

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

τιτλος

ΥΒΡΙΔΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ 4-ΘΕΙΑΤΟΚΟΦΕΡΟΛΗΣ/ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΕΣ ΤΟΥ ΠΡΩΤΕΑΣΩΜΑΤΟΣ

ΧΑΖΑΠΗ ΕΥΑΝΘΙΑ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ

ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2018

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

τιτλος

ΥΒΡΙΔΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ 4-ΘΕΙΑΤΟΚΟΦΕΡΟΛΗΣ/ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΕΣ ΤΟΥ ΠΡΩΤΕΑΣΩΜΑΤΟΣ

ΧΑΖΑΠΗ ΕΥΑΝΘΙΑ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δρ Καλογεροπούλου Θεοδώρα, Διευθύντρια Ερευνών

Δρ Τσοτίνης Ανδρέας, Καθηγητής

Δρ Παπαναστασίου Ιωάννης, Επίκουρος Καθηγητής

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν νέες βιοεμπνευσμένες υβριδικές ενώσεις της υδροξυτυροσόλης και της 4θειατοκοφερόλης.

Στόχος της εργασίας είναι η ενεργοποίηση του 20S πρωτεασώματος με πιθανή εφαρμογή στη θεραπεία και στην πρόληψη των ηλικιο-εξαρτώμενων ασθενειών, και στη γήρανση. Ο σχεδιασμός των νέων αναλόγων βασίστηκε σε αποτελέσματα προηγούμενων μελετών (μη δημοσιευμένα αποτελέσματα στα πλαίσια του χρηματοδοτούμενου έργου «ΣΘΕΝΟΣ») της Ομάδας Φαρμακευτικής Χημείας του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

Συντέθηκαν 5 νέες ενώσεις συνδυάζοντας σε ένα μόριο την υδροξυτυροσόλη που είναι δομικό συστατικό της ελευρωπαΐνης και την 4-θειατοκοφερόλη, που είναι (βιο)ισοστερές του χρωμανικού δακτυλίου της τοκοφερόλης. Οι δύο αυτές δομικές μονάδες συνδέονται μέσω πενταμελών ετεροκυκλικών δακτυλίων, οι οποίοι χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα ως (βιο)ισοστερή αμιδίου ή εστέρα, και ως φαρμακοφόρες ομάδες.

Η βιολογική αποτίμηση πραγματοποιήθηκε από την ερευνητική ομάδα της Δρ Νίκης Χονδρογιάννη από την υποψήφια Διδάκτορα Νικόλ Παπαευγενίου στο Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών. Εξετάστηκε η επίδραση των νέων ενώσεων στην πρωτεασωμική ενεργότητα χυμοθρυψίνης σε νεαρούς HFL-1 πρωτογενείς ινοβλάστες. Τα πειράματα έδειξαν ενεργοποίηση του πρωτεασώματος σε παρόμοιο ποσοστό, από τις ενώσεις που φέρουν ως υποκαταστάτη τον 1,2,3-τριαζολικό δακτύλιο, τον 1,2,4οξαδιαζολικό δακτύλιο και τον 1,3,4-οξαδιαζολικό δακτύλιο, σε συγκέντρωση 0.5 μg/mL. Η λιγότερο δραστική ένωση σε συγκέντρωση 0.5 μg/mL είναι η ένωση που είναι υποκατεστημένη με τον ισοξαζολικό δακτύλιο.

ABSTRACT

The present thesis involves the design and synthesis of new bio-inspired hydroxytyrosol/4-thiatocopherol hybrids.

The design of these analogues was based on previous studies of the research group of the Institute of Biology, Medicinal Chemistry and Biotechnology of the National Hellenic Research Foundation

The aim of the work was the synthesis of novel compounds that can activate 20S proteasome and thus, may have a beneficial or therapeutic effect against human aging and/or in age related diseases and conditions.

In the context of the present study 5 new hybrid compounds were synthesized that combine hydroxytyrosol, which is the main antioxidant phenolic constituent of olive oil and structural component of oleuropein and 4-thiatocopherol which is a bioisostere of the chroman ring of tocopherol. The two subunits were connected by five-membered heterocycle rings which are either bioisosteres of the amide or ester bond or pharmacophores.

The biological evaluation of the new compounds was performed by Dr. Niki Chondrogiannis' research team by Ph.D. candidate Nikole Papaevgeniou at the Institute of Biology, Medicinal Chemistry and Biotechnology of the National Hellenic Research Foundation. The effect of the novel compounds on the chymotrypsin proteasome activation in young primary HFL-1 fibroblasts was examined.

The experiments showed proteasome activation at similar level by the compounds that are substituted by a 1,2,3-triazole, a 1,2,4-oxadiazole and a 1,3,4-oxadiazole ring at a concentration of 0.5 μ g/mL. The least active compound at concentration of 0.5 μ g / mL is the isoxazole ring-substituted derivative.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών υπό την επίβλεψη της Δρ. Θεοδώρας Καλογεροπούλου, Διευθύντριας Ερευνών και μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη Δρ Θεοδώρα Καλογεροπούλου για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στην ερευνητική της ομάδα αλλά κυρίως για την καθοδήγηση της, τις πολύτιμες επιστημονικές συμβουλές της και πάνω από όλα την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, καθ' όλη την διάρκεια της εργασίας αυτής.

Στη συνέχεια θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής τον Καθηγητή Ανδρέα Τσοτίνη και τον Επίκουρο Καθηγητή Ιωάννη Παπαναστασίου για τις πολύτιμες υποδείξεις και τις συμβουλές τους κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον Δρ Κυριάκο Προυσή για την αμέριστη βοήθεια του σε όλα τα θέματα και τις δυσκολίες που προέκυψαν κατά τη διάρκεια της εργασίας μου καθώς και για τις πολύτιμες γνώσεις και συμβουλές του.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην ομάδα της Δρ Νίκης Χονδρογιάννη και ιδιαίτερα στην υποψήφια Διδάκτορα Νικόλ Παπαευγενίου για το σχεδιασμό και την εκτέλεση των βιολογικών πειραμάτων.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ Μαρία Κουφάκη, τον Δρ Δημήτρη Παπαχατζή, την MSc Ελένη Σιάπη, την Δρ Μαρία Ζερβού και τον Δρ Κωνσταντίνο Ποταμίτη για την επιστημονική βοήθεια και τις παρατηρήσεις τους.

Τέλος ευχαριστώ θερμά τα υπόλοιπα μέλη της ερευνητικής ομάδας της Δρ Θ. Καλογεροπούλου τους Ο. Κιρκιλέση MSc, Δρ. Γ. Μαγουλά, Δρ. Μ. Ρουσσάκη, τον υποψήφιο διδάκτορα Ι. Χριστόπουλο, Δρ. Θ. Φωτοπούλου καθώς και την υποψήφια Διδάκτορα Δ. Πουρνάρα και την Υ. Μπατσή MSc για το άψογο κλίμα συνεργασίας μέσα στο οποίο δούλεψα όλους αυτούς τους μήνες.

Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ στους δικούς μου ανθρώπους για την κατανόηση και τη στήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	. 18
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	. 19
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	. 19
1.1 Γενικά	. 19
1.2 Σύστημα Ουβικιτίνης – Πρωτεασώματος (UPS)	. 20
1.2.1 Ο ρόλος της ουβικιτίνης	. 20
1.2.2 Πρωτεάσωμα – Πρωτεολυτικός μηχανισμός	. 22
Πρωτεάσωμα 205	22
Ρυθμιστικές υπομονάδες του πρωτεασώματος 20S	23
1.3 Παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με την ενεργότητα πρωτεασώματος	του 26
1.4 Το πρωτεάσωμα ως θεραπευτικός στόχος	. 29
1.4.1 Αναστολείς του πρωτεασώματος	29
1.4.2 Ενεργοποιητές του πρωτεασώματος	. 33
1.5 Ελευρωπαΐνη	35
1.6 Βιταμίνη Ε	36
1.6.1 Η δομή και ο βιολογικός ρόλος της βιταμίνης Ε	36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	40
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	40
2.1 Σκοπός της ερευνητικής εργασίας	40
2.2 Σύνθεση ετεροκυκλικών αναλόγων της 4-θειατοκοφερόλης	. 43
2.2.1 Αντίδραση Diels-Alder	. 45
2.2.2 1,3-διπολική κυκλοπροσθήκη	49
_2.2.3 Αντίδραση κυκλοπροσθήκης κλικ	52
2.3 Σύνθεση τριαζολικού υβριδικού αναλόγου της θειατοκοφερόλης/υδροξυτυροσόλης 19	4- 55

	2.4 θειατ	Σύνθεση οκοφερόλης,	ισοξαζολικού /υδροξυτυροσόλης	υβ <u>ι</u> 	οιδικού	αναλόγου	της	4- 68
	2.5 θειατ	Σύνθεση οκοφερόλης,	1,2,4-οξαδιαζολικ /υδροξυτυροσόλης	κού 	υβριδικού	αναλόγου	της	4- 77
	2.6 θειατ	Σύνθεση οκοφερόλης,	1,3,4-οξαδιαζολικ /υδροξυτυροσόλης	:ών	υβριδικών	αναλόγων	της	4- 86
КЕФА	ΑΛΑΙΟ 3							. 103
ΒΙΟΛ ΘΕΙΑ	ОГІКН ТОКОФЕ	ΑΠΟΤΙΜΙ ΕΡΟΛΗΣ/ΥΔΡΟ	ΗΣΗ ΤΩΝ ΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗΣ	ΝΕΩΝ	ΥΒΡΙΔ	ΙΚΩΝ ΕΝΩ	ΣΕΩΝ	4- . 103
	3.1 EIΣ	ΑΓΩΓΗ						. 103
	3.2 ПEI	ΡΑΜΑΤΙΚΟ Ν	1ΕΡΟΣ					. 103
	3.3 АП	ΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	۹					. 104
	3.4 ΣYN	ΜΠΕΡΑΣΜΑΤ	۹					. 109
κεφΑ	ΑΛΑΙΟ 4							. 110
ΣΥΜΓ	1EPAΣΜ	АТА						. 110
κεφΑ	ΑΛΑΙΟ 5							. 111
ΠΕΙΡΑ	ΑΜΑΤΙΚΟ	Ο ΜΕΡΟΣ						. 111
ΣΥΝΤ	ΟΜΟΓΡΑ	ΑΦΙΕΣ						. 148
ΠΑΡΑ	PTHMA							. 149
ΒΙΒΛΙ	ογραφι	A						. 182

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Μόριο ουβικιτίνης προσδεδεμένο με κατάλοιπα λυσίνης των πρωτεϊνών που προορίζονται για αποικοδόμηση
Εικόνα 2: Πορεία ουβικιτινυλίωσης
Εικόνα 3: Τετραουβικιτίνη. Τέσσερα μόρια ουβικιτίνης συνδέονται με ισοπεπτιδικούς δεσμούς. Αυτή η μονάδα αποτελεί το βασικό σήμα αποικοδόμησης μιας πρωτεΐνης21
Εικόνα 4: Πρωτεάσωμα 26S (30S)22
Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση του 20S πρωτεασώματος (Α) και του ανοσοπρωτεασώματος (Β)
Εικόνα 6: Σύστημα ουβικιτίνης – πρωτεασώματος (UPS)25
Εικόνα 7: Πεπτιδικά ανάλογα, αναστολείς του πρωτεασώματος
Εικόνα 8: Πεπτιδικά φυσικά προϊόντα, αναστολείς του πρωτεασώματος
Εικόνα 9: Μη πεπτιδικά φυσικά προϊόντα, αναστολείς του πρωτεασώματος
Εικόνα 10: Φυσικά προϊόντα, ενεργοποιητές του πρωτεασώματος
Εικόνα 11: Δομή του αναλόγου του μπετουλινικού οξέος DSB, αναστολέας του πρωτεασώματος
Εικόνα 12: Δομή της ελευρωπαΐνης:(α) Γλυκόζη (β) Ελενολικό οξύ (γ)Υδροξυτυροσόλη 35
Εικόνα 13: Φαρμακολογικές ιδιότητες της ελευρωπαΐνης
Εικόνα 14: Δομή της βιταμίνη Ε που αποτελείται από ένα μίγμα τεσσάρων αναλόγων της τοκοφερόλης (1a - d) και τεσσάρων αναλόγων της τοκοτριενόλης (2a - d)
Εικόνα 15: Τμήματα της χημικής δομής των τοκοφερολών
Εικόνα 16: Τρισδιάστατη απεικόνιση της δομής των τοκοτριενολών και των τοκοφερολών.
Εικόνα 17: Οξειδοαναγωγικό σύστημα ανακύκλωσης της α-τοκοφερόλης (ΤΟΗ):
Εικόνα 18: Παραδείγματα φαινολικών αντιοξειδωτικών ουσιών
Εικόνα 19: Δεσμική αλληλεπικάλυψη MO: (α) supra – μετωπική, (β) antara - μετωπική 46
Εικόνα 20: Αλληλεπίδραση ανάμεσα σε MOs στις αντιδράσεις Diels-Alder κανονικής και αντίστροφης ηλεκτρονιακής απαίτησης
Εικόνα 21: Ενδο και εξω στερεοχημεία δικυκλικών συστημάτων

Εικόνα 22: Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ΜΟ του διενίου και του διενόφιλου στην αντίδραση Diels-Alder κανονικής (α), ουδέτερης (β) και αντίστροφης (γ) ηλεκτρονιακής απαίτησης
Εικόνα 23: Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ΜΟ του 1,3-διπόλου και του διπολόφιλου στην 1,3- διπολική κυκλοπροσθήκη
Εικόνα 24: Τελικά προϊόντα – υβριδικά ανάλογα 4-θειατοκοφερόλης και υδροξυτυροσόλης. 54
Εικόνα 25: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 19 σε CDCl₃61
Εικόνα 26: Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 19 σε CDCl ₃ 61
Εικόνα 27: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης 19 σε CDCl₃62
Εικόνα 28: Ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης 19 σε CDCl₃63
Εικόνα 29: Ετεροπυρηνικό φάσμα ΗΜΒC της ένωσης 19 σε CDCl3
Εικόνα 30: Φάσμα ¹ Η NMR της ένωσης 27 σε CDCl ₃ 71
Εικόνα 31: Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 27 σε CDCl ₃ 71
Εικόνα 32: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης 27 σε CDCl₃
Εικόνα 33: Ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης 27 σε CDCl₃
Εικόνα 34: Ετεροπυρηνικό φάσμα ΗΜΒC της ένωσης 27 σε CDCl3
Εικόνα 35: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 32 σε CDCl₃80
Εικόνα 36: Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 32 σε CDCl ₃ 80
Εικόνα 37: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης 32 σε CDCl₃
Εικόνα 38: Ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης 32 σε CDCl₃
Εικόνα 39: Ετεροπυρηνικό φάσμα ΗΜΒC της ένωσης 32 σε CDCl383
Εικόνα 40: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 38 σε CDCl₃90
Εικόνα 41: Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 38 σε CDCl ₃ 90
Εικόνα 42: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης 38 σε CDCl₃91
Εικόνα 43: Ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης 38 σε CDCl₃
Εικόνα 44: Ετεροπυρηνικό φάσμα ΗΜΒC της ένωσης 38 σε CDCl₃
Εικόνα 45: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 39 σε CDCl₃97
Εικόνα 46: Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 39 σε CDCl₃97 9

Εικόνα 47: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης 39 σε CDCl₃	91
Εικόνα 48: Ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης 39 σε CDCl₃	99
Εικόνα 49: Ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC της ένωσης 39 σε CDCl₃	100

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: υδροξυτυρ	Σχηματική οσόλης/4-θεια	απεικόνιση τοκοφερόλης.	σχεδιασμού	των νε	έων ι	νβριδικών	<i>ενώσεων</i> 40
Σχήμα 2: Δ	ομή των νέων υ	ιβριδικών ενώ	σεων				42
Σχήμα 3: Α	ντίστροφη ανά	λυση σχεδιασμ	ιού των νέων ε	νώσεων 1	19, 27, 3	32, 38 και 3	<i>9.</i> 43
Σχήμα 4: Α	ντίστροφη ανά	λυση σχεδιασμ	ιού της ένωσης	; 16			43
Σχήμα 5: Α	ντίστροφη ανά	λυση σχεδιασμ	ιού της ένωσης	; 24			44
Σχήμα 6: Α	ντίστροφη ανά	λυση σχεδιασμ	ιού της ένωσης	; 29			44
Σχήμα 7: Α	ντίστροφη ανά	λυση σχεδιασμ	ιού της ένωσης	; 36			44
Σχήμα 8: Ν	Ιηχανισμός της	αντίδρασης κι	<i>ικλοπροσ</i> θήκη	ς Diels-Alı	der		45
Σχήμα 9: 1,	3-διπολική κυκ	λοπροσθήκη.					49
Σχήμα 10: Ι	Κατηγορίες 1,3-	διπόλων που	συμμετέχουν ο	ε 1,3-διπ	ολική κ	υκλοπροσθ	ή <i>κη</i> 49
Σχήμα 11: <i>,</i>	Αντίδραση κυκλ	ιοπροσθήκης ι	κλικ (click) κατα	<i>κλυόμενη</i>	από Cι	<i>I</i>	53
Σχήμα 12: I	Ρετροσυνθετικι	ή ανάλυση σχε	διασμού της έι	νωσης 19.			55
Σχήμα 13: 2	Σύνθεση του φί	θαλιμιδοσουλ	φενυλοχλωριδι	lou 3			56
Σχήμα 14: ž	Σύνθεση του ο-	-υδροξυ-Ν-ϑει	οφθαλιμιδικού	παραγώ	γου 7		56
Σχήμα 15: 2	Σύνθεση της έν	νωσης 16					57
Σχήμα 16: I	Μηχανισμός κυ	κλοπροσθήκη	ς Click για τη σ	ύνθεση το	ου τρια	ζολικού ανα	κλόγου 14. 58
Σχήμα 17: 2	Σύνθεση της έν	ωσης 19					59
Σχήμα 18: Ι	Ρετροσυνθετικι	ή ανάλυση σχε	διασμού της έι	νωσης 27.			68
Σχήμα 19: ž	Συνθεση της έν	νωσης 24		•••••			69
Σχήμα 20: κετο αναλό	Μηχανισμός [3 όγου 23	+2] διπολικής	κυκλοπροσθή	κης για τι	η σύνθ	εση του ισο	οξαζολικού 69
Σχήμα 21: 2	Σύνθεση της έν	ωσης 27					70
Σχήμα 22: I	Ρετροσυνθετικη	ή ανάλυση σχε	διασμού της έν	νωσης 32.			77
Σχήμα 23: 2	Σύνθεση της έν	ωσης 29					78
Σχήμα 24: I	Μηχανισμός σύ	νθεσης της έν	ωσης 29				78

11

Σχήμα 25: Σύνθεση της ένωσης 32	79
Σχήμα 26: Ρετροσυνθετική ανάλυση σχεδιασμού των ενώσεων 38, 39	86
Σχήμα 27: Σύνθεση της ένωσης 36	87
Σχήμα 28: Μηχανισμός σύνθεσης της ένωσης 35	87
Σχήμα 29: Μηχανισμός κυκλοποίησης προς την ένωση 36	87
Σχήμα 30: Συνθετική πορεία των ενώσεων 38 και 39	88

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Οι κυριότερες κατηγορίες 1,3-διπόλων	. 50
Πίνακας 2: Χημικές μετατοπίσεις ¹Η και ¹³C (ppm) της ένωσης 19	. 67
Πίνακας 3: Χημικές μετατοπίσεις ¹Η και ¹³C (ppm) της ένωσης 27	. 76
Πίνακας 4: Χημικές μετατοπίσεις ¹ Η και ¹³ C (ppm) της ένωσης 32	. 85
Πίνακας 5: Χημικές μετατοπίσεις ¹ Η και ¹³ C (ppm) της ένωσης 38	. 95
Πίνακας 6: Χημικές μετατοπίσεις ¹Η και ¹³C (ppm) της ένωσης 39	102

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΙΣΤΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Ιστόγραμμα 1: Ποσοστά πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης σε νεαρούς πρωτογενείς ινοβλάστες παρουσία της ένωσης 19	<i>HFL-1</i> 104
Ιστόγραμμα 2: Ποσοστά πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης σε νεαρούς πρωτογενείς ινοβλάστες παρουσία της ένωσης 27	<i>HFL-1</i> 105
Ιστόγραμμα 3: Ποσοστά πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης σε νεαρούς πρωτογενείς ινοβλάστες παρουσία της ένωσης 32	<i>HFL-1</i> 106
Ιστόγραμμα 4: Ποσοστά πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης σε νεαρούς πρωτογενείς ινοβλάστες παρουσία της ένωσης 38	<i>HFL-1</i> 107
Ιστόγραμμα 5: Ποσοστά πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης σε νεαρούς πρωτογενείς ινοβλάστες παρουσία της ένωσης 39	<i>HFL-1</i> 108

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΟΣ

Εικόνα Π. 1: Φάσμα ¹ Η NMR της ένωσης 2 σε $CDCl_3$	149
Εικόνα Π. 2: Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 2 σε CDCl₃	149
Εικόνα Π. 3: Φάσμα ¹ Η NMR της ένωσης 4 σε CDCl ₃	150
Εικόνα Π. 4: Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 4 σε CDCl₃	150
Εικόνα Π. 5: Φάσμα ¹ Η NMR της ένωσης 5 σε CDCl ₃	151
Εικόνα Π. 6: Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 5 σε CDCl₃	151
Εικόνα Π. 7: Φάσμα ¹ Η NMR της ένωσης 6 σε CDCl ₃	152
Εικόνα Π. 8: Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 6 σε CDCl₃	152
Εικόνα Π. 9: Φάσμα ¹ Η NMR της ένωσης 7 σε CDCl ₃	153
Εικόνα Π. 10: Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 7 σε CDCl₃	153
Εικόνα Π. 11: Φάσμα ¹ Η NMR της ένωσης 9 σε CD₃OD	154
Εικόνα Π. 12: Φάσμα ¹ Η NMR της ένωσης 10 σε CDCl ₃	154
Εικόνα Π. 13: Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 10 σε CDCl ₃	155
Εικόνα Π. 14: Φάσμα ¹ Η NMR της ένωσης 11 σε CDCl ₃	155
Εικόνα Π. 15: Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 11 σε CDCl ₃	156
Εικόνα Π. 16: Φάσμα ¹ Η NMR της ένωσης 12 σε CDCl ₃	156
Εικόνα Π. 17: Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 12 σε CDCl ₃	157
Εικόνα Π. 18: Φάσμα ¹ Η NMR της ένωσης 13 σε CDCl ₃	157
Εικόνα Π. 19: Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 13 σε CDCl₃	158
Εικόνα Π. 20: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 14 σε CD₃OD	158
Εικόνα Π. 21: Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 14 σε CD ₃ OD	159
Εικόνα Π. 22: Φάσμα ¹ Η NMR της ένωσης 15 σε CDCl _{3.}	159
Εικόνα Π. 23: Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 15 σε CDCl ₃	160
Εικόνα Π. 24: Φάσμα ¹ Η NMR της ένωσης 16 σε CDCl₃	160
Εικόνα Π. 25: Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 16 σε CDCl ₃	161
Εικόνα Π. 26: Φάσμα ¹ Η NMR της ένωσης 17 σε CDCl₃	161 15
	L-1

Εικόνα Π. 27: Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 17 σε CDCl₃	162
Εικόνα Π. 28: Φάσμα ¹ Η NMR της ένωσης 18 σε CDCl ₃	162
Εικόνα Π. 29: Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 18 σε CDCl₃	163
Εικόνα Π. 30: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 19 σε CDCl₃	163
Εικόνα Π. 31: Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 19 σε CDCl ₃	164
Εικόνα Π. 32: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 20 σε (CD₃)₂CO	164
Εικόνα Π. 33: Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 20 σε (CD ₃) ₂ CO	165
Εικόνα Π. 34: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 21 σε CDCl₃	165
Εικόνα Π. 35: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 22 σε CDCl₃	166
Εικόνα Π. 36: Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 22 σε (CD ₃) ₂ CO	166
Εικόνα Π. 37: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 23 σε CDCl₃	167
Εικόνα Π. 38: Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 23 σε CDCl ₃	167
Εικόνα Π. 39: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 24 σε CDCl₃	168
Εικόνα Π. 40: Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 24 σε CDCl ₃	168
Εικόνα Π. 41: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 26 σε CDCl₃	169
Εικόνα Π. 42: Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 26 σε CDCl ₃	169
Εικόνα Π. 43: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 27 σε CDCl₃	170
Εικόνα Π. 44: Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 27 σε CDCl ₃	170
Εικόνα Π. 45: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 28 σε CDCl₃	171
Εικόνα Π. 46: Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 28 σε CDCl ₃	171
Εικόνα Π. 47: Φάσμα ¹ Η NMR της ένωσης 29 σε CD ₃ OD 3	172
Εικόνα Π. 48: Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 29 σε CD ₃ OD	172
Εικόνα Π. 49: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 31 σε CDCl₃	173
Εικόνα Π. 50: Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 31 σε CDCl ₃	173
Εικόνα Π. 51: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 32 σε CDCl₃	174
Εικόνα Π. 52: Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 32 σε CDCl ₃	174
Εικόνα Π. 53: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 33 σε CDCl₃	175

Εικόνα Π. 54: Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 33 σε CDCl ₃	175
Εικόνα Π. 55: Φάσμα ¹ Η NMR της ένωσης 34 σε CDCl ₃	176
Εικόνα Π. 56: Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 34 σε CDCl ₃	176
Εικόνα Π. 57: Φάσμα ¹ Η NMR της ένωσης 35 σε CDCl ₃	177
Εικόνα Π. 58: Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 35 σε CDCl ₃	177
Εικόνα Π. 59: Φάσμα ¹ Η NMR της ένωσης 36 σε CDCl ₃	178
Εικόνα Π. 60: Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 36 σε CDCl ₃	178
Εικόνα Π. 61: Φάσμα ¹ Η NMR της ένωσης 37 σε CDCl ₃	179
Εικόνα Π. 62: Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 37 σε CDCl ₃	179
Εικόνα Π. 63: Φάσμα ¹ Η NMR της ένωσης 38 σε CDCl ₃	180
Εικόνα Π. 64: Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 38 σε CDCl ₃	180
Εικόνα Π. 65: Φάσμα ¹ Η NMR της ένωσης 39 σε CDCl ₃	181
Εικόνα Π. 66: Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 39 σε CDCl ₃	181

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών υπό την επίβλεψη της Διευθύντριας Ερευνών Δρ. Θεοδώρας Καλογεροπούλου.

<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1</u>

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά

Η γήρανση είναι μια αναπόφευκτη και φυσιολογική διαδικασία φθίνουσας εξέλιξης κάθε οργανισμού. Η γήρανση και η μακροβιότητα ελέγχονται από ένα πλήθος μοριακών μηχανισμών και σηματοδοτικών μονοπατιών σε συνδυασμό με ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες για την διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης. Κάθε κυτταρική λειτουργία είναι αποτέλεσμα της δομής και της δράσης των πρωτεϊνών, συνεπώς η γήρανση και οι σχετιζόμενες με αυτήν παθήσεις όπως η νόσος Huntington (HD), η νόσος Alzheimer (AD) και η νόσος Parkinson (PD), συνδέονται με την ικανότητα του κυττάρου να διαφυλάσσει την πρωτεϊνική

Η πρωτεόσταση διασφαλίζεται από ένα σύνολο ρυθμιστικών δικτύων που ελέγχουν την πρωτεϊνοσύνθεση, την αναδίπλωση, τη διακίνηση, τη συσσωμάτωση και την αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Διαταραχές της πρωτεόστασης έχουν παρατηρηθεί σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις κατά τη γήρανση και έχουν σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευση κατεστραμμένων και μη λειτουργικών πρωτεϊνών.

Η αναγνώριση, σήμανση και αποικοδόμηση των μη λειτουργικών πρωτεϊνών επιτυγχάνεται μέσω ειδικών μηχανισμών αποικοδόμησης όπως είναι το σύστημα ουβικιτίνης – πρωτεασώματος (**UPS** – **U**biquitin **P**roteasome **S**ystem) ή μέσω της διαδικασίας της αυτοφαγίας με λυσοσώματα.

Το σύστημα ουβικιτίνης – πρωτεασώματος είναι η κύρια οδός αποικοδόμησης κατεστραμμένων ή μη λειτουργικών δομών στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Αποτελεί έναν ακριβή μηχανισμό με ιδιαίτερα μεγάλη σημασία αφού εμπλέκεται σε μία πληθώρα κυτταρικών λειτουργιών όπως είναι η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η λειτουργία των βλαστοκυττάρων, ο μεταβολισμός, η γονιδιακή έκφραση, η ανοσολογική απόκριση, ο έλεγχος της καρκινογένεσης, η επιδιόρθωση του DNA και το οξειδωτικό στρες.

Η ρύθμιση της λειτουργίας του πρωτεασώματος δύναται να επιμηκύνει το προσδόκιμο ζωής καθυστερώντας την εμφάνιση συμπτωμάτων που σχετίζονται με τις διαταραχές της πρωτεόστασης.¹

1.2 Σύστημα Ουβικιτίνης - Πρωτεασώματος (UPS)

1.2.1 Ο ρόλος της ουβικιτίνης

Το πρώτο στάδιο της αποικοδόμησης μέσω του συστήματος ουβικιτίνης – πρωτεασώματος είναι η ομοιοπολική σύζευξη της ουβικιτίνης, ενός πολυπεπτιδίου 76 αμινοξέων, με την πρωτεΐνη που προορίζεται για αποικοδόμηση. Συγκεκριμένα συνδέεται η καρβοξυ-τελική γλυκίνη της ουβικιτίνης (Ub) με την ε-αμινομάδα καταλοίπων λυσίνης των πρωτεϊνών προς αποικοδόμηση (Εικόνα **1**). Η απαιτούμενη ενέργεια για τον σχηματισμό των πεπτιδικών δεσμών προέρχεται από την υδρόλυση της ΑΤΡ.



Εικόνα 1: Μόριο ουβικιτίνης προσδεδεμένο με κατάλοιπα λυσίνης των πρωτεϊνών που προορίζονται για αποικοδόμηση.

Τρεις τάξεις ενζύμων συμμετέχουν στη διαδικασία της ουβικιτινυλίωσης των πρωτεϊνών. Αρχικά το ένζυμο E1 ενεργοποιεί την καρβοξυ-τελική γλυκίνη της ουβικιτίνης (Ub). Η ενεργοποιημένη ουβικιτίνη μεταφέρεται σε μια σουλφυδρυλική ομάδα ενός καταλοίπου κυστεΐνης του ενζύμου E2. Τέλος το ένζυμο E3 που είναι μία λιγάση, καταλύει τη μεταφορά της ουβικιτίνης από το E2 σε μια ε-αμινομάδα καταλοίπου λυσίνης στην πρωτεΐνη στόχο (Εικόνα **2**).



Εικόνα 2: Πορεία ουβικιτινυλίωσης.

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα υπάρχουν 2 διακριτά ένζυμα Ε1 ενώ υπάρχουν πολλά διακριτά ένζυμα Ε2 και Ε3, κάθε ένα από τα οποία αναγνωρίζει μία ή περισσότερες διαφορετικές οικογένειες πρωτεϊνών. Με τον τρόπο αυτό, το Ε3 εξασφαλίζει σε μεγάλο βαθμό την εξειδίκευση στην επιλογή του υποστρώματος προς ουβικιτινυλίωση ενώ οι πολλαπλοί συνδυασμοί Ε2 – Ε3 επιτρέπουν τον συντονισμό της διάκρισης του υποστρώματος.

Με τον ίδιο τρόπο η διαδικασία της ουβικιτινυλίωσης συνεχίζεται σχηματίζοντας αλυσίδες μέσω της σύνδεσης της ε-αμινομάδας του καταλοίπου λυσίνης 48 του ενός μορίου ουβικιτίνης στην τελική καρβοξυλομάδα του άλλου (Εικόνα **3**). Αλυσίδες τεσσάρων ή περισσότερων μορίων ουβικιτίνης αποτελούν το σήμα για την έναρξη της αποικοδόμησης από το πρωτεάσωμα.²



Εικόνα 3: Τετραουβικιτίνη. Τέσσερα μόρια ουβικιτίνης συνδέονται με ισοπεπτιδικούς δεσμούς. Αυτή η μονάδα αποτελεί το βασικό σήμα αποικοδόμησης μιας πρωτεΐνης

1.2.2 Πρωτεάσωμα – Πρωτεολυτικός μηχανισμός

Το πρωτεάσωμα είναι μία ενδοκυτταρική πρωτεάση και αποτελεί περίπου το 1% των κυτταρικών πρωτεϊνών. Βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, στον πυρήνα ή στο ενδοπλασματικό δίκτυο των ευκαρυωτικών κυττάρων αλλά και σε ορισμένα βακτήρια.

Το πρωτεάσωμα υφίσταται σε διαφορετικές μορφές. Η πιο συνηθισμένη του μορφή αποτελείται από μία κεντρική δομή, το πρωτεάσωμα 20S και τη ρυθμιστική υπομονάδα 19S. Το 26S πρωτεάσωμα είναι το σύμπλεγμα που προκύπτει όταν η ρυθμιστική υπομονάδα 19S προσδένεται στο ένα άκρο του 20S. Όταν η 19S προσδένεται και στα δύο άκρα του 20S, προκύπτει το 30S πρωτεάσωμα (Εικόνα **4**).



Εικόνα 4: Πρωτεάσωμα 26S (30S)

Πρωτεάσωμα 20S

To 20S πρωτεάσωμα είναι ένα καλά οργανωμένο σύμπλεγμα, μοριακού βάρους περίπου 700 KDa και αποτελεί το βασικό κορμό του πρωτεασώματος, αφού εκεί πραγματοποιείται η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών. Αποτελείται από 28 υπομονάδες, οι οποίες ταξινομούνται σε τέσσερις δακτυλίους των 7 υπομονάδων σχηματίζοντας μία κυλινδρική δομή. Οι δύο εξωτερικοί δακτύλιοι αποτελούνται από 7 υπομονάδες α (α1 – α7), ενώ οι δύο εσωτερικοί αποτελούνται από 7 υπομονάδες β (β1 – β7). Τρεις από τις β υπομονάδες, οι β1, β2 και β5, περιέχουν τα πρωτεολυτικά ενεργά κέντρα του ενζύμου. Συγκεκριμένα, η β1 αποτελεί το ενεργό κέντρο ενεργότητας κασπάσης (πεπτιδυλογλουταμυλο-υδρολάσης - PGPH), η β2 το ενεργό κέντρο ενεργότητας θρυψίνης ενώ η β5 το ενεργό κέντρο ενεργότητας χυμοθρυψίνης (CT-L) (Εικόνα **5**Α).

