8d** πρακτικά καθαρού, το οποίο χρησιμοποιείται ως έχει στο επόμενο στάδιο της συνθετικής πορείας.⁷²

5.18 Σύνθεση του 3-(2-αιθοξυ-2-οξοαιθυλ)-1H-ινδολο-2-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα (10).

Εναιώρημα του 2-κετογλουταρικού οξέος (10.0 g, 68.4 mmol, **9**) και φαινυλοϋδραζίνης (7.42 g, 6.76 mL, 68.6 mmol) σε αιθανόλη (100 mL) αναδεύεται σε θερμοκρασία βρασμού για 1 h. Έπειτα, προστίθεται στάγδην μεθανοσουλφονικό οξύ (40 mL) και ο βρασμός συνεχίζεται για 20 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης, το μίγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου και αποχύνεται σε νερό. Το λαμβανόμενο στερεό διηθείται υπό κενό και ξηραίνεται σε ξηραντήρα κενού παρουσία πεντοξειδίου του φωσφόρου (P_2O_5). Λαμβάνονται 10 g (53%) του επιθυμητού προϊόντος **10**, πρακτικά καθαρού, τα οποία χρησιμοποιούνται ως έχει στο επόμενο στάδιο της συνθετικής πορείας.⁷³

Σ.τ.: $76\text{-}78\text{ }^{\circ}\text{C}$ (EtOH/ H_2O).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 9.05 (s, D_2O exchang., 1H, H-1), 7.68 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-4), 7.40 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-7), 7.34 (t, 1H, $J = 8.1$ Hz, H-6), 7.17 (t, 1H, $J = 8.1$ Hz, H-5), 4.42 (q, 2H, $J = 7.4$ Hz, CH_2CH_3), 4.24 - 4.15 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_3, \text{CH}_2\text{COO}$), 1.42 (t, 3H, $J = 7.4$ Hz, CH_2CH_3), 1.27 (t, 3H, $J = 7.4$ Hz, CH_2CH_3).

5.19 Σύνθεση του 3-(καρβοξυμεθυλ)-1H-ινδολο-2-καρβοξυλικού οξέος (11)

Σε διάλυμα του διεστέρα **2** (5.0 g, 18.1 mmol) σε αιθανόλη (20 mL) προστίθεται διάλυμα NaOH 30% (19.4 mL, 145.3 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία

βρασμού για 2 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης η μεγαλύτερη ποσότητα της αιθανόλης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση, το υπόλειμμα αποχώνεται σε νερό και οξινίζεται με HCl 36% (pH~2). Το στερεό που σχηματίζεται διηθείται υπό κενό και ξηραίνεται σε ξηραντήρα κενού υπεράνω P₂O₅. Λαμβάνονται 4.0 g (99%) του προϊόντος **3** ως λευκό ίζημα, πρακτικά καθαρό, το οποίο χρησιμοποιείται ως έχει στο επόμενο στάδιο.⁷³

Σ.τ.: 226-228 °C (EtOH).

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 11.55 (s, D₂O exchang., 1H, H-1), 7.63 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-4), 7.42 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-7), 7.25 (t, 1H, *J* = 8.3 Hz, H-6), 7.06 (t, 1H, *J* = 8.3 Hz, H-5), 4.04 (s, 2H, CH₂COOH).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 172.61 (2COOH), 163.19 (CH₂COOH), 135.93 (C-7α), 127.57 (C-3α), 125.04 (C-2), 124.48 (C-6), 120.46 (C-4), 119.44 (C-5), 115.28 (C-3), 112.31 (C-7), 30.09 (CH₂COOH).

5.20 Σύνθεση του 3-(2-αμινο-2-οξοαιθυλ)-1H-ινδολο-2-καρβοξυλικού οξέος (13).

Σε σφαιρική που φέρει το διοξύβ **11** (7.6 g, 34.7 mmol) σε άνυδρο THF (150 mL), υπό ατμόσφαιρα αργού, προστίθεται DCC (7.87 g, 38.1 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 24 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, στο μίγμα της 4,9-διϋδροπυρανο[3,4-*b*]ινδολο-1,3-διόνης (**4**) διαβιβάζεται αέρια αμμωνία για 5 λεπτά και η ανάδευση συνεχίζεται για 2 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα αποχώνεται σε νερό και το στερεό που σχηματίζεται, διηθείται υπό κενό. Το διήθημα οξινίζεται με 9% HCl (pH~2) και καθιζάνει λευκό στερεό το οποίο ξηραίνεται σε ξηραντήρα κενού υπεράνω P₂O₅. Λαμβάνονται 6.64 g (88%) του επιθυμητού προϊόντος **12**, πρακτικά καθαρού, το οποίο χρησιμοποιείται ως έχει για το επόμενο στάδιο της συνθετικής πορείας.

Σ.τ.: 234-235 °C (EtOH).

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 11.51 (s, D₂O exchang., 1H, H-1), 7.63 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-4), 7.41 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-7), 7.28 - 7.23 (m, 2H, H-6, CONH), 7.06 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-5), 6.92 (s, D₂O exchang., 1H, CONH), 3.91 (s, 2H, CH₂CO).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 172.87(CONH₂), 163.73 (COOH), 136.36 (C-7a), 127.99 (C-3a), 125.57 (C-2), 124.86 (C-6), 120.85 (C-4), 119.74 (C-5), 116.38 (C-3), 112.69 (C-7), 31.93 (CH₂CO).

5.21 Σύνθεση του 3-(κυανομεθυλ)-1H-ινδολο-2-καρβοξυλικού οξέος (14).

