



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

Σχεδιασμός και Σύνθεση αναλόγων του Flindersine ως πιθανών αναστολέων της DYRK1A

Αλεξάνδρα Πάλλα
Φαρμακοποιός

Διπλωματική εργασία ΠΜΣ «Σχεδιασμός και Ανάπτυξη Νέων Φαρμακευτικών Ενώσεων»

Επιβλέπων Καθηγητής Ι. Κωστάκης

ΑΘΗΝΑ 2018

Στους δικούς μου ανθρώπους

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Ι. Κ. Κωστάκης, Επίκουρος Καθηγητής

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ε. Μικρός, Καθηγητής

Γ. Ζωίδης, Επίκουρος Καθηγητής

Ι. Κ. Κωστάκης, Επίκουρος Καθηγητής

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον επιβλέπωντα καθηγητή μου Επίκουρο Καθηγητή Ιωάννη Κωστάκη για την ανάθεση του θέματος, την καθοδήγηση, τις γνώσεις που μοιράστηκε μαζί μου καθώς και για την αμέριστη στήριξη του καθόλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας. Επίσης, τις θερμότερες ευχαριστίες προς τα μέλη της τριμελούς επιτροπής τον Καθηγητή Εμμανουήλ Μικρό και τον Επίκουρο Καθηγητή Γρηγόριο Ζωΐδη για την προσεκτική ανάγνωση της εργασίας και τις πολύτιμες συμβουλές και διορθώσεις τους. Επιπλέον, ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Εμμανουήλ Μικρό, τον μεταδιδάκτορα Βασίλειο Μυριανθόπουλο καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της εργαστηριακής ομάδας, για την πραγματοποίηση των υπολογισμών πρόσδεσης και τον χρόνο που αφιέρωσαν για την εκμάθηση στα απαιτούμενα υπολογιστικά προγράμματα. Σε αυτό το σημείο δεν θα μπορούσα να παραλείψω τα μέλη της εργαστηριακής ομάδας, τις υποψήφιες διδάκτορες Μαρία Καρέλου και Αμαλία Καλαμπαλίκη, καθώς και τις συμφοιτητριές μου Καλλιόπη Χριστοπούλου και Αικατερίνη- Χριστίνη Κομιανού για τις πολύτιμες συμβουλές, στήριξη και βοήθεια εντός του εργαστηρίου.

Ξεχωριστά θα ήθελα να ευχαριστήσω τους εγκάρδιους φίλους μου και τα μέλη της οικογένειας μου για την εμπιστοσύνη, την υπομονή, την στήριξη και την αγάπη που έδειξαν όλο αυτό το χρονικό διάστημα που χρειάστηκε για να ολοκληρωθεί η παρούσα εργασία.

Χωρίς όλους εσάς η πραγματοποίηση αυτής της μελέτης θα ήταν αδύνατη!

Πίνακας περιεχομένων

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1. ΤΑ ΑΛΚΑΛΟΕΙΔΗ ΩΣ ΜΟΡΙΑ ΟΔΗΓΟΙ	9
1.2. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ DYRK1A.....	11
1.3. Η DYRK1A ΣΕ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ	12
1.4. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ DYRK1A ΣΤΗ ΝΕΥΡΩΝΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ	13
1.5. Η ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ DYRK1A ΜΕ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ	15
1.6. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ DYRK1A	16
2. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ	19
2.1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ	19
2.2. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ (DOCKING).....	20
3. ΧΗΜΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	24
3.1. ΣΥΝΘΕΣΗ ΣΠΕΙΡΑΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΣΚΕΛΕΤΟΥ ΠΥΡΑΝΟΚΙΝΟΛΙΝΗΣ	24
3.2. ΣΥΝΘΕΣΗ ΣΠΕΙΡΑΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΣΚΕΛΕΤΟΥ ΒΕΝΖΟΠΥΡΑΝΟΚΙΝΟΛΙΝΗΣ.....	32
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	37
4.1 ΣΥΝΘΕΣΗ Τ-ΒΟΥΤΥΛΟΚΑΡΒΑΜΙΔΙΚΟΥ ΕΣΤΕΡΑ ΤΗΣ 3-(2-ΟΞΟΑΙΘΥΛΙΔΕΝΟ)ΑΖΕΤΙΔΙΝΗΣ (2) ⁶¹	37
4.2 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ 1-Τ-ΒΟΥΤΥΛΟΚΑΡΒΑΜΙΔΙΚΟΥ ΕΣΤΕΡΑ ΤΗΣ ΣΠΕΙΡΟ[ΑΖΕΤΙΔΙΝΟ-3,2'-ΠΥΡΑΝΟ[3,2- C]ΚΙΝΟΛΙΝ]-5'(6'H)-ΟΝΗΣ (3).....	37
4.3 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ 4-ΝΙΤΡΟΦΑΙΝΥΛΟΚΑΡΒΑΜΙΔΙΚΟΥ ΕΣΤΕΡΑ ΤΗΣ ΤΗΣ ΣΠΕΙΡΟ[ΑΖΕΤΙΔΙΝΟ-3,2'-ΠΥΡΑΝΟ[3,2- C]ΚΙΝΟΛΙΝ]-5'(6'H)-ΟΝΗΣ (5).....	38
4.4 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ Ν-(3-ΜΕΘΟΞΥΠΡΟΠΥΛ)-5'-ΟΞΟ-5',6'-ΔΙΪΔΡΟΣΠΕΙΡΟ[ΑΖΕΤΙΔΙΝΟ-3,2'-ΠΥΡΑΝΟ[3,2- C]ΚΙΝΟΛΙΝ-1-ΚΑΡΒΟΞΑΜΙΔΙΟΥ (6).....	39
4.5 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ Ν-(3-(ΔΙΑΙΘΥΛΑΜΙΝΟ)ΠΡΟΠΥΛ)-5'-ΟΞΟ-5',6'-ΔΙΪΔΡΟΣΠΕΙΡΟ[ΑΖΕΤΙΔΙΝΟ-3,2'- ΠΥΡΑΝΟ[3,2-C]ΚΙΝΟΛΙΝ-1-ΚΑΡΒΟΞΑΜΙΔΙΟΥ (7).....	39
4.6 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΤΟΥ 5'-ΟΞΟ-Ν-ΦΑΙΝΥΛΟ-5',6'-ΔΙΪΔΡΟΣΠΕΙΡΟ[ΑΖΕΤΙΔΙΝΟ-3,2'-ΠΥΡΑΝΟ[3,2-C]ΚΙΝΟΛΙΝ- 1-ΚΑΡΒΟΞΑΜΙΔΙΟΥ (8).....	40
4.7 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ Ν-(3-ΧΛΩΡΟ-4-ΦΘΟΡΟΦΑΙΝΥΛΟ)-5'-ΟΞΟ-5',6'-ΔΙΪΔΡΟΣΠΕΙΡΟ[ΑΖΕΤΙΔΙΝΟ-3,2'- ΠΥΡΑΝΟ[3,2-C]ΚΙΝΟΛΙΝ-1-ΚΑΡΒΟΞΑΜΙΔΙΟΥ (9).....	40
4.8 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ Ν-(4-ΚΥΑΝΟΦΑΙΝΥΛΟ)-5'-ΟΞΟ-5',6'-ΔΙΪΔΡΟΣΠΕΙΡΟ[ΑΖΕΤΙΔΙΝΟ-3,2'-ΠΥΡΑΝΟ[3,2- C]ΚΙΝΟΛΙΝ-1-ΚΑΡΒΟΞΑΜΙΔΙΟΥ (10).....	41
4.9 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ Ν-(4-ΑΚΕΤΥΛΟΦΑΙΝΥΛΟ)-5'-ΟΞΟ-5',6'-ΔΙΪΔΡΟΣΠΕΙΡΟ[ΑΖΕΤΙΔΙΝΟ-3,2'-ΠΥΡΑΝΟ[3,2- C]ΚΙΝΟΛΙΝ-1-ΚΑΡΒΟΞΑΜΙΔΙΟΥ (11).....	41
4.10 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΑΙΘΥΛΟ 4-(5'-ΟΞΟ-5',6'-ΔΙΪΔΡΟΣΠΕΙΡΟ[ΑΖΕΤΙΔΙΝΟ-3,2'-ΠΥΡΑΝΟ[3,2-C]ΚΙΝΟΛΙΝ-1- ΚΑΡΒΟΞΑΜΙΔΙΟ)ΒΕΝΖΟΪΚΟΥ ΕΣΤΕΡΑ (12).....	41

4.11 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ 4-(5'-ΟΞΟ-5',6'-ΔΙΪΔΡΟΣΠΕΙΡΟ[ΑΖΕΤΙΔΙΝΟ-3,2'-ΠΥΡΑΝΟ[3,2- <i>C</i>]ΚΙΝΟΛΙΝ-1-ΚΑΡΒΟΞΑΜΙΔΟ)ΒΕΝΖΟΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (13)	42
4.12 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ 1-ΒΕΝΖΟΪΛΟΣΠΕΙΡΟ[ΑΖΕΤΙΔΙΝΟ-3,2'-ΠΥΡΑΝΟ[3,2- <i>C</i>]ΚΙΝΟΛΙΝ]-5'(6' <i>H</i>)-ΟΝΗ (14)	42
4.13 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ 1-(4-(ΧΛΩΡΟΜΕΘΥΛ)ΒΕΝΖΟΪΛΟ)ΣΠΕΙΡΟ[ΑΖΕΤΙΔΙΝΟ-3,2'-ΠΥΡΑΝΟ[3,2- <i>C</i>]ΚΙΝΟΛΙΝ]-5'(6' <i>H</i>)-ΟΝΗ (15)	43
4.14 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ 1-(4-((ΔΙΜΕΘΥΛΑΜΙΝΟ)ΜΕΘΥΛ)ΒΕΝΖΟΪΛΟ)ΣΠΕΙΡΟ[ΑΖΕΤΙΔΙΝΟ-3,2'-ΠΥΡΑΝΟ[3,2- <i>C</i>]ΚΙΝΟΛΙΝ]-5'(6' <i>H</i>)-ΟΝΗ (16)	43
4.15 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ 1-(2-ΧΛΩΡΑΚΕΤΥΛΟ)ΣΠΕΙΡΟ[ΑΖΕΤΙΔΙΝΟ-3,2'-ΠΥΡΑΝΟ[3,2- <i>C</i>]ΚΙΝΟΛΙΝ]-5'(6' <i>H</i>)-ΟΝΗ (17)	44
4.16 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ 1-(ΔΙΜΕΘΥΛΟΓΛΥΚΥΛ)ΣΠΕΙΡΟ[ΑΖΕΤΙΔΙΝΟ-3,2'-ΠΥΡΑΝΟ[3,2- <i>C</i>]ΚΙΝΟΛΙΝ]-5'(6' <i>H</i>)-ΟΝΗ (18)	44
4.17 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ 1-ΤΟΣΥΛΟΣΠΕΙΡΟ[ΑΖΕΤΙΔΙΝΟ-3,2'-ΠΥΡΑΝΟ[3,2- <i>C</i>]ΚΙΝΟΛΙΝ]-5'(6' <i>H</i>)-ΟΝΗ (19)	45
4.18 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ Τ-ΒΟΥΤΥΛΟΚΑΡΒΑΜΙΔΙΚΟΥ ΕΣΤΕΡΑ ΤΗΣ ΝΑΦΘΥΛ-2-ΑΜΙΝΗΣ (21)	45
4.19 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΝΑΦΘΥΛ-2-ΑΜΙΝΗΣ (22) ⁷⁰	45
4.20 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ 1-ΥΔΡΟΞΥΒΕΝΖΟ[F]ΚΙΝΟΛΙΝ-3(4 <i>H</i>)-ΟΝΗΣ (23) ^{76,79}	45
4.21 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ 1-Τ-ΒΟΥΤΥΛΟΚΑΡΒΑΜΙΔΙΚΟΥ ΕΣΤΕΡΑ ΤΗΣ 5'-ΟΞΟ-5',6'-ΔΙΪΔΡΟΣΠΕΙΡΟ[ΑΖΕΤΙΔΙΝΟ-3,2'-ΒΕΝΖΟ[F]ΠΥΡΑΝΟ[3,2- <i>C</i>]ΚΙΝΟΛΙΝ]-5'(6' <i>H</i>)-ΟΝΗΣ (24)	46
4.22 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ N-(4-ΚΥΑΝΟΦΑΙΝΥΛΟ)-5'-ΟΞΟ-5',6'-ΔΙΪΔΡΟΣΠΕΙΡΟ[ΑΖΕΤΙΔΙΝΟ-3,2'-ΒΕΝΖΟ[F]ΠΥΡΑΝΟ[3,2- <i>C</i>]ΚΙΝΟΛΙΝΗ]-1-ΚΑΡΒΟΞΑΜΙΔΙΟΥ (26)	46
4.23 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ N-(4-ΑΚΕΤΥΛΟΦΑΙΝΥΛΟ)-5'-ΟΞΟ-5',6'-ΔΙΪΔΡΟΣΠΕΙΡΟ[ΑΖΕΤΙΔΙΝΟ-3,2'-ΒΕΝΖΟ[F]ΠΥΡΑΝΟ[3,2- <i>C</i>]ΚΙΝΟΛΙΝΗ]-1-ΚΑΡΒΟΞΑΜΙΔΙΟΥ (27)	47
4.24 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΑΙΘΥΛΟ 4-(5'-ΟΞΟ-5',6'-ΔΙΪΔΡΟΣΠΕΙΡΟ[ΑΖΕΤΙΔΙΝΟ-3,2'-ΒΕΝΖΟ[F]ΠΥΡΑΝΟ[3,2- <i>C</i>]ΚΙΝΟΛΙΝΟ]-1-ΚΑΡΒΟΞΑΜΙΔΟ)ΒΕΝΖΟΪΚΟΥ ΕΣΤΕΡΑ (28)	47
4.25 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ 4-(5'-ΟΞΟ-5',6'-ΔΙΪΔΡΟΣΠΕΙΡΟ[ΑΖΕΤΙΔΙΝΟ-3,2'-ΒΕΝΖΟ[F]ΠΥΡΑΝΟ[3,2- <i>C</i>]ΚΙΝΟΛΙΝΟ]-1-ΚΑΡΒΟΞΑΜΙΔΟ)ΒΕΝΖΟΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (29)	48
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	49

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι βασικοί ρυθμιστές της κυτταρικής λειτουργίας που καταλύουν τη μεταφορά μιας φωσφορικής ομάδας στα υποστρώματα τους. Η απορύθμιση της λειτουργίας πρωτεϊνικών κινασών εμπλέκεται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως ο καρκίνος και αρκετές νευρολογικές διαταραχές. Η διπλής επιλεκτικότητας κινάση (DYRK1A) είναι μια κινάση σερίνης / θρεονίνης που παρουσιάζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του εγκεφάλου τόσο κατά εμβρυϊκή νευρωνική ανάπτυξη όσο και στη φυσιολογική λειτουργία του ενήλικου εγκεφάλου. Υψηλότερα επίπεδα από τα φυσιολογικά συσχετίζονται με το σύνδρομο Down και την πρώιμη εμφάνιση συμπτωμάτων της νόσου Alzheimer σε αυτό, καθώς και με τη νοητική υστέρηση που εμφανίζεται στο σύνδρομο. Ως αποτέλεσμα, η ανάπτυξη αναστολέων της DYRK1A αποτελεί ελκυστικό στόχο και μια ενδιαφέρουσα στρατηγική για την τροποποίηση της νόσου. Ωστόσο, μόνο μερικοί αναστολείς αναφέρονται στη βιβλιογραφία και η πιθανή κλινική τους χρήση απαιτεί περαιτέρω αξιολόγηση. Η ερευνητική μας ομάδα έχει καταλήξει στο συμπέρασμα ότι το Flindersine, ένα αλκαλοειδές πυρανοκινολίνης, παρουσιάζει αξιοσημείωτη δράση έναντι του DYRK1A. Ως συνέχεια αυτής της μελέτης, περιγράφεται στην παρούσα διπλωματική εργασία ο σχεδιασμός και η σύνθεση νέων σπειρανικών αναλόγων του Flindersine έτσι ώστε να γίνουν περισσότερο κατανοητές οι σχέσεις δομής-δράσης των μορίων σε αλληλεπίδραση με την DYRK1A.