Το ανοσοπρωτεάσωμα είναι μία άλλη μορφή που αποτελείται από την κεντρική δομή 20S και μία ρυθμιστική υπομονάδα 11S προσδεδεμένη στο ένα ή και στα δύο

άκρα του και διαδραματίζει κύριο ρόλο στην αντιγονοπαρουσίαση. Σε αυτό, τα πρωτεολυτικά ενεργά κέντρα βρίσκονται στις υπομονάδες β₁, β₂, β₅ (Εικόνα **5B**).

Οι α υπομονάδες δημιουργούν αυθόρμητα επταμελείς δακτυλίους και αποτελούν μήτρες επάνω στις οποίες ενσωματώνονται οι β υπομονάδες. Επίσης αποτελούν σημεία πρόσδεσης για ρυθμιστικές υπομονάδες όπως η 19S, η 11S και η Blm10.³



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση του 20S πρωτεασώματος (A) και του ανοσοπρωτεασώματος (B)

Ρυθμιστικές υπομονάδες του πρωτεασώματος 20S

Το σύστημα του πρωτεασώματος περιλαμβάνει δύο πρωτεολυτικούς μηχανισμούς, τον ΑΤΡ-εξαρτώμενο που πραγματοποιείται από το 26S πρωτεάσωμα και τον ΑΤΡανεξάρτητο που πραγματοποιείται από το 20S πρωτεάσωμα. Το πρωτεάσωμα 20S χωρίς τις ρυθμιστικές υπομονάδες βρίσκεται σε ανενεργή μορφή (κλειστή δομή) και δεν έχει τη δυνατότητα να αποικοδομεί πολυουβικιτινυλιωμένες πρωτεΐνες. (Εικόνα **6**).⁴

• Ρυθμιστική υπομονάδα 19S (PA700)

Το **19S** σύμπλεγμα αποτελείται από 17 υπομονάδες που διακρίνονται σε 2 υποσυμπλέγματα, τη βάση (base) και το καπάκι (lid). Η βάση αποτελείται από έξι ΑΤΡάσες (Rpt1 - Rpt6) που ανήκουν στην ΑΑΑ οικογένεια (ΑΤΡάση που συνδέεται με ποικίλες κυτταρικές δράσεις – ATPaces Associated with different cellular Activities), και τρεις μη ΑΤΡάσες (Rpn1, Rpn2 και Rpn10). Οι ΑΤΡάσες δημιουργούν μια δομή εξαμελούς δακτυλίου. Η βάση βρίσκεται σε επαφή με το 20S σύμπλεγμα και είναι υπεύθυνη για το ξετύλιγμα του υποστρώματος, μέσω της υδρόλυσης του ΑΤΡ, καθώς και για την αναδιάταξη του 20S συμπλόκου προκειμένου να προωθηθούν τα υποστρώματα μέσα σε αυτό.

Το καπάκι το οποίο αποτελείται από οκτώ μη ΑΤΡάσες (Rpn3, Rpn5, Rpn6, Rpn7, Rpn8, Rpn9, Rpn11, και Rpn12), προσδένεται στην βάση μέσω αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στη Rpn12 και τη Rpn2 και ανάμεσα στη Rpn11 και τη Rpn1. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις φαίνεται να σταθεροποιούνται από την Rpn10. Το καπάκι είναι απαραίτητο για την αναγνώριση των πολυουβικιτινυλιωμένων υποστρωμάτων.

To 19S σύμπλεγμα έχει δράση ισοπεπτιδάσης που διασπά τις αλυσίδες ουβικιτίνης σε μονομερή για την επαναχρησιμοποίησή τους.

Ρυθμιστική υπομονάδα 11S (PA28)

Η ρυθμιστική υπομονάδα 11S (ή PA28) μπορεί να σχηματίσει σύμπλεγμα με το 20S πρωτεάσωμα συνδεόμενη στη μία ή και στις δύο άκρες του. Το 11S σύμπλεγμα δομείται από δύο υπομονάδες PA28 α και PA28 β, σχηματίζοντας έναν επταμελή δακτύλιο (3 PA28 α και 4 PA28 β) ή έναν εξαμελή δακτύλιο (3 PA28 α και 3 PA28 β). Ο κύριος ρόλος της ρυθμιστικής υπομονάδας PA28 α β αφορά στα κύτταρα του ανοσοποιητικού, διότι ενεργοποιείται παρουσία της ιντερφερόνης γ, και συμμετέχει στη διαδικασία της αντιγονοπαρουσίασης ευνοώντας τον σχηματισμό πεπτιδίων συγκεκριμένου μεγέθους και δομής.

Σε άλλη περίπτωση το σύμπλεγμα 11S δομείται από έναν επταμελή δακτύλιο της υπομονάδας PA28 γ και εμπλέκεται στον κυτταρικό κύκλο ρυθμίζοντας την αποικοδόμηση μικρών πρωτεϊνών, όπως είναι η p21. Η 11S υπομονάδα δεν έχει δράση ATPάσης και συμμετέχει μόνο στην αποικοδόμηση μικρών πεπτιδίων και όχι ολόκληρων πρωτεϊνών, διότι δεν έχει τη δυνατότητα να ξετυλίξει μεγαλύτερες δομές.

• Ρυθμιστική υπομονάδα Blm10/PA200

Μία άλλη μορφή του πρωτεασώματος αποτελείται από την κεντρική δομή 20S και τη ρυθμιστική υπομονάδα Blm10/PA200 σχηματίζοντας μια μονομερή πρωτεΐνη 250 kDa. Η ρυθμιστική υπομονάδα Blm10/PA200 έχει τη δυνατότητα να σχηματίσει υβριδικά πρωτεασώματα όταν συνδέεται στο ένα άκρο του 20S και στο άλλο άκρο η ρυθμιστική υπομονάδα 19S.⁵ Όπως η 11S υπομονάδα έτσι και η Blm10 δεν έχει δράση ΑΤΡάσης και δεν έχει την ικανότητα να αποικοδομεί ολόκληρες πρωτεΐνες αλλά μόνο μικρά πεπτίδια. Το Blm10 καλύπτει ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών. Εκτός από ρυθμιστική υπομονάδα του 20S πρωτεασώματος, εμπλέκεται στη διαδικασία επιδιόρθωσης του DNA, στη γονιδιακή σταθερότητα, στη διαδικασία σπερματογένεσης και στη μιτοχονδριακή ρύθμιση.⁶



Εικόνα 6: Σύστημα ουβικιτίνης – πρωτεασώματος (UPS)

1.3 Παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με την ενεργότητα του πρωτεασώματος

Το φαινόμενο της γήρανσης σχετίζεται μεταξύ άλλων με μεταβολές στην πρωτεολυτική ικανότητα του πρωτεασώματος. Η κατάσταση αυτή έχει ως συνέπεια τη συσσώρευση ανεπιθύμητων πρωτεϊνών που μπορεί να είναι κατεστραμμένες, εσφαλμένα αναδιπλωμένες ή να μην είναι πια απαραίτητες για τον οργανισμό. Η αυξημένη συγκέντρωση των ανεπιθύμητων πρωτεϊνών στον οργανισμό μπορεί να έχει τοξική δράση και να προκαλέσει παθολογικές καταστάσεις συμπεριλαμβανομένων των νευροεκφυλιστικών παθήσεων όπως είναι η νόσος Alzheimer (AD), η νόσος Huntington (HD), η νόσος Parkinson (PD) και η πλάγια αμυοτροφική σκλήρυνση (ALS).⁷

Nόσος Alzheimer (AD)

Η νόσος Alzheimer είναι η πιο κοινή ανάμεσα στις νευροεκφυλιστικές παθήσεις και οδηγεί σε διαταραχές μνήμης, ικανότητας κατανόησης και έκφρασης του λόγου, διαταραχές οπτικο-χωρικών δυνατοτήτων και νευρο-ψυχιατρικές διαταραχές, όπως κατάθλιψη και επιθετικότητα.

Οι ασθενείς με AD εμφανίζουν μειωμένη ενεργότητα του πρωτεασώματος στον εγκέφαλο σε σύγκριση με τα υγιή άτομα της ίδιας ηλικίας. Η AD χαρακτηρίζεται από την εναπόθεση αμυλοειδών πλακών και νευροϊνιδικών συμπλεγμάτων στον εγκέφαλο των ασθενών, τα οποία σχετίζονται με τη νευρική δυσλειτουργία και τον κυτταρικό θάνατο.

Το αμυλοειδές πεπτίδιο β (Αβ), που είναι το κύριο συστατικό της αμυλοειδούς πλάκας, προέρχεται από την ενζυμική πρωτεόλυση της πρόδρομης διαμεμβρανικής πρωτεΐνης APP που βρίσκεται στην επιφάνεια των εγκεφαλικών κυττάρων και σε άλλους ιστούς. Το πεπτίδιο Αβ συσσωρεύεται σχηματίζοντας αμυλοειδή, τα οποία εντοπίζονται στο παρέγχυμα του εγκεφάλου και γύρω από τα αιμοφόρα αγγεία. Η συσσώρευση του πεπτιδίου έχει νευροτοξική δράση και αποτελεί έναν από τους κύριους παθογόνους παράγοντες της νόσου.

Ένας δεύτερος παράγοντας που εμπλέκεται στη εξέλιξη της νόσου είναι η συσσώρευση μικροϊνιδικών συμπλεγμάτων που οφείλεται στη μη φυσιολογικά υπερφωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης τ (ταυ). Η πρωτεΐνη τ στη φυσιολογική της μορφή συμμετέχει στη συγκρότηση της δομής των μικροσωληνίσκων αλλά όταν υπερφωσφορυλιωθεί, συσσωρεύεται σε μικροϊνιδικά συμπλέγματα αποσταθεροποιώντας τους μικροσωληνίσκους και θέτει έτσι σε κίνδυνο την νευρωνική λειτουργία.

Nόσος Parkinson (PD)

Η νόσος Parkinson αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή νευροεκφυλιστική διαταραχή μετά την νόσο Alzheimer. Χαρακτηριστικά συμπτώματα της νόσου είναι η βραδυκινησία, ο τρόμος ηρεμίας, η αστάθεια καθώς και διαταραχές νοητικής φύσης, όπως η άνοια και η κατάθλιψη. Η PD οφείλεται στη συσσώρευση των σωματιδίων Lewy στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες. Τα σωματίδια Lewy αποτελούνται κυρίως από α-συνουκλεΐνη αλλά και από ουβικιτίνη, Ε3 λιγάση και άλλα συστατικά του UPS. Έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες για τον προσδιορισμό του ρόλου του πρωτεασώματος στην εκδήλωση της νόσου. Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια παρατηρήθηκε ότι η αναστολή του πρωτεασώματος οδήγησε σε συμπτώματα όπως βραδυκινησία και τρόμο καθώς και σε αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης α-συνουκλεΐνης στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες. Μελέτες που ακολούθησαν έδειξαν ότι η αναστολή της υπομονάδας PSMC1/RPt2 της ΑΤΡασης του πρωτεασώματος 26S ιδιαίτερα στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης της ουβικιτίνης και της α-συνουκλεΐνης που οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο. Τα αποτελέσματα των μελετών καταδεικνύουν τη σχέση του 26S πρωτεασώματος με την αποικοδόμηση της α-συνουκλεΐνης και κατ'επέκταση την εκδήλωση της νόσου.

Nόσος Huntington (HD)

Η νόσος του Huntington είναι μία αυτοσωμική, νευροεκφυλιστική ασθένεια του εγκεφάλου που εκδηλώνεται με συμπτώματα κινητικών, γνωσιακών και ψυχικών διαταραχών.

Η HD οφείλεται σε διεύρυνση της αλληλουχίας CAG του γονιδίου huntingtin που οδηγεί στο σχηματισμό μιας διευρυμένης αλυσίδας πολυγλουταμίνης στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης που προκύπτει από τη μετάφραση του γονιδίου. Μέχρι 26 επαναλήψεις της αλληλουχίας της CAG στο γονίδιο huntingtin αποτελεί σταθερή δομή και δεν οδηγεί στην εκδήλωση της νόσου. 27 έως 35 επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες είναι σχετικά ασταθείς δομές όμως τα συμπτώματα της νόσου δεν είναι αισθητά από τους ασθενείς. Ωστόσο ενδέχεται να διευρυνθούν σε μελλοντικές γενιές. Περισσότερες από 40 αλληλουχίες οδηγούν στην εκδήλωση της νόσου.

Το μεταλλαγμένο γονίδιο huntingtin οδηγεί στη συσσώρευση μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, κυρίως της πρωτεΐνης huntingtin, οι οποίες ενώ ουβικιτινυλιώνονται δεν είναι δυνατή η αποικοδόμησή τους από το σύστημα του πρωτεασώματος. Έχει παρατηρηθεί μειωμένη δράση του πρωτεασώματος σε εγκεφαλικά κύτταρα ασθενών ενώ η ενεργοποίησή του έχει θετική επίδραση στα συμπτώματα της νόσου. Σήμερα δεν είναι ακόμα σαφής ο μηχανισμός της ασθένειας, ενώ υπάρχουν ενδείξεις ότι η δυσλειτουργία του πρωτεασώματος είναι συνέπεια της νόσου και όχι το αντίθετο.

Αμυοτροφική Πλάγια Σκλήρυνση (ALS)

Η αμυοτροφική πλάγια σκλήρυνση γνωστή και ως νόσος κινητικού νευρώνα, είναι μια προοδευτική εκφυλιστική διαταραχή του νευρικού συστήματος και επηρεάζει τα νευρικά κύτταρα στον εγκέφαλο και στην σπονδυλική στήλη. Σε ασθενείς με αμυοτροφική πλάγια σκλήρυνση οι κινητικοί νευρώνες που στέλνουν ερεθίσματα από τον εγκέφαλο στους μυς σε όλο το σώμα καταστρέφονται με αποτέλεσμα ο εγκέφαλος να μην μπορεί να προκαλέσει και να ελέγξει την κίνηση των μυών οδηγώντας σε σπαστικότητα, δεσμιδώσεις και μυϊκή αδυναμία. Σε τελικό στάδιο επέρχεται πλήρης παράλυση.

Τα αίτια που προκαλούν την ALS δεν είναι απολύτως γνωστά, ωστόσο υπάρχει συσχέτιση του πρωτεασώματος με παράγοντες που οδηγούν στην εκδήλωση της νόσου. Η αναστολή της δράσης του πρωτεασώματος μέσω της απενεργοποίησης της υπομονάδας PSMC4/RPt3 οδηγεί σε μείωση της λειτουργικότητας των κινητικών νευρώνων ενώ προκαλείται αύξηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών TDP-43 και FUS, τα οποία αποτελούν χαρακτηριστικά της νόσου.

Καρκίνος

Η γήρανση αποτελεί επίσης έναν σημαντικό παράγοντα για την εκδήλωση καρκίνου. Ο καρκίνος χαρακτηρίζεται από τη μη ελεγχόμενη αύξηση της κυτταρικής επιβίωσης μέσω του ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Φαινομενικά η διαδικασία της γήρανσης και ο μηχανισμός εκδήλωσης καρκίνου είναι αντίστροφες πορείες, ωστόσο η συσσώρευση κατεστραμμένων κυττάρων κατά την διαδικασία της γήρανσης ενδέχεται να προάγει τους μηχανισμούς που οδηγούν στην εκδήλωση του καρκίνου. Σε πολλές μελέτες έχει παρατηρηθεί αυξημένη ενεργότητα του πρωτεασώματος σε περιπτώσεις καρκίνου στον άνθρωπο. Αυτό συμβαίνει διότι τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν αυξημένες ανάγκες παραγωγής και διάσπασης πρωτεϊνών εφόσον πολλαπλασιάζονται ταχύτατα. Όταν οι πρωτεΐνες των καρκινικών κυττάρων δεν διασπώνται από το πρωτεάσωμα, συσσωρεύονται στα κύτταρα οδηγώντας σε ενεργοποίηση μηχανισμών κατά του οξειδωτικού stress και κατά συνέπεια σε απόπτωση, επιβραδύνοντας έτσι την ανάπτυξη του καρκίνου.

1.4 Το πρωτεάσωμα ως θεραπευτικός στόχος

Η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών είναι μια διαδικασία απαραίτητη για τον έλεγχο της ομοιόστασης του κυττάρου. Η σημασία του συστήματος ουβικιτίνης – πρωτεασώματος στη διατήρηση της ομοιόστασης κάνει το πρωτεάσωμα έναν πολύτιμο θεραπευτικό στόχο. Η αναστολή ή η ενεργοποίηση του πρωτεασώματος αποτελούν στρατηγικές έναντι ασθενειών που σχετίζονται με διαταραχές της πρωτεόστασης.

1.4.1 Αναστολείς του πρωτεασώματος

Κατά τις τελευταίες δεκαετίες έχει σημειωθεί ραγδαία ανάπτυξη στην έρευνα για την ανακάλυψη και σύνθεση μορίων - αναστολέων του πρωτεασώματος. Η αποσαφήνιση της δομής του πρωτεασώματος και του μηχανισμού δράσης του παίζει σημαντικό ρόλο στην ανακάλυψη νέων ενώσεων με πιθανή φαρμακολογική δράση. Οι έως τώρα γνωστοί αναστολείς του πρωτεασώματος διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με την προέλευσή τους, στα μικρά συνθετικά μόρια και στα παράγωγα φυσικών προϊόντων.⁸

• Πεπτιδικά Ανάλογα

Η πλειοψηφία των μικρών συνθετικών μορίων που δρουν ως αναστολείς του πρωτεασώματος είναι πεπτιδικά ανάλογα που προσδένουν συνήθως στο ενεργό κέντρο των υπομονάδων β1, β2 και β5. Τα συνθετικά πεπτιδικά ανάλογα μπορεί να είναι αλδεϋδικά πεπτίδια, βορονικά πεπτίδια και σουλφονικά πεπτίδια (Εικόνα **7**).



Εικόνα 7: Πεπτιδικά ανάλογα, αναστολείς του πρωτεασώματος.

Τα αλδεϋδικά ανάλογα πεπτιδίων πρώτης γενιάς, όπως είναι το **MG132**, συντέθηκαν με στόχο τη μελέτη της δομής και της λειτουργίας του πρωτεασώματος. Το **MG132** είναι ένα τριπεπτιδικό αλδεϋδικό ανάλογο που προσδένεται στο καταλυτικό κέντρο της υπομονάδας β5 του πρωτεασώματος μέσω αλληλεπίδρασης με μια θρεονίνη του καταλυτικού κέντρου προς το σχηματισμό ενός αντιστρεπτού ημιακεταλικού ενδιάμεσου. Αντίστοιχα, η διπεπτιδική αλδεΰδη **CEP1612** εμφανίζει υψηλή εκλεκτικότητα για την υπομονάδα με ενεργότητα χυμοθρυψίνης (β5) του πρωτεασώματος.

Τα πεπτιδικά ανάλογα **ZLVS** και **NLVS** είναι δύο περιπτώσεις βινυλοσουλφονικών αναλόγων που προσδένονται εκλεκτικά και μη αντιστρεπτά στο ενεργό κέντρο με ενεργότητα χυμοθρυψίνης (β5) του πρωτεασώματος. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η αντικατάσταση της μεθυλομάδας του βινυλοσουλφονικού αναλόγου με φαινολική ομάδα οδηγεί σε εκλεκτικότητα για το ενεργό κέντρο της υπομονάδας β1 του πρωτεασώματος.

Τα βορονικά πεπτίδια εμφανίζουν υψηλή ανασταλτική δράση έναντι του πρωτεασώματος. Το **MG262** είναι ανάλογο βορονικού οξέος του **MG132** και εμφανίζει 100 φορές μεγαλύτερη ανασταλτική δράση έναντι του πρωτεασώματος από το αλδεϋδικό ανάλογο **MG132**.

Το βορονικό ανάλογο **PS341** (**Bortezomib**) είναι ο πρώτος αναστολέας πρωτεασώματος που εγκρίθηκε για τη θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος στον άνθρωπο, ενώ πλέον χρησιμοποιείται και για τη θεραπεία του λεμφώματος μανδύα. Το Bortezomib είναι ένα διπεπτιδικό βορονικό ανάλογο το οποίο προκαλεί αντιστρεπτή αναστολή στην υπομονάδα με ενεργότητα χυμοθρυψίνης του πρωτεασώματος 20S. Σε μορφή βορονικού οξέος σχηματίζει ψευδο-ομοιοπολικό δεσμό με την πυρηνόφιλη αλυσίδα της Thr1 στην S1 θέση της β5 υπομονάδας.⁹

Η αντικαρκινική δράση του Bortezomib σύμφωνα με τις προκλινικές μελέτες, (REF) οφείλεται στη ρύθμιση προαποπτωτικών πρωτεϊνών (NOXA, IκB), στην αναστολή του πρωτεϊνικού συμπλόκου NF-κB, αντι-αποπτωτικών γονιδίων και αρκετών αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών (Bcl-XL, Bcl-2 καιι STAT-3). Επιπλέον το Bortezomib οδηγεί σε μείωση της έκφρασης πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του DNA και επάγει στρες του ενδοπλασματικού δικτύου που ενεργοποιεί το μονοπάτι UPR (Unfolded Protein Response - απόκριση μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών) και οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση. Η δράση του Bortezomib μπορεί να ενισχυθεί σε συνδυασμό με άλλα αντικαρκινικά φάρμακα. Παρά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα υπάρχει το ενδεχόμενο υποτροπής σε ασθενείς που αρχικά είχαν ανταποκριθεί στη θεραπεία, ενώ παρενέργειες όπως η περιφερική νευροπάθεια έχουν συνδεθεί με τη χρήση του φαρμάκου.¹⁰

• Φυσικά προϊόντα

Πολλοί αναστολείς του πρωτεασώματος προέρχονται από φυσικά προϊόντα. Η **τυροπεπτίνη A** είναι μια τριπεπτιδική αλδεΰδη που έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Kitasatospora* sp MK993-dF2 και εμφανίζει εκλεκτικότητα ως προς την β5 υπομονάδα του πρωτεασώματος. Πεπτιδικές εποξυ κετόνες είναι μια δεύτερη κατηγορία αναστολέων πρωτεασώματος και έχουν απομονωθεί από διάφορους μικροοργανισμούς, όπως η εποξομυκίνη που προέρχεται από το βακτήριο *Streptomyces hygroscopicus* και τα **TMC-86** και **TMC-89** που προέρχονται από το βακτήριο συ αναστόλουν το πρωτεάσωμα τροποποιώντας ομοιοπολικά τα καταλυτικά κέντρα των β

Το **Carfilzomib** είναι μία τετραπεπτιδική επόξυ κετόνη ανάλογο της εποξομυκίνης, είναι αναστολέας του πρωτεασώματος δεύτερης γενιάς και χρησιμοποιείται από το 2012 σε υποτροπιάζουσες και ανθεκτικές περιπτώσεις πολλαπλού μυελώματος σε συνδυασμό με το ανοσορρυθμιστικό φάρμακο λεναλιδομίδη (Lenalidomide) και ντεξαμεθαζόνη (Dexamethasone). Το Carfilzomib προσδένεται μη αντιστρεπτά στην υπομονάδα με ενεργότητα χυμοθρυψίνης του πρωτεασώματος 20S. ¹¹

Το **PR39** είναι ένα ακόμα πεπτιδικό ανάλογο που προέρχεται από έντερο χοίρου και δρα ως αναστολέας του πρωτεασώματος προσδένοντας στην α7 υπομονάδα του 20S πρωτεασώματος. Το **PR39** όπως και το **PR11** που εμφανίζουν παρόμοια δράση, έχουν σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευση της προαποπτωτικής πρωτεΐνης ΙκΒ, η οποία ρυθμίζει την έκφραση NF-κB εξαρτώμενων γονιδίων.

Άλλοι αναστολείς πρωτεασώματος που προέρχονται από φυσικά προϊόντα ανήκουν στην κατηγορία των λακτονών, όπως είναι το Lactacystin και η ομάδα των Belactosins που προέρχονται από το βακτήριο Streptomyces sp., καθώς και το Salinosporamide A που απομονώθηκε από το θαλάσσιο μικροοργανισμό Salinospora tropica. Αυτές οι πεπτιδικές ενώσεις περιέχουν μια β λακτόνη ή πρόδρομες δομές β λακτόνης, η οποία μπορεί να σχηματίσει εστερικό δεσμό με αμινοξέα που περιέχουν μια υδροξυλομάδα, όπως η θρεονίνη. Το Lactacystin δύναται να μετατραπεί με μη ενζυματικό τρόπο στην ένωση Omuralide, η οποία αντιδρά με κατάλοιπα θρεονίνης σε καταλυτικά κέντρα του πρωτεασώματος.

Μία ακόμα κατηγορία ενώσεων με ανασταλτική δράση έναντι του πρωτεασώματος είναι τα κυκλικά πεπτίδια όπως είναι το **TMC-95A** και τα διαστερεομερή του που προέρχονται από το μύκητα *Apiospora montagnei Sacc*. Οι ενώσεις αυτής της κατηγορίας είναι πολύ ισχυροί αναστολείς του πρωτεασώματος και σε αντίθεση με τους αναστολείς που περιγράφηκαν έως τώρα δεν περιλαμβάνουν στη δομή τους κάποια λειτουργική ομάδα που να προσδένει σε κάποιο καταλυτικό κέντρο του

πρωτεασώματος. Αντίθετα, το **TMC-95A** δεσμεύει το καταλυτικό κέντρο μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και πολλαπλών δεσμών υδρογόνου.

Η **Argyrin A** είναι ένα ακόμα κυκλικό πεπτίδιο που απομονώθηκε από το βακτήριο *Archangium gephyra* και εμφανίζει αλληλεπίδραση με το πρωτεάσωμα όμοια με αυτή του Bortezomib αλληλεπιδρώντας με τις *β*1, *β*2 και *β*5 υπομονάδες.

Τέλος, υπάρχουν αρκετά μη πεπτιδικά φυσικά προϊόντα που απενεργοποιούν το πρωτεάσωμα όπως η **Withaferin A** από το ινδιάνικο χειμερινό κεράσι με δομή που παραπέμπει σε στεροειδή. Επίσης, οι πολυφαινολικές κατεχίνες του πράσινου τσαγιού και τα ανάλογά τους ((-)-EGCG) έχουν μελετηθεί εκτεταμένα για πιθανή επίδραση στην πρόληψη του καρκίνου.



Εικόνα 8: Πεπτιδικά φυσικά προϊόντα, αναστολείς του πρωτεασώματος.



Εικόνα 9: Μη πεπτιδικά φυσικά προϊόντα, αναστολείς του πρωτεασώματος.

1.4.2 Ενεργοποιητές του πρωτεασώματος

Σε αντίθεση με τους αναστολείς του πρωτεασώματος, η έρευνα για την ανάπτυξη φαρμακευτικών μορίων για την ενεργοποίηση ή την ενίσχυση της δράσης του πρωτεασώματος είναι περιορισμένη. Σήμερα είναι γνωστοί τρείς τύποι κυτταρικών ενεργοποιητών του πρωτεασώματος το PA28, το PA200 και το PA700¹². Το PA28 είναι μία σχετικά μικρή πρωτεϊνη που οδηγεί σε ενεργοποίηση του πρωτεασώματος. Η υπερέκφρασή της συνδέεται με την αύξηση της κυτταρικής επιβίωσης σε μοντέλα νευρικών κυττάρων της νόσου Huntigton.

Αντίστοιχα, διάφοροι τύποι μικρών μορίων, όπως κάποιοι αποδιατακτικοί παράγοντες (SDS), ανάλογα πεπτιδίων και λιπιδίων οδηγούν σε ενεργοποίηση του πρωτεασώματος σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις. Συγκεκριμένα, οι SDS σε 0.05%, η πολυλυσίνη σε 1 mg/ml ενώ κάποιοι ενεργοποιητές πεπτιδικής φύσης ενεργοποιούν το 20S πρωτεάσωμα σε συγκέντρωση μΜ. Λιπαρά οξέα, όπως το ολεϊκό οξύ, το λινολεϊκό οξύ και το λινολενικό οξύ ρυθμίζουν τη δράση του πρωτεασώματος προκαλώντας μερική αποδιάταξη της δομής του, όπως και το SDS.

Συνθετικά υδρόξυ πεπτιδικά ανάλογα πεπτιδυλικές αλκοόλες, εστέρες, νιτρίλια και p-νιτρο-ανιλίδια παρουσιάζουν ενεργοποίηση του πρωτεασώματος σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 50 – 150 mM προσδένοντας στο ίδιο κέντρο πρόσδεσης με το PA28. Κυτταρικά λιπίδια όπως τα κεραμίδια, η φωσφατιδυλινοσιτόλη και η καρδιολιπίνη επίσης οδηγούν σε ενεργοποίηση του πρωτεασώματος.

Η ιστόνη Η3 μία πρωτεΐνη, η οποία εντοπίζεται στη χρωματίνη και είναι πλούσια σε αργινίνη, ενισχύει επιλεκτικά την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών από το πρωτεάσωμα.

Η ελευρωπαΐνη, ένα φυσικό προϊόν που απομονώθηκε από την ελιά (Olea europea) και το μπετουλινικό οξύ (BA), ένα φυσικό προϊόν που απαντάται σε πολλά είδη φυτών όπως στη σημύδα, είναι δύο μικρά μόρια που μπορούν να οδηγήσουν σε ενεργοποίηση του πρωτεασώματος σε χαμηλές σχετικά συγκεντρώσεις (μΜ). Η ελευρωπαΐνη, το PA28 και το SDS ενισχύουν και τα τρία πρωτεολυτικά ενεργά κέντρα του πρωτεασώματος σε αντίθεση με το BA που επιδρά κυρίως στο ενεργό κέντρο με ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) και ελάχιστα ή καθόλου στα ενεργά κέντρα με ενεργότητα θρυψίνης ή κασπάσης.



Εικόνα 10: Φυσικά προϊόντα, ενεργοποιητές του πρωτεασώματος.

Ενεργοποιητές του πρωτεασώματος μπορούν να τροποποιηθούν δομικά και να προκαλέσουν αναστολή. Παράδειγμα αποτελεί το ανάλογο του μπετουλινικού οξέος 3,3-διμεθυλοσουκίνυλο μπετουλινικό οξύ (DSB) (Εικόνα **11**).



Εικόνα 11: Δομή του αναλόγου του μπετουλινικού οξέος DSB, αναστολέας του πρωτεασώματος.

1.5 Ελευρωπαΐνη

Η ελευρωπαΐνη αποτελεί το κύριο πολυφαινολικό συστατικό της ελιάς από την οποία και ονομάστηκε. Πρόκειται για έναν σεκοϊριδοειδή γλυκοζίτη, χαρακτηριστικό των ολεασών (*Oleaceae*), και η δομή της αποτελείται από μία πολυφαινόλη, την υδροξυτυροσόλη, ένα οξύ, το ελενολικό οξύ, και μία γλυκόζη (Εικόνα 12). ¹³



Εικόνα 12: Δομή της ελευρωπαΐνης:(α) Γλυκόζη (β) Ελενολικό οξύ (γ)Υδροξυτυροσόλη

Η ελευρωπαΐνη όπως και άλλες πολυφαινόλες και τα παράγωγά τους αποτελούν αντικείμενο μελέτης λόγω των πολλών φαρμακολογικών τους ιδιοτήτων. Η ελευρωπαΐνη εμφανίζει αντιοξειδωτική, αντικαρκινική, αντιφλεγμονώδη, αντιική, βακτηριοκτόνο και βακτηριοστατική δράση. Επιπλέον χαρακτηρίζεται ως καρδιοπροστατευτική εξαιτίας των αντιαθηρογόνων και αντιυπερτασικών ιδιοτήτων της, καθώς και για την δράση της κατά της συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων.

Τέλος, η ελευρωπαΐνη έχει μελετηθεί ιδιαίτερα για την νευροπροστατευτική της δράση. Συγκεκριμένα, μελέτες έχουν δείξει ότι σχετίζεται με τη μείωση ή την πρόληψη της συσσώρευσης του Αβ αμυλοειδούς πεπτιδίου που αποτελεί έναν από τους κύριους παθογόνους παράγοντες της νόσου Alzheimer.



Εικόνα 13: Φαρμακολογικές ιδιότητες της ελευρωπαΐνης.

1.6 Βιταμίνη Ε

1.6.1 Η δομή και ο βιολογικός ρόλος της βιταμίνης Ε¹⁴

Η βιταμίνη Ε είναι ένα σύμπλεγμα από 8 λιποδιαλυτές ενώσεις τις α/β/γ/δτοκοφερόλες και α/β/γ/δ-τοκοτριενόλες (Εικόνα **14**). Οι τοκοφερόλες έχουν βιταμινική και αντιοξειδωτική δράση, η βιταμινική δράση είναι φθίνουσα από την α-ΤΟΗ προς την δ-ΤΟΗ ενώ αντίθετα η αντιοξειδωτική δράση είναι αύξουσα από την α-ΤΟΗ προς την δ-ΤΟΗ. Η α-τοκοφερόλη (α-ΤΟΗ) είναι αυτή που παρουσιάζει τη μεγαλύτερη βιοδιαθεσιμότητα αλλά και τη καλύτερη βιολογική δραστικότητα.



Εικόνα 14: Δομή της βιταμίνη Ε που αποτελείται από ένα μίγμα τεσσάρων αναλόγων της τοκοφερόλης (1a - d) και τεσσάρων αναλόγων της τοκοτριενόλης (2a - d).
Οι α/β/γ/δ-τοκοφερόλες αποτελούνται από μια ομάδα χρωμανίου η οποία στη θέση 6 έχει ένα υδροξύλιο σχηματίζοντας την 6-χρωμανόλη και στη θέση 2 έχει μια πλευρική αλειφατική αλυσίδα που αναφέρεται ως ουρά φυτυλίου (Εικόνα **15**).