Σε εναιώρημα του αμιδίου **13** (3.5 g, 16.0 mmol) σε 1/1 μίγμα ακετονιτριλίου-νερού (80.0 mL) προστίθεται χλωριούχο παλλάδιο (142 mg) και το μίγμα θερμαίνεται στους 50 °C για 24 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το ακετονιτρίλιο απομακρύνεται από ελαττωμένη πίεση και το μίγμα της αντίδρασης αλκαλοποιείται με διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Na₂CO₃) 10% (pH~11) και εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα (3X100 mL). Στη συνέχεια η υδατική στιβάδα οξινίζεται με διάλυμα HCl 9% (pH~2), εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα (3X100 mL), τα οργανικά εκχυλίσματα συνενώνονται, ξηραίνονται υπεράνω άνυδρου Na₂SO₄ και συμπυκνώνονται υπό ελαττωμένη πίεση. Λαμβάνονται 1.09 g (34%)

του επιθυμητού νιτριλίου **6**, πρακτικά καθαρού, που χρησιμοποιείται ως έχει για το επόμενο στάδιο.⁷⁴

Σ.τ.: 214-216 °C (AcOEt).

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 11.88 (s, D₂O exchang., 1H, H-1), 7.81 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-4), 7.47 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-7), 7.32 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-6), 7.16 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, H-5), 4.36 (s, 2H, CH₂CN).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 162.70 (COOH), 135.84 (C-7a), 126.20 (C-3a), 125.05 (C-2), 120.20 (C-6), 119.80 (C-4), 118.78 (C-5), 112.72 (C-3), 109.93 (C-7), 12.79 (CH₂CN).

5.22 Σύνθεση της 4,6-διϋδροπυραζολο[4',3':5,6]πυριδο[3,4-*b*]ινδολ-5(2(3)H)-όνης (16).

Σε διάλυμα του νιτριλίου **14** (1.0 g, 45.6 mmol) σε άνυδρο DMF (150 mL), υπό ατμόσφαιρα αργού, προστίθεται DMF-DMA (9.08 mL, 68.4 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται σε θερμοκρασία βρασμού για 1 ώρα. Μετά την εξαφάνιση της πρώτης ύλης (παρακολούθηση με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας), στο μίγμα της αντίδρασης προστίθεται 80 % διάλυμα υδραζίνης (4.98 mL, 102.6 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται στους 150°C για 24 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, οι οργανικοί διαλύτες απομακρύνονται υπό ελαττωμένη πίεση και στο ελαιώδες υπόλειμμα που λαμβάνεται προστίθεται αιθανόλη 96%. Το στερεό που καθιζάνει διηθείται υπό κενό και λαμβάνονται 440 mg (54%) του παραγώγου **16**.

Σ.τ.: 304-305 °C (AcOEt).

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 12.55 (s, D₂O exchang., 1H, H-6), 8.37 (s, 1H, H-1), 8.18 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-10), 7.61 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-7), 7.53 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-8), 7.32 (t, *J* = 8Hz, 1H, H-9), 6.23 (s, D₂O exchang., 1H, H-4).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 154.39 (C-5), 139.68 (C-6a), 138.03 (C-1), 127.38 (C-8), 126.28 (C-5a), 120.82 (C-9), 120.25 (C-10), 120.19 (C-10a), 119.13 (C-10b), 116.90 (C-3a), 113.08 (C-7), 83.27 (C-10c).

ESI - HRMS υπολογισθέν ως προς C₁₂H₉N₄O⁺ [MH⁺]: 225,0771, ευρεθέν 225,0787.

5.23 Σύνθεση του 5-χλωρο-2H(3H)-4,6-διϋδροπυραζολο[4',3':5,6]πυριδο[3,4-*b*]ινδολίου (17).

Σε σφαιρική φιάλη που φέρει τριχλωριούχο φωσφόρο (3 mL) προστίθεται *N*-αιθυλοδισοπροπυλαμίνη (0.350 mL, 2.01 mmol) και το παράγωγο **16** (150 mg, 0.67 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται στους 80 °C υπό συνθήκες αργού για 24 ώρες. Στη συνέχεια, γίνεται εκδίωξη της περίσσειας του διαλύτη υπό κενό και αλκαλοποίηση με διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου 10%. Ακολουθεί εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα- νερό (3X 20 mL) και η οργανική στιβάδα καθαρίζεται περαιτέρω με χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλυσης 2/1.

Σ.τ.: >250°C (Διχλωρομεθάνιο)

¹H NMR (600 MHz, Acetone-*d*₆) δ (ppm): 11.55 (s, D₂O exchang., 1H, H-6), 8.61 (s, 1H, H-1), 8.50 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-9), 7.83 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-7), 7.79 (t, *J* = 8.0, 1H, H-8), 7.51 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-9).

¹³C NMR (151 MHz, Acetone-*d*₆) δ (ppm): 142.80 (C-1), 140.08 (C-3a), 138.47 (C-6a), 138.12 (C-5), 131.71 (C-8), 123.97 (C-10a), 123.66 (C-5a), 123.00 (C-10), 122.49 (C-9), 114.04 (C-7), 105.97 (C-10b), 87.40 (C-10c).

5.24 Σύνθεση του 2-[(τριφθοροακετυλο)αμινο]βενζοϊκού οξέος (19).

Σε διάλυμα ανθρανλικού οξέος (3 g, 21.9 mmol, **18**) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (5 mL) προστίθεται στάγδην τριφθοροξικός ανυδρίτης (9.17 mL, 65.6 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, υπό ατμόσφαιρα αργού, για 1 ώρα. Μετά το τέλος της αντίδρασης, το μίγμα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση και λαμβάνεται το αμίδιο **19**, πρακτικά καθαρό, το οποίο χρησιμοποιείται ως έχει στο επόμενο στάδιο της συνθετικής πορείας.⁷⁵

5.25 Σύνθεση της 2-(τριφθορομεθυλο)-4H-3,1-βενζοξαζιν-4-όνης (20).