ABSTRACT

Protein Kinases are key regulators of cell function that catalyze the transfer of phosphate group between their substrates. Dysregulation of protein kinase activity is involved in pathological conditions, such as cancer and several neurological disorders. Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A (DYRK1A) is a serine/threonine kinase that shows an important role in brain development in both embryonic neuronal development and physiology of the adult brain. Higher than normal levels are associated with neurogenesis in Down syndrome, the early onset of Alzheimer's disease-like symptoms and mental retardation that occurs in Down Syndrome. Thus it represents an attractive target for drug development: inhibition of DYRK1A is an interesting strategy to modify the disease. However, only a few inhibitors are reported, and their potential clinical uses require further evaluation. Our group has previously reported that Flindersine, a pyranoquinoline alkaloid, shows notable activity against DYRK1A. As a continuation of this study, in this project is been described the design and synthesis of novel spiro-flindersine analogs so as to better understand the structure-activity relationships regarding the interaction with DYRK1A.

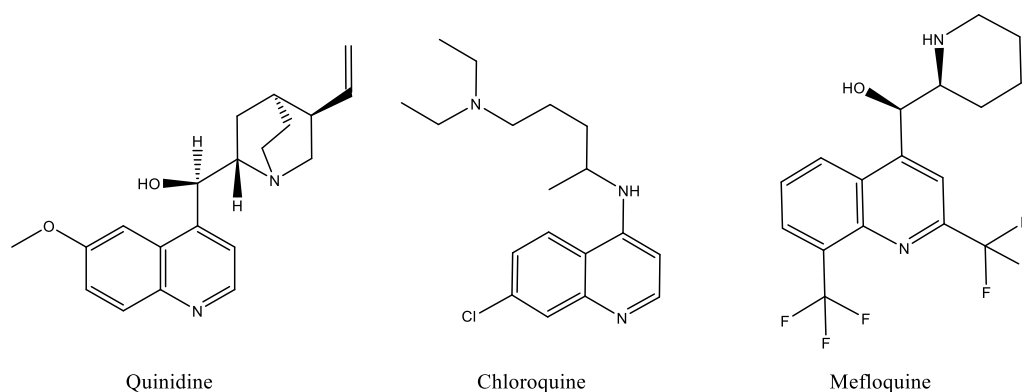
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΤΑ ΑΛΚΑΛΟΕΙΔΗ ΩΣ ΜΟΡΙΑ ΟΔΗΓΟΙ

Τα αλκαλοειδή αποτελούν μία διακριτή κατηγορία οργανικών ενώσεων, που απαντούν στη φύση και περιέχουν στο χημικό τύπο τους άζωτο. Απαρτίζουν τη μεγαλύτερη κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών στα ανώτερα φυτά και συναντώνται ακόμα σε βακτήρια και μύκητες. Ο φυσιολογικός τους ρόλος στα φυτά είναι να δρουν ως αμυντικός μηχανισμός έναντι φυτοφάγων ζώων και παθογόνων. Λόγω των ισχυρών τους βιολογικών δράσεων έχουν χρησιμοποιηθεί ως φαρμακευτικά προϊόντα, διεγερτικά, ναρκωτικά αλλά και δηλητήρια.

Ως αποτέλεσμα της μεγάλης ποικιλίας στη δομή, την βοτανική προέλευση, τη βιοσυνθετική οδό αλλά και τη βιολογική δράση τους, η κατάταξη τους πραγματοποιείται βάσει πολλών κριτηρίων. Η ταξινόμησή τους ως προς τη χημική δομή πραγματοποιείται αρχικά σε δύο κύριες κατηγορίες, τα μη ετεροκυκλικά αλκαλοειδή και τα ετεροκυκλικά, τα οποία με τη σειρά τους ταξινομούνται βάσει της δομής του κεντρικού ετερόκυκλου.

Μία πολυμελής χημική κατηγορία αλκαλοειδών είναι αυτά με κεντρικό ετερόκυκλο κινολίνης. Από τα πιο γνωστά μέλη αυτής της κατηγορίας είναι το αλκαλοειδές κινίνη, το οποίο απομονώνεται από το φλοιό των ειδών Cinchona. Η δρόγη χρησιμοποιήθηκε από λαούς του Αμαζονίου ως αντιπυρετικό, ενώ στην Ευρώπη από τις αρχές του 1600 χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία της ελονοσίας. Η κινίνη αποτέλεσε τη βάση για τη σύνθεση των ευρέως χρησιμοποιούμενων φαρμάκων για τη θεραπεία της ελονοσίας, χλωροκίνη και μεφλοκίνη¹ και αποτελεί ένα από τα πολλά παραδείγματα χρήσης των αλκαλοειδών στη θεραπευτική, καθώς και ως μόρια-οδηγοί στη φαρμακευτική χημεία. (Σχήμα 1)

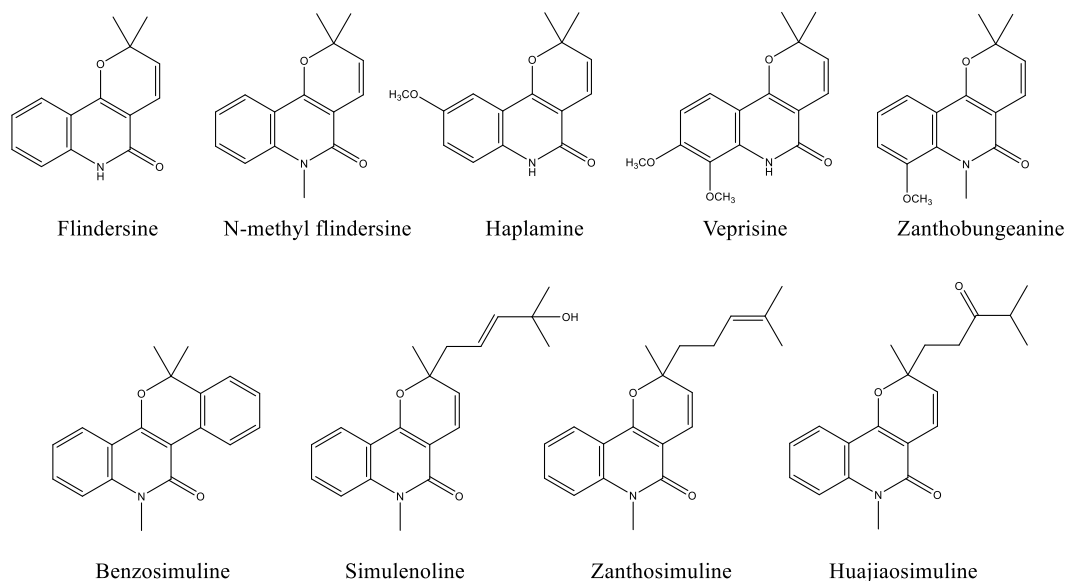


Σχήμα 1: Ανθελονοσιακά φάρμακα, Κινίνη, Χλωροκίνη και Μεφλοκίνη.

Στην κατηγορία των αλκαλοειδών κινολίνης, εμπεριέχεται και η υποκατηγορία των αλκαλοειδών με σκελετό πυρανο[3,2-c]κινολίνης, τα οποία εμφανίζονται κυρίως σε είδη της οικογένειας Rutaceae².

Οι χημικές δομές και οι κυριότερες δράσεις των φυσικά απομονωμένων αλκαλοειδών εμφανίζονται παρακάτω. (Σχήμα 2, Πίνακας 1)

Σχεδιασμός και Σύνθεση αναλόγων του Flindersine ως πιθανών αναστολέων της DYRK1A



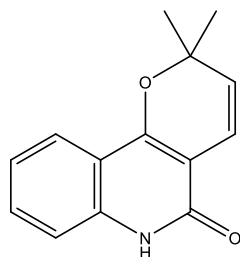
Σχήμα 2: Αλκαλοειδή πυρανοκινολίνης

Αλκαλοειδή	Δράσεις	Αναφορά
Flindersine	Αντικαρκινική Αντιβακτηριακή Αντιμυκητιασική SRS-Ανταγωνιστής Μυκητοκτόνο Αλγοκτόνο	3 4,5 4,6 7 8 8
N-methyl Flindersine	SRS-Ανταγωνιστής	7
Haplamine	Αντικαρκινική	3
Veprisine	SRS-Ανταγωνιστής Αλγοκτόνο Ανθελονοσιακή	7 8 9
Zanthobungeanine	Αντιαιμοπεταλιακή	10
Benzosimuline	Αντιαιμοπεταλιακή	10
Simulenoline	Αντιαιμοπεταλιακή	10
Zantosimuline	Αντικαρκινική	11
Huajiaosimuline	Αντικαρκινική Αντιαιμοπεταλιακή	11 10

Πίνακας 1: Δράσεις αλκαλοειδών πυρανοκινολίνης (SRS- slow-reacting substance of anaphylaxis).

Από όλα τα παραπάνω το καλύτερα μελετημένο αλκαλοειδές, είναι το Flindersine (Σχήμα 3) το οποίο απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1914 από το φυτό *Flindersia australis*¹² και γενικά ανευρίσκεται και σε άλλα είδη της οικογένειας *Rutaceae*. Εμφανίζεται στο είδος *Toddalia asiatica* το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά για την αντιμετώπιση πλήθους ασθενειών. Πιο συγκεκριμένα τα φύλλα του φυτού έχουν χρησιμοποιηθεί για αναπνευστικές και δερματικές παθήσεις, για την ανακούφιση σε πόνους του

γαστρεντερικού, ως σκόνη για τα δόντια και επίσης έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε ρευματικές παθήσεις¹³. Ύστερα από μελέτες, το εκχύλισμα του φυτού έδειξε αξιοσημείωτη δράση έναντι του διαβήτη σε *in vitro* πειράματα, δράση η οποία θεωρείται ότι οφείλεται στο Flindersine¹⁴. Επιπλέον η δράση του εκχυλίσματος έναντι μικροβίων και μυκήτων έδωσε το έναυσμα για περαιτέρω πειράματα, από τα οποία εξάχθηκε το συμπέρασμα ότι το συστατικό που είναι υπεύθυνο για τη δράση είναι το αλκαλοειδές Flindersine⁴. Τα φύλλα του φυτού *Geijera parviflora* χρησιμοποιήθηκαν στη θεραπευτική ως αναλγητικό, μια δράση που οδήγησε στη σκέψη ότι στο εκχύλισμα του φυτού περιέχονται συστατικά με αντιφλεγμονώδη δράση. Πράγματι, τα περιεχόμενα αλκαλοειδή πυρανοκινολίνης, συμπεριλαμβανομένου του Flindersine, αποδείχθηκε ότι αναστέλλουν τη σύνθεση προσταγλαδίνης E2 (PGE2) που δρα ως μεσολαβητής της φλεγμονώδους αντίδρασης¹⁵.



Flindersine

Σχήμα 3: Η δομή του αλκαλοειδούς Flindersine.

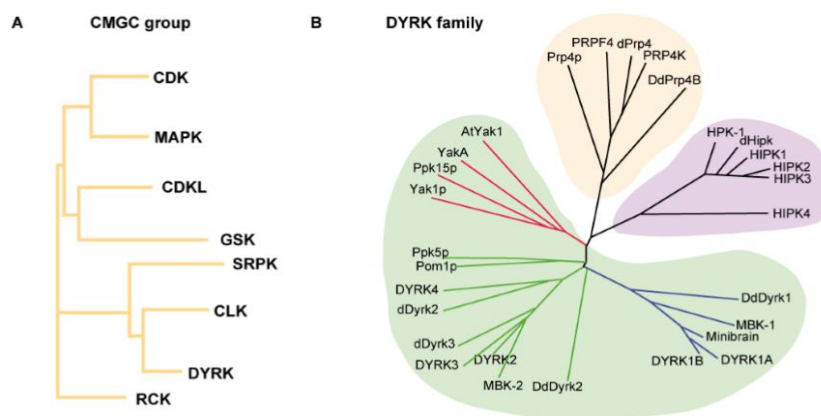
Στο εργαστήριο μας, τα τελευταία χρόνια ασχολούμαστε με την σχεδιασμό και την σύνθεση νέων μορίων ως πιθανών αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών. Στα πλαίσια της έρευνας αυτής, μετά από εφαρμογή μεθοδολογίας εικονικής αποτίμησης σε καταχωρημένες ουσίες της χημειοθήκης του Εργαστηρίου και σε συνδυασμό με τις αντίστοιχες βιολογικές δοκιμασίες διαπιστώσαμε ότι το αλκαλοειδές Flindersine, παρουσίασε ενδιαφέρουσα ανασταλτική δράση έναντι της κινάσης DYRK1A και πιο συγκεκριμένα υπολογίσθηκε η IC₅₀ έναντι αυτής στα 15.0 μΜ, δίνοντας το έναυσμα για περαιτέρω μελέτη του εν λόγω μορίου και αναλόγων του ως προς τη δράση του επί της κινάσης.

1.2. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ DYRK1A

Αρχικά, οι κινάσες είναι ένζυμα τα οποία φωσφορυλιώνουν πρωτεΐνες μέσω της μεταφοράς φωσφορικών ομάδων από υψηλής ενέργειας μόρια δότες, όπως το ATP, σε συγκεκριμένα υποστρώματα, τα οποία αποκαλούνται μόρια δέκτες. Η φωσφορυλίωση προκαλεί μια λειτουργική αλλαγή στην πρωτεΐνη στόχο με αποτέλεσμα τη μεταβολή της ενζυμικής δραστηριότητας της πρωτεΐνης ή την αλλαγή της κυτταρικής της δομής ή την τροποποίηση της συσχέτισης της με άλλες πρωτεΐνες.