Αντίστοιχα οι α/β/γ/δ-τοκοτριενόλες διαφέρουν από τις τοκοφερόλες ως προς την αλειφατική αλυσίδα η οποία περιλαμβάνει 3 διπλούς δεσμούς και αναφέρεται ως ουρά φαρνεσυλίου (Εικόνα **16**). Οι τοκοτριενόλες θεωρούνται πιο διεισδυτικές στις κυτταρικές μεμβράνες από τις τοκοφερόλες.



Εικόνα 16: Τρισδιάστατη απεικόνιση της δομής των τοκοτριενολών και των τοκοφερολών.

Ο κύριος βιολογικός ρόλος της α-τοκοφερόλης είναι η προστασία των λιπιδικών μεμβρανών από αλυσιδωτές αντιδράσεις υπεροξείδωσης λιπιδίων ¹⁵. Συγκεκριμένα, οι δραστικές οξυγονούχες ενώσεις (ROS) που περιλαμβάνουν την ανιοντική ρίζα σουπεροξειδίου (\cdot O₂⁻), τη ρίζα υπεροξειδίου (\cdot OOH), τη ρίζα υδροξυλίου (\cdot OH) και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂), ξεκινούν μια αλυσιδωτή αντίδραση προκαλώντας οξείδωση σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Polyunsaturated Fatty Acids - PUFA) και άλλα συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών και της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL). Η α-TOH δρα μέσω του μονοπατιού της υπεροξειδάσης

της γλουταθειόνης και αντιδρά με τα ενδιάμεσα των ελευθέρων ριζών οδηγώντας σε τερματισμό της αλυσιδωτής αντίδρασης. Οι οξειδωμένες ρίζες α-τοκοφεροξυλίου που παράγονται σε αυτή τη διαδικασία μπορούν να ανακυκλωθούν πάλι στην ενεργό ανηγμένη μορφή μέσω αναγωγής με άλλα αντιοξειδωτικά, όπως το ασκορβικό οξύ, η ρετινόλη ή η ουβικινόλη (Εικόνα **17**).



Εικόνα 17: Οξειδοαναγωγικό σύστημα ανακύκλωσης της α-τοκοφερόλης (ΤΟΗ): (1) δέσμευση της υπεροξυρίζας του λιποειδούς με σχηματισμό ρίζας της ατοκοφερόλης.

(2) Επανασχηματισμός της α-τοκοφερόλης από ενώσεις, όπως η γλουταθειόνη (GSH) και η βιταμίνη C με σχηματισμό των αντίστοιχων ριζών ή της οξειδωμένης μορφής της γλουταθειόνης (GSSG).

(3) Επανασχηματισμός γλουταθειόνης και της βιταμίνης C από την ανηγμένη μορφή του συνενζύμου NADP.

Άλλα φαινολικά αντιοξειδωτικά (Εικόνα **18**) έχουν εφαρμογή στον περιορισμό των βλαβών λόγω του οξειδωτικού στρες, όπως και η βιταμίνη Ε. Από αυτές, το PMC και το Trolox αποτελούν συνθετικά ανάλογα της α-τοκοφερόλης και παρουσιάζουν παρόμοια βιολογική ενεργότητα με αυτήν. ¹⁶



Εικόνα 18: Παραδείγματα φαινολικών αντιοξειδωτικών ουσιών.

Η δράση των φυσικών αντιοξειδωτικών, όπως είναι οι πολυφαινόλες, αποτελεί εδώ και χρόνια αντικείμενο έρευνας, ωστόσο η σύνθεση αναλόγων με βελτιστοποιημένη δραστικότητα, καλύτερη διαλυτότητα, βιοδιαθεσιμότητα και έλλειψη τοξικότητας είναι ακόμα σε αρχικό στάδιο.

Οι βλάβες που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες σε βιολογικά συστήματα μπορούν να παρεμποδιστούν ή να μειωθεί ο ρυθμός της εξέλιξής τους με αντιοξειδωτικές ουσίες που έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες χωρίς να σχηματίζουν δραστικά ενδιάμεσα. Οι φαινόλες αποτελούν την σημαντικότερη οικογένεια αντιοξειδωτικών και αποτελούν δότες των φαινολικών πρωτονίων στις περοξυλικές ρίζες για τη σταθεροποίησή τους μέσω δομών συντονισμού. Η σταθερά της ταχύτητας (k_{inh}) της αντίδρασης μεταξύ της αναστολής της αυτο-οξείδωσης των ακόρεστων υδρογονανθράκων και λιπιδίων.

 $ArOH + ROO \rightarrow ArO + ROOH$ (1)

Έχουν γίνει προσπάθειες προσδιορισμού των παραγόντων που καθορίζουν τη σταθερά της ταχύτητας (k_{inh}) της αντίδρασης **(1)** με σκοπό τη σύνθεση νέων ουσιών με ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση από την α-τοκοφερόλη που αποτελεί το πιο δραστικό λιποδιαλυτό αντιοξειδωτικό στη φύση.

Άλλες μελέτες πραγματοποιούνται με σκοπό τη σύνθεση αντιοξειδωτικών με προληπτική δράση για την παρεμπόδιση του σχηματισμού ελευθέρων ριζών που μπορούν να εκκινήσουν μια αλυσιδωτή αντίδραση ριζών. Τέτοιες δομές συχνά περιλαμβάνουν δισθενή άτομα S, Se ή Te στο μοριακό τους σκελετό τα οποία ενισχύουν τη αντιοξειδωτική δράση του μορίου.¹⁷

<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2</u>

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Σκοπός της ερευνητικής εργασίας

Η έρευνα για την ανάπτυξη φαρμακευτικών μορίων για την ενεργοποίηση ή την ενίσχυση της δράσης του πρωτεασώματος είναι περιορισμένη. Συγκεκριμένα μέχρι σήμερα δεν έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία ή σε διπλώματα ευρεσιτεχνίας, συνθετικές ενώσεις οι οποίες δρουν στοχευμένα ως δομικοί ενεργοποιητές του 20S πρωτεασώματος. Στηριζόμενοι σε αποτελέσματα προηγούμενων μελετών (μη δημοσιευμένα αποτελέσματα στα πλαίσια του χρηματοδοτούμενου έργου «ΣΘΕΝΟΣ») της Ομάδας Φαρμακευτικής Χημείας του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας του Ινστιτούτου Βιολογίας, φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι ο σχεδιασμός και η σύνθεση νέων βιο-εμπνευσμένων υβριδικών ενώσεων που συνδυάζουν σε ένα μόριο την υδροξυτυροσόλη (δομικό συστατικό της ελευρωπαΐνης) και την 4-θειατοκοφερόλη, που είναι οι νέες ενώσεις να δρουν ως ενεργοποιητές του 20S πρωτεασώματος με πιθανή εφαρμογή στη θεραπεία και στην προφύλαξη των ηλικιο-εξαρτώμενων ασθενειών, και στη γήρανση.



Σχήμα 1: Σχηματική απεικόνιση σχεδιασμού των νέων υβριδικών ενώσεων υδροξυτυροσόλης/4-θειατοκοφερόλης.

Η υδροξυτυροσόλη, η κύρια αντιοξειδωτική πολυφαινολική ένωση του ελαιόλαδου, εκτός από την *de-novo* βιοσύνθεσή της παράγεται και κατά την υδρόλυση της ελευρωπαΐνης και εμφανίζει ένα μεγάλο εύρος βιολογικών ιδιοτήτων, όπως αντιοξειδωτική δράση, αντιμικροβιακή δράση, προστατευτική δράση κατά της οξειδωτικής βλάβης του DNA, της οξείδωσης της LDL, της περιφερικής νευροπάθειας, καθώς και της αναστολής της συγκόλλησης των αιμοπεταλίων και της παρεμπόδισης της 5- και 12-λιποξυγενάσης.

Η α-τοκοφερόλη, η ένωση της βιταμίνης Ε με τη μεγαλύτερη βιοδιαθεσιμότητα, περιλαμβάνει τον τριμεθυλοχρωμανικό δακτύλιο, τη φαρμακοφόρο ομάδα της βιταμίνης Ε, που προσδίδει ισχυρή προστατευτική δράση έναντι της νευρικής βλάβης που προκαλείται από την επίδραση γλουταμινικού¹⁸, αντιοξειδωτική και αντιγηραντική δράση¹⁹. Στις ενώσεις της παρούσας μελέτης ο δακτύλιος αυτός έχει αντικατασταθεί από τον (βιο)ισοστερή τριμεθυλο-4-θειαχρωμανικό ούτως ώστε να μελετηθεί η επίδραση της παρουσίας του θείου στην βιολογική δράση. Η (βιο)ισοστερική αντικατάσταση χρησιμοποιείται ως εργαλείο στη φαρμακευτική χημεία για την βελτιστοποίηση της δράσης βιοδραστικών μορίων, τη βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας και τη μείωση της τοξικότητας ^{20 21}. Η αντικατάσταση της μεθυλενικής ομάδας από την ομάδα του θείου αποτελεί κλασσική ισοστερική αντικατάσταση.

Οι δύο αυτές δομικές μονάδες συνδέονται μέσω πενταμελών ετεροκυκλικών δακτυλίων και συγκεκριμένα μέσω του 1,2,3-τριαζολίου, του ισοξαζολίου, του 1,2,4-οξαδιαζολίου (Σχήμα **2**). Οι δακτύλιοι χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα ως (βιο)ισοστερή αμιδίου ή εστέρα, και ως φαρμακοφόρες ομάδες.

Παρά το γεγονός ότι οι δακτύλιοι αυτοί έχουν παρόμοιο μέγεθος και σχήμα, εμφανίζουν διαφορές στην αρωματικότητα και στην ηλεκτρονιακή τους δομή, καθώς και στην ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου. Έτσι για παράδειγμα τα οξαδιαζόλια συμμετέχουν στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου, αλλά διαφέρουν ως προς την αρωματικότητα, καθώς το 1,3,4-οξαδιαζόλιο είναι αρωματικό ενώ το 1,2,4-οξαδιαζόλιο θεωρείται συζευγμένο διένιο.

Είναι ευρέως γνωστό πως τα τριαζόλια εμφανίζουν μια μοναδική ποικιλία βιολογικών δράσεων, όπως αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή, αντιφλεγμονώδη, αντιφυματική, αναλγητική και αντικαρκινική^{22 23}. Το 1,2,3-τριαζόλιο λειτουργεί ως δύσκαμπτη συνδετική ομάδα που μπορεί να μιμηθεί τη θέση των ατόμων και τις ηλεκτρονιακές ιδιότητες ενός πεπτιδικού δεσμού χωρίς να διαθέτει την ίδια ευαισθησία ως προς την υδρολυτική διάσπαση^{24 25}.

Ο ισοξαζολικός δακτύλιος αποτελεί δομικό συστατικό ενώσεων με ένα ευρύ φάσμα βιολογικών ιδιοτήτων, όπως αντικαρκινικές, νευροπροστατευτικές, αντικαταθληπτικές, αντιδιαβητικές και αντιφλεγμονώδεις^{26 27 28}.



Σχήμα 2: Δομή των νέων υβριδικών ενώσεων.

2.2 Σύνθεση ετεροκυκλικών αναλόγων της 4-θειατοκοφερόλης.

Στο Σχήμα **3** περιγράφεται η αντίστροφη ανάλυση (retrosynthesis) για τη σύνθεση των αναλόγων **19, 27, 32, 38** και **39**.

Βασική αντίδραση για το σχηματισμό των υβριδικών αναλόγων είναι η αντίδραση ετερο-Diels-Alder αντίστροφης ηλεκτρονιακής απαίτησης μεταξύ του διενίου που παράγεται *in situ* από το *o*-tert-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ-*N*-θειοφθαλιμίδιο που θεωρείται ως το ηλεκτρονιακά φτωχό ετερο-διένιο και του κατάλληλου αλκενίου που θεωρείται ως το διενόφιλο.²⁹



Σχήμα 3: Αντίστροφη ανάλυση σχεδιασμού των νέων ενώσεων 19, 27, 32, 38 και 39.

Το αλκένιο **16** υποκατεστημένο με τον 1,2,3-τριαζολικό δακτύλιο είναι δυνατόν να ληφθεί μέσω αντίδρασης click καταλυόμενης από Cu μεταξύ του αζιδίου **13** και της εμπορικά διαθέσιμης 3-βουτιν-2-όλης (Σχήμα **4**).³⁰



Σχήμα 4: Αντίστροφη ανάλυση σχεδιασμού της ένωσης **16**.

Το αλκένιο **24** υποκατεστημένο με ισοξαζολικό δακτύλιο μπορεί να ληφθεί μέσω αντίδρασης 1,3-διπολικής κυκλοπροσθήκης μεταξύ της αλδοξίμης **22** και της εμπορικά διαθέσιμης 3-βουτιν-2-όνης (Σχήμα **5**).³¹



Σχήμα 5: Αντίστροφη ανάλυση σχεδιασμού της ένωσης **24**.

Το αλκένιο **29** υποκατεστημένο με 1,2,4-οξαδιαζολικό δακτύλιο μπορεί να ληφθεί μέσω μιας αντίδρασης κυκλοποίησης μεταξύ του ενεργοποιημένου μεθακρυλικού οξέος και της αμιδοξίμης **28** (Σχήμα **6**).



Σχήμα 6: Αντίστροφη ανάλυση σχεδιασμού της ένωσης **29**.

Τέλος, το αλκένιο **36** υποκατεστημένο με 1,3,4-οξαδιαζολικό δακτύλιο μπορεί να ληφθεί μέσω μίας αντίδρασης κυκλοποίησης με αφυδάτωση μεταξύ του υδραζιδίου **34** και του εμπορικά διαθέσιμου μεθακρυλικού οξέος. (Σχήμα **7**) ³²



Σχήμα 7: Αντίστροφη ανάλυση σχεδιασμού της ένωσης 36.

2.2.1 Αντίδραση Diels-Alder ^{33 34}

Η αντίδραση Diels – Alder είναι μία [4+2] κυκλοπροσθήκη που συμβαίνει μεταξύ ενός 1,3-διενίου και ενός συστήματος με π δεσμό (διενόφιλο). Ο μηχανισμός της αντίδρασης πραγματοποιείται σε ένα μόνο στάδιο μέσω μιας κυκλικής μεταβατικής κατάστασης, κατά την οποία δύο νέοι σ δεσμοί άνθρακα-άνθρακα σχηματίζονται ταυτόχρονα οδηγώντας στο σχηματισμό ενός κυκλοεξενκού παραγώγου (Σχήμα 8). Η αντίδραση Diels-Alder έχει γενικά μεγάλη ενέργεια ενεργοποίησης όμως πραγματοποιείται διότι δημιουργούνται δύο νέοι σ δεσμοί με την ταυτόχρονη διάσπαση δύο π δεσμών, οπότε η συνολική η αντίδραση είναι εξώθερμη.



Σχήμα 8: Μηχανισμός της αντίδρασης κυκλοπροσθήκης Diels-Alder.

Ανάλογα με τους υποκαταστάτες του διενίου και του διενόφιλου, οι αντιδράσεις Diels – Alder διακρίνονται σε αντιδράσεις κανονικής ηλεκτρονιακής απαίτησης (normal electron demand reactions), σε ουδέτερες και σε αντίστροφης ηλεκτρονιακής απαίτησης (inverse electron demand reactions).³⁵ Οι αντιδράσεις κανονικής ηλεκτρονιακής απαίτησης γίνονται μεταξύ ηλεκτρονιακά φτωχών διενόφιλων (φέρουν υποκαταστάτες που έλκουν ηλεκτρόνια) και ηλεκτρονιακά πλούσιων διενίων (φέρουν υποκαταστάτες δότες ηλεκτρονίων). Οι αντιδράσεις αντίστροφης ηλεκτρονιακής απαίτησης γίνονται μεταξύ ηλεκτρονιακά πλούσιων διενόφιλων και ηλεκτρονιακά φτωχών διενίων. Η αντίδραση πραγματοποιείται επίσης και για ενδιάμεσες περιπτώσεις (για παράδειγμα μεταξύ ενός ηλεκτρονιακά πλούσιου διενίου και ενός διενόφιλου που δεν είναι ηλεκτρονιακά φτωχό), όμως απαιτούνται δραστικότερες συνθήκες.

Σύμφωνα με τη θεωρία μοριακών τροχιακών, μία περικυκλική αντίδραση μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο εάν η συμμετρία στα μοριακά τροχιακά (MO) των αντιδρώντων είναι ίδια με τη συμμετρία στα μοριακά τροχιακά (MO) των προϊόντων. Με άλλα λόγια οι ακραίοι λοβοί των αντιδρώντων MO θα πρέπει να έχουν το κατάλληλο αλγεβρικό πρόσημο, ώστε στη μεταβατική κατάσταση να συμβεί δεσμική αλληλεπικάλυψη που οδηγεί στο προϊόν. Αυτό μπορεί να συμβεί με δύο τρόπους που αποκαλούνται supra-μετωπικός και antara-μετωπικός. Οι supraμετωπικές κυκλοπροσθήκες πραγματοποιούνται όταν λαμβάνει χώρα αλληλεπίδραση μεταξύ λοβών της ίδιας πλευράς ενός αντιδρώντος και ενός άλλου αντιδρώντος (Εικόνα **19**).



Εικόνα 19: Δεσμική αλληλεπικάλυψη MO: (α) supra – μετωπική, (β) antara μετωπική

Οι antara-μετωπικές κυκλοπροσθήκες πραγματοποιούνται όταν λαμβάνει χώρα αλληλεπίδραση μεταξύ λοβών της ίδια πλευράς ενός αντιδρώντος και της αντίθετης πλευράς του άλλου αντιδρώντος. Αυτές οι γεωμετρικές προϋποθέσεις καθιστούν δύσκολες τις antara-μετωπικές αντιδράσεις, γιατί απαιτούν συστροφή του π συστήματος των τροχιακών. Έτσι στα μικρά π συστήματα οι supra-μετωπικές κυκλοπροσθήκες είναι περισσότερο συνηθισμένες.

Η αντίδραση Diels-Alder είναι μία περικυκλική κυκλοπροσθήκη [π⁴s+π²s] κατά την οποία πραγματοποιείται αλληλεπίδραση του HOMO (highest occupied molecular orbital) του διενίου με το LUMO (lowest unoccupied molecular orbital) του διενόφιλου στην περίπτωση της κανονικής ηλεκτρονιακής απαίτησης. Αντίθετα, στην περίπτωση αντίστροφης ηλεκτρονιακής απαίτησης υφίσταται αλληλεπίδραση μεταξύ του LUMO του διενίου και του HOMO του διενόφιλου (Εικόνα **20**). Οι συμμετρίες των δύο τροχιακών στη βασική κατάσταση είναι τέτοιες ώστε η δεσμική αλληλεπικάλυψη των ακραίων λοβών μπορεί να συμβεί με supra-μετωπική γεωμετρία. Συνεπώς, οι αντιδράσεις Diels-Alder είναι θερμικά επιτρεπτές και φωτοχημικά απαγορευμένες.



Εικόνα 20: Αλληλεπίδραση ανάμεσα σε MOs στις αντιδράσεις Diels-Alder κανονικής και αντίστροφης ηλεκτρονιακής απαίτησης.

Ένα χαρακτηριστικό στοιχείο της αντίδρασης Diels-Alder είναι ότι συντελείται στερεοειδικά, δηλαδή η στερεοχημεία του αρχικού διενόφιλου και του διενίου παραμένει αναλλοίωτη κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και προκύπτει μόνο ένα στερεοϊσομερές προϊόν. Επίσης, οι αντιδράσεις Diels-Alder είναι στερεοεκλεκτικές ως προς τους υποκαταστάτες (ενδο κανόνας). Προτιμάται ο σχηματισμός του ενδο προϊόντος και όχι του εξω-προϊόντος, επειδή κατά την αντίδραση επιτυγχάνεται η μέγιστη δυνατή αλληλεπικάλυψη μεταξύ του διενίου και του διενόφιλου όταν τα αντιδρώντα βρίσκονται το ένα πάνω από το άλλο (Εικόνα **21**).



Εικόνα 21: Ενδο και εξω στερεοχημεία δικυκλικών συστημάτων.

Η ενέργεια της μεταβατικής κατάστασης σε μια αντίδραση Diels-Alder εξαρτάται από την ισχύ της αλληλεπίδρασης των επικαλυπτόμενων τροχιακών. Όσο πιο μικρή είναι η ενεργειακή διαφορά των επικαλυπτόμενων τροχιακών, τόσο μικρότερη θα είναι η ενέργεια της μεταβατικής κατάστασης και η αντίδραση θα πραγματοποιείται γρηγορότερα. Σε μία αντίδραση κανονικής ηλεκτρονιακής απαίτησης υποκαταστάτες – δότες ηλεκτρονίων στο διένιο αυξάνουν την ενέργεια στο HOMO και υποκαταστάτες – δέκτες ηλεκτρονίων στο διενόφιλο μειώνουν την ενέργεια του LUMO ευνοώντας την αντίδραση. Αντίστοιχα συμβαίνει στις αντιδράσεις αντίστροφης ηλεκτρονιακής απαίτησης (Εικόνα **22**).



Εικόνα 22: Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ΜΟ του διενίου και του διενόφιλου στην αντίδραση Diels-Alder κανονικής (α), ουδέτερης (β) και αντίστροφης (γ) ηλεκτρονιακής απαίτησης.

Αντιδράσεις ετερο-Diels-Alder

Στις αντιδράσεις ετερο-Diels-Alder ένα ή περισσότερα άτομα των π δεσμών του διενόφιλου ή και του διενίου είναι ετεροάτομα. Τα ετερο-διενόφιλα είναι συνήθως φτωχά ηλεκτρονιακά και δίνουν αντιδράσεις κανονικής ηλεκτρονιακής απαίτησης (HOMO_{διενίου} ελεγχόμενες). Αντίστοιχα τα ετερο-διένια με ηλεκτραρνητικά ετεροάτομα (συνήθως O ή N) δίνουν αντιδράσεις Diels-Alder αντίστροφης ηλεκτρονιακής απαίτησης (LUMO_{διενίου} ελεγχόμενες).

2.2.2 1,3-διπολική κυκλοπροσθήκη

Η [3+2] κυκλοπροσθήκη είναι μία περικυκλική αντίδραση 1,3-διπολικής κυκλοπροσθήκης που πραγματοποιείται μεταξύ ενός 1,3-διπόλου, το οποίο έχει 4 ηλεκτρόνια κατανεμημένα σε τρία παράλληλα π τροχιακά, και ενός διπολόφιλου (dipolarophile) που μπορεί να περιέχει διπλό ή τριπλό δεσμό με όμοια ή διαφορετικά άτομα. Η κυκλοποίηση πραγματοποιείται με το σχηματισμό δύο νέων σ-δεσμών οδηγώντας σε πενταμελή ετεροκυκλικά παράγωγα (Σχήμα **9**).



Σχήμα 9: 1,3-διπολική κυκλοπροσθήκη.

Τα δίπολα είναι συνήθως ασταθείς ενώσεις που παρασκευάζονται *in situ*. Υπάρχουν δύο κατηγορίες διπόλων, αλλυλικού τύπου και προπαργυλο-αλλενυλικού τύπου (Σχήμα **10**).



Σχήμα 10: Κατηγορίες 1,3-διπόλων που συμμετέχουν σε 1,3-διπολική κυκλοπροσθήκη.

Στον Πίνακα **1** αναφέρονται οι σημαντικότερες τάξεις 1,3-διπόλων. Στην παρούσα πειραματική διαδικασία το δίπολο που σχηματίστηκε από την αλδοξίμη **22** για την [3+2] κυκλοπροσθήκη με την 3-βουτιν-2-όνη προς σχηματισμό του πενταμελούς ετεροκυκλικού παραγώγου **23**, είναι ένα νιτριλοξείδιο.

1,3-δίπολο	Δομή
Αζίδια	R´ ^N `N _{`N} −
Αζωμεθινικά υλίδια	$\begin{array}{c} R_2 \\ R_1 \\ R_1 \\ R_3 \\ R_3 \\ R_3 \end{array}$
Αζωμεθινιμίνες	$\begin{matrix} H \\ R_1 \\ + \\ H \end{matrix} \xrightarrow{F} R_2 \\ H \end{matrix}$
Διαζωαλκάνια	N=N=CH ₂
Νιτριλιμίνες	H ^C N ^N H
Νιτριλοξείδια	R-≡N-0
Νιτρόνες	$\begin{array}{c} R_2 \\ R_1 \\ R_1 \\ R_3 \\ R_3 \end{array}$
Νιτρονικοί εστέρες	R
Όζον	-0 ⁻⁰ *0

Πίνακας 1: Οι κυριότερες κατηγορίες 1,3-διπόλων.

Οι 1,3-διπολικές κυκλοπροσθήκες είναι [π⁴s+π²s] κυκλοπροσθήκες όπως και η αντίδραση Diels-Alder, οι οποίες σύμφωνα με τη θεωρία μετωπικών μοριακών (FMOs) πραγματοποιούνται όταν τροχιακών λαμβάνει χώρα δεσμική αλληλεπίδραση του HOMO τροχιακού του ενός αντιδρώντος και του LUMO του άλλου. Συγκεκριμένα, υπάρχουν τρεις δυνατές αλληλεπιδράσεις: Η ΗΟΜΟδιπόλου ελεγχόμενη, που ευνοείται όταν υπάρχουν υποκαταστάτες δότες ηλεκτρονίων στο δίπολο (πυρηνόφιλο δίπολο) και υποκαταστάτες δέκτες ηλεκτρονίων στο διπολόφιλο. Η LUMO_{διπόλου} ελεγχόμενη αντίδραση ευνοείται όταν υπάρχουν υποκαταστάτες δέκτες ηλεκτρονίων στο δίπολο (ηλεκτρονιόφιλο δίπολο) και υποκαταστάτες δότες ηλεκτρονίων στο διπολόφιλο (Εικόνα 23). Στην τελευταία περίπτωση είναι δυνατή η αλληλεπίδραση τόσο μεταξύ του ΗΟΜΟ του διπόλου με το LUMO του διπολόφιλου, όσο και μεταξύ του LUMO του διπόλου με το HOMO του διπολόφιλου και χαρακτηρίζεται ως HOMO-LUMO_{διπόλου} ελεγχόμενη.

Όπως και η αντίδραση Diels-Alder, η 1,3-κυκλοπροσθήκη συντελείται στερεοειδικά διατηρώντας τη στερεοχημεία του 1,3-διπόλου και του διπολόφιλου.

Επιπλέον, η στερεοεκλεκτικότητα στις 1,3-διπολικές κυκλοπροσθήκες επηρεάζεται από τις π-αλληλεπιδράσεις των τροχιακών ευνοώντας την ενδο-προσθήκη και από τις στερεοχημικές παρεμποδίσεις ευνοώντας την εξω-προσθήκη με αποτέλεσμα να μειώνεται η εκλεκτικότητα της αντίδρασης.



Εικόνα 23: Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ΜΟ του 1,3-διπόλου και του διπολόφιλου στην 1,3-διπολική κυκλοπροσθήκη.

Οι αντιδράσεις 1,3-διπολικής κυκλοπροσθήκης υποκατεστημένων αλκινίων στα αζίδια μπορεί να είναι είτε ΗΟΜΟ_{διπόλου} ελεγχόμενη είτε LUMO_{διπόλου} ελεγχόμενη και οδηγεί στο σχηματισμό μίγματος τοποϊσομερών τριαζολίων 1,4υποκατεστημένων και 1,5- υποκατεστημένων παραγώγων.

Η σύνθεση του 1,4-υποκατεστημένου 1,2,3-τριαζολικού δακτυλίου πραγματοποιήθηκε μέσω μίας αντίδρασης κυκλοπροσθήκης click καταλυόμενης από Cu που ευνοεί το σχηματισμό μόνο του ενός τοποϊσομερούς.

2.2.3 Αντίδραση κυκλοπροσθήκης κλικ

Ο όρος κλικ χημεία (Click Chemistry) χρησιμοποιείται για να περιγράψει μία κατηγορία αντιδράσεων με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Πρόκειται για αντιδράσεις υψηλής απόδοσης, με ευρύ φάσμα εφαρμογής, με προϊόντα που είναι εύκολο να απομονωθούν, επειδή τα παραπροϊόντα που παράγονται και οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται απομακρύνονται εύκολα.

Η ευρεία χρήση αυτής της κατηγορίας αντιδράσεων από τη φαρμακευτική βιομηχανία οφείλεται στη δυνατότητα σύνθεσης μεγάλων χημικών βιβλιοθηκών με σκοπό την ανακάλυψη νέων οδηγών-δομών (hit compounds).

Έχουν ταυτοποιηθεί διάφοροι τύποι αντιδράσεων που πληρούν τα κριτήρια της χημείας κλικ. Μερικά παραδείγματα είναι οι αντιδράσεις πυρηνόφιλης υποκατάστασης με διάνοιξη δακτυλίου εποξειδίων και αζιριδινών, οι αντιδράσεις καρβονυλίου μη αλδολικού τύπου όπως ο σχηματισμός ουρίας, θειουρίας, αμιδίων και υδραζονών, οι προσθήκες σε πολλαπλούς δεσμούς άνθρακα-άνθρακα όπως ο σχηματισμός εποξειδίων με οξείδωση και οι αντιδράσεις προσθήκης Michael, και οι αντιδράσεις κυκλοπροσθήκης.

Η σύνθεση του διενόφιλου **16** για την τελική ένωση **19**, πραγματοποιείται μέσω μίας αντίδρασης κυκλοπροσθήκης click καταλυόμενης από Cu μεταξύ του αζιδίου **13** και της εμπορικά διαθέσιμης 3-βουτιν-2-όλης. Η συγκεκριμένη κυκλοπροσθήκη αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα κλικ αντίδρασης και έχει τις περισσότερες εφαρμογές. Η αντίδραση CuAAc (**Cu**-catalyzed **A**zide-**A**lkyne **C**ycloaddition) παρουσιάζει 10⁷ - 10⁸ αύξηση της ταχύτητας συγκριτικά με την μη καταλυόμενη 1,3-διπολική κυκλοπροσθήκη ενώ πραγματοποιείται σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών και δεν είναι ευαίσθητη σε υδατικές συνθήκες σε περιοχή pH από 4 έως 12. Επίσης μπορεί να πραγματοποιηθεί παρουσία πολλών χαρακτηριστικών ομάδων. Ο προτεινόμενος μηχανισμός για τη σύνθεση των 1,4-υποκατεστημένων 1,2,3-τριαζολικών δακτυλίων μέσω αντίδρασης click καταλυόμενης από Cu απεικονίζεται στο Σχήμα **11**.



Σχήμα 11: Αντίδραση κυκλοπροσθήκης κλικ (click) καταλυόμενη από Cu.

Ο μονοσθενής χαλκός μπορεί να παραχθεί στο μίγμα της αντίδρασης από άλατα Cu(I) ή από άλατα Cu(II) παρουσία ασκορβικού νατρίου ως αναγωγικό μέσο. Η προσθήκη μικρής περίσσειας ασκορβικού νατρίου επιπρόσθετα αποτρέπει το σχηματισμό οξειδωτικών παραπροϊόντων. Η περίσσεια άλατος Cu²⁺ παρουσία μεταλλικού χαλκού είναι ένας ακόμα τρόπος σχηματισμού Cu¹⁺.

Από την υποκατάσταση του όξινου υδρογόνου ενός ακραίου αλκινίου από μονοσθενή χαλκό σχηματίζεται ένα π-σύμπλοκο με τον τριπλό δεσμό οδηγώντας στο σχηματισμό του ενδιάμεσου χαλκοακετυλενιδίου. Η αντίδραση είναι δεύτερης τάξης ως προς τον χαλκό. Στη μεταβατική κατάσταση συμμετέχουν δύο άτομα χαλκού από τα οποία το ένα συνδέεται με το ακετυλενίδιο, ενώ το άλλο συνδέεται με τα ηλεκτρόνια του αζώτου. Η κυκλοποίηση πραγματοποιείται όταν το αζίδιο μετατοπίζει ένα δεσμό δημιουργώντας ένα σύμπλοκο χαλκού - αζιδίου - ακετυλενιδίου. Τέλος, το σύμπλοκο πρωτονιώνεται με αποτέλεσμα να λαμβάνεται το προϊόν και ο διαλύτης να αναγεννάται για να επαναληφθεί ο κύκλος της αντίδρασης.³⁶

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας συντέθηκαν 5 υβριδικά ανάλογα 4-θειατοκοφερόλης/υδροξυτυροσόλης (**19, 27, 32, 38** και **39**) που φέρουν ετεροκυκλικούς δακτυλίους όπως φαίνεται στην Εικόνα **24**.



Εικόνα 24: Τελικά προϊόντα – υβριδικά ανάλογα 4-θειατοκοφερόλης και υδροξυτυροσόλης.

2.3 Σύνθεση τριαζολικού υβριδικού αναλόγου της 4-θειατοκοφερόλης/υδροξυτυροσόλης 19

Στο Σχήμα **12** περιγράφεται η ρετροσυνθετική ανάλυση σχεδιασμού της ένωσης **19**. Το τελικό προϊόν **19** μπορεί να ληφθεί από την αντίδραση έτερο-Diels-Alder αντίστροφης ηλεκτρονιακής απαίτησης μεταξύ της ο-θειοκινόνης που προκύπτει από το πρόδρομο ο-υδροξυ-*N*-θειοφθαλιμίδιο **7** και θεωρείται ως το ηλεκτρονιακά φτωχό ετερο-διένιο και του αλκενίου **16** που προκύπτει από το 3,4διμεθοξυφαινυλοξικό οξύ το οποίο θεωρείται ως το διενόφιλο.



Σχήμα 12: Ρετροσυνθετική ανάλυση σχεδιασμού της ένωσης 19.