Σφαιρική φιάλη που φέρει το παράγωγο **20** (3 g, 21.9 mmol) και οξικός ανυδρίτης (10.33 mL, 109.5 mmol) αναδεύεται υπό ατμόσφαιρα αργού σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μέχρι ολοκλήρωσης της αντίδρασης. Στη συνέχεια, απομακρύνεται η περίσσεια του οξικού ανυδρίτη υπό ελαττωμένη πίεση και στο υπόλειμμα προστίθεται πεντάνιο και πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό. Το λαμβανόμενο στερεό (3.9 g, 82.8%) χρησιμοποιείται ως έχει στο επόμενο στάδιο της συνθετικής πορείας.⁷⁵

5.26 Σύνθεση του N-[4-(1H-ινδολ-3-υλ)-1H-πυραζολ-5-υλ]-2-[(τριφθοροακετυλο)αμινο]βενζαμίδιου (21).

Διάλυμα 4-(1H-ινδολ-3-υλ)-1H-πυραζολ-3-αμίνης (1.5 g, 7.6 mmol, **3**), 2-(τριφθορομεθυλο)-4H-3,1-βενζοξαζιν-4-όνης (1.7 g, 8 mmol, **20**) και 4-διμεθυλαμινοπυριδίνης (46.4 mg, 0.38 mmol), σε άνυδρο (THF) (7 mL) θερμαίνεται στους 55 °C, υπό ατμόσφαιρα αργού, για 30 λεπτά. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το μίγμα της αντίδρασης συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση, το υπόλειμμα κατεργάζεται με μεθανόλη (10 mL) και το στερεό διηθείται υπό κενό. Λαμβάνονται 1.96 g (62.4%) του παραγώγου **21**, ως κίτρινο στερεό, πρακτικά καθαρό.

Σ.τ.: 197.9- 199.8 °C (MeOH).

¹H NMR (600 MHz, Acetone-*d*₆) δ (ppm): 11.44 (s, D₂O exchang., 1H, H-1''), 11.34 (s, D₂O exchang., 1H, NHCOCF₃), 8.32 (s, 1H, H-3'), 7.78 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-6), 7.73 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H-2''), 7.72 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, H-4''), 7.63 (t, 1H, H-4), 7.58 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-3), 7.46 (d, 1H, H-7''), 7.45 (t, 1H), 7.18 (t, 1H, H-6''), 7.12 (t, *J* = 11.1 Hz, 1H, H-5''), 5.62 (s, D₂O exchang., 1H, NH₂).

¹³C NMR (151 MHz, Acetone-*d*₆) δ (ppm): 163.06 (CO), 157.34 (C-5'), 154.83 (COCF₃), 136.24 (C-7a''), 133.36 (C-2), 131.34 (C-4), 130.99 (C-6), 127.75 (C-6a), 126.08 (C-5), 125.49 (C-3a''), 125.03 (C-3'), 123.99 (C-2''), 121.76 (C-6''), 119.64 (C-5''), 119.11 (C-4''), 118.68 (CF₃), 116.81 (CF₃), 114.90 (CF₃), 113.03 (CF₃), 111.87 (C-7''), 111.25 (C-4'), 104.17 (C-3').

ESI - HRMS υπολογισθέν ως προς $C_{20}H_{14}F_3N_5NaO_2^+$ [MNa⁺]: 436,34189 ευρεθέν 436,1028.

5.27 Σύνθεση του 2H(3H)-4,6-διϋδροπυραζολο[4',3':5,6]πυριδο[3,4-b]ινδολίου (22).

Σε διάλυμα του παραγώγου **5a** (60 mg, 0.18 mmol) σε χλωροφόρμιο (2 mL) προστίθεται τριφθοροξικό οξύ (0.06 mL, 0.74 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται στους 25 °C για 4 ημέρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης, το μίγμα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση και στο υπόλειμμα που λαμβάνεται προστίθεται νερό και γίνεται αλκαλοποίηση με διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου 10% (pH~8). Ακολούθως, εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα (3X 15 mL), η οργανική στιβάδα ξηραίνεται (άνυδρο Na₂SO₄), συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα που λαμβάνεται καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλουσης κυκλοεξανίου/οξικού αιθυλεστέρα 3/1- 0/1. Τελικά, λαμβάνονται 39 mg (100%) του παραγώγου **22**.

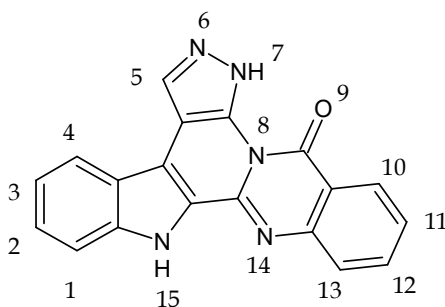
Σ.τ.: >250 °C (MeOH).

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 13.66 (s, 1H, D₂O exchange, NHN), 11.82 (s, 1H, D₂O exchange, H-6), 8.89 (s, 1H, H-5), 8.66 (s, 1H, H-1), 8.45 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-10), 7.67 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-7), 7.56 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, H-8), 7.30 (t, 1H, H-9).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 147.50 (C-3a), 140.17 (C-6a), 135.04 (C-5), 130.96 (C-5a), 130.82 (C-1), 127.33 (C-8), 122.69 (C-10), 120.34 (C-10a), 119.31 (C-9), 118.70 (C-10c), 112.29 (C-7), 107.41 (C-10b).

ESI - HRMS υπολογισθέν ως προς $C_{12}H_9N_4^+$ [MH⁺]: 209,2261, ευρεθέν 209,0820.

5.28 Σύνθεση της 6H(7H),15H-ινδολο[2',3':3,4]πυραζολο[4',3':5,6]πυριδο[2,1-b]κιναζολιν-9-όνης (23a).