Από την ανάλυση του ανθρώπινου γονιδιώματος έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 500 πρωτεϊνικές κινάσες και με βάση το υπόστρωμα που φωσφορυλιών διακρίνονται, σε κινάσες σερίνης/ θρεονίνης, κινάσες τυροσίνης, κινάσες ιστιδίνης και τέλος σε μία ιδιαίτερη κατηγορία της κινάσες διπλής επιλεκτικότητας οι οποίες μπορούν να φωσφορυλιώσουν υπολείμματα τυροσίνης καθώς και σερίνης/ θρεονίνης. Η DYRK1A (Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A) που προαναφέρθηκε, ανήκει στις κινάσες διπλής

επιλεκτικότητας όσα αφορά τα αμινοξέα που φωσφορυλιώνει, ενώ φυλογενετικά κατατάσσεται στην ομάδα CMGC, μέλη της οποίας είναι πλήθος κινάσων με γνωστά παραδείγματα τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (CDKs), οι ενεργοποιούμενες από μιτογόνο πρωτεϊνικές κινάσες (MAPKs) και η κινάση-3 της συνθάσης του γλυκογόνου (GSK-3) μεταξύ άλλων. (Εικόνα 1)¹⁶



Εικόνα 1: Α) Φυλογενετικό δέντρο της ομάδας CGMC. Β) Μέρος φυλογενετικού δέντρου που απεικονίζει τις τρεις υποομάδες της οικογένειας DYRK .

Η έννοια της διπλής επιλεκτικότητας έγκειται στο γεγονός ότι η κινάση φωσφορυλιώνει τα υποστρώματα της σε υπολείμματα σερίνης/θρεονίνης και συνάμα καταλύει την αυτό-φωσφορυλίωση της σε υπόλειμμα τυροσίνης στο βρόχο ενεργοποίησης (activation loop)¹⁷. Όπως είναι γνωστό, οι κινάσες λειτουργούν ως μοριακοί διακόπτες που μπορούν να υιοθετήσουν δύο διακριτές διαμορφώσεις, την ενεργή και την ανενεργή. Η αλλαγή στη διαμόρφωση, είναι αποτέλεσμα της ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης της φωσφορικής ομάδας με τη θετικά φορτισμένη περιοχή της θέσης σύνδεσης. Στην περίπτωση των DYRKs , η φωσφορυλιωμένη τυροσίνη (Y321 στη DYRK1A) αλληλεπιδρά με δύο αργινίνες (R325 και R328), σχηματίζοντας γέφυρες άλατος ώστε να επιτευχθεί η ενεργοποίηση¹⁸. Η φωσφορυλίωση της τυροσίνης λαμβάνει χώρα μόνο κατά τη διάρκεια της πρωτεϊνικής σύνθεσης, αλλά όχι στην ώριμη πρωτεΐνη υποδεικνύοντας έτσι ότι η αυτοφωσφορυλίωση είναι ένα "εφάπαξ" αρχικό γεγονός που οδηγεί στη ενεργοποίηση της κινάσης¹⁹.

1.3. Η DYRK1A ΣΕ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ

Η συμμετοχή της DYRK1A σε διαφορετικές κυτταρικές διεργασίες και μονοπάτια μεταγωγής σήματος απορρέει κυρίως από τη δράση των υποστρωμάτων της. Η ποικιλομορφία των υποστρωμάτων της, υποδεικνύει ότι η DYRK1A δρα ως ρυθμιστής διαφορετικών κυτταρικών διεργασιών, όπως μεταγραφή, μάτισμα του mRNA, μεταβολισμό, απόπτωση καθώς και στη διαδικασία της ενδοκυττάρωσης, μεταξύ άλλων.

Έχει αναφερθεί ότι η DYRK1A φωσφορυλιώνει μια πληθώρα υποστρωμάτων (Πίνακας 2) τόσο στο πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα, υποδεικνύοντας έτσι ότι ο υποκυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐνης μπορεί να καθορίσει το λειτουργικό της ρόλο στο κύτταρο. Ωστόσο, μόνο ένας μειωμένος αριθμός έχει αποδειχθεί *in vivo*. Σε αυτό θα πρέπει να έχουμε κατά νου ότι οι αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών και συνεπώς η φυσιολογική τους σχέση εξαρτάται από την ταυτόχρονη χρονική και τοπική έκφρασή. Για το σκοπό αυτό, οι

διαθέσιμες πληροφορίες είναι συχνά περιορισμένες και δεν αντικατοπτρίζουν κατά ανάγκη την πραγματικότητα στους διάφορους ιστούς, τύπους κυττάρων ή την φάση της ανάπτυξης στην οποία βρίσκονται τα κύτταρα που εξετάζονται.

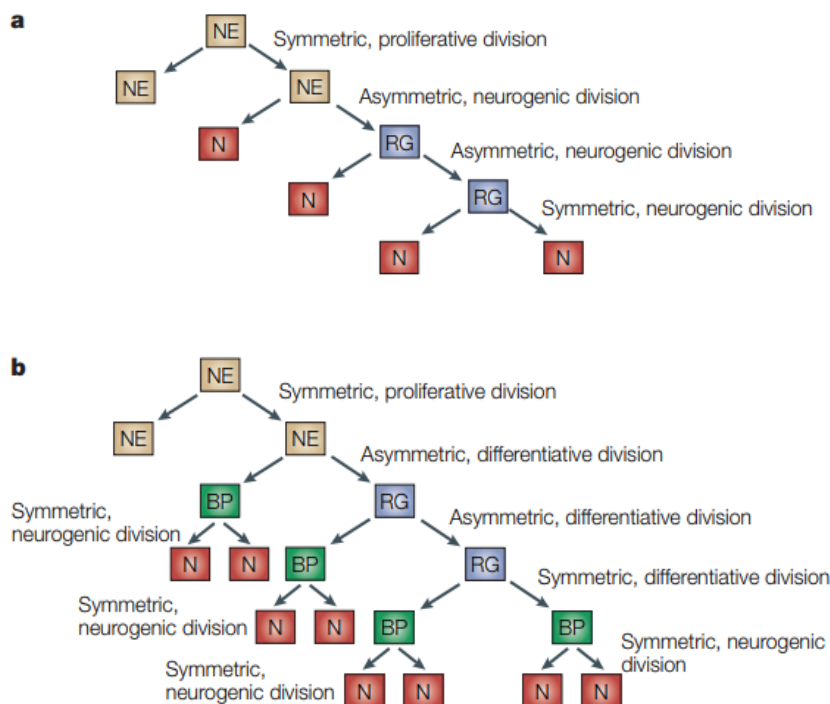
Υπόστρωμα	Υποκυτταρικός εντοπισμός	Λειτουργίες	Αναφορά
Androgen receptorinteracting protein 4 (Arip4)	πυρήνας	Ρύθμιση της μεταγραφής που επάγεται από στεροειδείς ορμόνες	20
cAMP responsive element binding protein (CREB)	πυρήνας	Νευρωνική ανάπτυξη και διαφοροποίηση	21
Cyclin L2	πυρήνας	Ρύθμιση της μεταγραφής που περιλαμβάνει το μάτισμα του pre-mRNA	22
Dynamin	κυτοσόλιο	Ενδοκύττωση των συναπτικών κυστιδίων	23
Forkhead (FKHR)	πυρήνας	Έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης επαγόμενη από ινσουλίνη Ρύθμιση της απόπτωσης από παράγοντες επιβίωσης	24
Glycogen synthase	κυτοσόλιο	Ρύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης	25
Nuclear factor of activated T cells (NFAT)	πυρήνας/ κυτοσόλιο	Ρύθμιση ανάπτυξης, κυτταρικής διαφοροποίησης και προσαρμογής των κυττάρων	26
Ras/MAP kinase pathway	πυρήνας/ κυτοσόλιο	Ανάπτυξη κυττάρων, διαφοροποίηση	27
Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)	πυρήνας	Ενεργοποίηση μεταγραφής	28
tau	κυτοσόλιο	Σχετίζεται με τους μικροσωληνίσκους Υπερφωσφορυλιώνεται στη νόσο Alzheimer	29

Πίνακας 2: Ταυτοποιημένα υποστρώματα της DYRK1A.

1.4. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ DYRK1A ΣΤΗ ΝΕΥΡΩΝΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ

Συμπεράσματα για τη λειτουργία της DYRK1A *in vivo* εξήχθησαν αρχικά από τη λειτουργία της κινάσης *mnb* (minibrain) το ανάλογο ένζυμο που ανευρίσκεται στη μύγα *Drosophila* και σχετίζεται με την ανάπτυξη των νευρώνων σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου. Η *mnb* είναι απαραίτητη για την φυσιολογική νευρογέννεση καθώς μύγες που έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο και εξέφραζαν μειωμένα επίπεδα της κινάσης εμφάνισαν αξιοσημείωτη μείωση του μεγέθους συγκεκριμένων περιοχών του εγκεφάλου καθώς και διαταραχές συμπεριφοράς³⁰.

Κατά τη διάρκεια της νευρωνικής ανάπτυξης στο κεντρικό νευρικό σύστημα, τα νευρικά βλαστικά κύτταρα, υποβάλλονται πρώτα σε συμμετρικές μιτωτικές διαιρέσεις, με αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο θυγατρικών βλαστοκυττάρων όμοια με το αρχικό. Αυτές οι διαιρέσεις ακολουθούνται από πολλές ασύμμετρες διαιρέσεις, που ονομάζονται και νευρογενετικές διαιρέσεις, από τις οποίες παράγονται ένα θυγατρικό βλαστικό κύτταρο, και ένα διαφοροποιημένο κύτταρο. Τα εν λόγω διαφοροποιημένα κύτταρα μπορεί να είναι γλοιακά κύτταρα, τα οποία διατηρούν την νευρογενετική ιδιότητα, μη βλαστικά κύτταρα προγονικά κύτταρα ή ένας πλήρως διαφοροποιημένος νευρώνας. Αυτά τα μη βλαστικά πρόγονα κύτταρα, δρουν ως ενδιάμεσα κύτταρα που θα οδηγήσουν τελικά στο σχηματισμό πλήρως διαφοροποιημένων νευρώνων μέσω συμμετρικών νευρογενετικών διαιρέσεων. (Εικόνα 2) (Για περισσότερα σχετικά με τη νευρωνική ανάπτυξη και διαφοροποίηση βλ. review ³¹.)



Εικόνα 2: Συμμετρική και ασύμμετη-νευρογενετική διαίρεση των νευροεπιθηλιακών κυττάρων. Στο σχήμα b φαίνεται η εμπλοκή των προγονικών κυττάρων ως ενδιάμεσα για τον σχηματισμό των νευρώνων (NE: νευροεπιθηλιακά κύτταρα, N: νευρώνας, RG: γλοιακά κύτταρα, BP: προγονικά κύτταρα).

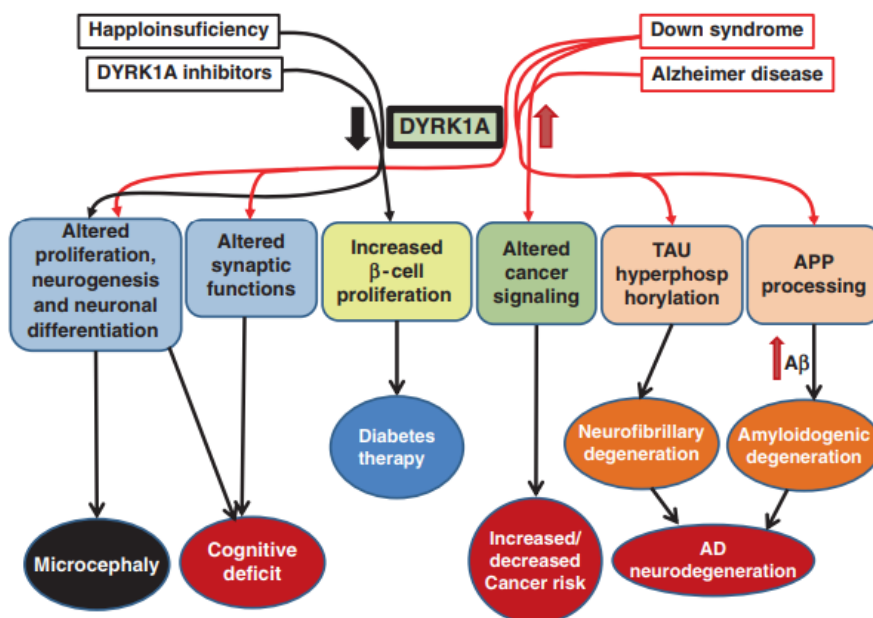
Κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, η έκφραση της DYRK1A στα σπονδυλωτά λαμβάνει χώρα σε δύο κύματα, με το πρώτο να εμφανίζεται στα νευροεπιθηλιακά κύτταρα αποτελώντας ένα μεταβατικό στάδιο μεταξύ του συμμετρικού πολλαπλασιασμού και των ασύμμετρων νευρογενετικών διαιρέσεων. Το δεύτερο κύμα έκφρασης ξεκινά από μια μεταβατική μετατόπισή της από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, υποδηλώνοντας τη συμμετοχή της στους μηχανισμούς σηματοδότησης που ενεργοποιούν τα τελικά στάδια της νευρωνικής διαφοροποίησης. Στη συνέχεια, η πρωτεΐνη DYRK1A μεταφέρεται στο αναπτυσσόμενο δενδριτικό δέντρο. ^{32,33}.

1.5. Η ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ DYRK1A ΜΕ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ

Το γονίδιο της DYRK1A χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 21q22.2, μια περιοχή του χρωμοσώματος που εμπλέκεται στο σύνδρομο Down (DS). Το DS προκαλείται από μερική ή ολική τρισωμία του χρωμοσώματος 21³⁴. Είναι η πιο κοινή χρωμοσωμική διαταραχή σχετιζόμενη με μη φυσιολογική ανάπτυξη του εγκεφάλου, που περιλαμβάνει μειωμένο μέγεθος εγκεφάλου και αριθμού νευρώνων, μικρότερους νευρώνες και μειωμένο δενδριτικό δένδρο, συμβάλλοντας στην εμφάνιση νοητικής υστέρησης. Η τρισωμία του χρωμοσώματος 21 έχει επίσης ως αποτέλεσμα την πρόωρη γήρανση, η οποία εκδηλώνεται κατά την τρίτη δεκαετία της ζωής, και την πρόωμη έναρξη συμπτωμάτων της νόσου Alzheimer επηρεάζοντας σχεδόν όλα τα άτομα με DS που είναι μεγαλύτερα των 40 ετών³⁵. Η νόσος του Alzheimer (Alzheimer disease- AD) είναι μια προοδευτική νευροεκφυλιστική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από δύο ιστικές βλάβες: εξωκυτταρικές αμυλοειδείς πλάκες και νευροϊνιδιακά συμπλέγματα. Οι αμυλοειδείς πλάκες είναι συμπαγείς, σφαιρικές εξωκυτταρικές αποθέσεις που αποτελούνται από μια μικρή πρωτεΐνη που ονομάζεται Αμυλοειδές β-πεπτιδίο (Αβ-peptide) ενώ τα νευροϊνιδιακά συμπλέγματα (Neurofibrillary tangles- NFTs) είναι ενδοκυτταρικά συσσωματώματα που αποτελούνται από υπερφωσφορυλιωμένες μορφές της πρωτεΐνης tau³⁶. Παρόλα αυτά, η εμφάνιση συμπτωματολογίας Alzheimer σε άτομα με σύνδρομο Down δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, με ένα πιθανό μηχανισμό να αποτελεί η υπερέκφραση του γονιδίου της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς (b-amyloid precursor protein- APP) που βρίσκεται επίσης στο χρωμόσωμα 21. Βέβαια, το συγκεκριμένο γενετικό υπόβαθρο δεν ανταποκρίνεται επαρκώς στο πλήρες φάσμα των παθολογιών που παρατηρούνται σε ασθενείς με AD, μιας και η υπερέκφραση μόνο της APP σε ποντίκια δεν είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση της παθολογίας τύπου Alzheimer που εμφανίζουν τα άτομα με DS. Αυτά τα αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι και άλλα γονίδια που εδρεύουν στο χρωμόσωμα 21 είναι απαραίτητα για την εμφάνιση AD σε ασθενείς με DS³⁷. Μελέτες που έχουν γίνει, δείχνουν ότι η APP αποτελεί υπόστρωμα για την κινάση DYRK1A καθώς και ότι τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης APP και του Αβ-πεπτιδίου σε διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν την DYRK1A είναι αυξημένα, υποδεικνύοντας έτσι το λειτουργικό ρόλο της κινάσης στην εμφάνιση AD μέσω φωσφορυλίωσης της APP³⁸.