Σύνθεση του ο-υδροξυ-Ν-θειοφθαλιμιδικού αναλόγου 7

Το-υδροξυ-*N*-θειοφθαλιμιδικό ανάλογο **7** προκύπτει από την ηλεκτρονιόφιλη αρωματική υποκατάσταση της 2,3,5-τριμεθυλο-4-((2-(τριμεθυλοσιλυλο)προπαν-2υλο)οξυ)φαινόλης (**6**) με το φθαλιμιδοσουλφενυλοχλωρίδιο (**3**) (Σχήμα **14**).

Το φθαλιμιδοσουλφενυλοχλωρίδιο **3** προκύπτει από το εμπορικά διαθέσιμο φθαλιμίδιο, το οποίο μετατρέπεται σε φθαλιμιδικό κάλιο (**1**) με επίδραση καυστικού καλίου και στη συνέχεια αντίδραση με διχλωρίδιο του διθείου δίνει το *N*,*N*'-διθειοδιφθαλιμιδιο (**2**). Επίδραση σουλφουρυλο χλωριδίου παρουσία πυριδίνης οδηγεί στο φθαλιμιδοσουλφενυλοχλωρίδιο (**3**). (Σχήμα **13**)



Σχήμα 13: Σύνθεση του φθαλιμιδοσουλφενυλοχλωριδίου **3**.

Εκλεκτική προστασία του λιγότερο παρεμποδισμένου φαινολικού υδροξυλίου της 2,3,5-τριμεθυλο-υδροξυκινόνης με τριμεθυλοακετυλοχλωρίδιο παρουσία πυριδίνης σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο, οδηγεί στην ένωση 4, η οποία μετά από αντίδραση με τερτ-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο χλωρίδιο, ιμιδαζόλιο σε διμεθυλοφορμαμίδιο δίνει την ένωση 5, η οποία αποπροστατεύεται εκλεκτικά με επίδραση LiAlH4 σε τετραϋδροφουράνιο προς την 2,3,5-τριμεθυλο-4-((2-(τριμεθυλοσιλυλο)προπαν-2υλο)οξυ)φαινόλη (6). Σουλφενυλίωση της 6 με επίδραση φθαλιμιδοσουλφενυλοχλωριδίου οδηγεί στο ο-υδροξυ-Ν-θειοφθαλιμιδικό παράγωγο 7 (Σχήμα 14).



(i) (CH₃)₃CCOCl, πυριδίνη, CH₂Cl₂, θερμοκρασία δωματίου (ii) TBDMSCl, IMI, DMF, θερμοκρασία δωματίου (iii) LiAlH₄, THF, 0 °C (iv) **3**, CHCl₃, 0 °C → θερμοκρασία δωματίου

Σχήμα 14: Σύνθεση του ο-υδροξυ-Ν-θειοφθαλιμιδικού παραγώγου 7.

• Σύνθεση της ένωσης 16

Στο Σχήμα 15 απεικονίζεται η σύνθεση του αλκενίου 16. Αρχικά πραγματοποιείται μεθοξυ-ομάδων αποπροστασία των του εμπορικά διαθέσιμου 3,4διμεθοξυφαινυλοξικού οξέος με επίδραση τριφθοροβορανίου διμεθυλοσουλφιδίου οδηγώντας στο διυδροξυ οξύ 8. Το οξύ 8 εστεροποιείται σε μεθανόλη παρουσία θειικού οξέος προς τον μεθυλεστέρα 9 και προστασία των υδροξυλομάδων με 2,2διμεθοξυπροπάνιο και καμφοροσουλφονικό οξύ σε χλωροφόρμιο δίνοντας το ακετονίδιο 10. Ο προστατευμένος εστέρας 10 ανάγεται στην αντίστοιχη αλκοόλη 11 με LiAlH₄ σε τετραϋδροφουράνιο, και η αλκοόλη μετατρέπεται στον τοσυλεστέρα **12** με επίδραση τοσυλοχλωριδίου παρουσία τριαιθυλαμίνης και στη συνέχεια, S_N2 πυρηνόφιλη υποκατάσταση της τοσυλομάδας από NaN3 σε διμεθυλοφορμαμίδιο οδηγεί στο αζίδιο 13. Αντίδραση κυκλοπροσθήκης κλικ (click) καταλυόμενης από χαλκό μεταξύ του αζιδίου 13 και της εμπορικά διαθέσιμης 3-βουτιν-2-όλης οδηγεί στο τριαζολικό ανάλογο 14. Οξείδωση του υδροξυλίου της ένωσης 14 με επίδραση διοξειδίου του μαγγανίου σε διχλωρομεθάνιο δίνει την κετόνη 15, η οποία με αντίδραση wittig με βρωμιούχο τριφαινυλομεθυλοφωσφόνιο οδηγεί στο αλκένιο **16**.



(i) BF₃S(CH₃)₂, CH₂Cl₂, θερμοκρασία δωματίου (ii) CH₃OH, πυκνό H₂SO₄, 65 °C (iii) (CH₃)₂C(OCH₃)₂, καμφοροσουλφονικό οξύ, CHCl₃, 65 °C, απουσία φωτός (iv) LiAlH₄, THF, 0 °C → θερμοκρασία δωματίου (v) TosCl, Et₃N, CH₂Cl₂, 0 °C → θερμοκρασία δωματίου (vi) NaN₃, DMF, θερμοκρασία δωματίου

(vii) CH₃CH(OH)CCH, CuSO₄·5H₂O, ασκορβικό νάτριο, CH₂Cl₂/H₂O 3:1, θερμοκρασία δωματίου
(viii) MnO₂, CH₂Cl₂, θερμοκρασία δωματίου (ix) Ph₃P⁺CH₃ Br⁻, tBuOH, THF, 0 °C → θερμοκρασία δωματίου

Σχήμα 15: Σύνθεση της ένωσης **16**.



Σχήμα 16: Μηχανισμός κυκλοπροσθήκης Click για τη σύνθεση του τριαζολικού αναλόγου **14**.

• Σύνθεση της ένωσης 19

Το πρόδρομο ο-υδροξυ-*N*-θειοφθαλιμιδικό ανάλογο **7** παρουσία τριαιθυλαμίνης δίνει την ενδιάμεση ο-θειοκινόνη, η οποία με αντίδραση ετερο-Diels-Alder αντίστροφης ηλεκτρονιακής απαίτησης με το αλκένιο **16** σε χλωροφόρμιο οδηγεί στο βενζοξαθειινικό ανάλογο **17**, τοποεκλεκτικά. Απομάκρυνση της τερτβουτυλοδιμεθυλοσιλυλο ομάδας με φθοριούχο τετραβουτυλαμμώνιο σε τετραϋδροφουράνιο οδηγεί στην ένωση **18**, η οποία με επίδραση τριφθοροξεικού οξέος δίνει το επιθυμητό το τελικό προϊόν **19** (Σχήμα **17**).



°C → θερμοκρασία δωματίου

Σχήμα 17: Σύνθεση της ένωσης **19**.

Στις Εικόνες **25** και **26** φαίνονται τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ¹Η NMR και ¹³C NMR, αντίστοιχα της τελικής ένωσης **19**. Σύμφωνα με το φάσμα ¹Η NMR παρατηρείται μία κορυφή στα 7.08 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του τριαζολικού δακτυλίου (H12). Η διπλή κορυφή στα 6.71 ppm, η διπλή κορυφή στα 6.69 ppm και η διπλή διπλών στα 6.39 ppm αντιστοιχούν στα αρωματικά πρωτόνια του φαινολικού δακτυλίου. Η πολλαπλή κορυφή στην περιοχή 4.58 – 4.40 ppm αντιστοιχεί στα 2 μεθυλενικά πρωτόνια H16 και η πολλαπλή κορυφή στην περιοχή 3.08 – 2.98 ppm αντιστοιχεί στα 2 μεθυλενικά πρωτόνια του βενζοθειινικού δακτυλίου (H28). Τέλος, οι απλές κορυφές στα 2.16, 2.13 και 2.11 ppm αντιστοιχούν στις 3 κορυφές των μεθυλίων του βενζοθειινικού δακτυλίου H30 συντονίζονται ως μία απλή κορυφή στα 1.77 ppm.

Στο φάσμα ¹³C NMR της ένωσης **19** παρατηρείται ο τεταρτοταγής άνθρακας του τριαζολικού δακτυλίου (C11) στα 151.6 ppm ενώ οι κορυφές στα 145.7, 144.4, 143.2, 142.0, 129.3, 124.4, 121.8, 120.7, 120.3, 117.3, 115.7, 115.4 και 114.5 ppm αντιστοιχούν στους 12 αρωματικούς άνθρακες και τον C12 του τριαζολικού δακτυλίου. Στην αλειφατική περιοχή διακρίνονται 8 κορυφές στα 72.2, 52.2, 36.3, 34.9, 27.9, 12.5, 12.4 και 12.3 ppm, που αντιστοιχούν στους άνθρακες του βενζοθειινικού δακτυλίου C27, C28, στους μεθυλενικούς άνθρακες C16, C17 και στα 4 μεθύλια (C8, C9, C10, C30).



Εικόνα 25: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 19 σε CDCl₃.



Εικόνα 26: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης 19 σε CDCl₃.



Εικόνα 27: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης 19 σε CDCl₃.

Στο ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης **19** (Εικόνα **27**) παρατηρούνται οι παρακάτω αλληλεπιδράσεις μεταξύ γειτονικών πρωτονίων:

6.69 (d, J = 8.0 Hz, 1H) και 6.39 (dd, J = 8.0, 1.7 Hz, 1H)

6.71 (d, J = 1.7 Hz) και 6.39 (dd, J = 8.0, 1.7 Hz, 1H)

4.58 – 4.40 (m, 2H) και 3.08 – 2.98 (m, 2H)

3.37 και 3.18 (AB_q, J_{AB} = 13.0 Hz, 2H)



Εικόνα 28: Ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης 19 σε CDCl₃.

Στο ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης **19** (Εικόνα **28**) παρατηρούνται οι παρακάτω αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτονίων και άμεσα συνδεδεμένων ατόμων άνθρακα. Επίσης από τη φάση των κορυφών συσχέτισης διακρίνεται ο υβριδισμός των αντιστοίχων ανθράκων:

¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)
7.08	121.8 (CH)
6.71	115.7 (CH)
6.68	115.4 (CH)
6.39	120.7 (CH)
4.58 - 4.40	52.2 (CH ₂)
3.37 και 3.18	34.9 (CH ₂)
3.08 – 2.98	36.3 (CH ₂)
2.16	12.5 (CH₃)
2.13	12.3 (CH₃)
2.11	12.4 (CH ₃)
1.77	27.9 (CH₃)



Εικόνα 29: Ετεροπυρηνικό φάσμα ΗΜΒC της ένωσης 19 σε CDCl₃.

Στο ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC της ένωσης **19** (Εικόνα **29**) παρατηρούνται οι παρακάτω αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτονίων και γειτονικών ατόμων άνθρακα:

¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)
7.08	151.6
6.71	36.3, 120.7, 143.2 και 144.4
6.68	129.3, 143.2 και 144.4
6.39	36.3, 115.7 και 143.2
4.58 - 4.40	36.3, 121.8 και 129.3
3.37 και 3.18	27.9, 72.2, 114.5 και 151.6
3.08 – 2.98	52.2, 115.7, 120.7 και 129.3
2.16	120.3, 124.4 και 145.7
2.13	120.3, 124.4 και 142.0
2.11	114.5, 117.3 και 145.7
1.77	34.9, 72.2 και 151.6

Από το πείραμα HSQC είναι εμφανές ότι τα πρωτόνια του μεθυλίου που συντονίζονται στα 1.77 ppm (H30) ανήκουν στον άνθρακα που συντονίζεται στα 27.9 ppm (C30). Από το ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC φαίνεται ότι το H30 αλληλεπιδρά με τους γειτονικούς άνθρακες στα 34.9 (H28), 72.2 (H27) και 151.6 (H11). Από το φάσμα του HSQC διακρίνεται ότι στον C28 αντιστοιχούν τα δύο μεθυλενικά πρωτόνια στα 3.37 και 3.18 ppm (H28) ενώ στους C27 και C11 δεν αντιστοιχούν πρωτόνια. Τα πρωτόνια H28, σύμφωνα με το φάσμα HMBC, αλληλεπιδρούν με τους γειτονικούς άνθρακες που συντονίζονται στα 27.9 (C30), 72.2 (C27) και 151.6 (C11) όπως ήταν αναμενόμενο, καθώς και με τον άνθρακα στα 114.5, ο οποίος βάσει του φάσματος HSQC δεν αντιστοιχεί σε κανένα πρωτόνιο (C5).

Από το πείραμα HSQC γνωρίζουμε ότι το πρωτόνιο του τριαζολίου H12 (7.08 ppm) αντιστοιχεί στον άνθρακα που συντονίζεται στα 121.8 ppm (C12). Από το ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC φαίνεται ότι το H12 αλληλεπιδρά με τον γειτονικό άνθρακα στα 151.6 ppm (C11).

Τα μεθυλενικά πρωτόνια που συντονίζονται στην περιοχή 4.58 – 4.40 ppm, αντιστοιχούν στον άνθρακα που συντονίζεται στα 52.2 ppm σύμφωνα με το πείραμα HSQC και αλληλεπιδρούν στο φάσμα HMBC με τους γειτονικούς άνθρακες στα στα 36.3 (C17), 121.8 (C12) και 129.3 ppm. Ο άνθρακας στα 129.3 ppm σύμφωνα με το πείραμα HSQC δεν αλληλεπιδρά με κάποιο πρωτόνιο, επομένως πρόκειται για τον C18.

Παράλληλα τα μεθυλενικά πρωτόνια που συντονίζονται στην περιοχή 3.08 – 2.98 ppm αντιστοιχούν στον άνθρακα που συντονίζεται στα 36.3 ppm σύμφωνα με το πείραμα HSQC και αλληλεπιδρούν στο φάσμα HMBC με τους γειτονικούς άνθρακες στα 52.2 (C16), 115.7 (23), 120.7 (19) και 129.3 ppm (C18).

Από το φάσμα του HSQC φαίνεται ότι οι άνθρακες που συντονίζονται στα 120.7, 115.7 και 115.4 ppm συνδέονται με τα αρωματικά πρωτόνια στα 6.39, 6.71 και 6.68 ppm αντίστοιχα. Επιπλέον, από το φάσμα του ¹Η και τη σχάση που εμφανίζουν τα αρωματικά πρωτόνια συμπεραίνουμε ότι η διπλή διπλών στα 6.39 ppm (J = 8.0, 1.7 Hz) αντιστοιχεί στο H19, η διπλή κορυφή στα 6.71 ppm (J = 8.0 Hz) αντιστοιχεί στο H23 και η διπλή κορυφή στα 6.68 ppm (J = 1.7 Hz) στο H20. Από το φάσμα COSY επιβεβαιώνεται ότι τα πρωτόνια στα 6.39 και 6.68 ppm βρίσκονται σε γειτονικούς άνθρακες C19 και C20 ενώ το πρωτόνιο στα 6.71 ppm αντιστοιχεί στο C23.

Το αρωματικό πρωτόνιο στα 6.71 ppm (H23) αλληλεπιδρά στο φάσμα HMBC με τους άνθρακες στα 36.3 (C17), 120.7 (C19) και 143.2 ppm (C21) και ελάχιστα με τον άνθρακα στα 144.4 ppm (C22).

Το αρωματικό πρωτόνιο στα 6.68 ppm (H2O) αλληλεπιδρά στο φάσμα HMBC με τους άνθρακες στα 129.3 (C18), 144.4 (C22) και λιγότερο με τον άνθρακα στα 143.2 ppm (C21).

Τέλος το αρωματικό πρωτόνιο στα 6.39 ppm (H19) αλληλεπιδρά στο φάσμα HMBC με τους άνθρακες στα 36.3 (C17), 115.7 (C23) και 143.2 ppm (C21).

Οι κορυφές των μεθυλίων στο φάσμα του πρωτονίου στα 2.16, 2.13 και 2.11 ppm αλληλεπιδρούν στο φάσμα HSQC με τους άνθρακες στα 12.5, 12.3 και 12.4 ppm αντίστοιχα. Στο φάσμα HMBC τα πρωτόνια του μεθυλίου που συντονίζονται στα 2.11 ppm αλληλεπιδρούν με τους γειτονικούς άνθρακες που συντονίζονται στα 114.5 (C5), 117.3 (C6) και 145.7 ppm (C1), επομένως πρόκειται για τα H8. Αντίστοιχα τα πρωτόνια του μεθυλίου που συντονίζονται στα 2.13 ppm αλληλεπιδρούν με τους γειτονικούς άνθρακες που συντονίζονται στα τα πρωτόνια του μεθυλίου που συντονίζονται στα 2.13 ppm αλληλεπιδρούν με τους γειτονικούς άνθρακες που συντονίζονται στα 2.13 ppm αλληλεπιδρούν με τους γειτονικούς άνθρακες που συντονίζονται στα 120.3, 124.4 και 142.0 ppm (C4), επομένως πρόκειται για το H10. Τέλος, το H9(2.16 ppm) αλληλεπιδρά με τους γειτονικούς άνθρακες που συντονίζονται στα 120.3, 124.4 και 145.7 ppm (C1).

Σύμφωνα με τα παραπάνω στον Πίνακα **2** παρατίθενται οι χημικές μετατοπίσεις για τα πρωτόνια και τους άνθρακες της ένωσης **19**.

$H_{3} = \begin{pmatrix} CH_{3} \\ B \\ B \\ B \\ B \\ CH_{3} \\ CH$			
No	¹ H(ppm)	¹³ C(ppm)	
1	-	145.7	
2	-	120 3 124 4	
3	-	120.3, 124.4	
4	-	142.0	
5	-	114.5	
6	-	117.3	
8	2.11	12.4	
9	2.16	12.5	
10	2.13	12.3	
11	-	151.6	
12	7.09	121.8	
16	4.58 – 4.40	52.2	
17	3.08 – 2.98	36.3	
18	-	129.3	
19	6.39	120.7	
20	6.68	115.4	
21	-	143.2	
22	-	144.4	
23	6.71	115.7	
27	-	72.2	
28	3.37 και 3.18	34.9	
30	1.77	27.9	

Πίνακας 2: Χημικές μετατοπίσεις ¹Η και ¹³C (ppm) της ένωσης **19**.

2.4 Σύνθεση ισοξαζολικού υβριδικού αναλόγου της 4θειατοκοφερόλης/υδροξυτυροσόλης 27

Στο Σχήμα **18** περιγράφεται η ρετροσυνθετική ανάλυση σχεδιασμού της ένωσης **27**. Η ένωση **27** μπορεί να ληφθεί μέσω αντίδρασης έτερο-Diels-Alder αντίστροφης ηλεκτρονιακής απαίτησης μεταξύ της ο-θειοκινόνης που προκύπτει από το πρόδρομο ο-υδροξυ-*N*-θειοφθαλιμίδιο **7** και θεωρείται ως το ηλεκτρονιακά φτωχό ετερο-διένιο και του αλκενίου **24** ως διενόφιλου. Το αλκένιο **24** μπορεί να ληφθεί από την κυκλοπροσθήκη της αλδοξίμης **22**, η οποία προκύπτει από το 3,4διμεθοξυφαινυλοξικό οξύ, με τη 3-βουτυνόνη.



Σχήμα 18: Ρετροσυνθετική ανάλυση σχεδιασμού της ένωσης 27.

• Σύνθεση της ένωσης 24

Στο Σχήμα **19** απεικονίζεται η σύνθεση του αλκενίου **24**. Ξεκινώντας από τον τοσυλικό εστέρα **12** πραγματοποιείται μία $S_N 2$ πυρηνόφιλη υποκατάσταση της τοσυλομάδας από NaCN σε διμεθυλοσουλφοξείδιο προς το σχηματισμό του νιτριλίου **20**. Ακολουθεί αναγωγή του νιτριλίου στην αλδεΰδη **21** χρησιμοποιώντας διισοβούτυλο αργίλιο υδρίδιο σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο και στη συνέχεια ο σχηματισμός της αλδοξίμης **22** χρησιμοποιώντας υδροχλωρική υδροξυλαμίνη παρουσία υδατικού διαλύματος NaOH 1N σε tBuOH : H₂O 1:1. Μεταξύ της αλδοξίμης **22** και της εμπορικά διαθέσιμης 3-βουτιν-2-όνης παρουσία του στην αλδοχίμης

του εμπορικά διαθέσιμου νιτρώδους ισοπεντυλίου πραγματοποιείται μία αντίδραση [3+2] διπολικής κυκλοπροσθήκης που οδηγεί στο ισοξαζολικό κετο ανάλογο **23**.Το αλκένιο **24** λαμβάνεται από το **23** μέσω αντίδρασης wittig με βρωμιούχο μεθυλοτριφαίνυλο φωσφόνιο.



<u>Αντιδραστήρια και συνθήκες:</u>

(i) NaCN, DMSO, 50 °C (ii) DIBAL-H, CH₂Cl₂, -78 °C (iii) NH₂OH·HCl, NaOH 1N, tBuOH/H₂O 1:1, θερμοκρασία δωματίου (iv) CH₃CH₂COCH₃, 65 °C (v) (Ph)₃P⁺CH₃Br⁻, tBuOH, THF, 0 °C \rightarrow θερμοκρασία δωματίου

Σχήμα 19: Συνθεση της ένωσης **24**.



Σχήμα 20: Μηχανισμός [3+2] διπολικής κυκλοπροσθήκης για τη σύνθεση του ισοξαζολικού κετο αναλόγου **23**.

• Σύνθεση της ένωσης 27

Το πρόδρομο ο-υδροξυ-*N*-θειοφθαλιμιδικό ανάλογο **7** παρουσία τριαιθυλαμίνης οδηγεί στην ενδιάμεση ο-θειοκινόνη, η οποία μέσω αντίδρασης ετερο-Diels-Alder αντίστροφης ηλεκτρονιακής απαίτησης με το αλκένιο **24** σε χλωροφόρμιο δίνει το βενζοξαθειινικό ανάλογο **25**. Ακολουθούν η αποπροστασία του υδροξυλίου από την τερτ-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο ομάδα με φθοριούχο τετραβουτυλαμμώνιο σε τετραϋδροφουράνιο που οδηγεί στην ένωση **26** και η αποπροστασία των υδροξυλίων από την ομάδα του ακετονιδίου με επίδραση τριφθοροξικού οξέος δίνοντας το τελικό προϊόν **27** (Σχήμα **21**).



Σχήμα 21: Σύνθεση της ένωσης **27**.

Στις Εικόνες **30** και **31** φαίνονται τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ¹H NMR και ¹³C NMR, αντίστοιχα της τελικής ένωσης **27**. Στο φάσμα ¹H NMR διακρίνονται τα αρωματικά πρωτόνια του φαινολικού δακτυλίου ως μία διπλή κορυφή στα 6.68 ppm, μία απλή κορυφή στα 6.61 ppm και μία διπλή κορυφή στα 6.50 ppm. Η απλή κορυφή στα 5.79 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H15 του ισοξαζολικού δακτυλίου. Το AB σύστημα στα 3.32 και 3.14 ppm αντιστοιχεί στα 2 πρωτόνια H17 του βενζοθειινικού δακτυλίου. Τα μεθυλενικά πρωτόνια H8 και H7 εμφανίζονται ως 2 πολλαπλές κορυφές στην περιοχή 2.86 – 2.80 ppm. Τέλος τα πρωτόνια των μεθυλίων H27, H29 και H30 αντιστοιχούν σε τρεις απλές κορυφές στην περιοχή στα 1.76 ppm.

Στο φάσμα ¹³C NMR της ένωσης **27** διακρίνονται οι άνθρακες του ισοξαζολικού δακτυλίου στα 173.5 και 163.4 ppm και οι 12 αρωματικοί άνθρακες στα 145.9, 143.8, 142.2, 141.8, 133.3, 124.5, 120.8, 120.6, 117.4, 115.4, 114.2, 101.6 ppm. Στην αλειφατική περιοχή διακρίνονται 8 κορυφές στα 72.8, 33.8, 33.7, 28.0, 26.7, 12.44, 12.38, 12.3 ppm που αντιστοιχούν στους άνθρακες του βενζοθειινικού δακτυλίου C16 και C17, στους άνθρακες των μεθυλίων C27, C29, C30 και C22 και στους αλειφατικούς άνθρακες C8 και C7.



7.4 7.2 7.0 6.8 6.6 6.4 6.2 6.0 5.8 5.6 5.4 5.2 5.0 4.8 4.6 4.4 4.2 4.0 3.8 3.6 3.4 3.2 3.0 2.8 2.6 2.4 2.2 2.0 1.8 1.6 f1(ppm)

Εικόνα 30: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης **27** σε CDCl₃.



Εικόνα 31: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης **27** σε CDCl₃.



Εικόνα 32: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης 27 σε CDCl3.

Στο ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης **27** (Εικόνα **32**) παρατηρούνται οι παρακάτω αλληλεπιδράσεις μεταξύ γειτονικών πρωτονίων:

6.68 (d, J = 5.8 Hz, 1H) και 6.50 (d, J = 7.5 Hz, 1H)

2.86 - 2.80 (m, 2H) και 2.86 - 2.80 (m, 2H)

3.32 και 3.14 (AB_q, J_{AB} = 13.1 Hz, 2H)


Εικόνα 33: Ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης 27 σε CDCl₃.

Στο ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης **27** (Εικόνα **33**) παρατηρούνται οι παρακάτω αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτονίων και άμεσα συνδεδεμένων ατόμων άνθρακα. Επίσης από τη φάση των κορυφών συσχέτισης διακρίνεται ο υβριδισμός των αντιστοίχων ανθράκων:

¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)
6.68	115.4 (CH)
6.61	115.4 (CH)
6.50	120.8 (CH)
5.79	101.6 (CH)
3.32 και 3.14 , 2.86 – 2.80	33.73 (CH ₂) , 33.76 (CH ₂)
2.86 - 2.80	28.0 (CH ₂)
2.17 - 2.12	12.44, 12.38 каι 12.3 (CH ₃)
1.76	26.7 (CH₃)



Εικόνα 34: Ετεροπυρηνικό φάσμα ΗΜΒC της ένωσης 27 σε CDCl3.

Στο ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC της ένωσης **27** (Εικόνα **34**) παρατηρούνται οι παρακάτω αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτονίων και γειτονικών ατόμων άνθρακα:

¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)
6.68	143.8, 142.2 και 133.3
6.61	33.73, 142.2 και 143.8
6.50	33.73, 115.4 και 142.2
5.79	173.5 και 163.4
3.32 και 3.14	26.7, 72.8, 114.2 και 173.5
2.86 - 2.80	28.0, 115.4, 120.8, 133.3 και 163.4
2.86 - 2.80	33.76, 101.6, 133.3 και 163.4
2.17	120.6, 124.5, 141.8 και 145.9
2.12	114.2, 117.4 και 145.9
1.76	33.75, 72.8 και 173.5

Από το πείραμα HSQC είναι εμφανές ότι τα πρωτόνια του μεθυλίου που συντονίζονται στα 1.76 ppm (H22) αντιστοιχούν στον άνθρακα που συντονίζεται στα 26.7 ppm (C22). Από το φάσμα HMBC φαίνεται ότι το H22 αλληλεπιδρά με τους γειτονικούς άνθρακες στα 33.76 (C17), 72.8 (C16) και 173.5 (C14). Από το φάσμα του HSQC συμπεραίνεται ότι στον C17 αντιστοιχούν τα δύο μεθυλενικά πρωτόνια στα

3.32 και 3.14 ppm (H17) ενώ στους C14 και C16 δεν αντιστοιχούν πρωτόνια. Τα πρωτόνια H17, σύμφωνα με το φάσμα HMBC, αλληλεπιδρούν με τους γειτονικούς άνθρακες που συντονίζονται στα 26.7 (C22), 72.8 (C16) και 173.5 ppm (C14) όπως ήταν αναμενόμενο, καθώς και με τον άνθρακα στα 114.2 ppm ο οποίος βάσει του φάσματος HSQC, δεν αντιστοιχεί σε κανένα πρωτόνιο (C19).

Στο φάσμα HMBC διακρίνεται το πρωτόνιο του ισοξαζολικού δακτυλίου στα 5.79 ppm (H15) να αλληλεπιδρά με τους άνθρακες στα 173.5 (C14) και 163.4 ppm (C11). Από το φάσμα HSQC φαίνεται ότι το H15 αντιστοιχεί στον άνθρακα που συντονίζεται στα 101.6 ppm (C15).

Τα μεθυλενικά πρωτόνια που συντονίζονται στην περιοχή 2.86 – 2.80 ppm αλληλεπιδρούν στο φάσμα HMBC, με τους γειτονικούς άνθρακες στα 28.0, 33.73, 101.6 (C15), 115.4, 120.8, 133.3 (C6) και 163.4 (C11). Παράλληλα φαίνεται ότι τα αρωματικά πρωτόνια που συντονίζονται στα 6.61 και 6.50 ppm αλληλεπιδρούν με τον άνθρακα της μεθυλενικής ομάδας στα 33.73 ppm (C7). Στο φάσμα του HSQC η κορυφή στα 115.4 ppm αντιστοιχεί στα αρωματικά πρωτόνια που συντονίζονται στα ότι τα αρωματικά πρωτόνια που συντονίχονται στα αρωματικά πρωτόνια που συντονίζονται στα 23.73 ppm (C7). Στο φάσμα του HSQC η κορυφή στα 115.4 ppm αντιστοιχεί στα αρωματικά πρωτόνια που συντονίζονται στην περιοχή 6.68 - 6.61 ppm ενώ ο άνθρακας που συντονίζεται στα 120.8 ppm συνδέεται με το αρωματικό πρωτόνιο στα 6.50 ppm.

Στο φάσμα COSY, τα πρωτόνια στα 6.68 και 6.50 ppm είναι συνδεδεμένα με τους γειτονικούς άνθρακες C4 και C5 ενώ το πρωτόνιο στα 6.61 ppm αντιστοιχεί στον C1.

Στο φάσμα HMBC, το αρωματικό πρωτόνιο στα 6.50 ppm, φαίνεται να αλληλεπιδρά με τους γειτονικούς άνθρακες στα 33.73 (C7), 115.5 (C1) και 142.2 ppm (C3) και άρα πρόκειται για το H5. Το αρωματικό πρωτόνιο στα 6.61 ppm αλληλεπιδρά με τους γειτονικούς άνθρακες στα 33.73 (C7), 142.2 ppm (C3) και λιγότερο με τον άνθρακα στα 143.8 ppm (C2), επομένως πρόκειται για το H1. Τέλος, το αρωματικό πρωτόνιο στα 6.68 ppm αλληλεπιδρά με τους γειτονικούς άνθρακες στα 142.2 ppm (C2) και λιγότερο με τον άνθρακα στα 142.2 ppm, επομένως αντιστοιχεί στο H4.

Οι κορυφές των μεθυλίων στο φάσμα του πρωτονίου στην περιοχή 2.17 - 2.12 ppm αντιστοιχούν στο φάσμα HSQC με τους άνθρακες που συντονίζονται στα 12.44, 12.38 και 12.3 ppm. Στο φάσμα HMBC τα πρωτόνια των μεθυλίων που συντονίζονται στην περιοχή 2.17 – 2.16 ppm αλληλεπιδρούν με τους γειτονικούς άνθρακες που συντονίζονται στα 120.6, 124.5, 141.8 και 145.9 ppm, όπου στα 145.9 αντιστοιχεί ο άνθρακας που συνδέεται με το υδροξύλιο (C24) και στα 141.8 αντιστοιχεί ο άνθρακας (C20) που συνδέεται με το οξυγόνο του βενζοθειινικού δακτυλίου. Επομένως πρόκειται για τα H29 και H30. Αντίστοιχα τα πρωτόνια του μεθυλίου που συντονίζονται στα 2.12 ppm αλληλεπιδρούν με τους γειτονικούς άνθρακες που συντονίζονται στα 2.12 ppm αλληλεπιδρούν και του μεθυλίου που συντονίζονται στα 14.2 (C19), 117.4(C23) και 145.9 και άρα πρόκειται για τα H27.

Σύμφωνα με τα παραπάνω στον Πίνακα **3** παρατίθενται οι χημικές μετατοπίσεις για τα πρωτόνια και τους άνθρακες της ένωσης **27**.

$\begin{array}{c} \begin{array}{c} CH_{3} \\ HO \\ 28 \\ 24 \\ 23 \\ 19 \\ 28 \\ 24 \\ 23 \\ 19 \\ 10 \\ 10 \end{array} \begin{array}{c} S \\ 18 \\ 17 \\ 10 \\ 10 \\ 10 \end{array} \begin{array}{c} 16 \\ 14 \\ 15 \\ 12 \\ 10 \\ 10 \\ 10 \end{array} \begin{array}{c} 5 \\ 4 \\ 5 \\ 4 \\ 3 \\ 9 \\ 10 \\ 10 \end{array} \begin{array}{c} 0 \\ 10 \\ 0 \\ 10 \end{array} $		
No	¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)
1	6.61	115.4
2	-	143.8
3	-	142.2
4	6.68	115.4
5	6.50	120.8
6	-	133.3
7	2.86 - 2.80	33.73
8	2.86 - 2.80	28.0
11	-	163.4
14	-	173.5
15	5.79	101.6
16	-	72.8
17	3.32 και 3.14	33.76
19	-	114.2
20	-	141.8
22	1.76	26.7
23	-	117.4
24	-	145.9
25		124 5 120 6
26		124.3, 120.0
27	2.12	
29	217, 216	12.44, 12.38 και 12.3
30	2.17 - 2.10	

Πίνακας 3: Χημικές μετατοπίσεις ¹Η και ¹³C (ppm) της ένωσης 27.

2.5 Σύνθεση 1,2,4-οξαδιαζολικού υβριδικού αναλόγου της 4-θειατοκοφερόλης/υδροξυτυροσόλης

Στο Σχήμα 22 περιγράφεται η ρετροσυνθετική ανάλυση σχεδιασμού της ένωσης 32. Η ένωση 32 μπορεί να ληφθεί μέσω αντίδρασης έτερο-Diels-Alder αντίστροφης ηλεκτρονιακής απαίτησης μεταξύ της ο-θειοκινόνης που προκύπτει από το πρόδρομο ο-υδροξυ-*N*-θειοφθαλιμιδικό 7 (ηλεκτρονιακά φτωχό ετερο-διένιο) και του αλκενίου 29. Το αλκένιο 29 μπορεί να προκύψει από την προσθήκη της αμιδοξίμης 28 (η οποία είναι δυνατόν να ληφθεί από το 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικό οξύ) στο ενεργοποιημένο μεθακρυλικό οξύ.