Σε διάλυμα του παραγώγου **5a** (290 mg, 0.89 mmol) σε χλωροφόρμιο (5 mL) προστίθεται τριφθοροξικό οξύ (136 μL, 1.77 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται στους 25 °C για 72 ώρες. Στη συνέχεια, το μίγμα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση, στο υπόλειμμα προστίθεται αιθανόλη (0.8 mL) και διάλυμα καυστικού καλίου (80 mg, 1.42 mmol σε 0.16 mL νερό) και το μίγμα που λαμβάνεται αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 24 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης στο μίγμα προστίθενται 10 mL νερό και εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα (3 X 15 mL), η οργανική στιβάδα ξηραίνεται (άνυδρο Na₂SO₄), συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα που λαμβάνεται καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλουσης κυκλοεξανίου/οξικού

αιθυλεστέρα 5/1- 0/1. Λαμβάνονται 200 mg (69.1%) του επιθυμητού προϊόντος **23a**, ως κίτρινου στερεού.

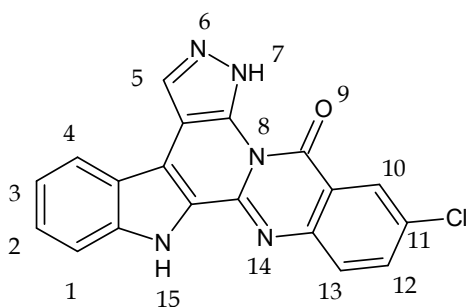
Σ.τ.: >250 °C (THF).

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 12.38 (s, D₂O exchang., 1H, H-15), 8.60 (s, 1H, H-5), 8.43 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-10), 8.33 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-4), 7.97 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, H-12), 7.88 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-13), 7.69 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-1), 7.59 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, H-11), 7.48 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, H-2), 7.29 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, H-3).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 159.86 (CO), 146.93 (C-13a), 139.81 (C-15a), 139.45 (C-7a), 135.11 (C-12), 132.94 (C-14a), 131.28 (C-5), 126.77 (C-10), 126.39 (C-2 και C-13), 125.33 (C-11), 124.92 (C-14b), 121.82 (C-4), 121.22 (C-4a), 120.26 (C-3), 117.68 (C-9a), 114.38 (C-4b), 112.84 (C-1), 104.12 (C-4a)

ESI - HRMS υπολογισθέν ως προς C₁₉H₁₂N₅O⁺ [MH⁺]: 326.3309, ευρεθέν 326.1045.

5.29 Σύνθεση της 11-χλωρο-6H(7H),15H-ινδολο[2',3':3,4]πυραζολο[4',3':5,6]πυριδο[2,1-b]κιναζολιν-9-όνης (23b).



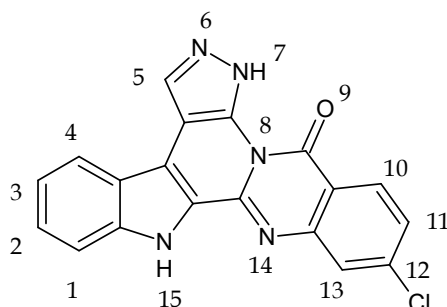
Η σύνθεση του παραγώγου αυτού γίνεται με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του παραγώγου **23a**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το παράγωγο **5b** (100 mg, 0.19 mmol). Το πρώτο στάδιο της αντίδρασης ολοκληρώνεται σε 30 ώρες και το δεύτερο σε 40 ώρες, ενώ το προϊόν κατεργάζεται με μεθανόλη και το στερεό διηθείται υπό κενό. Λαμβάνονται 61 mg (89.2%) υποκίτρινου στερεού **23b**.

Σ.τ.: >250°C (DMF-νερό).

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 12.37 (s, D₂O exchang., 1H, H-15), 8.67 (s, 1H, H-5'), 8.33 (s, 1H, H-10), 8.32 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H, H-4), 7.95 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1H, H-12), 7.86 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-13), 7.68 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-1), 7.49 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-2), 7.30 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-3).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 152.49 (CO), 145.59 (C-13a), 139.91 (C-15a), 135.06 (C-12), 133.76 (C-15a), 131.90 (C-14a), 131.26 (C-5), 129.19 (C-11), 128.60 (C-13), 126.59 (C-2), 125.54 (C-4), 124.95 (C-14b), 121.88 (C-10), 121.17 (C-4a), 120.34 (C-3), 119.05 (C-9a), 114.71 (C-4c), 112.88 (C-1), 104.32 (C-4b).

5.30 Σύνθεση της 12-χλωρο-6*H*(7*H*),15*H*-ινδολο[2',3':3,4]πυραζολο[4',3':5,6]πυριδο[2,1-*b*]κινναζολιν-9-όνης (23c).



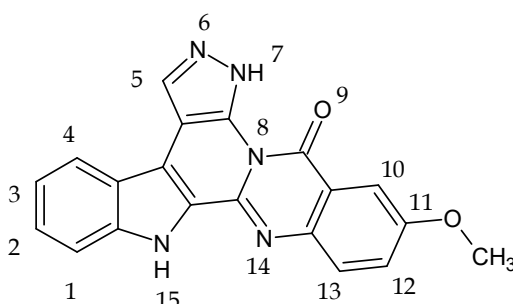
Η σύνθεση του παραγώγου αυτού γίνεται με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιείται για την σύνθεση του παραγώγου **23a** χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το παράγωγο **5c** (170 mg, 0.47 mmol). Το πρώτο στάδιο της αντίδρασης ολοκληρώνεται σε 48 ώρες και το δεύτερο σε 72 ώρες, ενώ το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης, εκλούμενη από οξικό αιθυλεστέρα, το υπόλειμμα κατεργάζεται με μεθανόλη και το στερεό διηθείται υπό κενό. Λαμβάνονται 73 mg (43.2%) προϊόντος **23c**.