Άλλος πιθανός μηχανισμός που φαίνεται να εμπλέκεται στην εμφάνιση των συμπτωμάτων την νόσου Alzheimer στο DS, έχει προταθεί ότι αποτελεί η υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης tau. Αρχικά, η πρωτεΐνη tau ανευρίσκεται στους νευρώνες του ΚΝΣ και η λειτουργία της σχετίζεται με την σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων μέσω αλληλεπίδρασης με την τουμπουλίνη³⁹. Η φωσφορυλίωση της tau αποτελεί την πιο συχνά περιγραφόμενη μετά-μεταγραφική της τροποποίηση και σύμφωνα με μελέτες, η DYRK1A φωσφορυλιώνει απ' ευθείας την πρωτεΐνη tau σε τουλάχιστον 11 υπολείμματα σερίνης και θρεονίνης, μερικά από τα οποία έχει διαπιστωθεί ότι οδηγούν στο σχηματισμό των μη διαλυτών συσσωματωμάτων της (NFTs). Επιπλέον, η φωσφορυλίωση της tau από την DYRK1A έχει δειχθεί ότι προωθεί την φωσφορυλίωση αυτής από τη συνθάση του γλυκογόνου 3β (Glycogen synthase kinase 3-β- GSK-3β) ένας επιπλέον παράγοντας που οδηγεί στη συσσώρευση της⁴⁰.

Από όλα τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι πιθανότατα η κινάση DYRK1A αποτελεί το συνδετικό κρίκο μεταξύ του συνδρόμου Down και της νόσου Alzheimer που εμφανίζεται σε αυτά τα άτομα (Εικόνα 3). Επιπλέον ως ρυθμιστική πρωτεΐνη που ελέγχει πολλαπλά μονοπάτια σηματοδότησης, η αναστολή της δραστηριότητάς της κερδίζει γρήγορα ενδιαφέρον ως πιθανός τρόπος θεραπείας για τη νόσο Alzheimer και το σύνδρομο Down.



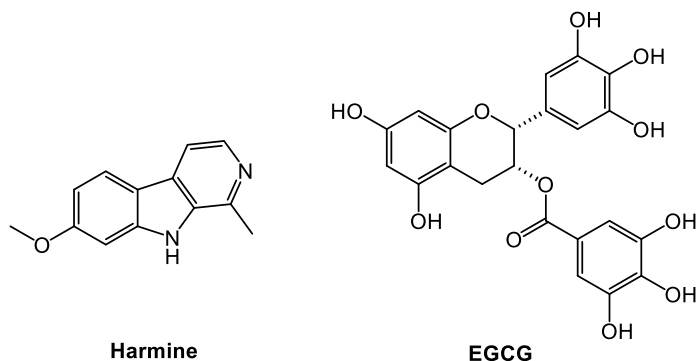
Εικόνα 3: Αυξημένη (κόκκινο) ή μειωμένη (μαύρο βέλος) λειτουργία/έκφραση της DYRK1A μπορεί να προκαλέσει μεταβολές σε πολλά παθογενετικά μονοπάτια. (Tejedor F.J. (2018) Dyrk1a. In: Choi S. (eds) Encyclopedia of Signaling Molecules. Springer, Cham).

1.6. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ DYRK1A

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί πολλοί αναστολείς της κινάσης DYRK1A οι οποίοι είναι δυνατό να κατηγοριοποιηθούν σε δύο γενικές κατηγορίες, τους αναστολείς που προέρχονται από φυσικά προϊόντα και τα συνθετικά τους ανάλογα και τους συνθετικούς αναστολείς. Γενικό χαρακτηριστικό αυτών των αναστολέων είναι ότι αποτελούν τύπου I, συνδέονται δηλαδή στην περιοχή του ATP συναγωνιστικά.

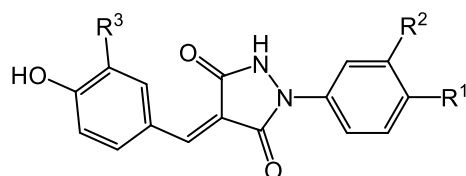
Ο πιο γνωστός αναστολέας της κινάσης αποτελεί το αλκαλοειδές β-καρβολίνης *harmine* (Σχήμα 4) με IC_{50} που υπολογίζεται *in vitro* στα 33 nM. Σημαντικό εύρημα αποτελεί το γεγονός ότι και σε μελέτες της ανασταλτικής δράσης του αλκαλοειδούς σε κύτταρα HeLa έδειξε παρόμοια συμπεριφορά στην αναστολή της ενδοκυττάριας DYRK1A με IC_{50} στα 48 nM. Στα πλεονεκτήματα αυτού του αναστολέα συγκαταλέγεται η σχετική εκλεκτικότητα του ως προς την DYRK1A σε σύγκριση με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας DYRK. Βέβαια παρόλο που οι τιμές των IC_{50} για τις DYRK2 και DYRK4 υπολογίζονται έως και 10 φορές υψηλότερες (1.9 μ M και 79.8 μ M αντίστοιχα), για τη DYRK1B λόγω της υψηλής δομικής ομοιότητας η IC_{50} έχει υπολογισθεί στα 166 nM. Επιπλέον, το *harmine* είναι αναστολέας της MAO-A με IC_{50} στα 5 nM γεγονός που αποκλείει την αναστολή της DYRK1A σε πειράματα με ζώα χωρίς τη σύγχρονη αναστολή και της MAO-A⁴¹.

Το κύριο πολυφαινολικό συστατικό του πράσινου τσαγιού Epigallocatechin gallate (EGCG) (Σχήμα 4) έχει αποδειχθεί σε μελέτες ότι αναστέλλει σχεδόν εκλεκτικά την DYRK1A με IC_{50} ίση με $0.33 \mu M$ ⁴². Προ-κλινικές μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν την κινάση, καθώς και κλινική μελέτη σε 31 ασθενείς με σύνδρομο Down έδειξε ότι η γνωστική λειτουργία τόσο στο μοντέλο των ποντικών όσο και στους ασθενείς βελτιώθηκε υποστηρίζοντας τη χρήση αναστολέων της DYRK1A, ως ελπιδοφόρα θεραπευτικά εργαλεία στη βελτίωση της γνωστικής λειτουργίας στο DS⁴³.



Σχήμα 4: Αναστολείς DYRK1A φυσικής προελεύσεως.

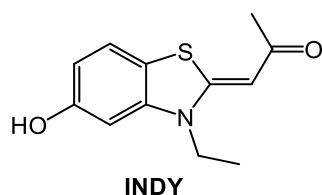
Για τους συνθετικούς αναστολείς της κινάσης DYRK1A, η πρώτη στοχευμένη προσέγγιση είχε ως αποτέλεσμα την ταυτοποίηση και βελτιστοποίηση αναλόγων πυραζολιδινοδιόνης (Σχήμα 5) με IC_{50} που υπολογίζονται από $0.6 - 2.5 \mu M$ ⁴⁴. Επιπλέον για τους συγκεκριμένους αναστολείς χρειάζεται να διαπιστωθεί η πιθανή ανασταλτική τους ιδιότητα σε κινάσες με δομική ομολογία με την DYRK1A προκειμένου να διαπιστωθεί η εκλεκτικότητα τους έναντι αυτής.



pyrazolidinedione analogues

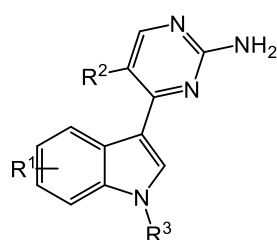
Σχήμα 5: Αναστολείς με δομή πυραζολιδινεδιόνης.

Το βενζοθειαζολικό παράγωγο INDY (Σχήμα 6), έχει επίσης αποδειχθεί ότι αναστέλλει τη δραστηριότητα της κινάσης DYRK1A με IC_{50} ίση με $0.24 \mu M$. Συνάμα, η κρυσταλλική δομή του INDY με την κινάση (PDB: 3ANQ) δείχνει ότι συνδέεται στην ATP περιοχή του ενζύμου. Πλεονέκτημα του συγκεκριμένου αναστολέα αποτελεί το γεγονός ότι δεν αναστέλλει την MAO-A⁴⁵, σε αντίθεση με το *harmine*, και είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί σε πειράματα *in vivo*.



Σχήμα 6:Βενζοθειαζολικό παράγωγο INDY.

Τα meridianins (Σχήμα 7) είναι θαλάσσια αλκαλοειδή και πολλά ανάλογα τους δείχνουν ισχυρή και μερικώς εκλεκτική δράση για την DYRK1A με IC₅₀ που κυμαίνεται μεταξύ 0.034 – 0.64 μM. Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει το γεγονός ότι εμφανίζουν εκλεκτικότητα έναντι τεσσάρων δομικά σχετιζόμενων κινασών, μέλη της οικογένειας CMGC (CDK5, CK1, GSK3β και Erk2)⁴⁶.



meridianins analogues

Σχήμα 7: Αναστολείς της κινάσης DYRK1A-παράγωγα meridianin.

Μια ακόμα περίπτωση που θαλάσσια αλκαλοειδή χρησιμοποιήθηκαν ως μόρια οδηγία για τη σύνθεση αναλόγων με δράση έναντι κινασών, αποτελεί και η ανάπτυξη παραγώγων χρωμενο-ινδολίου. Ως μόριο οδηγός χρησιμοποιήθηκε το Lamellarin D (Σχήμα 8), ένας μη εκλεκτικός αναστολέας κινασών με δράση της τάξεως των nM. Συγκεκριμένα τα ανάλογα που έφεραν υδρόξυ υποκατάσταση επί του βενζοπυρανικού δακτυλίου έδειξαν σε *in vitro* πειράματα, αξιοσημείωτη αναστολή της DYRK1A με IC₅₀ της τάξεως των nM με σχετική εκλεκτικότητα προς το ένζυμο⁴⁷.

Σχήμα 8: Το μόριο οδηγός Lamellarin D και τα ανάλογα αυτού ως αναστολείς της DYRK1A.

Όλα τα παραπάνω αποτελούν μερικά μόνο παραδείγματα αναστολέων της DYRK1A (για περισσότερα περί αναστολέων της DYRK1A βλ. review ⁴⁸) που έχουν αναπτυχθεί μέχρι σήμερα και όλα τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η πιθανή θεραπευτική τους χρήση για την τροποποίηση των συμπτωμάτων σε άτομα με σύνδρομο Down, είναι περιορισμένη είτε λόγω της έλλειψης εκλεκτικότητας είτε λόγω ανεπιθύμητων παρενεργειών.

2. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ

Με βάση τα στοιχεία που έχουν συλλεχθεί για τα αλκαλοειδή δομής πυρανοκινολίνης και με ιδιαίτερη έμφαση στα πειραματικά δεδομένα και τη βιολογική δράση του Flindersine έναντι της DYRK1A, αποφασίσθηκε η χρήση του ως μόριο οδηγός και η σύνθεση αναλόγων με σκοπό την βελτιστοποίηση της ανασταλτικής δράσης. Για αυτό το σκοπό χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Maestro 10.6 από την εταιρεία Schrödinger, προκειμένου να διεξαχθούν πειράματα μοριακής πρόσδεσης χρησιμοποιώντας την κρυσταλλική δομή της κινάσης και δομικά ανάλογα του Flindersine ώστε να αποφασισθεί ποία θα είναι η δομή των νέων αναλόγων που θα συντεθούν αρχικώς, και θα αξιολογηθούν φαρμακολογικά στη συνέχεια.

2.1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ

2.1.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΗΣ ΔΟΜΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ (PROTEIN PREPARATION WIZARD)

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

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

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

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

Το πρωτόκολλο του IFD των συνδετών ακολουθεί τα παρακάτω βήματα:

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

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

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

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

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

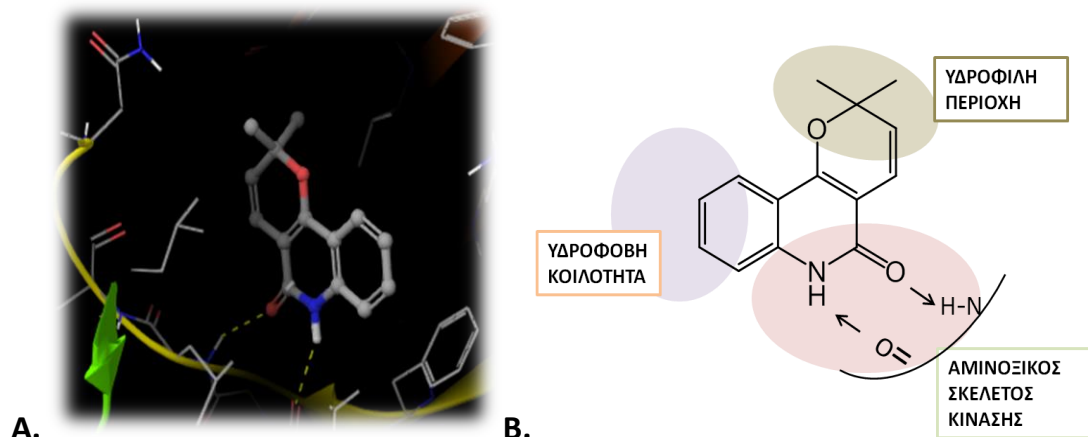
Στ. Τέλος εκτιμάται η ενέργεια πρόσδεσης (IFDScore) για κάθε εξαγόμενο πρόσδεμα.

2.2. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ (DOCKING).

Για το σχεδιασμό των νέων ενώσεων χρησιμοποιήθηκε η κρυσταλλική δομή της κινάσης DYRK1A σε σύμπλοκο με το *harmine* (PDB code 3ANR), η ίδια δομή που χρησιμοποιήθηκε και στις αρχικές μελέτες μοριακής προσομοίωσης από τις οποίες προέκυψε ο πιθανός τρόπος σύνδεσης του μορίου οδηγού. Επειτα απο οπτική παρατήρηση του τρόπου σύνδεσης της ένωσης οδηγού και αξιολογώντας την θεωρητική εμπειρική ενέργεια σύνδεσης έγινε ο σχεδιασμός των νέων ενώσεων και ενδεικτικά, παρουσιάζονται στη συνέχεια ορισμένα αποτελέσματα.