Σχήμα 22: Ρετροσυνθετική ανάλυση σχεδιασμού της ένωσης **32**.

• Σύνθεση της ένωσης 29

Στο Σχήμα **23** απεικονίζεται η σύνθεση του αλκενίου **29**. Το νιτρίλιο **20** με επίδραση υδροχλωρικής υδροξυλαμίνης παρουσία NaHCO₃ σε ισοπροπανόλη δίνει την αμιδοξίμη **28**.

Για το σχηματισμό του αλκενίου **29** πραγματοποιείται αρχικά ενεργοποίηση του μεθακρυλικού οξέος από το αντιδραστήριο σύζευξης 2-χλωρο-4,6-διμεθόξυ-1,3,5τριαζίνη παρουσία *Ν*-μεθυλομορφολίνης σε τετραϋδροφουράνιο. Το ενεργοποιημένο οξύ αντιδρά με την αμιδοξίμη **28** σε τολουόλιο μετά από ακτινοβόληση του μίγματος με συσκευή μικροκυμάτων σε 180 watt, 160 °C, για 6 λεπτά.



Σχήμα 23: Σύνθεση της ένωσης **29**.



Σχήμα 24: Μηχανισμός σύνθεσης της ένωσης **29.**

• Σύνθεση της ένωσης 32

Το πρόδρομο ο-υδροξυ-*N*-θειοφθαλιμιδικό ανάλογο **7** παρουσία τριαιθυλαμίνης δίνει την ενδιάμεση ο-θειοκινόνη. Στη συνέχεια αντίδραση ετερο-Diels-Alder αντίστροφης ηλεκτρονιακής απαίτησης μεταξύ της ο-θειοκινόνης και του αλκενίου **29** σε χλωροφόρμιο οδηγεί στην ένωση **30**. Ακολουθούν η αποπροστασία του υδροξυλίου από την τερτ-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο ομάδα με φθοριούχο τετραβουτυλαμμώνιο σε τετραϋδροφουράνιο που οδηγεί στην ένωση **31** και η αποπροστασία των υδροξυλίων από την ομάδα του ακετονιδίου με επίδραση τριφθοροξικού οξέος δίνοντας το τελικό προϊόν **32** (Σχήμα **25**).



Σχήμα 25: Σύνθεση της ένωσης **32.**

Στις Εικόνες **35** και **36** φαίνονται τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ¹Η NMR και ¹³C NMR, αντίστοιχα της τελικής ένωσης **32**. Στο φάσμα ¹Η NMR διακρίνονται τα αρωματικά πρωτόνια του φαινολικού δακτυλίου H26, H27, H30 ως μία διπλή κορυφή στα 6.69 ppm, μία απλή κορυφή στα 6.56 ppm και μία διπλή κορυφή στα 6.53 ppm. Το AB σύστημα στα 3.51 και 3.21 ppm αντιστοιχεί στα 2 πρωτόνια του βενζοθειινικού δακτυλίου H14. Τα μεθυλενικά πρωτόνια H23 και H24 εμφανίζονται ως 2 πολλαπλές κορυφές στην περιοχή 2.95 – 2.90 ppm. Τέλος στα 2.20, 2.14 και 2.12 ppm αντιστοιχούν οι 3 κορυφές των μεθυλίων του βενζολικού δακτυλίου H1, H2, H4 ενώ τα πρωτόνια του μεθυλίου H9 εμφανίζονται ως μία απλή κορυφή στα 1.87 ppm.

Στο φάσμα ¹³C NMR της ένωσης **32** διακρίνονται οι άνθρακες του οξαδιαζολικού δακτυλίου στα 179.8 και 170.0 ppm και οι 12 αρωματικοί άνθρακες στα 146.3, 143.7, 142.3, 142.1, 133.1, 125.2, 120.9, 120.7, 117.2, 115.5, 115.4 και 114.1 ppm. Στην αλειφατική περιοχή διακρίνονται 6 κορυφές στα 73.6, 34.0, 32.4, 28.2, 26.7 και 12.4 ppm που αντιστοιχούν στους άνθρακες του βενζοθειινικού δακτυλίου C14 και C15, στους άνθρακες των μεθυλίων C1, C2, C4 και C9 και στους μεθυλενικούς άνθρακες C23 και C24.



7.2 7.0 6.8 6.6 6.4 6.2 6.0 5.8 5.6 5.4 5.2 5.0 4.8 4.6 4.4 4.2 4.0 3.8 3.6 3.4 3.2 3.0 2.8 2.6 2.4 2.2 2.0 1.8 f1 (ppm)

Εικόνα 35: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 32 σε CDCl₃.



Εικόνα 36: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης **32** σε CDCl₃.



Εικόνα 37: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης 32 σε CDCl₃.

Στο ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης **32** (Εικόνα **37**) παρατηρούνται οι παρακάτω αλληλεπιδράσεις μεταξύ γειτονικών πρωτονίων:

6.69 (d, J = 8.0 Hz, 1H) και 6.53 (d, J = 8.0 Hz, 1H)

3.51 και 3.21 (AB_q, J_{AB} = 13.1 Hz, 2H)



Εικόνα 38: Ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης 32 σε CDCl₃.

Στο ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης **32** (Εικόνα **38**) παρατηρούνται οι παρακάτω αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτονίων και άμεσα συνδεδεμένων ατόμων άνθρακα. Επίσης από τη φάση των κορυφών συσχέτισης διακρίνεται ο υβριδισμός των αντιστοίχων ανθράκων.

¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)
6.69	115.4 (CH)
6.56	115.5 (CH)
6.53	120.9 (CH)
3.51 και 3.21	34.0 (CH ₂)
2.95 – 2.90	32.4 (CH ₂)
2.95 – 2.90	28.2 (CH ₂)
2.20, 2.14, 2,12	12.4 (CH ₃)
1.87	26.7 (CH₃)



Εικόνα 39: Ετεροπυρηνικό φάσμα ΗΜΒC της ένωσης 32 σε CDCl₃.

Στο ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC της ένωσης **32** (Εικόνα **39**) παρατηρούνται οι παρακάτω αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτονίων και γειτονικών ατόμων άνθρακα:

¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)
6.69	133.1, 142.3 και 143.7
6.56	32.4, 120.9, 142.3 και 143.7
6.53	115.5, 142.3
3.51 και 3.21	26.7, 73.6, 114.1 και 179.8
2.95 – 2.90	32.4, 133.1 και 170.0
2.95 – 2.90	28.2, 115.5, 120.9, 133.1 και 170.0
2.20, 2.14, 2.12	114.1, 117.2, 120.7, 125.2, 142.1 και 146.3
1.87	34.0, 73.6 και 179.8

Από το πείραμα HSQC είναι εμφανές ότι τα πρωτόνια του μεθυλίου που συντονίζονται στα 1.87 ppm (H9) ανήκουν στον άνθρακα που συντονίζεται στα 26.7 ppm (C9). Από το ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC φαίνεται ότι το H9 αλληλεπιδρά με τους γειτονικούς άνθρακες στα 34.0 (C14), 73.6 (C15) και 179.8 ppm (C17). Από το φάσμα του HSQC παρατηρείται ότι στον C14 αντιστοιχούν τα δύο μεθυλενικά

πρωτόνια στα 3.51 και 3.21 ppm (H14) ενώ στους C15 και C17 δεν αντιστοιχούν πρωτόνια. Τα πρωτόνια Η14, σύμφωνα με το φάσμα ΗΜΒC, αλληλεπιδρούν με τους γειτονικούς άνθρακες που συντονίζονται στα 26.7 (C9), 73.6 (C15) και 179.8 ppm (C17) όπως ήταν αναμενόμενο, καθώς και με τον άνθρακα στα 114.1 ppm ο οποίος βάσει του φάσματος HSQC, δεν αντιστοιχεί σε κανένα πρωτόνιο (C12). Τα μεθυλενικά πρωτόνια που συντονίζονται στην περιοχή 2.95 – 2.90 ppm αλληλεπιδρούν στο φάσμα HMBC, με τους γειτονικούς άνθρακες στα 28.2, 32.4, 115.5, 133.1 (C26) και 170.0 ppm (C20). Παράλληλα φαίνεται ότι το αρωματικό πρωτόνιο που συντονίζεται στα 6.56 ppm αλληλεπιδρά με τον άνθρακα της μεθυλενικής ομάδας στα 32.4 ppm (C24). Από το φάσμα του HSQC συμπεραίνεται ότι οι άνθρακες που συντονίζονται στα 120.9, 115.5 και 115.4 ppm συνδέονται με τα αρωματικά πρωτόνια στα 6.53, 6.56 και 6.69 ppm αντίστοιχα. Επιπλέον, από το φάσμα COSY φαίνεται ότι τα πρωτόνια στα 6.69 και 6.53 ppm βρίσκονται σε γειτονικούς άνθρακες C26 και C27 ενώ το πρωτόνιο στα 6.56 ppm αντιστοιχεί στον C30. Από το φάσμα του ¹Η και τη σχάση που εμφανίζουν τα αρωματικά πρωτόνια επιβεβαιώνεται ότι η διπλή κορυφή στα 6.69 ppm (J = 8.0) και η διπλή κορυφή στα 6.53 ppm (J = 8.0) αντιστοιχούν σε γειτονικούς άνθρακες ενώ η απλή στα 6.56 ppm στο Η30.

Το αρωματικό πρωτόνιο στα 6.69 ppm αλληλεπιδρά στο φάσμα HMBC με τους άνθρακες στα 133.1 ppm (C25), 143.7 ppm και λιγότερο με τον άνθρακα στα 142.3 ppm.

Το αρωματικό πρωτόνιο στα 6.56 ppm (H30) αλληλεπιδρά στο φάσμα HMBC με τον άνθρακα στα 32.4 ppm, 120.9 ppm, 142.3 ppm και λιγότερο με τον άνθρακα στα 143.7 ppm.

Τέλος το αρωματικό πρωτόνιο στα 6.53 ppm αλληλεπιδρά στο φάσμα HMBC με τους άνθρακες στα 115.5 ppm (C30) και 142.3 ppm.

Συμφώνα με τα παραπάνω φαίνεται πως ο C29 συντονίζεται στα 143.7 ppm και ο C28 στα 142.3 ppm, ενώ ο C27 στα 115.4 ppm και ο C26 στα 120.8 ppm.

Οι κορυφές των μεθυλίων στο φάσμα του πρωτονίου στα 2.20, 2.14 και 2.12 ppm αντιστοιχούν στο φάσμα HSQC με τους άνθρακες που συμπίπτουν στα 12.4 ppm. Στο φάσμα HMBC τα πρωτόνια του μεθυλίου που συντονίζονται στα 2.12 ppm αλληλεπιδρούν με τους γειτονικούς άνθρακες που συντονίζονται στα 114.9 (C12), 117.4 (C8) και 146.3 ppm (C25), επομένως πρόκειται για το H4. Αντίστοιχα τα πρωτόνια του μεθυλίου που συντονίζονται στα 2.14 ppm αλληλεπιδρούν με τους γειτονικούς άνθρακες που συληλεπιδρούν με τους γειτονικούς άνθρακες που συντονίζονται στα 2.14 ppm αλληλεπιδρούν με τους γειτονικούς άνθρακες που συντονίζονται στα 120.7, 125.2 και 146.3 ppm (C25), επομένως πρόκειται για το H2. Τέλος, το H1 (2.20 ppm) αλληλεπιδρά με τους γειτονικούς άνθρακες που συντονίζονται στα 120.7, 125.2 και 142.1 ppm (C11).

Σύμφωνα με τα παραπάνω στον Πίνακα **4** παρατίθενται οι χημικές μετατοπίσεις για τα πρωτόνια και τους άνθρακες της ένωσης **32**.

$HO_{3} = HO_{4} = H$		
No	¹ H	¹³ C
NO	(ppm)	(ppm)
1	2.20	
2	2.14	12.4
4	2.12	
5	-	125 2 120 7
6	-	123.2, 120.7
7	-	146.3
8	-	117.3
9	1.87	26.7
11	-	141.1
12	-	114.1
14	3.51 και 3.21	34.0
15	-	73.6
17	-	179.8
20	_	170.0
23	2.95 – 2.90	28.2
24	2.95 – 2.90	32.4
25	-	133.1
26	6.53	120.9
27	6.69	115.4
28	-	143.7
29	-	142.3
30	6.56	115.5

Πίνακας 4: Χημικές μετατοπίσεις ¹Η και ¹³C (ppm) της ένωσης 32.

2.6 Σύνθεση 1,3,4-οξαδιαζολικών υβριδικών αναλόγων της 4θειατοκοφερόλης/υδροξυτυροσόλης

Στο Σχήμα **26** περιγράφεται η ρετροσυνθετική ανάλυση σχεδιασμού των ενώσεων **38** και **39.** Οι ενώσεις **38** και **39** είναι δυνατόν να προκύψουν από αντίδραση ετερο-Diels-Alder αντίστροφης ηλεκτρονιακής απαίτησης μεταξύ της ο-θειοκινόνης που προκύπτει από το πρόδρομο ο-υδροξυ-*N*-θειοφθαλιμιδικό ανάλογο **7** και συμπεριφέρεται ως το ηλεκτρονιακά φτωχό ετερο-διένιο και του αλκενίου **36.** Το αλκένιο **36** μπορεί να ληφθεί από την αντίδραση του υδραζιδίου **34** (που μπορεί να προκύψει από το 3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)προπανοϊκό οξύ) με το μεθακρυλικό οξύ.



Σχήμα 26: Ρετροσυνθετική ανάλυση σχεδιασμού των ενώσεων **38, 39.**

• Σύνθεση της ένωσης 36

Στο Σχήμα **27** απεικονίζεται η σύνθεση του αλκενίου **36**. Αρχικά πραγματοποιείται εστεροποίηση του εμπορικά διαθέσιμου 3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)προπανοϊκού οξέος και λαμβάνεται ο 3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)προπανικός αιθυλεστέρας **(33)**. Στη συνέχεια ακολουθεί ο σχηματισμός του υδραζιδίου **34** με την προσθήκη ένυδρης υδραζίνης σε αιθανόλη στον εστέρα **33** και την ακτινοβόληση του μίγματος με μικροκύματα στα 180 watt για 10 λεπτά στους 120°C. Αντίδραση του υδραζιδίου **34** με το μεθακρυλικό οξύ παρουσία του αντιδραστηρίου σύζευξης HATU και *N*,*N*-διισοπροπυλοαιθυλαμίνης σε τετραϋδροφουράνιο οδηγεί στο δις-ακυλοϋδραζίδιο **35**. Κυκλοποίηση με ταυτόχρονη αφυδάτωση της ένωσης **35** με χρήση τοσυλοχλωρδίου και τριαιθυλαμίνης σε διχλωρομεθάνιο δίνει το 1,3,4-οξαδιαζολικό

παράγωγο **36**. Ο προτεινόμενος μηχανισμός κυκλοποίησης απεικονίζεται στο Σχήμα **28**.



(i) CH₃CH₂OH, πυκνό H₂SO₄, 75 °C (ii) NH₂NH₂·H₂O, CH₃CH₂OH MW: 180 W, 120 °C, 12 λεπτά (iii) HATU, DIPEA, THF, 0 °C → θερμοκρασία δωματίου (iv) TsCl, TEA, CH₂Cl₂, 0 °C → θερμοκρασία δωματίου

Σχήμα 27: Σύνθεση της ένωσης **36**.



Σχήμα 28: Μηχανισμός σύνθεσης της ένωσης **35**.



Σχήμα 29: Μηχανισμός κυκλοποίησης προς την ένωση **36.**³⁷

• Σύνθεση των ενώσεων 38 και 39

Το πρόδρομο ο-υδροξυ-*N*-θειοφθαλιμιδικό ανάλογο **7** παρουσία τριαιθυλαμίνης δίνει την ενδιάμεση ο-θειοκινόνη, η οποία με αντίδραση ετερο-Diels-Alder αντίστροφης ηλεκτρονιακής απαίτησης με το αλκένιο **36** σε χλωροφόρμιο δίνει βενζοθειϊνικό 1,3,4-οξαδιαζολικό ανάλογο **37**. Ακολουθεί η αποπροστασία του υδροξυλίου από την τερτ-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο ομάδα με φθοριούχο τετραβουτυλαμμώνιο σε τετραϋδροφουράνιο που οδηγεί στο τελικό προϊόν **38** και η αποπροστασία των υδροξυλίων από τις μεθόξυ-ομάδες δίνοντας το τελικό προϊόν **39** (Σχήμα **30**).



Σχήμα 30: Συνθετική πορεία των ενώσεων **38** και **39**.

Στις Εικόνες **40** και **41** φαίνονται τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ¹Η NMR και ¹³C NMR, αντίστοιχα της τελικής ένωσης **38**. Στο φάσμα ¹Η NMR διακρίνονται τα αρωματικά πρωτόνια του φαινολικού δακτυλίου H21, H24, H25 ως μία διπλή κορυφή στα 6.75 ppm, μία διπλή κορυφή στα 6.69 ppm και μία διπλή διπλών στα 6.65 ppm. Στα 4.41 ppm διακρίνεται μία απλή κορυφή λόγω του υδροξυλίου. Στα 3.84 ppm συμπίπτουν 2 απλές κορυφές που αντιστοιχούν στα 6 πρωτόνια του βενζοθειινικού δακτυλίου H14 το οποίο συμπίπτει με την τριπλή κορυφή στα 3.13 ppm που αντιστοιχεί στη μεθυλενική ομάδα H27, εμφανίζεται ως πολλαπλή στην περιοχή 3.06 – 2.98 ppm. Τέλος στα 2.14-2.15 ppm συμπίπτουν οι 3 κορυφές των μεθυλίων του φαινολικού δακτυλίου H1, H2, H4 ενώ τα πρωτόνια του μεθυλίου H9 εμφανίζονται ως μία απλή κορυφή στα 1.83 ppm.

Στο φάσμα ¹³C NMR της ένωσης **38** διακρίνονται οι άνθρακες του οξαδιαζολικού δακτυλίου στα 167.6 και 166.9 ppm, και οι 12 αρωματικοί άνθρακες στα 149.2, 148.0, 146.4, 141.9, 132.1, 125.0, 120.5, 120.4, 117.3, 115.0, 111.7 και 111.5 ppm. Στην αλειφατική περιοχή διακρίνονται 9 κορυφές στα 72.3, 56.1, 56.0, 33.8, 32.3, 27.7, 25.6, 12.4 και 12.3 ppm που αντιστοιχούν στους άνθρακες του βενζοθειινικού δακτυλίου C14 και C15, στους άνθρακες των μεθοξυ ομάδων C31 και C32, στους άνθρακες των μεθυλίων C1, C2, C4 και C9 και στους αλειφατικούς άνθρακες C27 και C28.



Εικόνα 40: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 38 σε CDCl₃.



Εικόνα 41: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης **38** σε CDCl₃.



Εικόνα 42: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης 38 σε CDCl3.

Στο ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης **38** (Εικόνα **42**) παρατηρούνται οι παρακάτω αλληλεπιδράσεις μεταξύ γειτονικών πρωτονίων:

6.75 (d, J = 8.1 Hz, 1H) και 6.65 (dd, J = 8.1, 1.8 Hz, 1H)

6.69 (d, J = 1.8 Hz, 1H) και 6.65 (dd, J = 8.1, 1.8 Hz, 1H)

3.13 (t, J = 7.6 Hz, 2H) кал 3.09 – 2.93 (m, 2H)

3.51 και 3.17 (AB_q, J_{AB} = 13.1 Hz, 2H)



Εικόνα 43: Ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης 38 σε CDCl3.

Στο ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης **38** (Εικόνα **43**) παρατηρούνται οι παρακάτω αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτονίων και άμεσα συνδεδεμένων ατόμων άνθρακα. επίσης, από τη φάση των κορυφών συσχέτισης διακρίνεται ο υβριδισμός των αντιστοίχων ανθράκων:

¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)
6.75	111.5 (CH)
6.69	111.7 (CH)
6.65	120.4 (CH)
3.84	56.1 και 56.0 (CH ₃)
3.51 και 3.17	33.8 (CH ₂)
3.13	27.7 (CH ₂)
3.06 - 2.98	32.3 (CH ₂)
2.15 - 2.14	12.3, 12.4 (CH₃)
1.83	25.6 (CH₃)



Εικόνα 44: Ετεροπυρηνικό φάσμα ΗΜΒC της ένωσης 38 σε CDCl3.

Στο ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC της ένωσης **38** (Εικόνα **44**) παρατηρούνται οι παρακάτω αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτονίων και γειτονικών ατόμων άνθρακα:

¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)
6.75	111.7, 132.1, 148.0 και 149.2
6.69	32.3, 120.4, 148.0 και 149.2
6.65	32.3, 111.7 και 148.0
4.41	117.3, 120.5 και 146.4
3.84	148.0 και 149.2
3.51 και 3.17	25.6, 72.3, 115.0 και 167.6
3.13	32.3, 132.1 και 166.9
3.06 - 2.98	27.7, 111.7, 120.4, 132.1 και 166.9
2.15 – 2.14	115.0, 117.3, 120.5, 125.0, 141.9 και 146.4
1.83	33.8, 72.3 και 167.6

Από το πείραμα HSQC είναι εμφανές ότι τα πρωτόνια του μεθυλίου που συντονίζονται στα 1.83 ppm (H9) ανήκουν στον άνθρακα που συντονίζεται στα 25.6 ppm (C9). Από το ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC φαίνεται ότι το H9 αλληλεπιδρά με τους γειτονικούς άνθρακες στα 33.8 (C14), 72.3 (C15) και 167.6 ppm (C17). Από το φάσμα HSQC παρατηρείται ότι στον C14 αντιστοιχούν τα δύο μεθυλενικά πρωτόνια

στα 3.51 και 3.17 ppm (H14) ενώ στους C15 και C17 δεν αντιστοιχούν πρωτόνια. Τα πρωτόνια H14, σύμφωνα με το φάσμα HMBC, αλληλεπιδρούν με τους γειτονικούς άνθρακες που συντονίζονται στα 25.6 (C9), 72.3 (C15) και 167.6 ppm (C17) όπως ήταν αναμενόμενο, καθώς και με τον άνθρακα στα 115.0 ppm ο οποίος βάσει του φάσματος HSQC, δεν αντιστοιχεί σε κανένα πρωτόνιο (C12). Τα μεθυλενικά πρωτόνια που συντονίζονται στα 3.13 ppm αλληλεπιδρούν στο φάσμα HMBC, με τους γειτονικούς άνθρακες στα 32.3 (C27), 132.1 (C26) και 166.9 ppm (C20). Παράλληλα τα μεθυλενικά πρωτόνια που συντονίζονται στην περιοχή 3.06 – 2.98 αλληλεπιδρούν με τους γειτονικούς άνθρακες στα 27.7 (C28), 111.7 (C21), 120.4 (C25), 132.1 (C26), και 166.9 (C20) ppm. Από το φάσμα του HSQC φαίνεται ότι οι άνθρακες που συντονίζονται στα 120.4, 111.7 και 111.5 συνδέονται με τα αρωματικά πρωτόνια στα 6.65, 6.69 και 6.75 αντίστοιχα. Επιπλέον, από το φάσμα του ¹Η και τη σχάση που εμφανίζουν τα αρωματικά πρωτόνια συμπεραίνεται ότι η διπλή διπλών στα 6.65 ppm (J = 8.1, 1.8) αντιστοιχεί στο H25, η διπλή κορυφή στα 6.75 ppm (*J* = 8.1) αντιστοιχεί στο H24 και η διπλή κορυφή στα 6.69 ppm (*J* = 1.8) στο H21. Από το φάσμα COSY επιβεβαιώνεται ότι τα πρωτόνια στα 6.75 και 6.69 ppm βρίσκονται σε γειτονικούς άνθρακες C25 και C24 ενώ το πρωτόνιο στα 6.75 ppm αντιστοιχεί στον C21.

Από την αλληλεπίδραση των πρωτονίων των μεθόξυ ομάδων H31 και H32 στο HMBC με τους άνθρακες στα 148.0 και 149.2 ppm είναι σαφές ότι πρόκειται για τους άνθρακες 22 και 23 του αρωματικού δακτυλίου.

Το αρωματικό πρωτόνιο στα 6.75 ppm (H24) αλληλεπιδρά στο φάσμα HMBC περισσότερο με τους άνθρακες στα 132.1 ppm (C26), 149.2 ppm, λιγότερο με τον άνθρακα στα 148.0 ppm και ελάχιστα με τον άνθρακα στα 111.7 ppm (C21).

Το αρωματικό πρωτόνιο στα 6.69 ppm (H21) αλληλεπιδρά στο φάσμα HMBC με τους άνθρακες στα 32.3 ppm (C27), 120.4 ppm (C25) 148.0 ppm και λιγότερο με τον άνθρακα στα 149.2 ppm.

Τέλος το αρωματικό πρωτόνιο στα 6.65 ppm (H25) αλληλεπιδρά στο φάσμα HMBC με τους άνθρακες στα 32.3 ppm (C27), 111.7 ppm (C21) και μόνο με τον άνθρακα στα 148.0 ppm.

Συμφώνα με τα παραπάνω φαίνεται πως ο C23 συντονίζεται στα 148.0 ppm και ο C22 στα 149.2 ppm.

Η κορυφή στα 4.41 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του υδροξυλίου και από το φάσμα του HMBC φαίνεται να αλληλεπιδρά με τους τρεις γειτονικούς άνθρακες στα 117.3, 120.5 και 146.4 ppm. Η τελευταία κορυφή αποδίδεται στον άνθρακα που συνδέεται με την υδροξυλομάδα (C7).

Οι κορυφές των μεθυλίων στο φάσμα του πρωτονίου συμπίπτουν στα 2.15 – 2.14 ppm και στο φάσμα HMBC αντιστοιχούν με όλους του άνθρακες του βενζολικού δακτυλίου 115.0, 117.3, 120.5, 125.0, 141.9 και 146.4 ppm. Από αυτές τις μετατοπίσεις μόνο ο C12 μπορεί να αποδωθεί στα 115.0 ppm, ο C11 στα 141.9 ppm και ο C7 στα 146.4 ppm όπως αναφέρεται παραπάνω.

Σύμφωνα με τα παραπάνω στον Πίνακα **5** παρατίθενται οι χημικές μετατοπίσεις για τα πρωτόνια και τους άνθρακες της ένωσης **38**.

$\begin{array}{c} \begin{array}{c} \begin{array}{c} CH_{3} \\ HO \\ 3 \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} HO \\ 3 \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} HO \\ 1 \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} HO \\ 3 \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} HO \\ 1 \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} HO \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} HO \\ 1 \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} HO \\ HO \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} HO \\ HO \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} HO \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} HO \\ HO \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} HO \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} HO \\ HO \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} HO \\ HO \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} HO \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} HO \\ HO \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} HO \\ HO \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} HO \\ HO \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} HO \\ HO \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} HO \\ HO \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} HO \\ HO \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} HO \\ HO \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} HO \\ HO \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} HO \\ HO \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} HO \\ HO \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} HO \\ HO \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} HO \\ HO \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} HO \\ HO \\ \end{array} \\ \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} HO \\ HO \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} HO \\ HO \\ \end{array} \\ \\ \end{array} \\ \\ \begin{array}{c} HO \\ HO \\ \end{array} \\ \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} HO \\ HO \\ \end{array} \\ HO \\ \\ \end{array} \\ \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \\ \begin{array}{c} HO \\ HO \\ \end{array} \\ \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \\ \end{array} \\ \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \\ \begin{array}{c} HO \\ \\ HO \\ \end{array} \\ \\ \end{array} \\ \\ \end{array} \\ \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \\ \end{array} \\ \end{array} \\ $		
No	¹ H(ppm)	¹³ C(ppm)
1, 2, 4	2.14 – 2.15	12.4 και 12.3
3	4.41	-
5, 6, 8	-	117.3, 120.5 και 125.0
7	-	146.4
9	1.83	25.6
11	-	141.9
12	-	115.0
14	3.51 και 3.17	33.8
15	-	72.3
17	-	167.6
20	-	166.9
21	6.69	111.7
22	-	149.2
23	-	148.0
24	6.75	111.5
25	6.65	120.4
26	-	132.1
27	3.06 - 2.98	32.3
28	3.13	27.7
31	3.8/1	56 1 56 0
32	5.84	50.1, 50.0

Πίνακας 5: Χημικές μετατοπίσεις ¹Η και ¹³C (ppm) της ένωσης 38.

Στις Εικόνες **45** και **46** φαίνονται τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ¹Η NMR και ¹³C NMR, αντίστοιχα της τελικής ένωσης **39**. Στο φάσμα ¹Η NMR διακρίνονται τα αρωματικά πρωτόνια του φαινολικού δακτυλίου H21, H24, H25 ως μία διπλή κορυφή στα 6.66 ppm, μία απλή κορυφή στα 6.47 ppm και μία διπλή στα 6.45 ppm. Το AB σύστημα στα 3.52 και 3.20 ppm αντιστοιχεί στα 2 πρωτόνια του βενζοθειινικού δακτυλίου H14. Η τριπλή κορυφή που ακολουθεί στα 3.09 ppm αντιστοιχεί στη μεθυλενική ομάδα H28. Η δεύτερη μεθυλενική ομάδα H27 εμφανίζεται ως πολλαπλή στην περιοχή 3.01 – 2.81 ppm. Τέλος στα 2.16 - 2.12 ppm συμπίπτουν οι 3 κορυφές των μεθυλίων του βενζολικού δακτυλίου H1, H2, H4 ενώ τα πρωτόνια του μεθυλίου H9 εμφανίζονται ως μία απλή κορυφή στα 1.84 ppm.

Στο φάσμα ¹³C NMR της ένωσης **39** διακρίνονται οι άνθρακες του οξαδιαζολικού δακτυλίου στα 167.6 και 167.0 ppm και οι 12 αρωματικοί άνθρακες στα 146.3, 143.8, 142.6, 142.0, 131.9, 125.1, 120.6, 120.6, 117.4, 115.5, 115.4 και 114.9 ppm. Στην αλειφατική περιοχή οι 6 κορυφές στα 72.3, 33.7, 32.0, 27.6, 26.1 και 12.4 ppm αντιστοιχούν στους άνθρακες του βενζοθειινικού δακτυλίου C14 και C15, στους άνθρακες των μεθυλίων C1, C2, C4 και C9 και στους αλειφατικούς άνθρακες C27 και C28.



Εικόνα 45: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 39 σε CDCl₃.



Εικόνα 46: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης 39 σε CDCl₃.



Εικόνα 47: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης 39 σε CDCl3.

Στο ομοπυρηνικό φάσμα COSY της ένωσης **39** (Εικόνα **47**) παρατηρούνται οι παρακάτω αλληλεπιδράσεις μεταξύ γειτονικών πρωτονίων:

6.66 (d, J = 8.0 Hz, 1H) και 6.45 (d, J = 8.0 Hz, 1H)

3.09 (t, J = 7.3 Hz, 2H) και 3.01 – 2.81 (m, 2H)

3.52 και 3.20 (AB_q, J_{AB} = 13.1 Hz, 2H)



Εικόνα 48: Ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης 39 σε CDCl3.

Στο ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC της ένωσης **39** (Εικόνα **48**) παρατηρούνται οι παρακάτω αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτονίων και άμεσα συνδεδεμένων ατόμων άνθρακα. Επίσης από τη φάση των κορυφών συσχέτισης διακρίνεται ο υβριδισμός των αντιστοίχων ανθράκων:

¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)
6.66	115.5 (CH)
6.47	115.4 (CH)
6.45	120.6 (CH)
3.52 και 3.20	33.7 (CH ₂)
3.09	27.6 (CH ₂)
3.01 - 2.81	32.0 (CH ₂)
2.16, 2.13, 2.12	12.4 (CH₃)
1.84	26.1 (CH₃)



Εικόνα 49: Ετεροπυρηνικό φάσμα ΗΜΒC της ένωσης 39 σε CDCl₃.

Στο ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC της ένωσης **39** (Εικόνα **49**) παρατηρούνται οι παρακάτω αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτονίων και γειτονικών ατόμων άνθρακα:

¹³ C (ppm)
131.9, 142.6 και 143.8
120.64 και 143.8
32.0, 115.4 και 142.6
26.1, 72.3, 114.9 και 167.6
32.0, 131.9 και 167.0
27.6, 115.4, 120.6, 131.9 και 167.0
120.6, 125.1 και 142.0
120.6, 125.1 και 146.3
114.9, 117.4 και 146.3
33.7, 72.3 και 167.6

Από το πείραμα HSQC είναι εμφανές ότι τα πρωτόνια του μεθυλίου που συντονίζονται στα 1.84 ppm (H9) ανήκουν στον άνθρακα που συντονίζεται στα 26.1 ppm (C9). Από το ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC φαίνεται ότι το H9 αλληλεπιδρά με τους γειτονικούς άνθρακες στα 33.7 (C14), 72.3 (C15) και 167.6 ppm (C17). Από το φάσμα του HSQC παρατηρείται ότι στον C14 αντιστοιχούν τα δύο μεθυλενικά πρωτόνια στα 3.52 και 3.20 ppm (H14) ενώ στους C15 και C17 δεν αντιστοιχούν πρωτόνια. Τα πρωτόνια Η14, σύμφωνα με το φάσμα ΗΜΒC, αλληλεπιδρούν με τους γειτονικούς άνθρακες που συντονίζονται στα 26.1 (C9), 72.3 (C15) και 167.6 ppm (C17) όπως ήταν αναμενόμενο, καθώς και με τον άνθρακα στα 114.9 ppm ο οποίος βάσει του φάσματος HSQC, δεν αντιστοιχεί σε κανένα πρωτόνιο (C12). Τα μεθυλενικά πρωτόνια που συντονίζονται στα 3.09 ppm αλληλεπιδρούν στο φάσμα HMBC, με τους γειτονικούς άνθρακες στα 32.0 (C27), 131.9 (C26) και 167.0 ppm (C20). Παράλληλα τα μεθυλενικά πρωτόνια που συντονίζονται στην περιοχή 3.01 -2.81 αλληλεπιδρούν με τους γειτονικούς άνθρακες στα 27.6 (C28), 27.6, 115.4, 120.6, 131.9 (26) και 167.0 ppm (20). Από το φάσμα του HSQC παρατηρείται ότι οι άνθρακες που συντονίζονται στα 120.4, 115.5 και 115.4 συνδέονται με τα αρωματικά πρωτόνια στα 6.45, 6.66 και 6.47 αντίστοιχα. Επιπλέον, από το φάσμα COSY φαίνεται ότι τα πρωτόνια στα 6.66 και 6.45 ppm βρίσκονται σε γειτονικούς άνθρακες C25 και C24 ενώ το πρωτόνιο στα 6.47 ppm αντιστοιχεί στον C21. Από το φάσμα του ¹Η και τη σχάση που εμφανίζουν τα αρωματικά πρωτόνια επιβεβαιώνεται ότι η διπλή κορυφή στα 6.66 ppm (J = 8.0) και η διπλή κορυφή στα 6.45 ppm (J = 8.0) αντιστοιχούν σε γειτονικούς άνθρακες ενώ η απλή στα 6.47 ppm στο Η21.