Σ.τ.: >250 °C (THF).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 12.41 (s, D₂O exchang., 1H, H-15), 8.64 (s, 1H, H-5), 8.41 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H-10), 8.35 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-4), 7.81 (s, 1H, H-13), 7.69 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-1), 7.60 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-11), 7.51 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-2), 7.31 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-3).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 151.61 (CO), 148.05 (C-13a), 142.77 (C-7a), 140.55 (C-15a), 136.66 (C-14a), 133.85 (C-5), 131.38 (C-10), 129.03 (C-2), 127.60 (C-11), 126.74 (C-13), 125.50 (C-12), 125.07 (C-14b), 124.16 (C-4), 121.97 (C-3), 120.38 (C-4a), 115.22 (C-9a), 114.11 (C-1), 112.93 (C-4c), 104.30 (C-4b).

5.31 Σύνθεση της 2-μεθοξυ-6*H*(7*H*),15*H*-ινδολο[2',3':3,4]πυραζολο[4',3':5,6]πυριδο[2,1-*b*]κινναζολιν-9-όνης (23d).



Η σύνθεση του παραγώγου αυτού γίνεται με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιείται για την σύνθεση του παραγώγου **23a**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το παράγωγο **5d** (120 mg, 0.34 mmol). Το πρώτο στάδιο της αντίδρασης ολοκληρώνεται σε 120 ώρες και το δεύτερο σε 168 ώρες, ενώ το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης, εκλούμενη από οξικό αιθυλεστέρα, το υπόλειμμα κατεργάζεται με ακετόνη και το στερεό διηθείται υπό κενό. Λαμβάνονται 15 mg (12.4%) προϊόντος **23d**.

Σ.τ.: >250 °C (Ακετόνη).

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 12.33 (s, D₂O exchang., 1H, H-15), 8.60 (s, 1H, H-5), 8.28 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.85 (d, J = 8.9 Hz, 1H, H-13), 7.78 (d, J = 2.8 Hz, 1H, H-10), 7.67 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-1), 7.62 (s, 1H, H-12), 7.46 (t, J = 7.5 Hz, 1H, H-2), 7.29 (t, J = 7.4 Hz, 1H, H-3), 3.97 (s, 3H, OCH₃).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 159.73 (CO), 157.49 (C-11), 142.00 (C-13a), 141.16 (C-7a), 139.59 (C-15a), 132.55 (C-14a), 131.44 (C-5), 128.24 (C-13), 126.43 (C-2), 125.25 (C-12), 124.58 (C-14b), 121.38 (C-4), 120.80 (C-4a), 120.38 (C-4), 119.53 (C-9a), 115.50 (C-4c), 112.67 (C-1), 106.23 (C-10), 104.38 (C-4b), 55.82 (OCH₃).

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, *CA Cancer J Clin.* **2016** 66, 7-30.
2. 1. (a) D.A. Karnofsky, Mechanism of action of anticancer drugs at a cellular level *CA Cancer J Clin.* **1968** 18, 232-234, b) Hickman J.A. Apoptosis induced by anticancer drugs, *Cancer Met. Rev.* **1992** 11, 122-139.
3. C.V. Duenas, I.R. Camarero, C. Cobaleda, I.S. Garcia, Function of oncogenes in cancer development: a changing paradigm, *The EMBO Journal* **2013** 32, 1502-1513.
4. J. Dancey, S. Arbuck, Cancer Drugs and Cancer Drug Development for the New Millennium. In: Khayat D, Hortobagyi GN (eds). Progress in anti-cancer chemotherapy , Volume IV. **2000**, 91-107.
5. a) W.A. Denny, Emerging DNA topoisomerase inhibitors as anticancer drugs. *Exp. Opin. Emerg. Drugs*, 2004, 9, 105; b) Liu L.F. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs, *Ann. Rev. Biochem.*, **1989**, 58, 351-375.
6. a) M. Binaschi, F. Zunino, G. Capranico, Mechanism of Action of DNA Topoisomerase Inhibitors *Stem Cells* **1995** 13, 369-379, b) J.J. Champoux, DNA TOPOISOMERASES: Structure, Function, and Mechanism, *Ann. Rev. Biochem.* **2001** 70, 369-413.
7. M.S. Liberio , M.C. Sadowski , R.A. Davis , A. Rockstroh , R. Vasireddy , M.L. Lehman, C.C. Nelson, The ascidian natural product eusynstyelamide B is a novel topoisomerase II poison that induces DNA damage and growth arrest in prostate and breast cancer cells, *Ongotarget* 2015 6, 43944-43963.
8. D.R. Davies, H. Interthal, J.J. Champoux, W.G.J. Hol, The Crystal Structure of Human Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase, Tdp1, *Elsevier* **2002** 10, 237-248.
9. Y. Pommier, S.-y.N. Huang, R. Gao, B.B. Das, J. Murai, C. Marchand, Tyrosyl-DNA-phosphodiesterases (TDP1 and TDP2), *DNA Repair (Amst)*. **2014** 19, 114-129.
10. J.L. Nitiss, K.C. Nitiss, Tdp2: A Means to Fixing the Ends, *PLOS Genet.* **2013** 9, e1003370.
11. S.-y.N. Huang, Y. Pommier, C. Marchand, Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 (Tdp1) Inhibitors, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2011** 9, 1285-1292.
12. F. Fares, The Anti-Carcinogenic Effect of Indole-3-Carbinol and 3, 3'-Diindolylmethane and their Mechanism of Action, *Med chem* **2014** S1-002.
13. a) P.L. Yang, N.S. Gray, Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors *Nat. Rev. Cancer* **2009** 9 27-39, b) D. Fabbro, C. García-Echeverría, Targeting protein kinases in cancer therapy, *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **2002** 5, 701-712.
14. J. Zhang, P.L. Yang, N.S. Gray, Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors, *Nat. Rev. Cancer* **2009** 9, 29-39.
15. X. An, A.K. Tiwari, Y. Sun, P.R. Ding, C.R. Jr Ashby, Z.S. Chen, BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: a review *Leuk Res.* **2010** 34, 1255-1268.
16. J.H. Kang, Protein Kinase C (PKC) Isozymes and Cancer, *New J. Sci.* **2014**, article ID 231418.