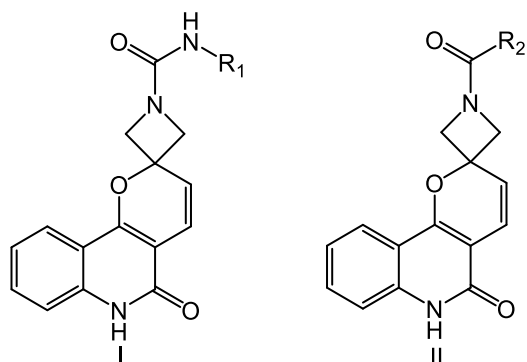
Σύμφωνα λοιπόν με τις αρχικές μελέτες μοριακής προσομοίωσης, το εκτεταμένο αρωματικό σύστημα και το ζεύγος δότη και δέκτη δεσμού υδρογόνου σε γειτονία, είναι απαραίτητα για την αλληλεπίδραση του Flindersine με το ενεργό κέντρο της DYRK1A. Πιο συγκεκριμένα, το λακταμικό σύστημα του Flindersine αλληλεπιδρά με δύο δεσμούς υδρογόνου (Leu421,

Glu239), ενώ το αρωματικό κομμάτι εισέρχεται σε μία υδρόφοβη κοιλότητα. Ο πυρανικός δακτύλιος, από την άλλη, διευθετείται προς την υδρόφιλη περιοχή του ενεργού κέντρου και με εισαγωγή υποκαταστατών επί αυτού είναι πιθανή η επίτευξη επιπλέον αλληλεπιδράσεων με το ενεργό κέντρο της κινάσης. (Εικόνα 4A, 4B)



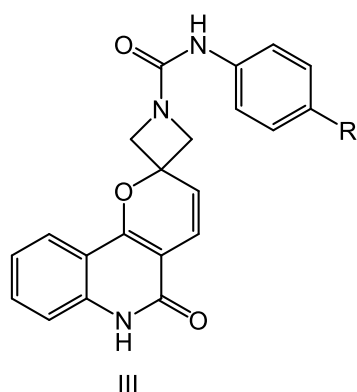
Εικόνα 4A, 4B: A) Πιθανός τρόπος σύνδεσης Flindersine στο ενεργό κέντρο της κινάσης DYRK1A. B) Σχηματική αναπαράσταση του Flindersine στο ενεργό κέντρο της κινάσης.

Τα νέα παράγωγα αποφασίσθηκε να φέρουν το κεντρικό σκελετό του Flindersine, με διαφορά ό,τι τα δύο gem μεθύλια του πυρανικού δακτυλίου αντικαθίστανται από σπειρανικό αζετίδινο δακτύλιο. Στο δακτυλίο αυτό, σε αντιδιαμετρική θέση ως προς τον πυρανικό δακτύλιο εισάγεται πλευρική αζωτούχος αλυσίδα. Η ύπαρξη του σπειρανικού συστήματος, το οποίο είναι κάθετο στο σύστημα των αρωματικών δακτυλίων δίνει τη δυνατότητα διατήρησης σταθερής απόστασης και διευθέτησης της πλευρικής αλυσίδας. Επί αυτού εισάγεται αρωματική και αλειφατική αλυσίδα που φέρει τη χαρακτηριστική ομάδα της ουρίας καθώς πλευρική αλυσίδα τύπου αμιδίου (Σχήμα 9) έτσι ώστε να ερευνηθεί κατά πόσο επηρεάζεται η εκλεκτικότητα και η δράση.

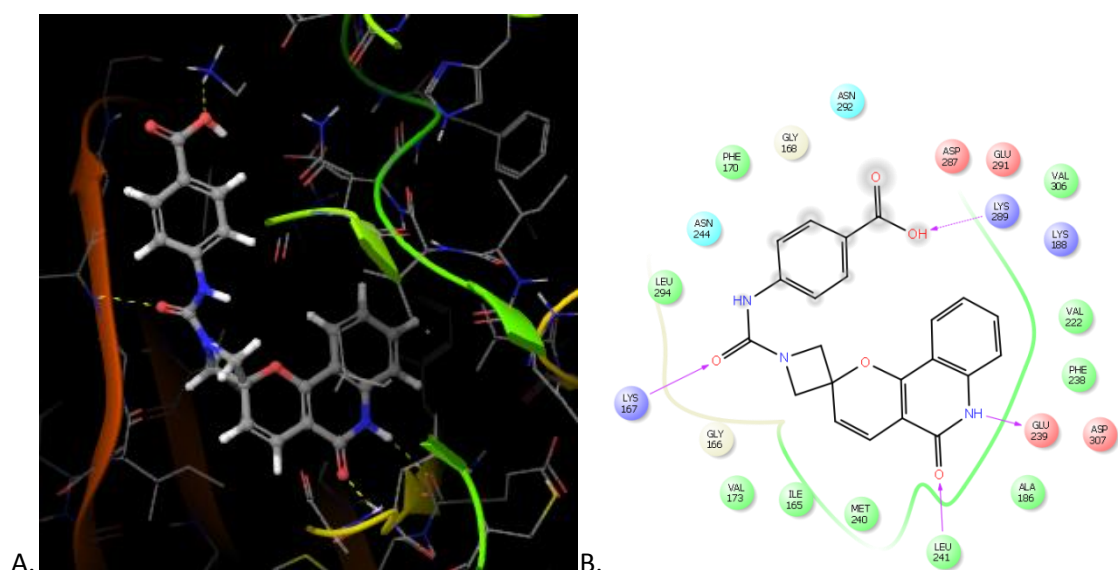


Σχήμα 9: Σπειρανικά ανάλογα Flindersine με δομή πυρανοκινολινόνης.

Η επιλογή των υποκαταστάτων έγινε αξιοποιώντας δεδομένα από πειράματα υπολογισμών πρόσδεσης και ιδιαιτέρως τα πιο ελπιδοφόρα φαίνεται να είναι τα παράγωγα με αρωματική υποκατάσταση που έχουν σε πάρα θέση ομάδα ικανή να αναπτύξει δεσμούς υδρογόνου ή δεσμό άλατος (Σχήμα 10). Ενδεικτικά παρουσιάζεται ο πιθανός τρόπος σύνδεσης ενός τέτοιου μορίου (Εικόνα 5A, 5B).



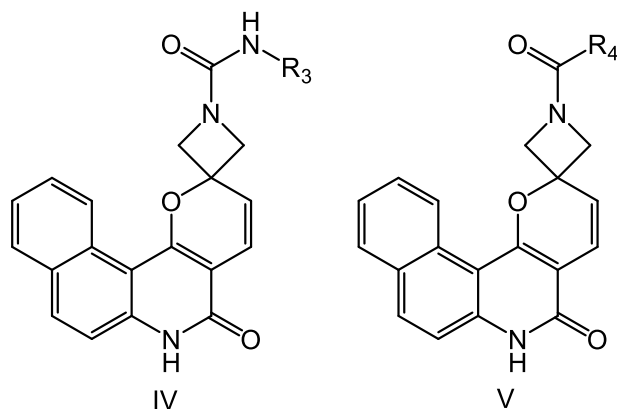
Σχήμα 10: Σπειρανικά ανάλογα Flindersine με αρωματική υποκατάσταση.



Εικόνα 5A, 5B: A) Πιθανός τρόπος σύνδεσης σπειρανικών αναλόγων πυρανοκινολινόνης στο ενεργό κέντρο της κινάσης DYRK1A. B) Δύο διαστάσεων απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων.

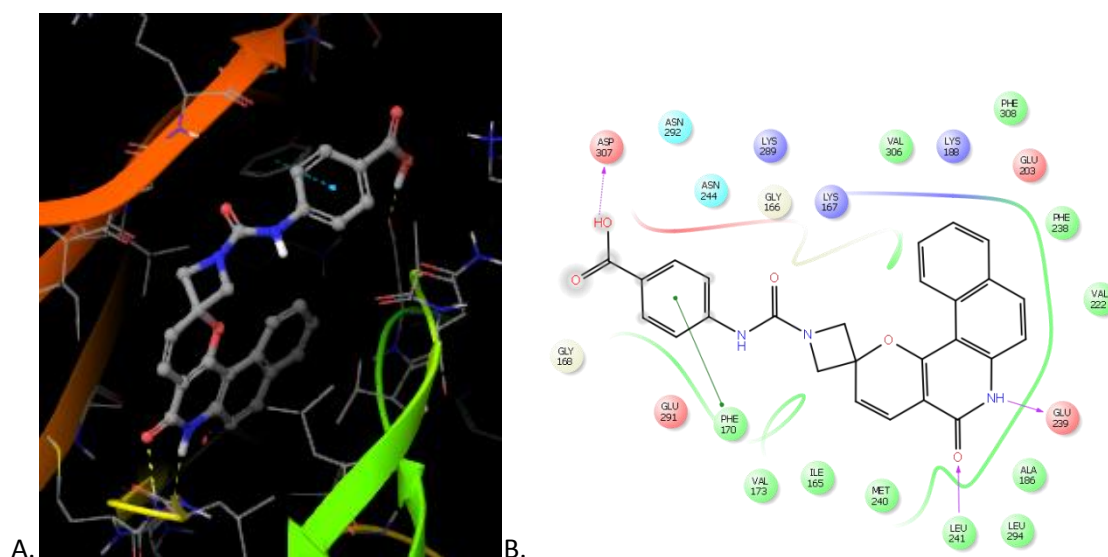
Παρατηρούμε ότι και αυτά τα παράγωγα συνδέονται με όμοιο τρόπο με το Flindersine, αλληλεπιδρώντας με τη Leu241 και Glu239 σχηματίζοντας δυο δεσμούς υδρογόνου με το λακταμικό σύστημα του μορίου, ενώ συνάμα αναπτύσσονται δεσμοί υδρογόνου και με την πλευρική αλυσίδα. Αξίζει να σημειωθεί ότι, το καρβονύλιο της πλευρικής αλυσίδας φαίνεται να έχει κρίσιμο ρόλο μιας και όλα τα παράγωγα της σειράς του δείχνουν να αναπτύσσουν διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μέσω αυτού.

Στη συνέχεια των πειραμάτων υπολογισμού πρόσδεσης, αποφασίσθηκε να εισαχθεί επιπλέον αρωματικός πυρήνας επί της κινολινόνης ευνοώντας με αυτό τον τρόπο τις λιπόφιλες αλληλεπιδράσεις. Ο σκελετός της κινολινόνης διευθετείται στην υδρόφοβη περιοχή του ενεργού κέντρου και θεωρήθηκε ότι αυτή η δομική τροποποίηση επί του ετερόκυκλου, θα ήταν δυνατό να βελτιώσει τη δράση και την εκλεκτικότητα ως προς την κινάση και συνάμα να δώσει επιπλέον πληροφορίες για τον τρόπο σύνδεσης των νέων μορίων. Έτσι λοιπόν αποφασίσθηκε η σύνθεση των παραγώγων του σχήματος 11.



Σχήμα 11: : Σπειρανικά ανάλογα Flindersine με δομή βενζοπυρανοκινολινόνης.

Οι υποκαταστές της πλευρικής αλυσίδας των νέων σπειρανικών παράγωγων βενζοπυρανοκινολινόνης, αξιοποιώντας τα προηγούμενα δεδομένα, επιλέχθηκε να είναι αρωματικοί και να φέρουν σε πάρα θέση ομάδες ικανές να αλληλεπιδράσουν σχηματίζοντας δεσμό υδρογόνου ή άλατος. Επιπλέον σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί ότι, το μοτίβο σύνδεσης των αναλόγων αυτής της σειράς φαίνεται να είναι ίδιο με εκείνο του Flindersine. Ενδεικτικά παρουσιάζεται ο πιθανός τρόπος σύνδεσης ενός τέτοιου αναλόγου με το ενεργό κέντρο της κινάσης DYRK1A (Εικόνα 6A, 6B)



Εικόνα 6A, 6B: A) Πιθανός τρόπος σύνδεσης σπειρανικών αναλόγων βενζοπυρανοκινολινόνης στο ενεργό κέντρο της κινάσης DYRK1A. B) Δύο διαστάσεων απεικόνιση των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων.

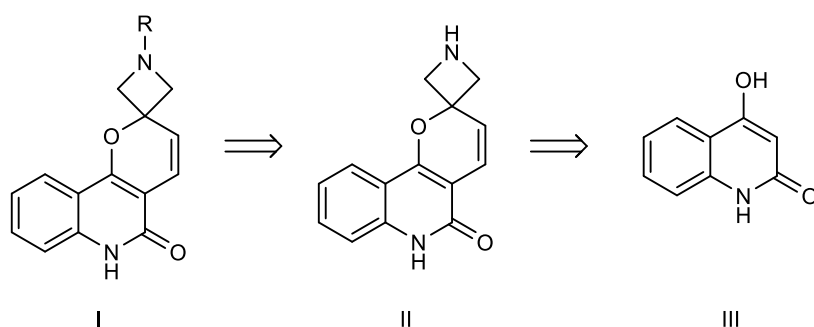
Συνοπτικά, τα νέα παράγωγα που αποτελούν και μόρια-στόχοι της παρούσας διπλωματικής εργασίας, μπορούν να διακριθούν σε δύο γενικές ομάδες: τα σπειρανικά παράγωγα πυρανοκινολίνης και στα σπειρανικά παράγωγα βενζοπυρανοκινολίνης τα οποία θα αξιολογηθούν φαρμακολογικά για την ανασταλτική δράση τους έναντι της κινάσης DYRK1A.

3. ΧΗΜΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Στη συνέχεια ακολουθούν οι συνθετικές πορείες από τις οποίες προκύπτουν τα τελικά μόρια-στόχοι της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

3.1. ΣΥΝΘΕΣΗ ΣΠΕΙΡΑΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΣΚΕΛΕΤΟΥ ΠΥΡΑΝΟΚΙΝΟΛΙΝΗΣ

Σύμφωνα με το ρετροσυνθετικό σχήμα (Σχήμα 12), τα τελικά μόρια με γενικό τύπο I μπορούν να συντεθούν με επίδραση κατάλληλου αντιδραστηρίου επί της αμίνης II, η οποία μπορεί να ληφθεί ύστερα από σχηματισμό του πυρανικού δακτυλίου επί της κινολίνης III.

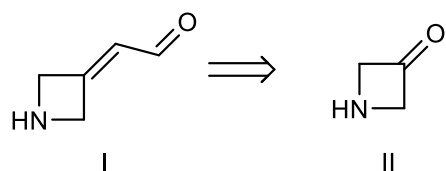


Σχήμα 12: Ρετροσύνθεση τελικών μορίων-στόχων δομής πυρανοκινολίνης.