Το αρωματικό πρωτόνιο στα 6.66 ppm αλληλεπιδρά στο φάσμα HMBC με τους άνθρακες στα 131.9 ppm (C26), 143.8 ppm και λιγότερο με τον άνθρακα στα 142.6 ppm.

Το αρωματικό πρωτόνιο στα 6.47 ppm (H21) αλληλεπιδρά στο φάσμα HMBC με τον άνθρακα στα 120.6 ppm και με τον άνθρακα στα 143.8 ppm.

Τέλος το αρωματικό πρωτόνιο στα 6.45 ppm αλληλεπιδρά στο φάσμα HMBC με τους άνθρακες στα 32.0 ppm (C27), 115.4 ppm (C21) και 142.6 ppm.

Συμφώνα με τα παραπάνω φαίνεται πως ο C23 συντονίζεται στα 143.8 ppm και ο C22 στα 142.6 ppm, ενώ ο C25 στα 120.6 ppm και ο C24 στα 115.5 ppm.

Οι κορυφές των μεθυλίων στο φάσμα του πρωτονίου συμπίπτουν στην περιοχή 2.16 – 2.12 ppm και στο φάσμα HSQC αντιστοιχούν στους άνθρακες που συμπίπτουν στα 12.4 ppm. Στο φάσμα HMBC τα πρωτόνια του μεθυλίου που συντονίζονται στα 2.12 ppm αλληλεπιδρούν με τους γειτονικούς άνθρακες που συντονίζονται στα 114.9 (C12), 117.4 (C8) και 146.3 ppm (C7), επομένως πρόκειται για τα H4. Αντίστοιχα τα πρωτόνια του μεθυλίου που συντονίζονται στα 2.13 ppm αλληλεπιδρούν με τους γειτονικούς άνθρακες που συντονίζονται στα 120.6, 125.1 και 146.3 ppm (C7), επομένως πρόκειται για το H2. Τέλος, το H1(2.17 ppm) αλληλεπιδρά με τους γειτονικούς άνθρακες που συντονίζονται στα 120.6, 125.1 και 142.0.ppm (C11).

Σύμφωνα με τα παραπάνω στον Πίνακα **6** παρατίθενται οι χημικές μετατοπίσεις για τα πρωτόνια και τους άνθρακες της ένωσης **39**.



Πίνακας 6: Χημικές μετατοπίσεις ¹Η και ¹³C (ppm) της ένωσης **39**.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΥΒΡΙΔΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ 4-ΘΕΙΑΤΟΚΟΦΕΡΟΛΗΣ/ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗΣ

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα βιολογικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν από την ερευνητική ομάδα της Δρ Νίκης Χονδρογιάννη από την υποψήφια Διδάκτορα Νικόλ Παπαευγενίου στο Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

Στα πειράματα εξετάζεται η επίδραση των νέων υβριδικών ενώσεων **19, 27, 32, 38** και **39** στην πρωτεασωμική ενεργότητα χυμοθρυψίνης σε νεαρούς HFL-1 πρωτογενείς ινοβλάστες.

3.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Ανθρώπινοι εμβρυϊκοί ινοβλάστες πνεύμονα HFL-1 στρώθηκαν και διατηρήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό [DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium: Invitrogen Life Technologies Inc.), με συμπλήρωμα 10% (v/v) ορό εμβρύου μόσχου, 100 Units/ml πενικιλλίνης, 100 μg/ml στρεπτομυκίνης, 2mM γλουταμίνης και 1% (v/v) μη απαραίτητα αμινοξέα]. Ύστερα από 24 ώρες, το θρεπτικό υλικό συμπληρώθηκε με τις υπό εξέταση ενώσεις σε 4 διαφορετικές τελικές συγκεντρώσεις (0.5, 2, 5, 10 μg/ml) ή προστέθηκε ο αντίστοιχος διαλύτης [0,1% διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)], και ακολούθησε πρόσθετη επώαση 24 ωρών. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν, λύθηκαν, εκχυλίστηκαν οι πρωτεΐνες τους και υποβλήθηκαν σε δοκιμές ενεργοτήτων πρωτεασώματος. Η ανίχνευση της κύριας ενεργότητας του πρωτεασώματος (τύπου χυμοθρυψίνης που είναι υπεύθυνη για την αποικοδόμηση μετά από υδρόφοβα αμινοξικά κατάλοιπα) διεξήχθη σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα, με την υδρόλυση του φθορίζοντος πεπτιδίου LLVY-AMC, για 30 λεπτά, στους 37°C. Η ενεργότητα του πρωτεασώματος ορίζεται ως η διαφορά μεταξύ της συνολικής ενεργότητας των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων και της υπολειπόμενης ενεργότητας, παρουσία 10 μΜ του αναστολέα πρωτεασώματος MG132. Ο φθορισμός μετρήθηκε με τη βοήθεια φθορισμοφωτομέτρου VersaFluorTM (BioRad Laboratories Inc.). Οι συγκεντρώσεις πρωτεΐνης προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Bradford και βάσει του προτύπου BSA.

3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

• Βιολογική αποτίμηση της ένωσης 19

Στο ιστόγραμμα 1 διακρίνονται τα ποσοστά πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης σε νεαρούς HFL-1 πρωτογενείς ινοβλάστες ύστερα από επώαση 24 ωρών με την ουσία **19**. Οι τελικές συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν είναι 0.5, 2, 5 και 10 μg/ml. Οι τιμές αποτελούν τον μέσο όρο των μετρήσεων 2 ανεξάρτητων πειραμάτων. Η ουσία **MK151** χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας σε τελικές συγκεντρώσεις 0.5 και 2 μg/ml, ενώ αντίστοιχος όγκος DMSO (διαλύτης των χορηγημένων ουσιών) ως μάρτυρας όλων των χορηγημένων ουσιών. Οι γραμμές σφάλματος υποδεικνύουν το τυπικό σφάλμα μέσου. *p<0.5, **p<0.01, ***p<0.001



Ιστόγραμμα 1: Ποσοστά πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης σε νεαρούς HFL-1 πρωτογενείς ινοβλάστες παρουσία της ένωσης **19**.

Στην περίπτωση της ένωσης **19** σε συγκεντρώσεις 0.5, 2, 5 μg/mL παρατηρείται μεγαλύτερο ποσοστό πρωτεασωμικής ενεργότητας συγκριτικά με το θετικό μάρτυρα **MK151** σε τελική συγκέντρωση 0.5 και 2 μg/mL. Η ένωση **19** χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα των υπόλοιπων ενώσεων ως θετικός μάρτυρας σε συγκέντρωση 0.5 μg/mL, η οποία έδωσε το μεγαλύτερο ποσοστό πρωτεασωμικής ενεργότητας.

Στο ιστόγραμμα 2 διακρίνονται τα ποσοστά πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης σε νεαρούς HFL-1 πρωτογενείς ινοβλάστες ύστερα από επώαση 24 ωρών με την ουσία **27**. Οι τελικές συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν είναι 0.5, 2, 5 και 10 μg/ml. Οι τιμές αποτελούν τον μέσο όρο των μετρήσεων 2 ανεξάρτητων πειραμάτων. Οι ουσίες **MK151** και **19** χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες σε τελική συγκέντρωση 0.5 μg/ml, ενώ αντίστοιχος όγκος DMSO (διαλύτης των χορηγημένων ουσιών) ως μάρτυρας όλων των χορηγημένων ουσιών. Οι γραμμές σφάλματος υποδεικνύουν το τυπικό σφάλμα μέσου. *p<0.5, **p<0.01, ***p<0.001



Ιστόγραμμα 2: Ποσοστά πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης σε νεαρούς HFL-1 πρωτογενείς ινοβλάστες παρουσία της ένωσης **27**.

Στην περίπτωση της ένωσης **27** σε συγκέντρωση 5 μg/mL παρατηρείται μεγαλύτερο ποσοστό πρωτεασωμικής ενεργότητας συγκριτικά με τους θετικούς μάρτυρες **MK151** και **19** σε τελική συγκέντρωση 0.5 μg/mL. Ωστόσο η ένωση **27** σε συγκέντρωση 0.5 μg/mL οδηγεί σε μικρότερο ποσοστό ενεργότητας του πρωτεασώματος συγκριτικά με τους θετικούς μάρτυρες στην ίδια συγκέντρωση. Επιπλέον, σε συγκέντρωση 10 μg/mL παρατηρείται μείωση του ποσοστού ενεργότητας συγκριτικά με τους θετικούς μάρτυρες στην ίδια συγκέντρωση 0.5 μg/ml καθώς και με του θετικούς μάρτυρες σε τελική συγκέντρωση 0.5 μg/ml καθώς και με τον αντίστοιχο όγκο DMSO (διαλύτης των χορηγημένων ουσιών). Η ένωση **27** σε συγκέντρωση 10 μg/mL θα μπορούσε να εξεταστεί για πιθανή ανασταλτική δράση.

Στο ιστόγραμμα 3 διακρίνονται τα ποσοστά πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης σε νεαρούς HFL-1 πρωτογενείς ινοβλάστες ύστερα από επώαση 24 ωρών με την ουσία **32**. Οι τελικές συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν είναι 0.5, 2, 5 και 10 μg/ml. Οι τιμές αποτελούν τον μέσο όρο των μετρήσεων 2 ανεξάρτητων πειραμάτων. Οι ουσίες **MK151** και **19** χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες σε τελική συγκέντρωση 0.5 μg/ml, ενώ αντίστοιχος όγκος DMSO (διαλύτης των χορηγημένων ουσιών) ως μάρτυρας όλων των χορηγημένων ουσιών. Οι γραμμές σφάλματος υποδεικνύουν το τυπικό σφάλμα μέσου. *p<0.5, **p<0.01, ***p<0.001



Ιστόγραμμα 3: Ποσοστά πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης σε νεαρούς HFL-1 πρωτογενείς ινοβλάστες παρουσία της ένωσης **32**.

Στην περίπτωση της ένωσης **32** σε συγκεντρώσεις 2, 5 και 10 μg/mL παρατηρείται μεγαλύτερο ποσοστό πρωτεασωμικής ενεργότητας συγκριτικά με τους θετικούς μάρτυρες **MK151** και **19** σε τελική συγκέντρωση 0.5 μg/mL. Ωστόσο η ένωση **32** σε συγκέντρωση 0.5 μg/mL δεν φαίνεται να οδηγεί σε μεγαλύτερο ποσοστό ενεργότητας του πρωτεασώματος συγκριτικά με τους θετικούς μάρτυρες στην ίδια συγκέντρωση.

Στο ιστόγραμμα 4 διακρίνονται τα ποσοστά πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης σε νεαρούς HFL-1 πρωτογενείς ινοβλάστες ύστερα από επώαση 24 ωρών με την ουσία **38**. Οι τελικές συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν είναι 0.5, 2, 5 και 10 μg/ml. Οι τιμές αποτελούν τον μέσο όρο των μετρήσεων 1 ανεξάρτητου πειράματος. Οι ουσίες **MK151** και **19** χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες σε τελική συγκέντρωση 0.5 μg/ml, ενώ αντίστοιχος όγκος DMSO (διαλύτης των χορηγημένων ουσιών) ως μάρτυρας όλων των χορηγημένων ουσιών. Οι γραμμές σφάλματος υποδεικνύουν το τυπικό σφάλμα μέσου. *p<0.5, **p<0.01, ***p<0.001



Ιστόγραμμα 4: Ποσοστά πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης σε νεαρούς HFL-1 πρωτογενείς ινοβλάστες παρουσία της ένωσης **38**.

Στην περίπτωση της ένωσης **38** σε συγκέντρωση 2 μg/mL παρατηρείται μεγαλύτερο ποσοστό πρωτεασωμικής ενεργότητας συγκριτικά με τους θετικούς μάρτυρες **MK151** και **19** σε τελική συγκέντρωση 0.5 μg/mL. Ωστόσο η ένωση **38** σε συγκέντρωση 0.5 μg/mL δεν φαίνεται να οδηγεί σε μεγαλύτερο ποσοστό ενεργότητας του πρωτεασώματος συγκριτικά με τους θετικούς μάρτυρες στην ίδια συγκέντρωση.

Στο ιστόγραμμα 5 διακρίνονται τα ποσοστά πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης σε νεαρούς HFL-1 πρωτογενείς ινοβλάστες ύστερα από επώαση 24 ωρών με την ουσία **39**. Οι τελικές συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν είναι 0.5, 2, 5 και 10 μg/ml. Οι τιμές αποτελούν τον μέσο όρο των μετρήσεων 1 ανεξάρτητου πειράματος. Η ουσία **19** χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας σε τελική συγκέντρωση 0.5 μg/ml, ενώ αντίστοιχος όγκος DMSO (διαλύτης των χορηγημένων ουσιών) ως μάρτυρας όλων των χορηγημένων ουσιών. Οι γραμμές σφάλματος υποδεικνύουν το τυπικό σφάλμα μέσου. *p<0.5, **p<0.01, ***p<0.001



Ιστόγραμμα 5: Ποσοστά πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης σε νεαρούς HFL-1 πρωτογενείς ινοβλάστες παρουσία της ένωσης **39**.

Στην περίπτωση της ένωσης **39** σε συγκέντρωση 10 μg/mL παρατηρείται μεγαλύτερο ποσοστό πρωτεασωμικής ενεργότητας συγκριτικά με το θετικό μάρτυρα **19** σε τελική συγκέντρωση 0.5 μg/mL. Ωστόσο η ένωση **39** σε συγκέντρωση 0.5 μg/mL δεν φαίνεται να οδηγεί σε μεγαλύτερο ποσοστό ενεργότητας του πρωτεασώματος συγκριτικά με το θετικό μάρτυρα στην ίδια συγκέντρωση. Επιπλέον η ένωση **39** σε συγκέντρωση 2 μg/mL φαίνεται ότι προκαλεί μείωση του ποσοστού ενεργότητας συγκριτικά με τους θετικούς μάρτυρες σε τελική συγκέντρωση 0.5 μg/ml καθώς και με τον αντίστοιχο όγκο DMSO (διαλύτης των χορηγημένων ουσιών). Η ένωση **39** σε συγκέντρωση 2 μg/mL φαίνεται θα μπορούσε να εξεταστεί για πιθανή ανασταλτική δράση.
3.4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι νέες υβριδικές ενώσεις **19, 27, 32, 38** και **39** προκαλούν πρωτεασωμική ενεργότητα χυμοθρυψίνης σε νεαρούς HFL-1 πρωτογενείς ινοβλάστες. Ειδικότερα, η ένωση **19,** η οποία είναι υποκατεστημένη με 1,2,3-τριαζολικό δακτύλιο, η **32** η οποία είναι υποκατεστημένη με 1,2,4-οξαδιαζολικό δακτύλιο και οι ενώσεις **38** και **39** οι οποίες είναι υποκατεστημένες με 1,3,4-οξαδιαζολικό δακτύλιο εμφανίζουν παρόμοια ικανότητα ενεργοποίησης του πρωτεασώματος σε συγκέντρωση 0.5 μg/mL. Η λιγότερο δραστική ένωση σε συγκέντρωση 0.5 μg/mL είναι η **27**, η οποία είναι υποκατεστημένο δακτύλιο.

Τέλος η ένωση **38** η οποία είναι το διμεθόξυ ανάλογο της ένωσης **39**, εμφανίζει παρόμοια ικανότητα ενεργοποίησης με την **39** σε συγκέντρωση 0.5 μg/mL.

Συνεπώς στην παρούσα βιοδοκιμή φαίνεται ότι ο ετεροκυκλικός δακτύλιος έχει μεγαλύτερη επίδραση στην πρωτεασωμική ενεργότητα χυμοθρυψίνης νεαρών ινοβλαστών από τις ελεύθερες υδροξυλομάδες του δακτυλίου.

Μελλοντικά πειράματα θα αποσαφηνίσουν εάν οι ενώσεις **19**, **27**, **32**, **38** και **39** είναι δομικοί ενεργοποιητές του πρωτεασώματος και εάν προκαλούν επέκταση του προσδόκιμου ζωής των πρωτογενών ινοβλαστών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας συντέθηκαν 5 νέες βιοεμπνευσμένες υβριδικές ενώσεις συνδυάζοντας σε ένα μόριο την υδροξυτυροσόλη και την 4-θειατοκοφερόλη, ενωμένες μέσω πενταμελών ετεροκυκλικών δακτυλίων. Συγκεκριμένα συντέθηκαν το 1,2,3-τριαζολικό ανάλογο 19, το ισοξαζολικό ανάλογο 27, το 1,2,4-οξαδιαζολικό ανάλογο 32 και το 1,3,4οξαδιαζολικό ανάλογο 39. Επιπλέον, συντέθηκε το διμεθόξυ ανάλογο της ένωσης 39, η ένωση 38.

Αντίδραση – κλειδί για τη σύνθεση των ετεροκυκλικών αναλόγων της 4θειατοκοφερόλης ήταν η αντίδραση ετερο – Diels Alder αντίστοφης ηλεκτρονιακής απαίτησης.

Η βιολογική αποτίμηση των νέων αναλόγων έδειξε ότι οι νέες υβριδικές ενώσεις **19**, **27, 32, 38** και **39** προκαλούν πρωτεασωμική ενεργότητα χυμοθρυψίνης σε νεαρούς HFL-1 πρωτογενείς ινοβλάστες.

Οι ενώσεις **19, 32, 38** και **39** εμφανίζουν παρόμοια ικανότητα ενεργοποίησης του πρωτεασώματος σε συγκέντρωση 0.5 μg/mL, σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα MK151 στην ίδια συγκέντρωση.

Η ένωση **27** εμφανίζει τη μικρότερη δραστικότητα ενεργοποίησης του πρωτεασώματος, σε συγκέντρωση 0.5 μg/mL, σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα MK151 στην ίδια συγκέντρωση.

Οι ενώσεις **38** και **39**, εμφανίζουν παρόμοια ικανότητα ενεργοποίησης σε συγκέντρωση 0.5 μg/mL επομένως ο ετεροκυκλικός δακτύλιος έχει μεγαλύτερη επίδραση στην πρωτεασωμική ενεργότητα χυμοθρυψίνης νεαρών ινοβλαστών από τις υδροξυλομάδες του δακτυλίου.

<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5</u>

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Όργανα - Διαλύτες – Αντιδραστήρια

Σε όλες τις συνθετικές πορείες χρησιμοποιήθηκαν χημικώς καθαρά αντιδραστήρια και διαλύτες τα οποία ήταν εμπορικά διαθέσιμα από τις εταιρίες Aldrich, Alfa, Fluka, Merck καθαρότητας \geq 98%. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν είναι άνυδροι και οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε ατμόσφαιρα αδρανούς αερίου (N₂). Η απομάκρυνση της υγρασίας από τους διαλύτες έγινε με απόσταξή τους υπό αδρανές αέριο (το τετραϋδροφουράνιο αποστάζεται από νάτριο παρουσία βενζοφαινόνης, το διχλωρομεθάνιο αποστάζεται από υδρίδιο του ασβεστίου) ή με ξήρανση παρουσία μοριακών κόσκινων.

Για τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας χρησιμοποιήθηκαν πλάκες επιστρωμένες με γέλη πυριτίου τύπου Merck F254.

Για τη χρωματογραφία στήλης υπό πίεση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου (200 – 400 mesh)

Οι αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν με την επίδραση μικροκυμάτων έγιναν σε αντιδραστήρα CEM Discover LabMate.

Τα φάσματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) ¹Η και ¹³C ελήφθησαν σε φασματογράφο Varian 300 MHz ή 600 MHz. Οι δευτεριωμένοι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τη λήψη των φασμάτων ήταν CDCl₃, CD₃OD και (CD₃)₂CO. Οι χημικές μετατοπίσεις (δ) μετρήθηκαν σε σύγκριση με τις γνωστές χημικές μετατοπίσεις των δευτεριωμένων διαλυτών και εκφράζονται σε ppm ενώ οι σταθερές σύζευξης σε Hz. Τα σύμβολα που χρησιμοποιήθηκαν για την περιγραφή της πολλαπλότητας των κορυφών είναι: (s) απλή, (bs) ευρεία απλή, (d) διπλή, (dd) διπλή διπλών, (t) τριπλή, (m) πολλαπλή. Η επεξεργασία των φασμάτων πραγματοποιήθηκε με το υπολογιστικό πακέτο MestReNova.

Τα φάσματα μάζας ελήφθησαν σε φασματόμετρο LC-MSⁿ Fleet, Thermo όπου ο ιονισμός των ουσιών έγινε μέσω της τεχνικής ηλεκτροψεκασμού (ESI, Electron Spray Ionisation). Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν MeOH (LC-MS).

Τα φάσματα μάζας υψηλής ανάλυσης (HR-MS) ελήφθησαν σε φασματογράφο μάζας UHPLC LC-MSⁿ Orbitrap Velos-Thermo.

Φθαλιμιδικό κάλιο (1)



Σε διάλυμα KOH 84% (169.7 mmol, 9.5 g) σε απόλυτη αιθανόλη (100 mL) προστίθεται φθαλιμίδιο (119 mmol, 17.5 g) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται με θέρμανση υπό επαναρροή για 1 ώρα. Το μίγμα αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου. Το προϊόν

συλλέγεται μετά από διήθηση υπό κενό και πλύσεις με απόλυτη αιθανόλη ως λευκό στερεό και χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο χωρίς επιπλέον καθαρισμό.

Απόδοση: 21.2 g (96%)

Ν,Ν'-Διθειοδιφθαλιμίδιο (2)



Σε εναιώρημα της ένωσης **1** (50 mmol, 9.26 g) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (50 mL) προστίθεται στάγδην S_2Cl_2 (25 mmol, 2 mL) στους 0 °C. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Το μίγμα της αντίδρασης διηθείται και το

στερεό που λαμβάνεται μετά από εξάτμιση του διαλύτη πλένεται αρχικά με νερό, στη συνέχεια με αιθέρα και τέλος με μίγμα: μεθανόλη / χλωροφόρμιο 1:2. Το προϊόν που λαμβάνεται ως υπόλευκο στερεό χρησιμοποιείται σε επόμενο στάδιο χωρίς επιπλέον καθαρισμό.

Απόδοση: 5.26 g (59%)

Σ.Τ.: 114 - 116 °C

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 7.96 – 7.95 (m, 4H, Ar), 7.83 – 7.82 (m, 4H, Ar)

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 166.7, 135.1, 132.4, 124.5

Φθαλιμιδοσουλφενυλο χλωρίδιο (3)



Σε διάλυμα της ένωσης **2** (7.0 mmol, 2.5 g) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (70 mL) προστίθεται άνυδρη πυριδίνη (0.3 mL) και SO₂Cl₂ (42 mmol, 3.4 mL) στάγδην. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 48 ώρες. Το προϊόν

λαμβάνεται μετά από εξάτμιση του διαλύτη ως κίτρινο στερεό και χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο χωρίς επιπλέον καθαρισμό.

Τριμεθυλοξικός-(4-υδροξυ-2,3,5-τριμεθυλο)φαινυλεστέρας (4)



Σε διάλυμα τριμεθυλοακετυλοχλωριδίου (8.57 mmol, 1.05 mL) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (5 mL) προστίθεται στάγδην στους 0 °C διάλυμα που περιέχει 2,3,5-υδροκινόνη (8.6 mmol, 1.30 g) και άνυδρη πυριδίνη (20.8 mmol, 1.7 mL) σε

άνυδρο διχλωρομεθάνιο (4.7 mL). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα αραιώνεται με διχλωρομεθάνιο και η οργανική φάση πλένεται με διάλυμα οξικού οξέος (1M), με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου και ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν λαμβάνεται ως υπόλευκο κρυσταλλικό στερεό κατόπιν πολλαπλών πλύσεων με πεντάνιο.

Απόδοση: 1.4 g (70%)

Σ.Τ.: 117 - 119 °C

Rf: 0.45 (Πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / οξικός αιθυλεστέρας 9:1).

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 6.58 (s, 1H, Ar), 4.65 (s, 1H, OH), 2.17 (s, 3H, CH₃), 2.14 (s, 3H, CH₃), 2.02 (s, 3H, CH₃), 1.37 (2 s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C NMR (**75** MHz, CDCl₃): δ 177.7, 149.7, 142.4, 127.0, 123.5, 121.3, 120.6, 39.2, 27.4, 15.9, 12.7, 12.3

HRMS (ESI): υπολογισθέν για C₁₄H₂₁O₃ [M+H]⁺ 237.14124, ευρεθέν για C₁₄H₂₁O₃ 237.14844, υπολογισθέν για C₁₄H₂₀O₃Na [M+Na]⁺ 259.14124, ευρεθέν για C₁₄H₂₀O₃Na 259.13000.

4-(t-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-2,3,5-τριμεθυλοφαινυλο πιβαλικός εστέρας (5)



Σε διάλυμα της ένωσης **4** (5.2 mmol, 1.24 g) σε άνυδρο διμέθυλοφορμαμίδιο (10.5 mL) προστίθεται ιμιδαζόλιο (10.5 mmol, 710 mg) και tβουτυλοδιμεθυλοσιλυλοχλωρίδιο (10.5 mmol, 1.57 g).

Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 48 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης ο διαλύτης εξατμίζεται, το στερεό υπόλοιπο διαλύεται σε διχλωρομεθάνιο και ακολουθούν πλύσεις με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου. Η οργανική φάση πλένεται με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν λαμβάνεται ως υπόλευκο κρυσταλλικό στερεό μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: Πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / Οξικός αιθυλεστέρας 99:1)

Απόδοση: 1.8 g (99%)

Σ.Τ.: 47 - 49 °C

Rf: 0.64 (Πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / Οξικός αιθυλεστέρας 96:4).

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 6.60 (s, 1H, Ar), 2.16 (s, 3H, CH₃), 2.12 (s, 3H, CH₃), 1.99 (s, 3H, CH₃), 1.37 (s, 9H, OCC(CH₃)₃), 1.03 (s, 9H, (SiC(CH₃)₃), 0.16 (s, 6H, (CH₃)₂Si).

¹³C NMR (**75** MHz, CDCl₃): δ 177.4, 149.4, 143.3, 128.5, 127.1, 126.7, 121.0, 39.2, 27.4, 26.2, 18.8, 17.8, 14.6, 13.0, 3.0

HRMS (ESI): υπολογισθέν για C₂₀H₃₅O₃Si [M+H]⁺ 351.22772, ευρεθέν για C₂₀H₃₅O₃Si 351.23469, υπολογισθέν για C₂₀H₃₄O₃SiNa [M+Na]⁺ 373.22772, ευρεθέν για C₂₀H₃₄O₃SiNa 373.21656

2,3,5-τριμεθυλο-4-((2-(τριμεθυλοσιλυλο)προπαν-2-υλο)οξυ)φαινόλη (6)



Σε εναιώρημα LiAlH₄ (5.2 mmol, 197 mg) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (5.2 mL) προστίθεται στους 0 °C διάλυμα της ένωσης **5** (2.6 mmol, 910 mg) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (7.3 mL). Το μίγμα της αντίδρασης

αναδεύεται στους 0 °C για 25 λεπτά. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης η περίσσεια LiAlH₄ υδρολύεται με στάγδην προσθήκη διαλύματος: τετραϋδροφουράνο / H₂O (95:5) στους 0 °C. Το μίγμα της αντίδρασης αραιώνεται με οξικό αιθυλεστέρα και ακολουθεί προσθήκη άνυδρου θειικού νατρίου, και το μίγμα διηθείται από γη διατόμων υπό κενό. Το διήθημα συμπυκνώνεται υπό κενό και το προϊόν λαμβάνεται ως υποκίτρινο διαυγές έλαιο μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: Πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / Ακετόνη 96:4).

Απόδοση: 0.67 g (96%)

R_f: 0.4 (Πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / Οξικός αιθυλεστέρας 96:4).

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 6.44 (s, 1H, Ar), 4.28 (s, 1H, OH), 2.14 (s, 3H, CH₃Ar), 2.12 – 2.11 (2s, *6*H, CH₃-Ar), 1.03 (s, 9H, (SiC(CH₃)₃), 0.14 (s, 6H, (CH₃)₂Si).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 147.5, 145.6, 128.5, 126.3, 120.9, 114.6, 26.2, 18.8, 17.7, 14.6, 12.2, -3.1

HRMS (ESI): υπολογισθέν για C₁₅H₂₅O₂Si [M-H]⁻ 265.17021, ευρεθέν για C₁₅H₂₅O₂Si 265.16277

2-((2-υδροξυ-3,4,6-τριμεθυλο-5-((2-(τριμεθυλοσιλυλο)προπαν-2υλο)φαινυλο)θειο)ισοινδολινο-1,3-διονη (7)



Σε διάλυμα της ένωσης **6** (11.5 mmol, 3.10 g) σε άνυδρο χλωροφόρμιο (23.3 mL) προστίθεται διάλυμα της ένωσης **3** (14.0 mmol, 2.99 g) σε άνυδρο χλωροφόρμιο (28 mL) στάγδην στους 0 °C. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε

θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα αραιώνεται με διχλωρομεθάνιο και ακολουθούν πλύσεις της οργανικής φάσης με κορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου, με νερό και με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν λαμβάνεται ως κίτρινο στερεό μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: Διχλωρομεθάνιο / Πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C 30:5)

Απόδοση: 4.68 g (91%)

Σ.Τ.: 174 - 176 °C

Rf: 0.44 (Πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / Οξικός αιθυλεστέρας 9:1).

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 8.39 (s, 1H, OH), 7.89 – 7.87 (m, 2H, Ar), 7.77 – 7.74 (m, 2H, Ar), 2.71 (s, 3H, CH₃), 2.17 (s, 3H, CH₃), 2.12 (s, 3H, CH₃), 1.02 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.11 (s, 6H, (CH₃)₂Si)

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 169.1, 152.5, 145.0, 135.4, 134.9, 132.2, 131.8, 124.2, 122.5, 116.1, 26.2, 18.8, 16.9, 15.2, 13.2, -3.1

HRMS (ESI): υπολογισθέν για C₂₃H₃₀NO₄SSi [M+H]⁺ 444.15866, ευρεθέν για C₂₃H₃₀NO₄SSi 444.16599

2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)οξικό οξύ (8)



Σε διάλυμα 2-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)οξικού οξέος (10.2 mmol, 2.0 g), σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (40 mL) προστίθεται BF₃S(CH₃)₂ (101.9 mmol, 10.7 mL) στάγδην στους

0 °C. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου, απουσία φωτός για 24 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης διαβιβάζεται άζωτο στην αντίδραση έως ότου εξατμιστεί ο διαλύτης και το προϊόν που λαμβάνεται ως διαυγές κίτρινο έλαιο, χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο χωρίς επιπλέον καθαρισμό.

Rf: 0.63 (Διχλωρομεθάνιο / Μεθανόλη 7:3)

2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)μεθυλεστέρας (9)



Σε διάλυμα της ένωσης **8** (10.2 mmol) σε μεθανόλη (140 mL) προστίθεται πυκνό θειικό οξύ (10 σταγόνες). Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται υπό επαναρροή, απουσία φωτός

για 2 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το μίγμα αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου, η μεθανόλη εξατμίζεται υπό κενό σχεδόν μέχρι ξηρού, προστίθεται οξικός αιθυλεστέρας και η οργανική φάση πλένεται με κορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου και κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν που λαμβάνεται ως πορτοκαλί έλαιο χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο χωρίς επιπλέον καθαρισμό.