17. H.L. Goel, A.M. Mercurio, VEGF targets the tumour cell, *Nat. Rev. Cancer* **2013**, 13, 871-882.
18. M. Sudol, I.M. Gelman, PTEN Tumor Suppressor Network in PI3K-Akt Pathway Control, *Genes Cancer* **2010** 1, 1170-1177.
19. M.T. El Sayed, N.A. Hamdy, D.A. Osman, K.M. Ahmed, Indoles as anti-cancer agents, *Adv. Mod. Oncol. Res.* **2015** 1, 20-35.
20. O.O. Ajani, D. Aderohunmu, E.N. Umeokoro, A.O. Olomieja, Quinazoline pharmacophore in therapeutic medicine, *Bangladesh J. Pharmacol.* **2016** 11, 716-733.
21. J.P. Michael, Quinoline, quinazoline and acridone alkaloids, *Nat. Prod. Rep.*, **2007** 24, 223-246.
22. M. Zahedifard, F.L. Faraj, M. Paydar, C.Y. Looi, M. Hajrezaei, M. Hasanpourghadi, B. Kamalidehghan, N.A. Majid, H.M. Ali, M.A. Abdulla, Synthesis, characterization and apoptotic activity of quinazolinone Schiff base derivatives toward MCF-7 cells via intrinsic and extrinsic apoptosis pathways, *Sci. Rep* **2015** 5.
23. G.N. Raju, N.V.N.S.V. Lakshmi, M.S. Meghana, R.R. Nadendla, Quinazoline: unique and versatile pharmacophore in the field of cancer, *IAJPS* **2015** 2.
24. T.P. Selvam, P.V. Kumar, Quinazoline Marketed drugs - A Review, *RIP* **2011** 1, 1-21.
25. C.-G. Yang, H. Huang, B. Jiang, Progress in Studies of Novel Marine Bis(indole) Alkaloids, *Curr. Org. Chem.* **2004** 8, 1691-1720.
26. B. Bao, J.H. Jung, Q. Sun, X. Yao, J. Hong, C.-O. Lee, C.J. Sim, K.S. Im, J.H. Jung, Cytotoxic Bisindole Alkaloids from a Marine Sponge *Spongisorites* sp., *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 711-715.
27. N. Neuss, M.N. Neuss, Alkaloids: Chemistry and Pharmacology: Chapter 6: Therapeutic Use of Bisindole Alkaloids from *Catharanthus*, *Elsevier* **1990** 37, 229-240.
28. B. Jiang, X.-H. Gu, Syntheses and Cytotoxicity Evaluation of Bis(indolyl)thiazole, Bis(indolyl)pyrazinone and Bis(indolyl)pyrazine: Analogues of Cytotoxic Marine Bis(indole) Alkaloid, *Bioorg. Med. Chem.* **2000** 8 363-371.
29. A. Andreani, S. Burnelli, M. Granaiola, A. Leoni, A. Locatelli, R. Morigi, M. Rambaldi, L. Varoli, L. Landi, C. Prata, M.V. Berridge, C. Grasso, H.-H. Fiebig, G. Kelter, A.M. Burger, M.W. Kunkel, Antitumor Activity of Bis-indole Derivatives, *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 4563-4570.
30. E.R. Pereira, S. Fabre, M. Sancelme, M. Prudhomme, Antimicrobial Activities of Indolocarbazole and Bis-indole Protein Kinase C Inhibitors II. Substitution Bearing on Maleimide a Labile Nitrogen Hydrogen with Functional Groups, *J. Antibiot.* **1995** 48, 863-868.
31. A. Martinez, A. Castro, I. Dorronsoro, M. Alonso, Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK-3) Inhibitors as New Promising Drugs for Diabetes, Neurodegeneration, Cancer, and Inflammation, *Med. Res. Rev.* **2002** 22, 373- 384.
32. J. Amato, N. Iaccarino, B. Pagano, R. Morigi, A. Locatelli, A. Leoni, M. Rambaldi, P. Zizza, A. Biroccio, E. Novellino, A. Randazzo, Bis-indole derivatives with antitumor activity turn out to be specific ligands of human telomeric G-quadruplex, *Front. Chem.* **2014** 2.