Για τη σύνθεση, λοιπόν, του πυρανικού δακτυλίου και κατ' επέκταση του απαραίτητου δομικού ενδιαμέσου II, από το οποίο μπορεί να προέλθει ένα πλήθος μορίων, στη βιβλιογραφία έχουν περιγραφεί διάφοροι τρόποι, από τους οποίους σημαντικότεροι είναι οι εξής:

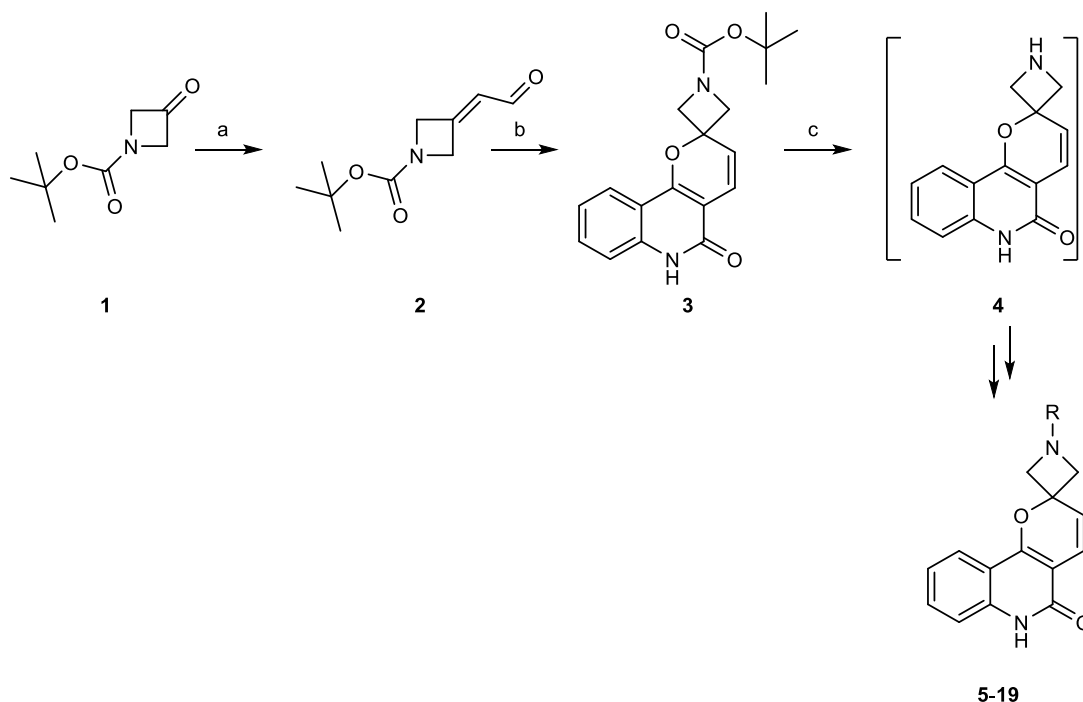
- Μετάθεση Claisen των προπαργυλικών φαινυλαιθέρων⁴⁹
- Κύκλωση 2-ισοπρενυλοφαινυλαιθέρων με χρήση Pd ως καταλύτη⁵⁰
- Συμπύκνωση ο-βρωμιωμένων φαινολών με 3,3-διμεθυλακρολεΐνη, με χρήση οργανολιθιακών και κύκλωση σε όξινο περιβάλλον⁵¹
- Συμπύκνωση φαινολών με 3-αλκυλοβουτεν-2-άλη παρουσία φαινυλοβορικού οξέος εντός μίγματος οξικού οξέος-τολουολίου⁵²
- Συμπύκνωση φαινολών με 3-αλκυλοβουτεν-2-άλη με χρήση οξέος κατά Lewis⁵³ σε βασικό περιβάλλον⁵⁴⁻⁵⁶ ή εντός χλωροφορμίου με χρήση μικροκυμάτων⁵⁷

Από τους τρόπους που παρατίθενται παραπάνω, επιλέχθηκε ο σχηματισμός του πυρανικού δακτυλίου να γίνει με χρήση της κατάλληλης α,β-ακόρεστης αλδεΐδης, λόγω της απλότητας και της ευκολίας της μεθόδου. Επιπρόσθετα, σημαντικό πλεονέκτημα αποτελεί, το γεγονός ότι η κατάλληλη αλδεΐδη μπορεί να συντεθεί εύκολα μέσω αντίδρασης Wittig από την αντίστοιχη κετόνη, όπως φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 13).



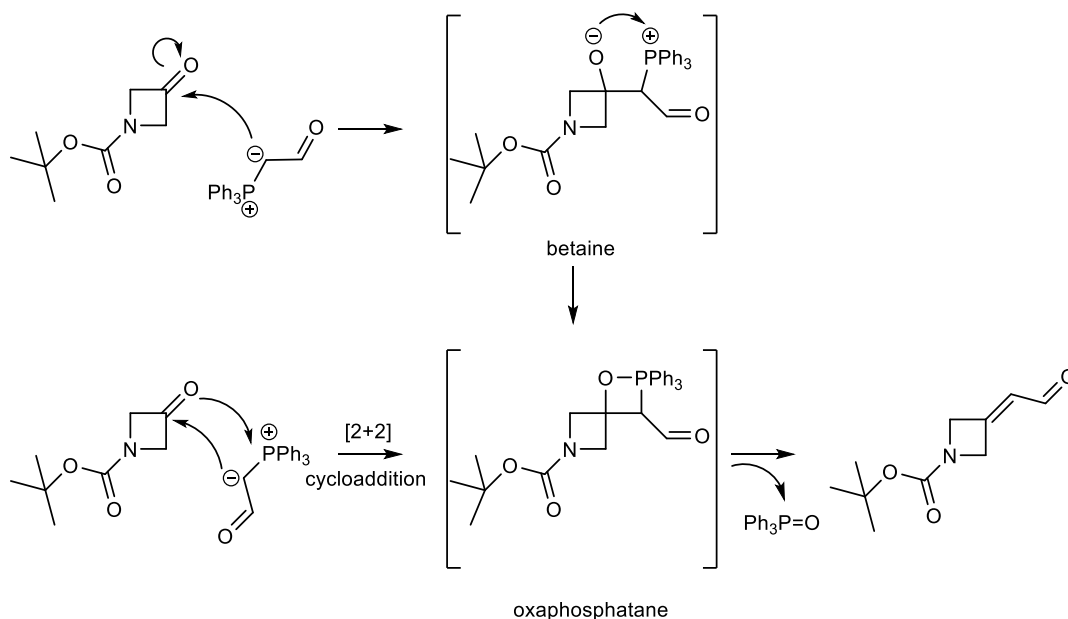
Σχήμα 13: Ρετροσύνθεση α,β-ακόρεστης αλδεΐδης.

Αρχικά λοιπόν, με επίδραση της 2-(τριφαινυλοφωσφορανυλιδενο)ακεταλδεΐδης επί της εμπορικά διαθέσιμης αζετιδινόνης **1** λαμβάνεται η επιθυμητή αλδεΐδη **2** (Σχήμα 14).



Σχήμα 14: Αντιδραστήρια και συνθήκες: a) $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CHCH}=\text{O}$, CH_2Cl_2 , 40°C ; b) 2,4-dihydroxyquinoline, NH_4Cl , pyridine, reflux; c) trifluoroacetic acid, neat, rt.

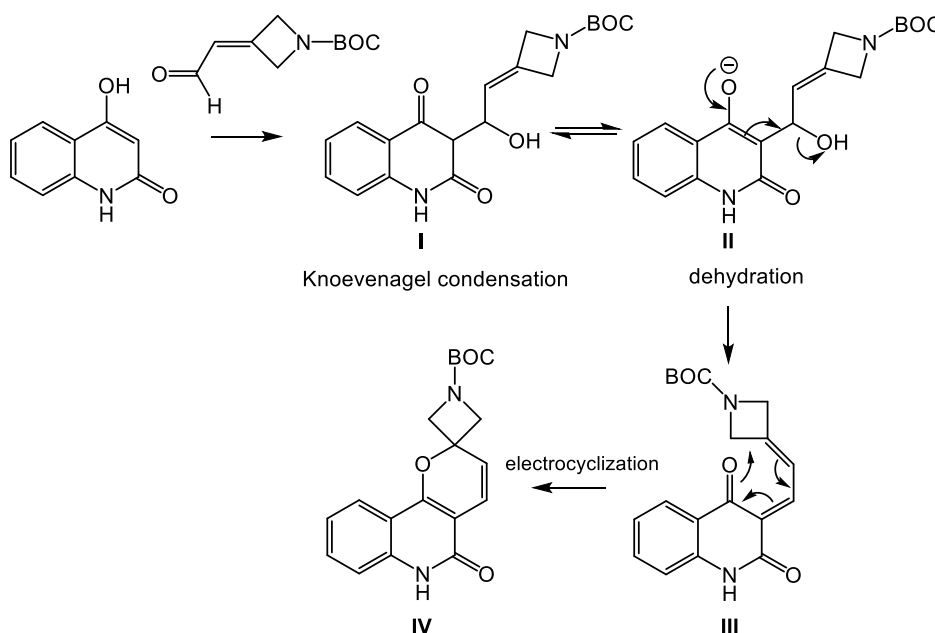
Σε μια κλασική αντίδραση Wittig, το υλίδιο του φωσφόρου αντιδρά με το καρβονύλιο αλδεΐδης ή κετόνης δίνοντας το αντίστοιχο αλκένιο και τριφαινυλοφωσφονοξείδιο. Η παλαιότερη αντίληψη γύρω από τον μηχανισμό της αντίδρασης υποστηρίζει ότι το υλίδιο του φωσφόρου προστίθεται στην κετόνη και σχηματίζεται ένα διπολικό ενδιάμεσο που ονομάζεται βεταΐνη. Το ενδιάμεσο αυτό κυκλώνει προς οξαφωσφατάνιο, το οποίο τελικά αποσυντίθεται ακαριαία προς το επιθυμητό παράγωγο και τριφαινυλοφωσφίνοξείδιο⁵⁸. Πλέον, τείνει να εγκαταλειφτεί ο μηχανισμός που εμπλέκει το σχηματισμό της βεταΐνης, αλλά αντιθέτως ως μοναδικό ενδιάμεσο θεωρείται το οξαφωσφατάνιο, που σχηματίζεται μετά από [2+2] κυκλοπροσθήκη^{59,60} όπως διαφαίνεται στο σχήμα 15. Ως αποτέλεσμα αυτού είναι η αντικατάσταση του καρβονυλικού οξυγόνου από την οργανική ομάδα που ήταν αρχικά ενωμένη με το φώσφορο.



Σχήμα 15: Μηχανισμός αντίδρασης Wittig.

Από τη λήψη φάσματος ¹H NMR έγινε εμφανής η ύπαρξη της αλδεΐδης **2**. Χαρακτηριστικές κορυφές είναι η διπλή στα 9.60 ppm και η πολλαπλή στα 5.95 ppm που αντιστοιχούν στις απορρόφησης του πρωτονίου της αλδεΐδης και του πρωτονίου του διπλού δεσμού αντίστοιχα όπως περιγράφεται και στη βιβλιογραφία⁶¹.

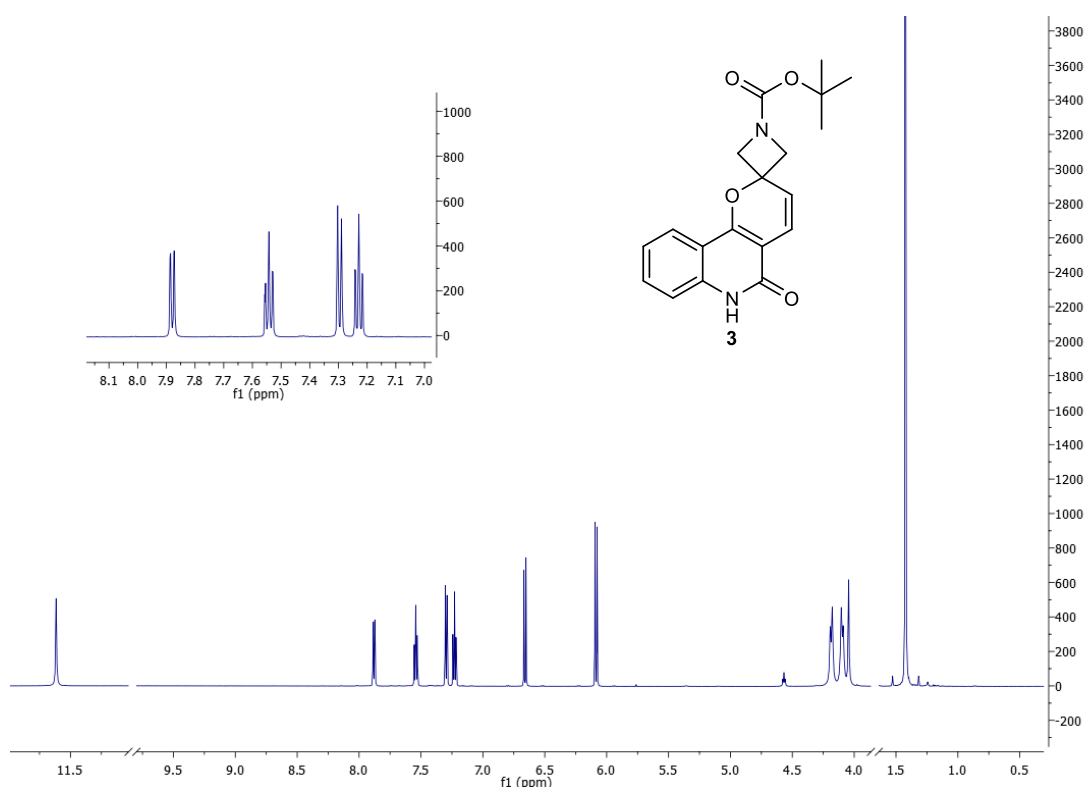
Στη συνέχεια της συνθετικής πορείας το κυκλωμένο παράγωγο **3** λαμβάνεται με επίδραση της αλδεΐδης **2** επί της 2,4-διυδροξυκινολίνης. Αρχικά πραγματοποιείται πυρηνόφιλη προσθήκη στο καρβονύλιο της αλδεΐδης **2** και ακολούθως περικυκλική αντίδραση προς σχηματισμό του πυρανικού δακτυλίου. Πρόκειται για μια domino Knoevenagel/6π ηλεκτροκυκλική αντίδραση όπως περιγράφεται και στη βιβλιογραφία⁶² και ο μηχανισμός της παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 16)



Σχήμα 16 Μηχανισμός κύκλωσης.

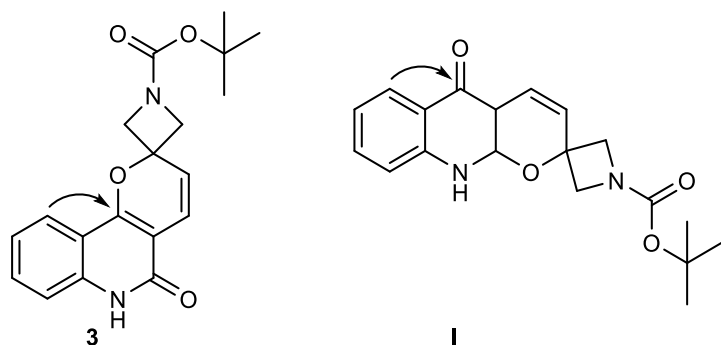
Η χρήση χλωριούχου αμμωνίου (NH_4Cl) αλλά και πυριδίνης κατά την αντίδραση, συμβάλουν στη μετατόπιση της ισορροπίας προς το σχηματισμό του επιθυμητού ταυτομερούς, βοηθώντας έτσι την πυρηνόφιλη προσθήκη και το σχηματισμό του παραγώγου **1** (Σχήμα 16). Στη συνέχεια, ακολουθεί αφυδάτωση προς ο-κινονικό σύστημα^{63,64}, το οποίο μετά από 6π ηλεκτροκυκλική αντίδραση σχηματίζει το επιθυμητό προϊόν **3**. Τόσο η ύπαρξη οξέος κατά Lewis, όσο και η παρουσία βάσης είναι απαραίτητα για την διεξαγωγή της αντίδρασης, το οποίο έχει περιγραφεί εκτενώς, και για τη σύνθεση αλκαλοειδών με σκελετό πυρανοκινολίνης⁶⁵⁻⁶⁸. Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί ότι η αντίδραση πραγματοποιήθηκε και με παρουσία θειϊκού μαγνησίου (MgSO_4) ως οξύ κατά Lewis στις ίδιες πειραματικές συνθήκες, δίνοντας το επιθυμητό προϊόν σε χαμηλή απόδοση. Με χρήση του χλωριούχου αμμωνίου εν αντιθέσει, λήφθηκε το επιθυμητό παράγωγο σε τριπλάσια απόδοση συγκριτικά με την προηγούμενη μέθοδο.