Rf: 0.58 (Πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / Οξικός αιθυλεστέρας 1:1)

¹**H NMR (300 MHz, CD₃OD):** δ 6.70 – 6.68 (m, 2H, Ar), 6.56 (dd, *J* = 8.1, 1.9 Hz, 1H, Ar), 3.66 (s, 3H, OCH₃), 3.46 (s, 2H, CH₂)

2-(2,2-διμεθυλοβενζο[d][1,3]διοξο-6-)μεθυλεστέρας (10)



Σε διάλυμα της ένωσης **9** (10.2 mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (102 mL) προστίθεται 2,2διμεθοξυπροπάνιο (101.9 mmol, 12.5 mL) και

καμφοροσουλφονικό οξύ (1.9 mmol, 438 mg). Το μίγμα θερμαίνεται υπό επαναρροή, απουσία φωτός για 24 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το μίγμα αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθεται κορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου, μέχρι ουδέτερο pH. Το μίγμα της αντίδρασης αραιώνεται με οξικό αιθυλεστέρα, η οργανική φάση πλένεται με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν λαμβάνεται ως πορτοκαλί διαυγές έλαιο μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: Πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / Οξικός αιθυλεστέρας 95:5)

Απόδοση 3 σταδίων από την ένωση 8: 2.1 g (92%)

Rf: 0.61 (Πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / Οξικός αιθυλεστέρας 85:15)

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 6.68 - 6.66 (m, 3H, Ar), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 3.52 (s, 2H, CH₂), 1.66 (s, 6H, C(CH₃)₂)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 172.3, 147.7, 146.6, 126.9, 121.8, 118.0, 109.6, 108.2, 52.1, 40.9, 25.95

2-(2,2-διμεθυλοβενζο[d][1,3]διοξο-6-αιθανόλη (11)



Σε εναιώρημα LiAlH₄ (14 mmol, 532 mg) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (20 mL) προστίθεται στους 0 °C διάλυμα της ένωσης **10** (9.3 mmol, 2.08 g) σε άνυδρο

τετραϋδροφουράνιο (32 mL). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για μία ώρα. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης η περίσσεια LiAlH₄ υδρολύεται με στάγδην προσθήκη διαλύματος: τετραϋδροφουράνιο / H₂O (95:5) στους 0 °C. Το μίγμα της αντίδρασης αραιώνεται με οξικό αιθυλεστέρα, και ακολουθεί προσθήκη άνυδρου θειικού νατρίου, διηθείται από γη διατόμων υπό κενό και πλένεται με οξικό αιθυλεστέρα. Το διήθημα συμπυκνώνεται υπό κενό και το προϊόν που λαμβάνεται ως κίτρινο έλαιο χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο χωρίς επιπλέον καθαρισμό.

Rf: 0.15 (Πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / Οξικός αιθυλεστέρας 85:15)

¹**H NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ 6.68 – 6.63 (m, 3H, Ar), 3.80 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂OH), 2.77 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂Ar), 1.66 (s, 6H, C(CH₃)₂)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 147.7, 146.1, 131.5, 121.3, 117.8, 109.2, 108.2, 63.9, 38.97, 25.9

2-(2,2-διαιθυλοβενζο[d][1,3]διοξολο-6)αιθυλο-4-μεθυλοβενζοσουλφονικός εστέρας (12)



Σε διάλυμα της ένωσης **11** (9.3 mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (38.1 mL) προστίθεται Et₃N (72.5 mmol, 10.2 mL) στάγδην στους 0 °C και ακολουθεί προσθήκη διαλύματος

τοσυλοχλωριδίου (24.2 mmol, 4.61 g) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (20 mL) στάγδην στους 0 °C. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 19 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα αραιώνεται με διχλωρομεθάνιο. Η οργανική φάση πλένεται με νερό και με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν λαμβάνεται ως άχρωμο κρυσταλλικό στερεό μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: Πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / Οξικός αιθυλεστέρας 9:1)

Απόδοση 2 σταδίων από την ένωση 11: 3.2g (99%)

Σ.Τ.: 39 - 41 °C

Rf: 0.35 (Πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / Οξικός αιθυλεστέρας 9:1)

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 7.72 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, Ar), 7.30 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, Ar), 6.59 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar), 6.51 – 6.49 (m, 2H, Ar), 4.14 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂O), 2.84 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂Ar), 2.44 (s, 3H, CH₃), 1.65 (s, 6H, C(CH₃)₂).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 147.6, 146.4, 144.7, 133.1, 129.8, 129.2, 127.9, 121.4, 117.9, 109.1, 108.2, 70.9, 35.2. 25.9, 21.7

HRMS (ESI): υπολογισθέν για C₁₈H₂₁O₅S [M+H]⁺ 349.10314, ευρεθέν για C₁₈H₂₁O₅S 349.11054, υπολογισθέν για C₁₈H₂₀O₅SNa [M+Na]⁺ 371.10314, ευρεθέν για C₁₈H₂₀O₅SNa 371.09211

5-(2-αζιδοαιθυλο)-2,2-διμεθυλοβενζο[d][1,3]διοξόλη (13)



Σε διάλυμα τηε ένωσης **12** (2.5 mmol, 890 mg) σε άνυδρο διμεθυλοφορμαμίδιο (8.5 mL) προστίθεται NaN₃ (25.4 mmol, 1.66 g). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε

θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα αραιώνεται με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση πλένεται με νερό και με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν που λαμβάνεται ως διαυγές έλαιο, χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο χωρίς επιπλέον καθαρισμό.

Rf: 0.56 (Πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / Οξικός αιθυλεστέρας 95:5)

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 6.67 - 6.60 (m, 3H, Ar), 3.45 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂N₃) 2.79 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂Ar), 1.66 (s, 6H, C(CH₃)₂)

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 147.7, 146.4, 131.1, 121.2, 117.9, 108.97, 108.3, 52.8, 35.2, 25.9

1-(1-(2,2-διμεθυλβενζο[d][1,3]διοξολ-5-υλο)αιθυλο)-1*Η*-1,2,3-τριαζολ-4υλο)αιθαν-1-όλη (14)



Σε διάλυμα της ένωσης **13** (2.2 mmol, 489 mg) σε διχλωρομεθάνιο (6.7 mL) προστίθεται 3-βουτιν-2όλη (4.5 mmol, 0.35 mL). Στη συνέχεια προστίθεται H₂O (2.2 mL), ένυδρος θειικός χαλκός

(0.67 mmol, 167 mg) και ασκορβικό νάτριο (1.3 mmol, 265 mg). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται έντονα σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης προστίθεται νερό και η οργανική φάση πλένεται με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν λαμβάνεται ως υποπράσινο κρυσταλλικό στερεό μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: Διχλωρομεθάνιο / Μεθανόλη 95:5)

Απόδοση 2 σταδίων: 0.528 g (82%)

Σ.Τ.: 104 - 106 °C

Rf: 0.48 (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 95:5)

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 7.69 (bs, 1H, τριαζολίου), 6.61 – 6.50 (m, 3H, Ar), 4.94 (bs, 1H, CH(OH)CH₃), 4.56 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂N), 3.09 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂Ar), 1.61 (s, 6H, C(CH₃)₂), 1.49 (d, *J* = 5.8 Hz, 3H, CH₃)

¹³C NMR (**75** MHz, CD₃OD): δ 149.0, 147.8, 131.8, 122.9, 122.3, 118.9, 109.8, 109.0, 63.7, 52.9, 37.3, 25.9, 23.8

HRMS (ESI): υπολογισθέν για C₁₅H₂₀N₃O₃ [M+H]⁺ 290.14264, ευρεθέν για C₁₅H₂₀N₃O₃ 290.14983, υπολογισθέν για C₁₅H₁₉N₃O₃Na [M+Na]⁺ 312.14264, ευρεθέν για C₁₅H₁₉N₃O₃Na 312.13141

1-1-(2-(2,2-διμεθυλοβενζο[d][1,3]διοξολ-5-υλο)αιθυλο)-1Η-1,2,3-τριαζολο-4υλο)αιθαν-1-όνη (15)



Σε διάλυμα της ένωσης **14** (1.8 mmol, 514 mg) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (35.5 mL) προστίθεται MnO₂ (17.8 mmol, 1.55 g). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2.5

ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα διηθείται από γη διατόμων υπό κενό και πλένεται με διχλωρομεθάνιο. Το διήθημα συμπυκνώνεται υπό κενό και το προϊόν λαμβάνεται ως λευκό στερεό.

Απόδοση: 493 mg (97%)

Σ.Τ.: 134 - 136 °C

R_f: 0.77 (Διχλωρομεθάνιο / Μεθανόλη 95:5)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.81 (s, 1H, τριαζολίου), 6.59 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar), 6.47 – 6.43 (m, 2H, Ar), 4.57 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂N), 3.10 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂Ar), 2.65 (s, 3H, CH₃C=O), 1.63 (s, 6H, C(CH₃)₂).

¹³C NMR (**75** MHz, CDCl₃): δ 192.9, 147.9, 147.85, 146.7, 129.3, 125.7, 121.1, 118.2, 108.6, 108.4, 52.2, 36.3, 27.1, 25.8

HRMS (ESI): υπολογισθέν για C₁₅H₁₈N₃O₃ [M+H]⁺ 288.12699, ευρεθέν για C₁₅H₁₈N₃O₃ 288.13424, υπολογισθέν για C₁₅H₁₇N₃O₃Na [M+Na]⁺ 310.12699, ευρεθέν για C₁₅H₁₇N₃O₃Na 310.11594

1-(2-(2,2-διμεθυλοβενζο[d][1,3]διοξολ-5-υλο)αιθυλο)-4-(προπ-1-εν-2-υλο)-1*Η*-1,2,3-τριαζόλιο (16)



Σε εναιώρημα βρωμιούχου μεθυλοτριφαίνυλο φωσφονίου (4.96 mmol, 1.77 g) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (3.3 mL) προστίθεται tβουτοξείδιο του καλίου (4.96 mmol, 556 mg) στους

0 °C. Το μίγμα αναδεύεται στους 0 °C για 15 λεπτά. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη διαλύματος της ένωσης **15** (1.7 mmol, 474 mg) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (6.4 mL) στάγδην. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης προστίθεται νερό και ακολουθεί εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση πλένεται με νερό και με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν λαμβάνεται ως υποκίτρινο έλαιο μετά από καθαρισμό με στήλη χρωματογραφίας υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: Πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / Ακετόνη 85:15).

Απόδοση: 461 mg (98%)

Rf: 0.34 (Πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / Οξικός αιθυλεστέρας 75:25)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.27 (s, 1H, τριαζολίου), 6.61 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, Ar), 6.50 – 6.47 (m, 2H, Ar), 5.64 (s, 1H, CH₂=C), 5.05 - 5.04 (m, 1H, CH₂=C) 4.49 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₂N), 3.07 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₂Ar), 2.08 (s, 3H, CH₃), 1.64 (s, 6H, C(CH₃)₂)

¹³**C NMR (75 MHz, CDCl₃):** δ 148.5, 147.8, 146.5, 133.6, 130.1, 121.2, 120.0, 118.1, 112.4, 108.9, 108.4, 51.9, 36.6, 25.9, 20.7

HRMS (ESI): υπολογισθέν για C₁₆H₂₀N₃O₂ [M+H]⁺ 286.14773, ευρεθέν για C₁₆H₂₀N₃O₂ 286.15507, υπολογισθέν για C₁₆H₁₉N₃O₂Na [M+Na]⁺ 308.14773, ευρεθέν για C₁₆H₁₉N₃O₂Na 308.13695

4-(6-((τερτ-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο)οξυλο)-2,5,7,8-τετραμεθυλο-2,3διυδροβενζο[b][1,4]οξαθειιν-2-υλο)-1-(2-(2,2-διμεθυλοβενζο[d][1,3]διοξολ-5υλο)αιθυλο)-1*H*-1,2,3-τριαζόλιο (17)



Σε διάλυμα της ένωσης **7** (0.139 mmol, 61.7 mg σε άνυδρο χλωροφόρμιο (2.8 mL) προστίθεται στους 0°C άνυδρη τριαιθυλαμίνη (20 μL) και η

ένωση **16** (0.139 mmol, 39.7 mg). Το μίγμα θερμαίνεται υπό επαναρροή για 48 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης ακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη και το προϊόν λαμβάνεται ως σκούρο κίτρινο έλαιο μετά από καθαρισμό με στήλη χρωματογραφίας υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: Πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / Οξικός αιθυλεστέρας 83:17).

Απόδοση: 53.5 mg (66%)

Rf: 0.45 (Πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / Οξικός αιθυλεστέρας 8:2)

¹**H NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ 7.09 (s, 1H, τριαζολίου), 6.59 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar), 6.44 – 6.41 (m, 2H, Ar), 4.56 – 4.37 (m, 2H, CH₂N), 3.35, 3.21 (AB_q, *J_{AB}* = 13.0 Hz, 2H, CH₂S), 3.05 (t, *J* = 7.0, 2H, CH₂Ar), 2.11 (s, 3H, CH₃Ar), 2.10 (s, 3H, CH₃Ar), 2.07 (s, 3H, CH₃Ar), 1.77 (s, 3H, CH₃), 1.65 (s, 6H, (CH₃)₂C), 1.03 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.11 (d, *J* = 1.5, 6H, (CH₃)₂Si)

¹³C NMR (**75** MHz, CDCl₃): δ 151.9, 147.8, 145.3, 142.3, 134.4, 132.7, 130.1, 124.8, 124.3, 123.7, 122.2, 121.2, 118.1, 114.6, 108.3, 72.2, 52.0, 36.6, 35.0, 27.2, 26.1, 25.9, 18.7, 14.4, 14.3, 12.4, 3.3

HRMS (ESI): υπολογισθέν για $C_{31}H_{44}N_3O_4SSi$ [M+H]⁺ 582.27435, ευρεθέν για $C_{31}H_{44}N_3O_4SSi$ 582.28169, υπολογισθέν για $C_{31}H_{43}N_3O_4SSiNa$ [M+Na]⁺ 604.27435, ευρεθέν για $C_{31}H_{43}N_3O_4SSiNa$ [M+Na]⁺ 604.27435,

2-(1-(2-(2,2-διμεθυλοβενζο[d][1,3]διοξολ-5-υλο)αιθυλο)-1*Η*-1,2,3-τριαζολ-4-υλο)-2,5,7,8-τετραμεθυλο-2,3-διυδροβενζο[b][1,4]οξαθειιν-6-ολη (18)



Σε διάλυμα της ένωσης **17** (0.21 mmol, 122.2 mg) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (4.2 mL) προστίθεται διάλυμα TBAF σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (4.2 mL, 0.05M). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται

σε θερμοκρασία δωματίου για 40 λεπτά. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα αραιώνεται με διχλωρομεθάνιο και ακολουθούν πλύσεις της οργανικής φάσης με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου. Η οργανική φάση πλένεται με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν λαμβάνεται ως λευκό στερεό μετά από καθαρισμό με στήλη χρωματογραφίας υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: Πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / Οξικός αιθυλεστέρας 75:25)

Απόδοση: 71 mg (72%)

Σ.Τ.: 151 - 153 °C

Rf: 0.2 (Πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / Οξικός αιθυλεστέρας 75:25)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.08 (s, 1H, τριαζολίου), 6.57 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, Ar), 6.45 – 6.39 (m, 2H, Ar), 4.55 – 4.38 (m, 2H, CH₂N), 3.37, 3.19 (AB_q, *J_{AB}* = 13.0 Hz, 2H, CH₂S), 3.05 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂Ar), 2.17 (s, 3H, CH₃Ar), 2.13 (s, 6H, 2CH₃Ar), 1.77 (s, 3H, CH₃), 1.65 (s, 6H, C(CH₃)₂)

¹³C NMR (**75** MHz, CDCl₃): δ 151.8, 147.8, 146.5, 145.7, 141.9, 130.1, 124.2, 121.3, 121.2, 119.9, 118.1, 117.0, 114.6, 108.8, 108.3, 72.3, 52.0, 36.6, 35.0, 27.3, 25.9, 12.3

HRMS (ESI): υπολογισθέν για $C_{25}H_{30}N_3O_4S$ [M+H]⁺ 468.18788, ευρεθέν για $C_{25}H_{30}N_3O_4S$ 468.19481, υπολογισθέν για $C_{25}H_{29}N_3O_4SNa$ [M+Na]⁺ 490.18788, ευρεθέν για $C_{25}H_{29}N_3O_4SNa$ 490.17648, υπολογισθέν για $C_{25}H_{28}N_3O_4S$ [M-H]⁻ 466.18788, ευρεθέν για $C_{25}H_{28}N_3O_4S$ 466.17964

4-(2-(4-(6-υδροξυ-2,5,7,8-τετραμεθυλο-2,3-διυδροβενζο[b][1,4]οξαθειιν-2-υλο)-1-1,2,3-τριαζολ-1-υλο)αιθυλοφαινυλο-1,2-διόλη (19)



Σε διάλυμα της ένωσης **18** (0.094 mmol, 44 mg) σε απαερωμένο χλωροφόρμιο (2 mL) προστίθεται στάγδην στους 0°C διαλύμα τριφθοροξικού οξέος/νερού 75:25 (0.65 mL). Το μίγμα αναδεύεται

σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης προστίθεται κορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου, μέχρι ουδέτερο pH. Το μίγμα της αντίδρασης αραιώνεται με χλωροφόρμιο, η οργανική φάση πλένεται με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν λαμβάνεται ως κίτρινο έλαιο μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: Διχλωρομεθάνιο / Μεθανόλη 96:4)

Απόδοση: 12.5 mg (31%)

R_f: 0.55 (Διχλωρομεθάνιο / Μεθανόλη 96:4).

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 7.08 (s, 1H, τριαζολίου), 6.71 (d, J = 1.7 Hz, 1H, Ar), 6.69 (d, J = 8.0 Hz, 1H, Ar), 6.39 (dd, J = 8.0, 1.7 Hz, 1H, Ar), 4.58 – 4.40 (m, 2H, CH₂N), 3.37, 3.18 (AB_q, $J_{AB} = 13.0$ Hz, 2H, CH₂S), 3.08 – 2.98 (m, 2H, CH₂Ar), 2.16 (s, 3H, CH₃Ar), 2.13 (s, 3H, CH₃Ar), 2.11 (s, 3H, CH₃Ar), 1.77 (s, 3H, CH₃)

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 151.6, 145.7, 144.4, 143.2, 142.0, 129.3, 124.4, 121.8, 120.7, 120.3, 117.3, 115.7, 115.4, 114.5, 72.2, 52.2, 36.3, 34.9, 27.9, 12.5, 12.4, 12.3

HRMS (ESI): υπολογισθέν για $C_{22}H_{26}N_3O_4S$ [M+H]⁺ 428.15658, ευρεθέν για $C_{22}H_{26}N_3O_4S$ 428.16338, υπολογισθέν για $C_{22}H_{25}N_3O_4SNa$ [M+Na]⁺ 450.15658, ευρεθέν για $C_{22}H_{25}N_3O_4SNa$ 450.14526, υπολογισθέν για $C_{22}H_{24}N_3O_4S$ [M-H]⁻ 426.15658, ευρεθέν για $C_{22}H_{24}N_3O_4S$ 426.14826

3-(2,2-διμεθυλοβενζο[d][1,3]διοξολ-5-υλο)προπανονιτρίλιο (20)



Σε διάλυμα της ένωσης **12** (5.9 mmol, 2.05 g) σε DMSO (5.9 mL) προστίθεται NaCN (17.6 mmol, 864.4 mg). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται στους 50 °C για 1 ώρα.

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, προστίθεται H₂O στους 0 °C και διαιθυλαιθέρας. Η οργανική φάση πλένεται με H₂O και με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν λαμβάνεται ως άχρωμο διαυγές έλαιο μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: Πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / Ακετόνη 9:1)

Απόδοση: 1.128 g (94%)

Rf: 0.46 (Πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / Ακετόνη 85:15)

¹H NMR (600 MHz, (CD₃)₂CO): δ 6.75 – 6.68 (m, 3H, Ar), 2.85 (t, J = 7.3 Hz, 2H, CH₂CN), 2.70 (t, J = 7.3 Hz, 2H, CH₂Ar), 1.63 (s, 6H, C(CH₃)₂)

¹³C NMR (150 MHz, (CD₃)₂CO): δ 148.5, 147.2, 133.0, 121.8, 120.2, 118.6, 109.3, 108.8, 31.8, 25.9, 19.6

HRMS (ESI): υπολογισθέν για C₁₂H₁₄NO₂ [M+H]⁺ 204.09463, ευρεθέν για C₁₂H₁₄NO₂ 204.10174, υπολογισθέν για C₁₂H₁₃NO₂Na [M+Na]⁺ 226.09463, ευρεθέν για C₁₂H₁₃NO₂Na 226.08333

3-(2,2-διμεθυλοβενζυλο[d][1,3]διοξολο-5-υλο)προπανάλη (21)



Σε διάλυμα της ένωσης **20** (0.69 mmol, 140 mg) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (2.85 mL) προστίθεται διάλυμα DIBAL-H 1M σε εξάνιο (0.9 mL) στάγδην στους -78 °C. Το

μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται στους -78°C για 1.5 ώρα. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα HCl 2M (2.5 mL) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Το μίγμα αραιώνεται με διχλωρομεθάνιο και η οργανική στοιβάδα πλένεται με διάλυμα HCl 2M, με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν που λαμβάνεται ως κίτρινο έλαιο, χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο χωρίς επιπλέον καθαρισμό.

Rf: 0.64 (Πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / Οξικός αιθυλεστέρας 8:2)

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 9.81 (t, *J* = 1.4 Hz, 1H, CHO), 6.64 – 6.58 (m, 3H, Ar), 2.86 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂CHO), 2.73 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂Ar), 1.66 (s, 6H, C(CH₃)₂)

HRMS (ESI): υπολογισθέν για C₁₂H₁₅O₃ [M+H]⁺ 207.09429, ευρεθέν για C₁₂H₁₅O₃ 207.10155, υπολογισθέν για C₁₂H₁₄O₃Na [M+Na]⁺ 429.09429, ευρεθέν για C₁₂H₁₄O₃Na 429.08345

Οξίμη της 3-(2,2-διμεθυλοβενζο[d][1,3]διοξολο-5-υλο)προπανάλης (22)



Σε διάλυμα της ένωσης **21** (0.64 mmol, 132 mg) σε tert-βουτανόλη / H_2O 1:1 (2.6 mL) προστίθεται υδροχλωρική υδροξυλαμίνη (62 mg, 0.96 mmol) και

υδατικό διάλυμα NaOH 1N (0.96 mL). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1.5 ώρα. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα, η οργανική φάση πλένεται με H₂O και με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν λαμβάνεται ως διαυγές έλαιο, ως μίγμα γεωμετρικών ισομερών μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: Πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / Οξικός αιθυλεστέρας 9:1).

Απόδοση: 127.7 mg (90%)

Rf: 0.32 (Πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / οξικός αιθυλεστέρας 9:1)

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 7.45 (t, 0.5H, CH=N), 6.74 (t, 0.5H, CH=N), 6.65 – 6.58 (m, 3H, Ar), 2.74 – 2.71 (m, 2H, CH₂), 2.67 – 2.66 (m, 1H, CH₂), 2.49 – 2.45 (m, 1H, CH₂), 1.66 (s, 6H, C(CH₃)₂)

¹³C NMR (150 MHz, (CD₃)₂CO)): δ 150.7, 150.0, 148.4, 146.6, 135.4, 121.3, 109.2, 108.6, 32.5, 27.4, 25.9

HRMS (ESI): υπολογισθέν για C₁₂H₁₆NO₃ [M+H]⁺ 222.10519, ευρεθέν για C₁₂H₁₆NO₃ 222.11238, υπολογισθέν για C₁₂H₁₅NO₃Na [M+Na]⁺ 244.10519, ευρεθέν για C₁₂H₁₅NO₃Na 244.09422, υπολογισθέν για C₁₂H₁₄NO₃ [M-H]⁻ 220.10519, ευρεθέν για C₁₂H₁₄NO₃ 220.09775

1-(3-(2-(2,2-διμεθυλοβενζο[d][1,3]διοξολο-5-υλο)αιθυλο)ισοξαζολ-5υλο)αιθανόνη (23)



Σε διάλυμα της ένωσης **22** (0.32 mmol, 70 mg) σε άνυδρη βουτανόνη (2.65 mL) προστίθεται 3-βουτιν-2-όνη (0.47 mmol, 32.3 mg) και νιτρώδες ισοπεντύλιο (0.35 mmol, 40.7 mg). Το μίγμα της

αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και στη συνέχεια θερμαίνεται υπό επαναρροή στους 65 °C για 1 ώρα. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν λαμβάνεται ως κίτρινο έλαιο μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: Πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / Οξικός αιθυλεστέρας 9:1)

Απόδοση: 25 mg (27%)

Rf: 0.38 (Πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / Οξικός αιθυλεστέρας 9:1)

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 6.66 – 6.56 (m, 3H Ar, 1H οξαζολίου), 3.01 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, CH₂- οξαζόλιο), 2.90 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, CH₂Ar), 2.59 (s, 3H, CH₃), 1.66 (s, 6H, C(CH₃)₂)

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃): δ 187.2, 166.6, 164.3, 147.8, 146.2, 133.2, 120.7, 118.0, 108.7, 108.3, 107.2, 34.2, 28.2, 27.4, 26.0

HRMS (ESI): υπολογισθέν για C₁₆H₁₈NO₄ [M+H]⁺ 288.11576, ευρεθέν για C₁₆H₁₈NO₄ 288.12292, υπολογισθέν για C₁₆H₁₇NO₄Na [M+Na]⁺ 310.11576, ευρεθέν για C₁₆H₁₇NO₄Na 310.10455

(3-(2-(2,2-διμεθυλοβενζο[d][1,3]διοξολο-5-υλο)αιθυλο)-5-(προπ-1-εν-2υλο)ισοξαζολιο (24)



Σε εναιώρημα βρωμιούχου μεθυλοτριφαίνυλο φωσφονίου (0.5 mmol, 180.2 mg) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (0.5 mL) προστίθεται tβουτοξείδιο του καλίου (0.5 mmol, 56.6 mg) στους

0 °C. Το μίγμα αναδεύεται στους 0 °C για 15 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθεται διαλύμα της ένωσης **15** (0.168 mmol, 48.3 mg) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (0.5 mL) στάγδην. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης προστίθεται νερό και ακολουθεί εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση πλένεται με νερό και με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν λαμβάνεται ως υποκίτρινο έλαιο μετά από καθαρισμό με στήλη χρωματογραφίας υπό πίεση (Πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / Οξικός αιθυλεστέρας 95:5).

Απόδοση: 67%

Rf: 0.63 (Πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / Οξικός αιθυλεστέρας 9:1)

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 6.65 – 6.60 (m, 3H, Ar), 5.99 (s, 1H, οξαζολίου), 5.74 (s, 1H CH2=C), 5.26 (s, 1H, CH2=C), 2.93 – 2.88 (m, 4H, 2CH₂), 2.05 (s, 3H, CH₃), 1.66 (s, 6H, C(CH₃)₂)

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃): 170.2, 163.5, 147.5, 145.8, 133.8, 130.7, 120.5, 117.6, 116.6, 108.6, 108.0, 100.2, 34.2, 28.3, 25.8, 19.6

HRMS (ESI): υπολογισθέν για C₁₇H₂₀NO₃ [M+H]⁺ 286.13649, ευρεθέν για C₁₇H₂₀NO₃ 286.14381, υπολογισθέν για C₁₇H₁₉NO₃Na [M+Na]⁺ 308.13649, ευρεθέν για C₁₇H₁₉NO₃Na 308.12567

5-(6-((tert-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο)οξυ)-2,5,7,8-τετραμεθυλο-2,3διυδροβενζο[b][1,4]οξαθειιν-2-υλο)-3-(2,2-διμεθυλοβενζο[d][1,3]διοξολ-5υλο)εθυλο)ισοξαζόλιο (25)



Σε διάλυμα της ένωσης **7** (0.22 mmol, 98 mg) σε άνυδρο χλωροφόρμιο (4.4 mL) προστίθεται στους 0°C άνυδρη τριαιθυλαμίνη (31 μL) και η ένωση **24** (0.11 mmol, 31.5 mg).

Το μίγμα θερμαίνεται υπό επαναρροή για 48 ώρες. Η αντίδραση δεν ολοκληρώθηκε οπότε διακόπηκε. Ακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη και το προϊόν λαμβάνεται μαζί με την ένωση **24** που δεν αντέδρασε, ως σκούρο κίτρινο έλαιο μετά από καθαρισμό με στήλη χρωματογραφίας υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: Πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / Οξικός αιθυλεστέρας 95:5) και χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο χωρίς επιπλέον καθαρισμό.

Rf: 0.8 (Πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / Οξικός αιθυλεστέρας 82:18)

2-(3-(2-(2,2-διμεθυλοβενζο[d][1,3]διοξολ-5-υλο)αιθυλο)ισοξαζολ-5-υλο)-2,5,7,8τετραμεθυλο-2,3-διυδροβενζο[b][1,4]οξαθειιν-6-όλη (26)



Σε διάλυμα της ένωσης **25** (0.11 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (1.6 mL) προστίθεται διάλυμα TBAF σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (1.6 mL, 0.05M). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου

για 40 λεπτά. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα αραιώνεται με διχλωρομεθάνιο και ακολουθούν πλύσεις της οργανικής φάσης με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου. Η οργανική φάση πλένεται με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν λαμβάνεται ως κίτρινο έλαιο μετά από καθαρισμό με στήλη χρωματογραφίας υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: Πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / Ακετόνη 9:1)

Απόδοση 2 σταδίων από την ένωση 25: 21.6 mg (42%)

Rf: 0.2 (Πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / Ακετόνη 9:1)

¹**H NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ 6.61 – 6.51 (m, 3H, Ar), 5.87 (s, 1H, οξαζολίου), 4.47 (s, 1H, OH), 3.32, 3.13 (AB_q, *J_{AB}* = 13.1 Hz, 2H, CH₂S), 2.91 – 2.82 (m, 4H, 2CH₂), 2.17 (s, 6H, 2CH₃ Ar), 2.13 (s, 3H, CH₃ Ar), 1.76 (s, 3H, CH₃), 1.65 (s, 6H, C(CH₃)₂)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 173.5, 163.3, 147.6, 146.1, 145.9, 141.7, 133.9, 124.5, 120.7, 120.3, 117.8, 117.2, 114.3, 108.7, 108.1, 101.3, 72.9, 34.2, 33.8, 28.5, 26.4, 26.0, 12.4

HRMS (ESI): υπολογισθέν για C₂₆H₃₀NO₅S [M+H]⁺ 468.17664, ευρεθέν για C₂₆H₃₀NO₅S 468.18372, υπολογισθέν για C₂₆H₂₉NO₅S Na [M+Na]⁺ 490.17664, ευρεθέν για C₂₆H₂₉NO₅S Na 490.16565

4-(2-(5-(6-υδροξυ-2,5,7,8-τετραμεθυλο-2,3-διυδροβενζο[b][1,4]οξαθειιν-2υλο)ισοξαζολ-3-υλο)αιθυλο)φαινυλο-1,2-διόλη (27)



Στην ένωση 26 (0.033 mmol, 15.6 mg) προστίθεται καθαρό τριφθοροξικό οξύ (0.5 mL) στους 0°C. То διάλυμα αναδεύεται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης η

περίσσεια τριφθοροξικού οξέος απομακρύνεται με εξάτμιση υπό κενό με τολουόλιο. Το προϊόν λαμβάνεται ως κίτρινο έλαιο μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: Διχλωρομεθάνιο / Μεθανόλη 96:4)

Απόδοση: 9 mg (63%)

R_f: 0.3 (Διχλωρομεθάνιο / Μεθανόλη 97:3)

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 6.68 (d, J = 5.8 Hz, 1H, Ar), 6.61 (s, 1H, Ar), 6.50 (d, J = 7.5 Hz, 1H, Ar), 5.79 (s, 1H, oξαζολίου), 3.32, 3.14 (AB_q, J_{AB} = 13.1 Hz, 2H, CH₂S), 2.86 – 2.80 (2m, 4H, 2CH₂), 2.17 (2s, 6H, (CH₃)₂Ar), 2.12 (s, 3H, CH₃Ar), 1.76 (s, 3H, CH₃)

¹³C NMR (150MHz, CDCl₃): δ 173.5, 163.4, 145.9, 143.8, 142.2, 141.8, 133.3, 124.5, 120.8, 120.6, 117.4, 115.4, 114.2, 101.6, 72.8, 33.8, 33.7, 28.0, 26.7, 12.44, 12.38, 12.3

HRMS (ESI): υπολογισθέν για C₂₃H₂₆NO₅S [M+H]⁺ 428.14534, ευρεθέν για C₂₃H₂₆NO₅S 428.15255, υπολογισθέν για C₂₃H₂₅NO₅SNa [M+Na]⁺ 450.14534, ευρεθέν για C₂₃H₂₅NO₅SNa 450.13443, υπολογισθέν για C₂₃H₂₄NO₅S [M-H]⁻ 426.14534, ευρεθέν για C₂₃H₂₄NO₅S [M-H]⁻ 426.14534, ευρεθέν για C₂₃H₂₄NO₅S [M-H]⁻ 426.14534,

(*E,Z*)-3-(2,2-διμεθυλοβενζο[d][1,3]διοξολ-5-υλο)-Ν'-υδροξυπροπαναμιδίνη (28)



Σε εναιώρημα υδροχλωρικής υδροξυλαμίνης (154 mg, 2.2 mmol) σε ισοπροπανόλη (5.3 mL) προστίθεται όξινο ανθρακικό νάτριο (273 mg, 3.3 mmol). Το προκύπτον μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία

δωματίου για 20 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα της ένωσης **20** (0.3 g, 1.5 mmol) σε ισοπροπανόλη (4.5 mL). Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται υπό επαναρροή για 24 ώρες. Το μίγμα της αντίδρασης ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου και διηθείται υπό κενό. Το διήθημα συμπυκνώνεται υπό κενό και το προϊόν λαμβάνεται ως άχρωμο στερεό μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: Διχλωρομεθάνιο / Μεθανόλη 96:4)

Απόδοση: 289 mg (83%)

Σ.Τ.: 74 - 76 °C

Rf: 0.37 (Διχλωρομεθάνιο / Μεθανόλη 96:4)

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 6.64 – 6.61 (m, 3H, Ar), 4.50 (s, 2H, NH₂), 2.79 (t, J = 7.9, 2H, CH₂C), 2.40 (t, J = 7.9, 2H, CH₂Ar), 1.66 (s, 6H, C(CH₃)₂)

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 153.8, 147.6, 146.0, 133.9, 120.6, 117.8, 108.7, 108.2, 33.5, 32.9, 25.9

HRMS (ESI): υπολογισθέν για C₁₂H₁₇N₂O₃ [M+H]⁺ 237.11609, ευρεθέν για C₁₂H₁₇N₂O₃ 237.12336, υπολογισθέν για C₁₂H₁₆N₂O₃Na [M+Na]⁺ 259.11609, ευρεθέν για C₁₂H₁₆N₂O₃Na 259.10510

3-(2-(2,2-διμεθυλοβενζο[d][1,3]διοξολ-5-υλο)αιθυλο)-5-(προπ-1-εν-2-υλο)-1,2,4οξαδιαζόλιο (29)



Σε δοκιμαστικό σωλήνα για συσκευή μικροκυμάτων προστίθεται διάλυμα μεθακρυλικού οξέος (22 mg, 0.25 mmol) σε άνυδρο τεταϋδροφουράνιο (0.9 mL), 2-χλωρο-4,6-διμεθόξυ-1,3,5-τριαζίνη (54 mg, 0.3

mmol) και *N*-μεθυλομορφολίνη (84 μL, 0.8 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για μία ώρα. Μετά την κατανάλωση του οξέος (έλεγχος με TLC) προστίθεται διάλυμα της ένωσης **28** (50 mg, 0.2 mmol) σε άνυδρο τολουόλιο (0.4 mL) και το μίγμα ακτινοβολείται με συσκευή μικροκυμάτων σε 180 watt, 160 °C, για 6 λεπτά. Το μίγμα ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου και αραιώνεται με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση πλένεται με νερό, με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν λαμβάνεται ως άχρωμο έλαιο μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: Πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / Οξικός αιθυλεστέρας 97:3)

Απόδοση: 34 mg (56%)

Rf: 0.28 (εξάνιο / ακετόνη 98:2)

¹H NMR (600 MHz, CD₃OD): δ 6.62 – 6.60 (m, 3H, Ar), 6.21 (s, 1H, CH₂C), 5.72 (s, 1H, CH₂C), 2.96 (bs, 4H, CH₂CH₂), 2.19 (s, 3H, CH₃), 1.61 (s, 6H, C(CH₃)₂)

¹³C NMR (**75** MHz, CD₃OD): δ 177.4, 171.5, 148.9, 147.3, 134.8, 130.9, 124.7, 121.8, 118.7, 109.5, 108.9, 33.8, 29.2, 25.9, 19.0

HRMS (ESI): υπολογισθέν για $C_{16}H_{19}N_2O_3$ [M+H]⁺ 287.13174, ευρεθέν για $C_{16}H_{19}N_2O_3$ 287.13894, υπολογισθέν για $C_{16}H_{18}N_2O_3Na$ [M+Na]⁺ 309.13174, ευρεθέν για $C_{16}H_{18}N_2O_3Na$ 309.12071 4-(6-((τερτ-βουτυλοδιμεθυλοσιλιλο)οξυλο)-2,5,7,8-τετραμεθυλο-2,3διυδροβενζο[b][1,4]οξαθειιν-2-υλο)--3-(2-(2,2-διμεθυλοβενζο[d][1,3]διοξολ-5υλο)αιθυλ-1,2,4-οξαδιαζόλιο (30)



Σε διάλυμα της ένωσης 7 (0.126 mmol, 55.8 mg) σε άνυδρο χλωροφόρμιο (2.5 mL) προστίθεται στους 0°C άνυδρη τριαιθυλαμίνη (20 μL) και η ένωση 29 (0.105 mmol, 30 mg).