33. a) D. Gadbois, J.R. Hamaguchi, R.A. Swank, E.M. Bradbury, Staurosporine is a potent inhibitor of p34cdc2 and p34cdc2-like kinases, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **1992** 184, 80-85, b) L. Meijer, Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases, *Prog. Cell Cycle Res.* **1995**, 1, 351-361.
34. A. Gescher, Staurosporine analogues – pharmacological toys or useful antitumour agents?, *Crit. Rev. Oncol. Hemat.* **2000**, 34, 127-135.
35. 7-Hydroxystaurosporine and Irinotecan Hydrochloride in Treating Patients With Metastatic or Unresectable Solid Tumors or Triple Negative Breast Cancer. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00031681.
36. Y. Tahamtani, M. Azarnia, A. Farrokhi, A. Moradmamand, S. Mirshahvaladi, S. Aghdami, H. Baharvand, Stauprimide Priming of Human Embryonic Stem Cells toward Definitive Endoderm, *Cell J.* **2014** 16, 63-72.
37. Daunorubicin, cytarabine and midostaurin in treating patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00651261.
38. M. Prudhomme, Rebeccamycin analogues as anti-cancer agents, *Eur. J. Med. Chem.* **2003** 38, 123-140.
39. Singh S., McCoy J.G., Zhang C., Bingman C.A., Phillips G.N. Jr, Thorson J.S. Structure and Mechanism of the Rebeccamycin Sugar 4'-O-Methyltransferase RebM, *J Biol Chem.* **2008** 283, 22628-22636.
40. C. Sánchez, I.A. Butovich, A.F. Braña, J. Rohr, C. Méndez, J.A. Salas, The biosynthetic gene cluster for the antitumor rebeccamycin: characterization and generation of indolocarbazole derivatives, *Chem Biol.* **2002** 9, 519-531.
41. S. Ho Lee, J.-K. Son, B. S. Jeong, T.-C. Jeong, H. W. Chang, E.-S. Lee, Y. Jahng Progress in the Studies on Rutaecarpine, *Molecules* **2008**, 13, 272-300.
42. G.R. Martins, H.B. Napolitano, L.T.M.F. Camargo, A.J. Camargo, Structure-Activity Relationship Study of Rutaecarpine Analogous Active Against Central Nervous System Cancer, *J. Braz. Chem. Soc.* **2012** 23, 2183-2190.
43. J. Jiang, C. Hu, Evodiamine: A Novel Anti-Cancer Alkaloid from *Evodia rutaecarpa*, *Molecules* **2009** 14, 1852-1859.
44. H. Yu, H. Jin, W. Gong, Z. Wang, H. Liang, Pharmacological Actions of Multi-Target-Directed Evodiamine, *Molecules* **2013** 18, 1826-1843.
45. a) J. Du, X.F. Wang, Q.M. Zhou, T.L. Zhang, Y.Y. Lu, H. Zhang, S.B. Su, Evodiamine induces apoptosis and inhibits metastasis in MDA-MB-231 human breast cancer cells in vitro and in vivo, *Oncol. Rep.* **2013** 30, 685-694, b) C.-H. Liao, S.L. Pan, J.-H. Guh, Y.-L. Chang, H.-C. Pai, C.-H. Lin, C.-M. Teng, Antitumor mechanism of evodiamine, a constituent from Chinese herb *Evodiae fructus*, in human multiple-drug resistant breast cancer NCI/ADR-RES cells in vitro and in vivo, *Carcinogenesis* **2005** 26, 968-975.
46. K.G. Shyu, S. Lin, C.C. Lee, E. Chen, L.C. Lin, B.W. Wang, S.C. Tsai, Evodiamine inhibits in vitro angiogenesis: Implication for antitumorigenicity, *Life Sci.* **2006** 78, 2234-2243.
47. M. Prudhomme, Rebeccamycin analogues as anti-cancer agents, *Eur. J. Med. Chem.* **2003** 38, 123-140.

48. A. Nathubhai, R. Patterson, T.J. Woodman, H.E.C. Sharp, M.T.Y. Chui, H.H.K. Chung, S.W.S. Lau, J. Zheng, M.D. Lloyd, A.S. Thompson, M.D. Threadgill, *N*³-Alkylation during formation of quinazolin-4-ones from condensation of anthranilamides and *ortho*amides, *Org. Biomol. Chem.* **2011** 17.
49. H. Elguero, A.R. Katritzky, O.V. Denisco, Prototropic Tautomerism of Heterocycles: Heteroaromatic Tautomerism-General Overview and Methology, *Adv. Heterocycl. Chem.* **2000** 76, 1-84.
50. H.F. Anwar, M.H. Elnagdi, Recent developments in aminopyrazole chemistry, *ARKIVOC* **2009** 1, 198-250.
51. N. Kanışkan, Ş. Kökten, İ. Çelik, A new protocol for the synthesis of primary, secondary and tertiary anthranilamides utilizing N-(2-aminoarylacyl)benzotriazoles, *ARCHIVOC* **2012** 8, 198-213.
52. T. Deligeorgiev, A. Vasilev, J.J. Vaquero, J. Alvarez-Builla, A green synthesis of isatoic anhydrides from isatins with urea-hydrogen peroxide complex and ultrasound, *Ultrason. Sonochem.* **2007** 14, 497-501.
53. L. Chengyuan, X. Juan, S. Huihui, Z. Zhiguang, X. Yu, Y. Qizheng, Synthesis, in vitro and in vivo antitumor activity and docking studies of new evodiamine derivatives, *J. Chem. Pharm. Res.* **2014** 6, 1161-1171.
54. a) A. Ghorbani-Choghamarani, M. Nikoorazm, G. Azadi, One-pot and novel route for the synthesis of 4-substituted-1,2,4-triazolidine-3,5-diones, *Chin. Chem. Lett.* **2014** 25, 451-454, b) J. Roestamadji, S. Mobashery, A. Banerjee, Bis(trichloromethyl) Carbonate, *EROS Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis* **2006**.
55. D.J. Connolly, D. Cusack, T.P. O'Sullivan, P.J. Guiry, Synthesis of quinazolinones and quinazolines, *Tetrahedron Lett.* **2005** 61, 10153-10202.
56. G. Grieco, O. Blacque, H. Berke, A facile synthetic route to benzimidazolium salts bearing bulky aromatic N-substituents, *Beilstein J. Org. Chem.* **2015** 11, 1656-1666.
57. P.C. Rao, N.O. Oliveira Jr., R. Varala, Scope of Selective Heterocycles from Organic and Pharmaceutical Perspective, Chapter 4: Strategies Towards the Synthesis of Staurosporine Indolocarbazole Alkaloid and Its Analogues, ISBN 978-953-51-2503-7, **2016**.
58. J.-K. Son, H.W. Chang, Y. Jahng, Progress in Studies on Rutaecarpine. II. –Synthesis and Structure-Biological Activity Relationships, *Molecules* **2015** 20, 10800-10821.
59. J. Bergman, S. Bergman, Studies of Rutaecarpine and Related Quinazolinocarboline Alkaloids, *J. Org. Chem.* **1985** 50.
60. K.R. Rao, A. Raghunadh, R. Mekala, S.B. Meruva, T.V. Pratap, T. Krishna, D. Kalita, E. Laxminarayana, B. Prasad, M. Pal, Glyoxylic acid in the reaction of isatoic anhydride with amines: a rapid synthesis of 3-(un)substituted quinazolin-4(3H)-ones leading to rutaecarpine and evodiamine, *Tetrahedron Lett.* **2014** 55, 6004-6006.