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του ενδιαμέσου **3**, είναι εμφανής η ύπαρξη των πρωτονίων του ολεφινικού δεσμού στα 6.1 και 6.7 ppm περίπου, καθώς και μίας απλής κορυφής στα 11.6 ppm που αντιστοιχεί στο ευκίνητο πρωτόνιο του αζώτου της κινολινόνης (Εικόνα 7)



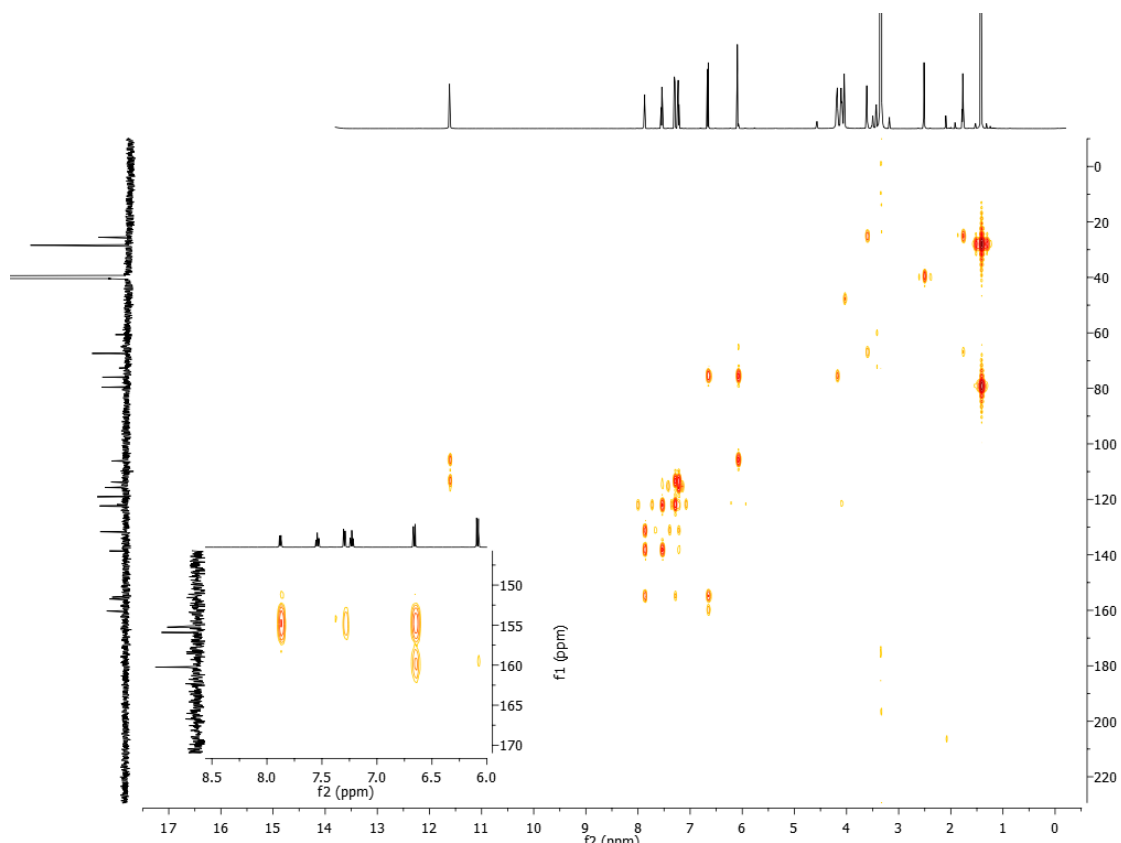
Εικόνα 7: Φάσμα του παραγώγου **3** σε $\text{DMSO-}d_6$.

Όπως φαίνεται και από τον μηχανισμό, κατά την αντίδραση αυτή είναι πιθανή η σύνθεση των δύο ισομερών θέσεως του σχήματος 17. Για τον λόγο αυτό, η πλήρης απόδειξη της δομής του παραγώγου **3** έγινε με τη βοήθεια φασματοσκοπίας NMR μίας και δύο διαστάσεων ($^1\text{H NMR}$, $^{13}\text{C NMR}$, HMBC, HMQC και COSY).



Σχήμα 17: Δύο πιθανά ισομέρη από την αντίδραση σχηματισμού του πυρανικού δακτυλίου.

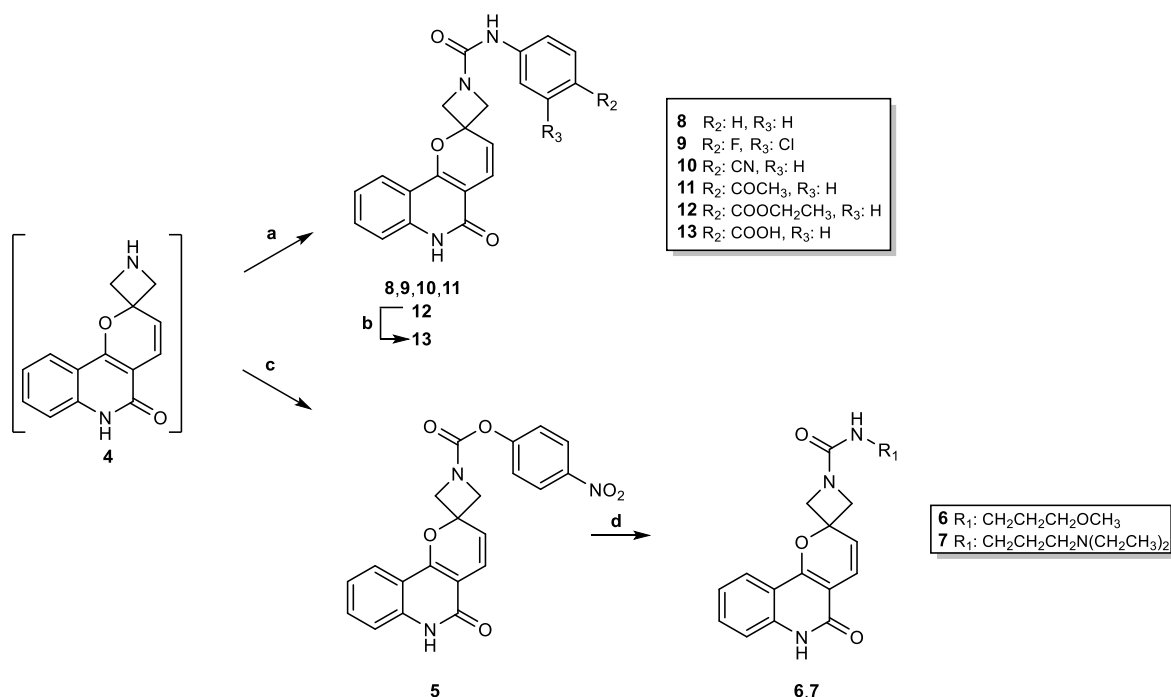
Στο φάσμα HMBC του αναλόγου, είναι εμφανής η σύζευξη ενός αρωματικού πρωτονίου που συντονίζεται στα 7.8 ppm με άνθρακα στα 154 ppm και όχι με το καρβονύλιο που συντονίζεται στα 161 ppm, το οποίο είναι εφικτό μόνο στο επιθυμητό παράγωγο και όχι στο ισομερές θέσεως I (Σχήμα 17, Εικόνα 8)



Εικόνα 8: Φάσμα HMBC του μορίου 3 σε DMSO- d_6 .

Το επόμενο στάδιο της συνθετικής πορείας αφορά την αποπροστασία του αζώτου της αζετιδίνης, ώστε στη συνέχεια να πραγματοποιηθεί η σύνθεση των επιθυμητών τελικών παραγώγων. Η σύνθεση του παραγώγου 4 επιτυγχάνεται με επίδραση τριφθοροξικού οξέος, απουσία διαλύτη. Ωστόσο, κατά την προσπάθεια απομόνωσης και ταυτοποίησής του, το παράγωγο αποδείχθηκε ιδιαίτερα ασταθές με αποτέλεσμα να χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο απευθείας.

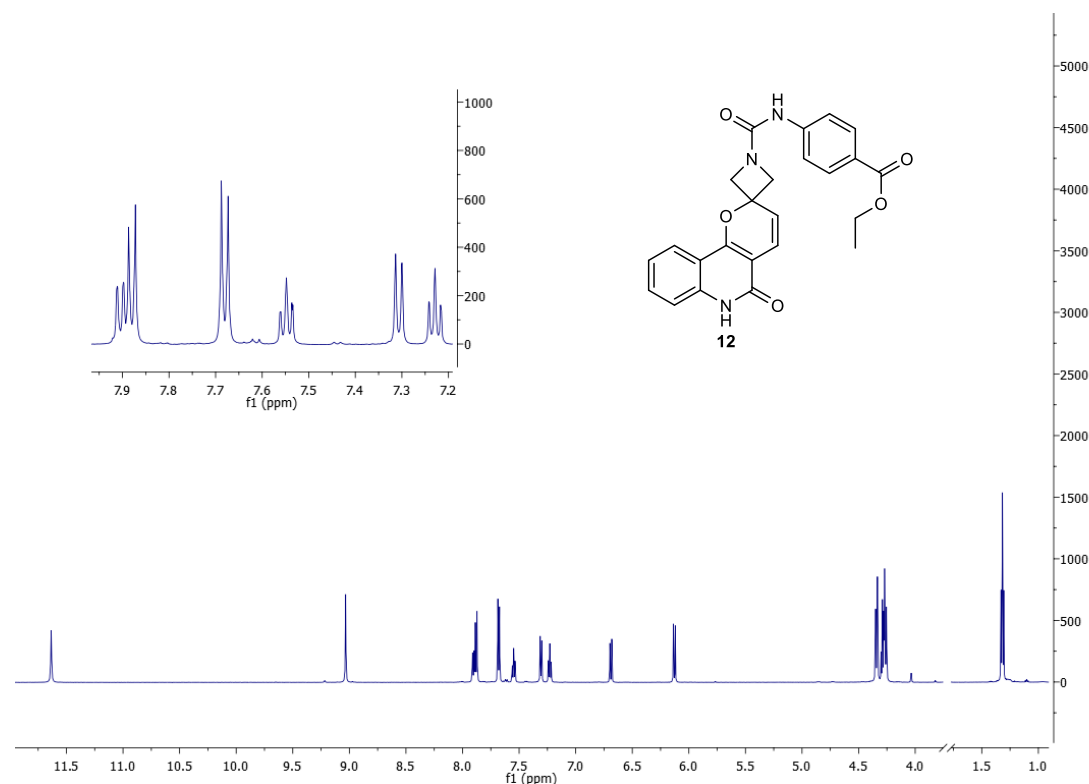
Τελικά, η σύνθεση αναλόγων με υποκαταστάτες που φέρουν την χαρακτηριστική ομάδα της ουρίας γίνεται με δύο διακριτούς τρόπους. Στην πρώτη περίπτωση που ο υποκαταστάτης είναι αρωματικός, η αντίδραση γίνεται σε ένα στάδιο, ενώ στη δεύτερη περίπτωση που ο υποκαταστάτης είναι αλειφατικού χαρακτήρα πραγματοποιείται μέσω ενδιάμεσου όπως φαίνεται στο σχήμα 18. Ο τρόπος αυτός επιλέχθηκε, διότι η π-νιτροφαινόλη αποτελεί μια καλή αποχωρούσα ομάδα, που χρησιμοποιείται συχνά σε αντιδράσεις αμιδοποίησης και σχηματισμού ασύμμετρων παραγώγων ουρίας⁶⁹.



Σχήμα 18: Αντιδραστήρια και συνθήκες: a) isocyanate, DIEA, THF, rt; b) NaOH 20 %, EtOH; c) 4-nitrophenyl chloroformate, DIEA, THF, rt; d) amine, neat, rt.

Έτσι λοιπόν, μετά το σχηματισμό του ενδιάμεσου **4** η περίσσεια του τριφθοροξικού οξέος απομακρύνεται, και στη συνέχεια ακολουθεί προσθήκη του κατάλληλου ισοκυανικού εστέρα σε βασικό περιβάλλον, το οποίο οδηγεί στο σχηματισμό των αναλόγων **8-12**. Το καρβοξυλικό οξύ **13** προκύπτει μετά από σαπωνοποίηση του αντίστοιχου εστέρα **12**.

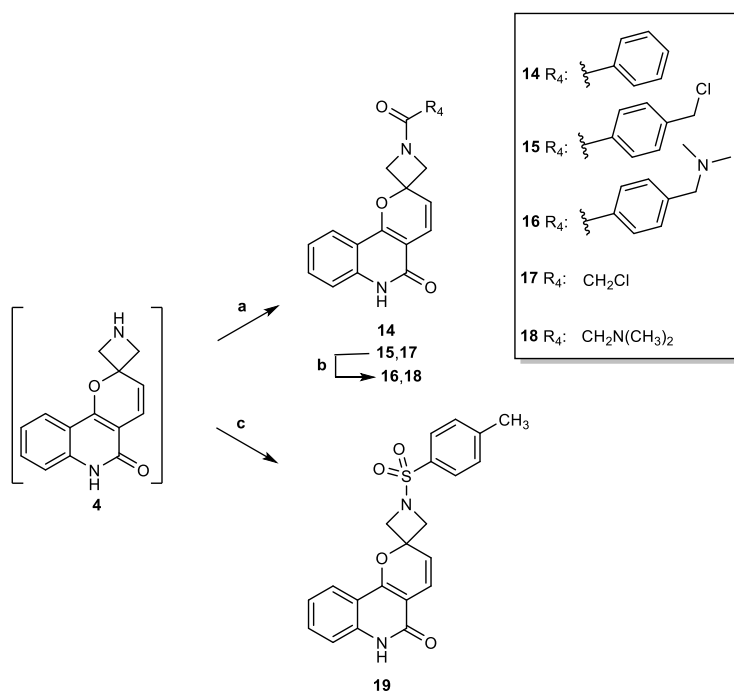
Ενδεικτικά, στο φάσμα ¹H-NMR του τελικού προϊόντος **12** παρατηρείται στα 9.0 ppm, μία απλή κορυφή που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του αζώτου της ουρίας καθώς και η σχηματομορφή της π-υποκατάστατης του πλευρικού υποκαταστάτη (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Φάσμα του παραγώγου **12** σε DMSO- d⁶.