Το μίγμα θερμαίνεται υπό επαναρροή για 48 ώρες. Η αντίδραση δεν ολοκληρώθηκε οπότε διακόπηκε. Ακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη και το προϊόν λαμβάνεται μαζί με την ένωση **24** που δεν αντέδρασε, ως σκούρο κίτρινο έλαιο μετά από καθαρισμό με στήλη χρωματογραφίας υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: Εξάνιο / Ακετόνη 98:2) και χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο χωρίς επιπλέον καθαρισμό.

Rf: 0.2 (Εξάνιο/ Ακετόνη 98:2)

2-(3-(2-(2,2-διμεθυλοβενζο[d][1,3]διοξολ-5-υλο)αιθυλο)-1,2,4-οξαδιαζολ-5-υλο)-2,5,7,8-τετραμεθυλο-2,3-διυδροβενζο[b][1,4]οξαθειιν-6-όλη (31)



Σε διάλυμα της ένωσης **30** (0.105 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (1.1 mL) προστίθεται διάλυμα TBAF σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (1.1 ml, 0.05M). Το μίγμα της αντίδρασης

αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 40 λεπτά. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα αραιώνεται με διχλωρομεθάνιο και ακολουθούν πλύσεις της οργανικής φάσης με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου. Η οργανική φάση πλένεται με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν λαμβάνεται ως κίτρινο έλαιο μετά από καθαρισμό με στήλη χρωματογραφίας υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: Πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / Ακετόνη 9:1)

Απόδοση 2 σταδίων από την ένωση 30: 16.4 mg (33%)

Rf: 0.25 (Πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / Ακετόνη 9:1)

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 6.59 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, Ar), 6.55 – 6.53 (m, 2H, Ar), 3.50, 3.19 (AB_q, *J*_{AB} = 13.1 Hz, 2H, CH₂S), 2.99 – 2.92 (m, 4H, CH₂CH₂), 2.17 (s, 3H, CH₃Ar), 2.15 (s, 3H, CH₃Ar), 2.13 (s, 3H, CH₃Ar), 1.86 (s, 3H, CH₃), 1.65 (s, 6H, (CH₃)₂C)

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 179.8, 170.1, 147.6, 146.4, 146.0, 142.0, 133.4, 125.1, 120.7, 120.6, 117.8, 117.2, 114.2, 108.8, 108.2, 73.6, 34.1, 32.9, 28.5, 26.5, 26.0, 12.4

HRMS (ESI): υπολογισθέν για C₂₅H₂₉N₂O₅S [M+H]⁺ 469.17189, ευρεθέν για C₂₅H₂₉N₂O₅S 469.17906, υπολογισθέν για C₂₅H₂₈N₂O₅S Na [M+Na]⁺ 491.17189, ευρεθέν για C₂₅H₂₈N₂O₅SNa 491.16096

4-(2-(5-(6-υδροξυ-2,5,7,8-τετραμεθυλο-2,3-διυδροβενζο[b][1,4]οξαθειιν-2υλο)1,2,4-οξαδιαζολ-3-υλο)αιθυλο)φαινυλο-1,2-διόλη (32)



Στην ένωση **31** (0.035 mmol, 16.4 mg) προστίθεται καθαρό τριφθοροξικό οξύ (1.5 mL) στους 0°C. Το διάλυμα αναδεύεται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης η

περίσσεια τριφθοροξικού οξέος απομακρύνεται με εξάτμιση υπό κενό με τολουόλιο. Το προϊόν λαμβάνεται ως κίτρινο έλαιο μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: Εξάνιο / Ακετόνη 7:3)

Απόδοση: 8.1 mg (54%)

Rf: 0.27 (Εξάνιο / Ακετόνη 67:33)

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 6.69 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar), 6.56 (s, 1H, Ar), 6.53 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar), 3.51, 3.21 (AB_q, *J*_{AB} = 13.1 Hz, 2H, CH₂S), 2.96 – 2.89 (2m, 4H, CH₂CH₂), 2.20 (s, 3H, CH₃Ar), 2.14 (s, 3H, CH₃Ar), 2.12 (s, 3H, CH₃Ar), 1.87 (s, 3H, CH₃)

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 179.8, 170.0, 146.3, 143.7, 142.3, 142.1, 133.1, 125.2, 120.9, 120.7, 117.2, 115.5, 115.4, 114.1, 73.6, 34.0, 32.4, 28.2, 26.7, 12.4

HRMS (ESI): υπολογισθέν για $C_{22}H_{25}N_2O_5S$ [M+H]⁺ 429.14059, ευρεθέν για $C_{22}H_{25}N_2O_5S$ 429.14772, υπολογισθέν για $C_{22}H_{24}N_2O_5SNa$ [M+Na]⁺ 451.14059, ευρεθέν για $C_{22}H_{24}N_2O_5SNa$ [M+Na]⁺ 451.14059,

3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)προπανικός μεθυλεστέρας (33)



Σε διάλυμα 3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)προπανοϊκού οξέος (1 g, 4.76 mmol) σε απόλυτη αιθανόλη (20 mL) προστίθεται πυκνό θειικό οξύ (10 σταγόνες). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται ενώ θερμαίνεται υπό

επαναρροή για 4 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου, ο διαλύτης εξατμίζεται και προστίθεται Et₂O. Ακολουθούν πλύσεις με κορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου. Η οργανική φάση πλένεται με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν που λαμβάνεται ως κίτρινο έλαιο και χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο χωρίς επιπλέον καθαρισμό.

Απόδοση: 1.13 g (ποσοτικά)

Rf: 0.74 (Πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / Οξικός αιθυλεστέρας 6:4)

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 6.79 (d, 8.3 Hz, 1H, Ar) 6.75 – 6.73 (m, 2H, Ar), 4.13 (q, J = 7.1 Hz, 2H, OCH₂), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 3.85 (s, 3H, OCH3), 2.90 (t, J = 7.8 Hz, 2H, CH₂COO), 2.60 (t, J = 7.8 Hz, 2H, CH₂Ar), 1.24 (t, J = 7.2 Hz, 2H, CCH₃)

¹³C NMR (MHz, CDCl₃): δ 173.1, 149.0, 147.6, 133.4, 120.3, 111.8, 111.4, 60.5, 56.1, 56.0, 36.4, 30.8, 14.4

HRMS (ESI): υπολογισθέν για C₁₃H₁₉O₄ [M+H]⁺ 239.12051, ευρεθέν για C₁₃H₁₉O₄ 239.12781, υπολογισθέν για C₁₃H₁₈O₄Na [M+Na]⁺ 261.10936, ευρεθέν για C₁₃H₁₈O₄Na 261.10936

3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)προπανυλο υδραζίδιο (34)



Σε δοκιμαστικό σωλήνα για συσκευή μικροκυμάτων προστίθεται διάλυμα 3-(3,4διμεθοξυφαινυλο)προπανικού μεθυλεστέρα (**33)** (258 mg, 1.15 mmol) σε απόλυτη αιθανόλη (0.2 mL) και

NH₂NH₂·H₂O (0.45 mL, 4.03 mmol). Το μίγμα ακτινοβολείται με συσκευή μικροκυμάτων σε 180 watt, 120 °C για 12 λεπτά. Η αντίδραση ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου και καθιζάνει λευκό ίζημα το οποίο διηθείται, πλένεται με απόλυτη αιθανόλη και ξηραίνεται σε αντλία κενού.

Απόδοση: 106 mg (44%)

Σ.Τ.: 103-105 °C

Rf: 0,5 (Διχλωρομεθάνιο / Μεθανόλη 95:3)

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 6.79 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar), 6.73 – 6.71 (m, 2H), 6.62 (s, 1H, NH), 3.86 – 3.85 (2s, 6H), 2.91 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.43 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.62 (s, 1H, NH₂)

¹³C NMR (MHz, CDCl₃): δ 173.1, 149.1, 147.8, 133.2, 120.2, 111.8, 111.5, 56.1, 56.0, 36.8, 31.3

Ν-(3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)προπανοϋλο)μεθακρυλοϋδραζίδιο (35)



Σε διάλυμα μεθακρυλικού οξέος (19.3 mg, 0.2 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (1 mL) προστίθεται η ένωση **34** (60 mg, 0.27 mmol) και HATU (127.8 mg, 0.34 mmol) και *N*,*N*-

διισοπροπυλοαιθυλαμίνη (0.12 mL 0.67 mmol) στάγδην στους 0 °C. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για δύο ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, προστίθεται H₂O στους 0 °C και το μίγμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση πλένεται με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν λαμβάνεται ως άχρωμο διαυγές έλαιο μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης Πετρελαϊκός αιθέρας 40-60 °C / οξικός αιθυλεστέρας 6:4)

Απόδοση: 58.4 mg (89%)

R_f: 0.2 (Διχλωρομεθάνιο / Μεθανόλη 97:3)

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 8.87 (d, J = 5.5 Hz, 1H, NH), 8.72 (d, J = 5.6 Hz, 1H, NH), 6.78 (d, J = 7.8 Hz, 1H, Ar), 6.73 (d, J = 7.6 Hz, 2H, Ar), 5.85 (s, 1H, CH₂=C), 5.44 (s, 1H, CH₂=C), 3.85 (d, J = 5.8 Hz, 6H, 2OCH₃), 2.94 (t, J = 7.7 Hz, 2H, CH₂CO), 2.59 (t, J = 7.7 Hz, 2H, CH₂Ar), 1.98 (s, 3H, CH₃)

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 168.9, 164.5, 149.1, 147.7, 136.9, 132.9, 122.2, 120.2, 111.8, 111.5, 56.1, 56.0, 36.2, 31.1, 18.3

HRMS (ESI): υπολογισθέν για $C_{15}H_{21}N_2O_4$ [M+H]⁺ 293.14231, ευρεθέν για $C_{15}H_{21}N_2O_4$ 293.14970, υπολογισθέν για $C_{15}H_{20}N_2O_4Na$ [M+Na]⁺ 315.14231, ευρεθέν για $C_{15}H_{20}N_2O_4Na$ 315.13111, υπολογισθέν για $C_{15}H_{19}N_2O_4$ [M-H]⁻ 291.14231, ευρεθέν για $C_{15}H_{19}N_2O_4$

2-(3,4-διμεθόξυφαιναιθυλο)-5-(προπ-1-εν-2-υλο)-1,3,4-οξαδιαζόλιο (36)



Σε διάλυμα της ένωσης **35** (51 mg, 0.176 mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (1.0 mL) προστίθεται τοσυλοχλωρίδιο (100.4 mg, 0.53 mmol) και άνυδρη τριαιθυλαμίνη (0.1 mL, 0.7 mmol) στάγδην στους 0

°C. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης προστίθεται H₂O στους 0 °C και το μίγμα εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο. Η οργανική φάση πλένεται με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν λαμβάνεται ως άχρωμο διαυγές έλαιο μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: Διχλωρομεθάνιο / Μεθανόλη 97:3)

Απόδοση: 43.2 mg (90%)

Rf: 0.31 (Διχλωρομεθάνιο / Μεθανόλη 97:3)

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃):δ 6.81 – 6.73 (m, 3H, Ar), 5.90 (s, 1H, CH₂=C), 5.49 (s, 1H, CH₂=C), 3.86 (s, 6H, 2OCH₃), 3.15 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, CH₂ – οξαδιαζόλιο), 3.07 (t, J= 7.7 Hz, 2H, CH₂Ar), 2.20 (s, 3H, CH₃)

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 166.2, 165.5, 149.2, 148.0, 132.3, 129.1, 120.5, 120.4, 111.8, 111.6, 56.1, 56.0, 32.5, 27.8, 18.8

HRMS (ESI): υπολογισθέν για C₁₅H₁₉N₂O₃ [M+H]⁺ 275.13174, ευρεθέν για C₁₅H₁₉N₂O₃ 275.13907, υπολογισθέν για C₁₅H₁₈N₂O₃Na [M+Na]⁺ 297.13174, ευρεθέν για C₁₅H₁₈N₂O₃Na 297.12065
4-(6-((τερτ-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο)οξυλο)-2,5,7,8-τετραμεθυλο-2,3διυδροβενζο[b][1,4]οξαθειιν-2-υλο)-5-(3,4-διμεθοξυφαιναιθυλο)-1,3,4οξαδιαζόλιο (37)



Σε διάλυμα της ένωσης **7** (0.22 mmol, 98.1 mg) και της ένωσης **36** (0.66 mmol, 182 mg) σε άνυδρο χλωροφόρμιο (2.2 mL) προστίθεται στους 0°C τριαιθυλαμίνη (31 μL). Το μίγμα θερμαίνεται υπό

επαναρροή για 24 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης ο διαλύτης εξατμίζεται και το προϊόν λαμβάνεται ως μιγμα με την ένωση **36** που δεν καταναλώθηκε, ως σκούρο κίτρινο έλαιο μετά από καθαρισμό με στήλη χρωματογραφίας υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: Διχλωρομεθάνιο / Μεθανόλη 98:2).

Rf: 0.6 (Διχλωρομεθάνιο / Μεθανόλη 98:2)

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 6.75 (d, J = 8.2 Hz, 1H, Ar), 6.70 (d, J = 1.8 Hz, 1H, Ar), 6.65 (dd, J = 8.1, 1.8 Hz, 1H, Ar), 3.84 (s, 6H, 2OCH₃), 3.51, 3.16 (AB_q, $J_{AB} = 13.1$ Hz, 2H, CH₂S), 3.13 (t, 2H, CH₂ οξαδιαζολίου), 3.03 – 3.00 (m, 2H, CH₂Ar), 2.12 (s, 3H, CH₃Ar), 2.10 (s, 3H, CH₃Ar), 2.10 (s, 3H, CH₃Ar), 1.84 (s, 3H, CH₃), 1.03 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.11 (s, 6H, Si(CH₃)₃)

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 167.7, 166.9, 149.2, 148.0, 146.0, 142.3, 132.1, 125.5, 125.0, 122.5, 120.4, 114.8, 111.7, 111.5, 72.2, 56.1, 56.0, 33.8, 32.3, 27.8, 26.2, 25.5, 18.7, 14.5, 14.4, 12.5, -3.17, -3.20

HRMS (ESI): υπολογισθέν για C₃₀H₄₃N₂O₅SSi [M+H]⁺ 571.25837, ευρεθέν για C₃₀H₄₃N₂O₅SSi 571.26578, υπολογισθέν για C₃₀H₄₂N₂O₅SSiNa [M+Na]⁺ 593.25837, ευρεθέν για C₃₀H₄₂N₂O₅SSiNa 593.24768

2-(5-(3,4-διμεθοξυφαιναιθυλο)-1,3,4-οξαδιαζολ-2-υλο)-2,5,7,8-τετραμεθυλο-2,3διυδροβενζο[b][1,4]οξαθειιν-6-όλη (38)



Σε διάλυμα της ένωσης **37** (0.22 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (4.4 mL) προστίθεται διάλυμα TBAF σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (4.4 mL, 0.05M). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 40 λεπτά.

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα αραιώνεται με διχλωρομεθάνιο και ακολουθούν πλύσεις της οργανικής φάσης με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου. Η οργανική φάση πλένεται με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν λαμβάνεται ως κίτρινο έλαιο μετά από καθαρισμό με στήλη χρωματογραφίας υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: εξάνιο / Ακετόνη 75:25, 7:3)

Απόδοση 2 σταδίων: 27.4 mg (27%)

Rf: 0,22 (εξάνιο / Ακετόνη 75:25)

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 6.75 (d, J = 8.1 Hz, 1H, Ar), 6.69 (d, J = 1.8 Hz, 1H, Ar), 6.65 (dd, J = 8.1, 1.8 Hz, 1H, Ar), 4.41 (s, 1H, OH), 3.84 (2s, 6H, 2OCH₃), 3.51, 3.17 (AB_q, $J_{AB} = 13.1$ Hz, 2H, CH₂S), 3.13 (t, J = 7.6 Hz, 2H, CH₂-oξαδιαζόλιο), 3.09 – 2.93 (m, 2H, CH₂Ar), 2.15 (3s, 9H, 3CH₃Ar), 1.83 (s, 3H, CH₃)

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 167.6, 166.9, 149.2, 148.0, 146.4, 141.9, 132.1, 125.0, 120.5, 120.4, 117.3, 115.0, 111.7, 111.5, 72.3, 56.1, 56.0, 33.8, 32.3, 27.7, 25.6, 12.4, 12.3

HRMS (ESI): υπολογισθέν για $C_{24}H_{29}N_2O_5S$ [M+H]⁺ 457.17189, ευρεθέν για $C_{24}H_{29}N_2O_5S$ 457.17933, υπολογισθέν για $C_{24}H_{28}N_2O_5SNa$ [M+Na]⁺ 479.17189, ευρεθέν για $C_{24}H_{28}N_2O_5SNa$ 479.16075, υπολογισθέν για $C_{24}H_{27}N_2O_5S$ [M-H]⁻ 455.17189, ευρεθέν για $C_{24}H_{27}N_2O_5S$ 455.16336

4-(2-(5-(6-υδροξυ-2,5,7,8-τετραμεθυλο-2,3-διυδροβενζο[b][1,4]οξαθειιν-2υλο)1,3,4-οξαδιαζολ-2-υλο)αιθυλο)φαινυλο-1,2-διόλη (39)



Σε διάλυμα της ένωσης **38** (15 mg, 0.033 mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (0.5 mL) προστίθεται BF₃S(CH₃)₂ (36 μL) στους 0 °C. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της

αντίδρασης διαβιβάζεται άζωτο στην αντίδραση έως ότου εξατμιστεί ο διαλύτης. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: Διχλωρομεθάνιο / Μεθανόλη 95:5) και λαμβάνεται το προϊόν ως κίτρινο έλαιο.

Απόδοση: 2 mg (14%)

R_f: 0.62 (Διχλωρομεθάνιο / Μεθανόλη 9:1)

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 6.66 (d, J = 8.0 Hz, 1H, Ar), 6.47 (s, 1H, Ar), 6.45 (d, J = 8.0 Hz, 1H, Ar), 3.52, 3.20 (AB_q, J_{AB} = 13.1 Hz, 2H, CH₂S), 3.09 (t, J = 7.3 Hz, 2H, CH₂- οξαδιαζόλιο), 3.01 – 2.81 (m, 2H, CH₂Ar), 2.16 (s, 3H, CH₃), 2.13 - 2.12 (2s, 6H, 2CH₃), 1.84 (s, 3H, CH₃)

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 167.6, 167.0, 146.3, 143.8, 142.6, 142.0, 131.9, 125.1, 120.6, 120.6, 117.4, 115.5, 115.4, 114.9, 72.3, 33.7, 32.0, 27.6, 26.1, 12.4

HRMS (ESI): υπολογισθέν για C₂₂H₂₃N₂O₅S [M-H]⁻ 427.14059, ευρεθέν για C₂₂H₂₃N₂O₅S 427.13266

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

CDMT 2-χλωρο-4,6-διμεθόξυ-1,3,5-τριαζίνη DCM Διχλωρομεθάνιο DIBAL-H Διισοβουτυλο αργιλιο υδριδιο DIPEA Ν,Ν-Διισοπροπυλαιθυλαμίνη DMF Διμεθυλοφορμαμίδιο DMSO Διμεθυλοσουλφοξείδιο **EtN**₃ Τριαιθυλαμίνη HATU Εξαφθοροφωσφορικό άλας της ο-(7-αζαβενζοτριαζολυλ)-1,1,3,3-τετραμεθυλουρίας IMI Ιμιδαζόλιο Ν-μεθυλομορφολίνη NMM TBAF Φθοριούχο τετραβουτυλαμμώνιο TBDMSCI Τερτ-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοχλωρίδιο TFA Τριφθοροξικό οξύ THF Τετραϋδροφουράνιο TosCl Τόσυλοχλωρίδιο



Εικόνα Π. 1: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης **2** σε CDCl_{3.}



Εικόνα Π. 2: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης **2** σε CDCl₃.



Εικόνα Π. 3: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 4 σε CDCl₃.



Εικόνα Π. 4: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης 4 σε CDCl₃.



Εικόνα Π. 5: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 5 σε CDCl₃.



Εικόνα Π. 6: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης **5** σε CDCl₃.



Εικόνα Π. 7: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης **6** σε CDCl₃.



Εικόνα Π. 8: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης **6** σε CDCl₃.



Εικόνα Π. 9: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 7 σε CDCl₃.



Εικόνα Π. 10: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης **7** σε CDCl₃.



Εικόνα Π. 11: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης **9** σε CD₃OD.



Εικόνα Π. 12: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 10 σε CDCl₃.



Εικόνα Π. 13: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης **10** σε CDCl₃.



Εικόνα Π. 14: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 11 σε CDCl₃.



Εικόνα Π. 15: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης 11 σε CDCl₃.



Εικόνα Π. 16: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 12 σε CDCl₃.



Εικόνα Π. 17: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης **12** σε CDCl₃.



Εικόνα Π. 18: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 13 σε CDCl₃.



Εικόνα Π. 19: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης 13 σε CDCl₃.



Εικόνα Π. 20: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης **14** σε CD₃OD.



Εικόνα Π. 21: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης **14** σε CD₃OD.



Εικόνα Π. 22: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 15 σε CDCl₃.



Εικόνα Π. 24: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 16 σε CDCl₃.



Εικόνα Π. 26: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 17 σε CDCl₃.



Εικόνα Π. 28: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 18 σε CDCl₃.



Εικόνα Π. 29: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης 18 σε CDCl₃.



Εικόνα Π. 30: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 19 σε CDCl₃.



Εικόνα Π. 32: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης **20** σε (CD₃)₂CO.



Εικόνα Π. 34: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 21 σε CDCl₃.



Εικόνα Π. 36: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης **22** σε (CD₃)₂CO.



Εικόνα Π. 38: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης **23** σε CDCl₃.





Εικόνα Π. 40: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης 24 σε CDCl₃.



Εικόνα Π. 41: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 26 σε CDCl₃.



Εικόνα Π. 42: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης 26 σε CDCl₃.



Εικόνα Π. 44: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης 27 σε CDCl₃.



Εικόνα Π. 46: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης 28 σε CDCl₃.



Εικόνα Π. 48: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης **29** σε CD₃OD.



Εικόνα Π. 50: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης **31** σε CDCl₃.



Εικόνα Π. 52: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης **32** σε CDCl₃.



Εικόνα Π. 54: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης **33** σε CDCl₃.



Εικόνα Π. 56: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης **34** σε CDCl₃.



Εικόνα Π. 58: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης 35 σε CDCl₃.



Εικόνα Π. 60: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης **36** σε CDCl₃.



Εικόνα Π. 61: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 37 σε CDCl₃.



Εικόνα Π. 62: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης **37** σε CDCl₃.





Εικόνα Π. 64: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης 38 σε CDCl₃.


Εικόνα Π. 65: Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης **39** σε CDCl₃.



Εικόνα Π. 66: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης **39** σε CDCl₃.

<u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>

¹ C. Lopez-Otin, M. A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano, G. Kroemer, "The Hallmarks of Aging, *Cell*, **2013**, *153(6)*, 1194-1217

² J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, "Βιοχημεία" Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης,
2011, *1*, 713 – 719.

³ R. Raynes, L. C. D. Pomatto, K. J. A. Daviesa, "Degradation of oxidized proteins by the proteasome: Distinguishing between the 20S, 26S, and immunoproteasome proteolytic pathways", *Mol Aspects Med.*, **2016**, *50*, 41–55.

⁴ J. Calise, S. R. Powell, "The ubiquitin proteasome system and myocardial ischemia", *AJP-Heart Circ Physiol*, **2013**, *304*, H337-H349.

⁵ A. V. Gomes, "Genetics of Proteasome Diseases", *Scientifica*, **2013**, 1-30.

⁶ B. M. Stadtmueller, C. P. Hill, "Proteasome Activators", **2011**, *41(1)*, 8–19.

⁷ I. Saez, D. Vilchez, "The Mechanistic Links between Proteasome Activity, Aging and Age-related Diseases", *Current Genomics.*, **2014**, *15*, 38-51.

⁸ L. Huang, C. H. Chen, "Proteasome regulators: activators and inhibitors", *Curr. Med. Chem.*, **2009**, *16(8)*, 931-939.

⁹ D. Chen, M. Frezza, S. Schmitt, J. Kanwar, Q.P. Dou, "Bortezomib as First Proteasome Inhibitor Anticancer Drug: Current Status and Future Perspectives", *Curr Cancer Drug Targets*, **2011**, *11*(*3*) 239–253.

¹⁰ T. Mujtaba, Q.P. Dou, "Advances in the Understanding of Mechanisms and Therapeutic Use of Bortezomib", *Discov Med.*, **2011**, *12(67)*, 471–480.

¹¹ R.E. Steiner, E.E. Manasanch, "Carfilzomib boosted combination therapy for relapsed multiple myeloma", *Onco Targets Ther.*, **2017**, *10*, 895-907.

¹² B. M. Stadtmueller, C. P. Hill, "Proteasome Activators", *Molecular Cell*, 2011, 41(1), 8–19.

 ¹³ S. H. Omar, "Cardioprotective and Neuroprotective Roles of Oleuropein in Olive", Saudi Pharmaceutical Journal, **2010**, *18*, 111 - 121.

¹⁴ M. Koufaki, "Vitamin E derivatives: a patent review (2010-2015)", *Expert Opin. Ther. Pat.*, **2016**, *26*, 35–47.

¹⁵ S.A. van Acker, L.M. Koymans, A. Bast, "Molecular pharmacology of vitamin E: structural aspects of antioxidant activity", *Free Radic Biol Med.*, **1993**, *15(3)*, 311-328.

¹⁶ G. W. Burton, M. G. B. Traber, "Vitamin E: Antioxidant Activity, Biokinetics and Bioavailability", *Annu. Rev. Nutr.*, **1990**, *10*, 357-382.

¹⁷ R. Amorati, A. Cavalli, M. G. Fumo, M. Masetti, S. Menichetti, C. Pagliuca, G. F. Pedulli, C. Viglianisi, "Kinetic and Thermochemical Study of the Antioxidant Activity of Sulfur - Containing Analogues of Vitamin E", *Chem. Eur. J.*, **2007**, *13*, 8223 – 8230.

¹⁸ M. Koufaki, A. Tsatsaroni, X. Alexi, H. Guerrand, S. Zerva, M.N. Alexis, "Isoxazole Substituted Chromans against Oxidative Stress-Induced Neuronal Damage", *Bioorg. Med. Chem*, **2011**, *19*, 4841-4850.

¹⁹ M. Koufaki, T. Fotopoulou, M. Kapetanou, G.A. Heropoulos, E.S. Gonos,
N. Chondrogianni, "Microwave-assisted synthesis of 3,5-disubstituted isoxazoles and evaluation of their anti-ageing activity", *Eur. J. Med. Chem.*, **2014**, *83*, 508–515.

²⁰ Y. Singh, S. Srivastava, R. Tripathi, Y. Jain, "A Review Report on Newer advancement in Bioisosteric Replacement in Drug Design", *International Journal of Pharma Sciences and Research*, **2015**, *6*, 939-947.

²¹ G. A. Patani, E. J. LaVoie, "Bioisosterism: A Rational Approach in Drug Design", Chem Rev., **1996**, *96*, 3147-3176

²² G. R. Kokil, P. V. Rewatkar, S. Gosain, S. Aggarwal, A. Verma, A. Kalra, S. Thareja, "Synthesis and In Vitro Evaluation of Novel 1, 2, 4-Triazole Derivatives as Antifungal Agents", *Lett. Drug Des. Discov*, **2010**, *7*, 46 – 49.

²³ N. Singhal, P.K. Sharma, R. Dudhe, N. Kumar, "Recent advancement of triazole derivatives and their biological significance", *J. Chem. Pharm. Res.*, 2011, 3(2), 126 - 33.

²⁴ V. D. Bock, H. Hiemstra, J. H. Maarseveen, "Cul-catalyzed alkyne-azide "click" cycloadditions from a mechanistic and synthetic perspective", *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, 51-68.

²⁵ R. Huisgen, "1,5,-electrocyclizations- an important principle of heterocyclic chemistry", *Angew Chem Int Ed.*, **1980**, *19*, 947-973.

²⁶ E.A. Musad, R. Mohamed, B.A. Saeed, B.S. Vishwanath, K.M.L. Rai, "Synthesis and evaluation of antioxidant and antibacterial activities of new substituted bis(1,3,4-

oxadiazoles), 3,5-bis(substituted) pyrazoles and isoxazoles", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2011**, *21*, 3536–3540.

²⁷ A. Kumar, R.A. Maurya, S. Sharma, P. Ahmad, A.B. Singh, A.K. Tamrakar, A.K. Srivastava, "Design and synthesis of 3,5-diarylisoxazole derivatives as novel class of antihyperglycemic and lipid lowering agents", *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, *17*, 5285–5292.

²⁸ T. Haddad, R. Gershman, R. Dilis, D. Labaree, R.B. Hochberg, R.N. Hanson, "Synthesis and evaluation of 4-(substituted styryl/alkenyl)-3,5-bis(4-hydroxyphenyl)isoxazoles as ligands for the estrogen receptor", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2012**, *22*, 5999–6003.

²⁹ S. Menichetti, R. Amorati, M. G. Bartolozzi, G. F. Pedulli, A. Salvini, C. Viglianisi, "A Straightforward Hetero-Diels–Alder Approach to $(2-ambo,4_R,8_R)-\alpha/\beta/\gamma/\delta-4-$ Thiatocopherol", *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 2218–2225.

³⁰ T. Farooq, L. K. Sydnes, K. W. Tömroos, B. E. Haug, "Debenzylation of Functionalized 4- and 5- Substituted 1,2,3-Triazoles", *Synthesis*, **2012**, *44*, 2070 – 2078.

³¹ K. S. Kadam, T. Gandhi, A. Gupte, A. K. Gangopadhyay, R. Sharma, "Alkyl Nitrites: Novel Reagents for One-Pot Synthesis of 3,5-Disubstituted Isoxazoles from Aldoximes and Alkynes", *Synthesis*, **2016**, *48*, 3996 – 4008.

³² Bastos, M. Cecilia, Derivatives of 3-Heteroarylisoxazol-5-carboxylic Amide Useful for the Treatment of Inter Alia Cystic Fibrosis, **WO2016/105468 A1**.

³³ J. "McMurry, Οργανική Χημεία" Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, **2005**, *1*, 611 –
644.

³⁴ J. "McMurry, Οργανική Χημεία" Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, **2005**, 2, 1485
– 1517.

³⁵ Α. Κουμπής, Κ. Φυλακτακίδου, "Περικυκλικές Αντιδράσεις", Ελληνικά Ακαδημαϊκά Ηλεκτρονικά Συγγράμματα και Βοηθήματα Εκδόσεις Κάλλιπος, **2015**.

³⁶ B. T. Worrell, J. A. Malik, V. V. Fokin, "Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions", *Science*, **2013**, *340*, 457 – 460.

³⁷ L. Weiwei, L. Quxiang, C. Fengchang, S. Dahua, C. Zhiling, "Synthesis of novel glycosyl 1,3,4-oxadiazole derivatives", *Heterocycl. Commun.*, **2014**, *20(6)*, 333–338.