61. B.V.S. Reddy, R.A. Babu, B. J.M. Reddy, B. Sridhar, T.R. Murthy, P. Pranathi, S.V. Kalivendi, T.P. Rao, A short and highly convergent approach for the synthesis of rutaecarpine derivatives, *RSC Adv.* **2015** 5.
62. J.A. Joule, K. Mills, *Heterocyclic chemistry*, 5th ed. **2009**, 402-405.
63. N.K. Bhattacharyya, J. Sat, J. San, T.Y. Bhutia, G. Adhikary, Dehydration of Amides to Nitriles: A Review, *Int. j. adv. chem. sci. appl.* **2012** 4, 295-304.
64. a) H. Laborie, H. Rouillard, E. Deau, P. Pineau, L. Domon, J.-R. Chérouvrier, V. Thiéry, HIGHLIGHTS IN 1,2,3-DITHIAZOLE CHEMISTRY, *St. Cerc. St. CICBIA* **2010** 11, 91-102, b) P. A. Koutentis, The Preparation and Characterization of 5-Substituted-4- chloro-1,2,3-dithiazolium Salts and their Conversion into 4- Substituted-3-chloro-1,2,5-thiadiazoles, *Molecules* **2005** 10, 346-359.
65. a) A.S. Kalogirou, P.A. Koutentis, The Reaction of 4,5-Dichloro-1,2,3-dithiazolium Chloride with Sulfinimides: A New Synthesis of N-Aryl-1,2,3-dithiazolimines, *Molecules* **2009** 14, 2356-2362, b) V. Thiéry, T. Besson, Syntheses d'heterocycles azotes et soufres via les 5-arylimino-4-chloro- 5h-1,2,3-dithiazoles issus de la condensation d'amines aromatiques avec le sel d'appel, *SCSCC6* 2002 3.
66. a) J. Wangsahardja, G.M. Marcolin, Y. Lizarme, J.C. Morris, L. Hunter, Concise Synthesis of Dictyoquinazol A via a Dimerisation-Cyclocondensation Sequence, *Synlett* **2016** 27, 1237-1240, b) D.J. Connolly, D. Cusack, T.P. O'Sullivan, P.J. Guiry, Synthesis of quinazolinones and quinazolines, *Tetrahedron* **2005** 61, 10153-10202.
67. S. Gao, M. Chen, M.-N. Zhao, W. Du, Z.-H. Ren, Y.-Y. Wang, Z.-H. Guan, Palladium-Catalyzed Carbonylation of *o*-Iodoanilines for Synthesis of Isatoic Anhydrides, *J. Org. Chem.* **2014** 79 4196-4200.
68. T.M. Acker, A. Khatri, K.M. Vance, C. Slabber, J. Bacsá, J.P. Snyder, S.F. Traynelis, D.C. Liotta, Structure-Activity Relationships and Pharmacophore Model of a Noncompetitive Pyrazoline Containing Class of GluN2C/GluN2D Selective Antagonists, *J. Med. Chem.* **2013** 56, 6434-6456.
69. J. Borišek, M. Vizovišek, P. Sosnowski, B. Turk, D. Turk, B. Mohar, M. Novič, Development of N-(Functionalized benzoyl)-homocycloleucyl-glycinonitriles as Potent Cathepsin K Inhibitors, *J. Med. Chem.* **2015** 58, 6928-6937
70. A. Nencini, C. Pratelli, J.M. Quinn, M. Salerno, P. Tunici, A.De Robertis, S. Valensin, F. Mennillo, M. Rossi, Structure-activity relationship and properties optimization of a series of Quinazoline-2,4-diones as inhibitors of the canonical Wnt pathway, *J. Med. Chem.* **2015**, 95, 526-545.
71. a) F.H. Darras, B. Kling, J. Heilmann, M. Decker, Neuroprotective Tri- and Tetracyclic BChE Inhibitors Releasing Reversible Inhibitors upon Carbamate Transfer, *ACS Med. Chem. Lett.* **2012** 3, 914-919, b) E. Sawatzky, J. Bukowczan, M. Decker, Investigation into selective debenzoylation and ring cleavage of quinazoline based heterocycles, *Tetrahedron Lett.* **2014** 55, 2973-2976.
72. N.M. Gray, J.M.S. Dappen, B.K. Cheng, A.A. Cordi, J.P. Biesterfeldt, W.F. Hood, J.B. Monahan, Novel Indole-2-carboxylates as Ligands for the Strychnine-Insensitive N-Methyl-D-aspartate Linked Glycine Receptor, *J. Med. Chem.* **1991** 34, 1283-1292.

73. D. Thielke, D. Hoeltje, Tryptamine compounds, and methods of cerebrovascular treatment therewith, United States Patent **1990**, Patent Number: 4,980,368.
74. D.R. Olson, W.J. Wheeler, J.N. Wells, Rigid analogs of indomethacin, *J. Med. Chem.*, **1974** 17, 167-171.
75. J.M. Elkins, M. Vollmar, J. Wang, S. Picaud, C.H. Arrowsmith, A. Edwards, C. Bountra, F. Von Delft, S. Knapp, Crystal Structure of Human Aurora B in Complex with Incenp and Vx-680, *J. Med. Chem.* 2012 55, 7841.
76. M. Sabat, H. Wang, N. Scolah, J.D. Lawson, J. Atienza, R. Kamran, M.S. Hixon, D.R. Dougan, Design, synthesis and optimization of 7-substituted-pyrazolo[4,3-b]pyridine ALK5 (activin receptor-like kinase 5) inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017** 27, 1955-1961.
77. P. Hornyak, T. Askwith, S. Walker, E. Komulainen, M. Paradowski, L.E. Pennicott, E.J. Bartlett, N.C. Brissett, A. Raouf, M. Watson, A.M. Jordan, D.J. Ogilvie, S.E. Ward, J.R. Atack, L.H. Pearl, K.W. Caldecott, A.W. Oliver, Mode of action of DNA-competitive small molecule inhibitors of tyrosyl DNA phosphodiesterase 2, *Biochem. J.* **2016** 473, 1869-1879.