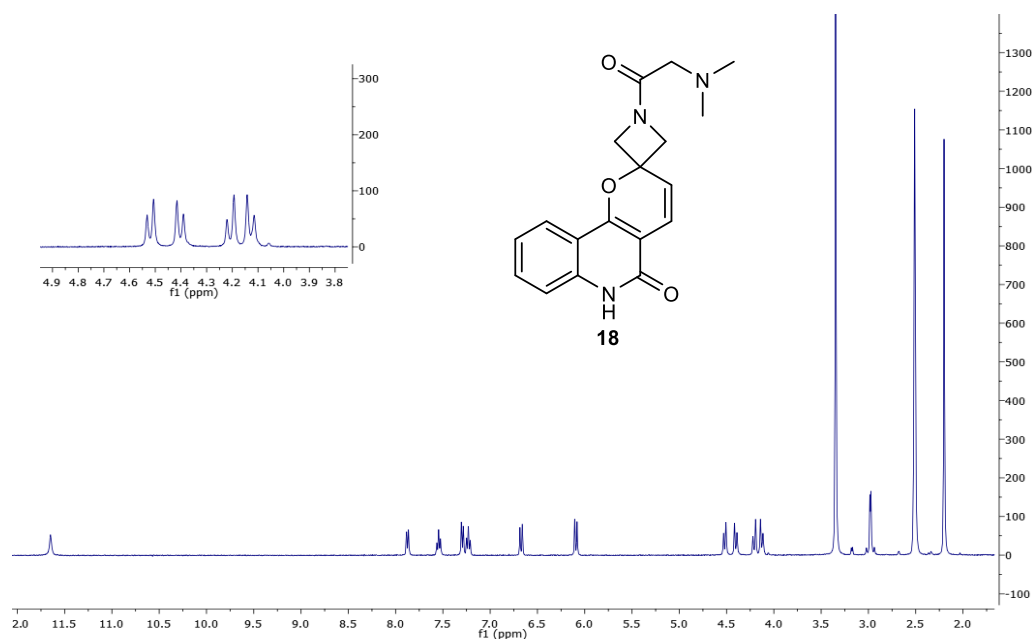
Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, τα αλειφατικά παράγωγα ουρίας, συντίθενται μέσω του ενδιαμέσου **5**, που σχηματίζεται κατ' αντίστοιχο τρόπο με τα τελικά αρωματικά παράγωγα, με μόνη διαφορά ότι αντί του ισοκυανικού εστέρα χρησιμοποιείται το κατάλληλο χλωρίδιο. Η μικρή αλλαγή στο τρόπο σύνθεσης πραγματοποιήθηκε λόγω μεγαλύτερης ευκολίας στις τεχνικές καθαρισμού και μεγαλύτερης ποικιλίας αντιδραστηρίων. Συνεπώς τα τελικά παράγωγα **6,7** σχηματίζονται μετά από επίδραση της εκάστοτε αμίνης, απουσία διαλύτη επί του αναλόγου **5**.

Όσο αφορά τη σύνθεση των παραγώγων με γενικό τυπό αμιδίου **14-18**, αυτή επιτυγχάνεται με επίδραση κατάλληλου χλωριδίου οξέος επί του αποπροστατευμένου ενδιαμέσου **4**, παρουσία τριαιθυλαμίνης (Σχήμα 19). Κατά όμοιο τρόπο συντίθεται και το σουλφοναμίδιο **19**, με επίδραση χλωριδίου του π-τουλουολοσουλφονικού οξέος. Επιπροσθέτως, η σύνθεση των τελικών παραγών **16, 18** πραγματοποιείται μετά από πυρηνόφιλη υποκατάσταση του χλωρίου με διμεθυλαμίνη.



Σχήμα 19: Αντιδραστήρια και συνθήκες: : a) acyl chloride, DIEA, THF, rt; b) dimethylamine, EtOH, reflux; c) TsCl, DIEA, THF, rt.

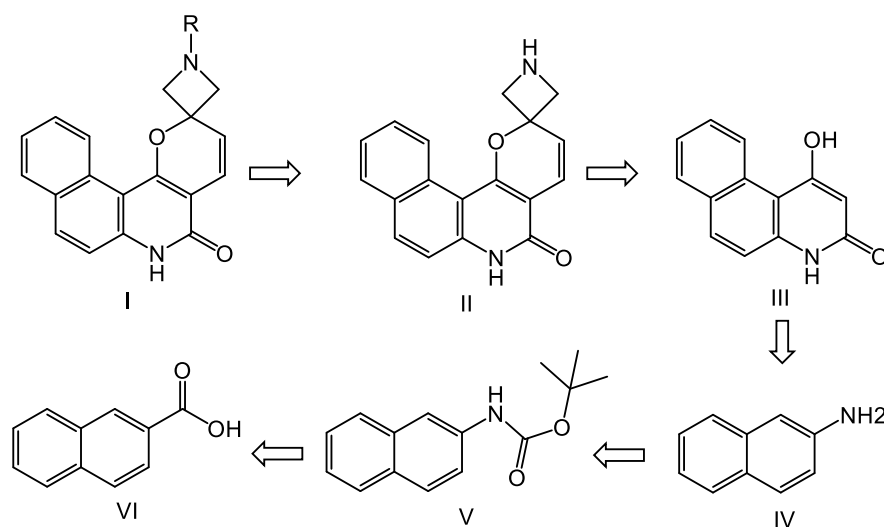
Ενδεικτικά, στο φάσμα ¹H-NMR του παραγώγου **18** σε DMSO-*d*⁶ (Εικόνα 10), διακρίνονται οι κορυφές του μεθυλίου και του μεθυλενίου στα 2.2 και 4.3 ppm αντίστοιχα. Αξίζει να παρατηρηθεί, ότι τα πρωτόνια του αζετιδινικού δακτυλίου στα μόρια αυτού του τύπου, αντιστοιχούν σε 4 διαφορετικές μετατοπίσεις, σε αντίθεση με τα παράγωγα ουρίας που τα πρωτόνια εμφανίζουν χημική ισοδυναμία ανά δύο και φαίνονται στο φάσμα ¹H-NMR ως δύο διπλές κορυφές, με αναλογία 1:1.



Εικόνα 10: Φάσμα του παραγώγου **18** σε DMSO-*d*⁶.

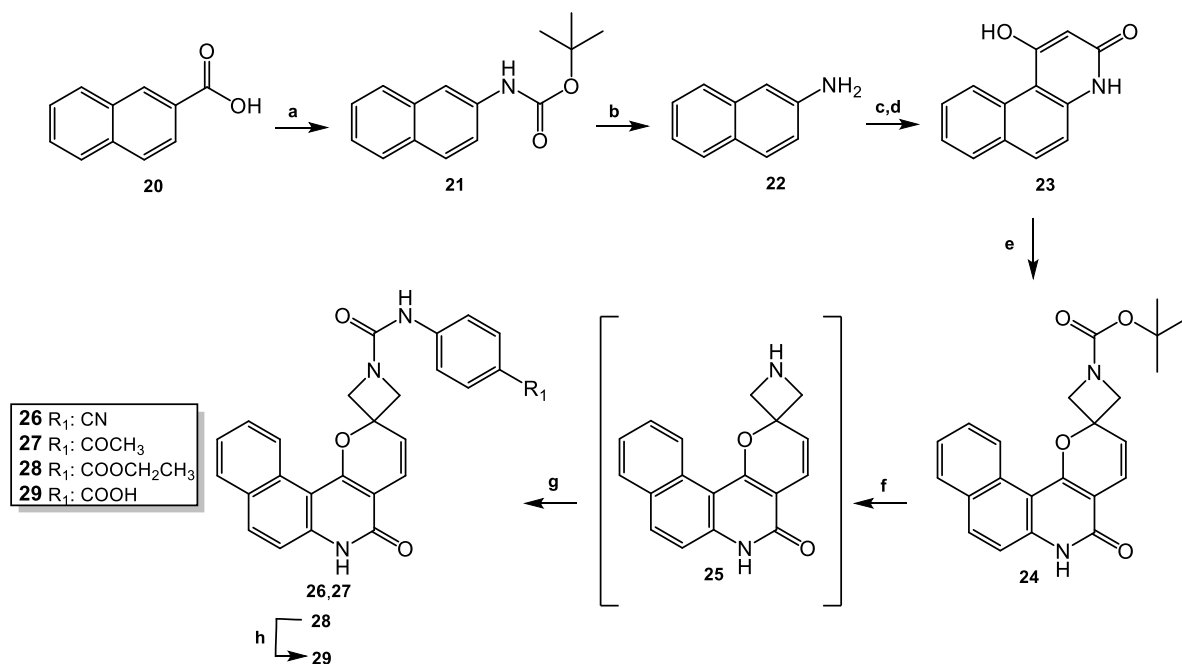
3.2. ΣΥΝΘΕΣΗ ΣΠΕΙΡΑΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΣΚΕΛΕΤΟΥ ΒΕΝΖΟΠΥΡΑΝΟΚΙΝΟΛΙΝΗΣ

Η σύνθεση των παραγώγων βενζοπυρανοκινολίνης, μπορεί να πραγματοποιηθεί με τον ίδιο τρόπο όπως για τα παράγωγα σκελετού πυρανοκινολίνης. Όπως φαίνεται και στο ρετροσυνθετικό σχήμα (Σχήμα 20) τα τελικά παράγωγα με γενικό τύπο I, θα μπορούν να προέλθουν από υποκατάσταση της αμίνης II, η οποία μπορεί να σχηματισθεί μετά από κύκλωση του παραγώγου III. Εν συνεχεία το ανάλογο III μπορεί να συντεθεί από αντίδραση κύκλωσης της κατάλληλης αμίνης IV, η οποία με τη σειρά της θα μπορούσε να προέλθει μέσω κατάλληλων αντιδράσεων από το οξύ VI



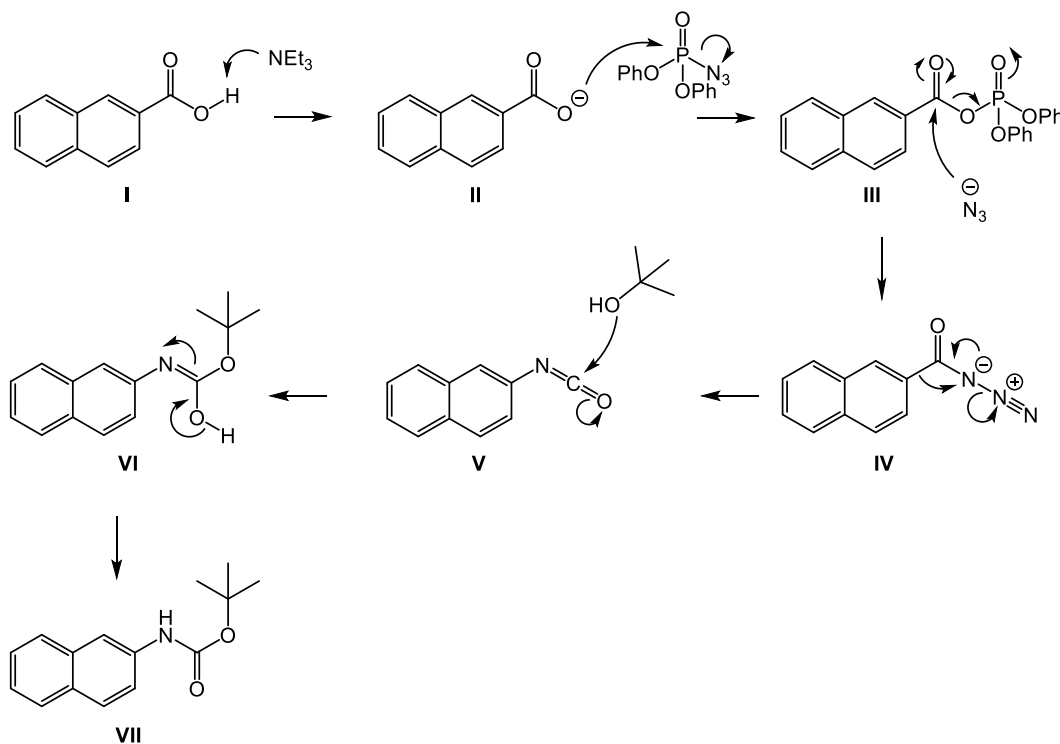
Σχήμα 20: Ρετροσύνθεση τελικών μορίων-στόχων δομής βενζοπυρανοκινολίνη.

Έτσι λοιπόν, με επίδραση διφαινυλοφωσφορυλοαζιδίου, τερτ-βουτανόλης εντός τουλουολίου επί του εμπορικά διαθέσιμου 2-ναφθοϊκού οξέος **20** λαμβάνεται το προστατευμένο παράγωγο **21**⁷⁰. Η συγκεκριμένη αντίδραση πραγματοποιείται σε πολύ καλή απόδοση και λαμβάνεται μεγάλη ποσότητα του ενδιάμεσου **21** (Σχήμα 21).



Σχήμα 21: Αντιδραστήρια και συνθήκες: a) DPPA, t-BuOH, Et₃N, toluene, 3 Å MS, reflux; b) trifluoroacetic acid, neat, rt; c) Meldrum's acid, 110 °C; d) Eaton's reagent, 65 °C; e) tert-butyl 3-(2-oxoethylidene)azetidene-1-carboxylate, NH₄Cl, pyridine, reflux; f) trifluoroacetic acid, neat; g) isocyanate, DIEA, THF, rt; h) NaOH 20 %, EtOH.

Η συγκεκριμένη αντίδραση αποτελεί παραλλαγή της κλασικής μετάθεσης Curtius, που σε αντίθεση με την κλασική περίπτωση, είναι απλή και πραγματοποιείται σε ένα στάδιο, αντί για δύο. Σύμφωνα με το μηχανισμό της αντίδρασης, που φαίνεται στο σχήμα 22, αρχικά το σχηματιζόμενο αζίδιο μετατρέπεται στον ισοκυανικό εστέρα, που εν συνεχεία μετά από πυρηνόφιλη προσθήκη στο καρβονύλιο του εστέρα, σχηματίζεται το τελικό προϊόν^{71,72}.



Σχήμα 22: Μηχανισμός μετάθεσης Curtius.

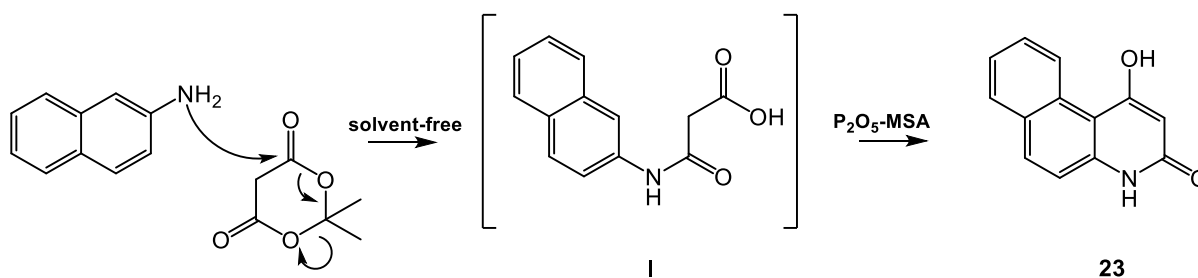
Στη συνέχεια της συνθετικής πορείας το παράγωγο **22** παραλαμβάνεται από το **21** μετά από αποπροστασία με τριφθοροξικό οξύ.

Η σύνθεση της βενζο[f]κινολίνης **23** μπορεί να γίνει κατά αντιστοιχία με τους τρόπους που έχουν περιγραφεί για τη σύνθεση της 4-υδροξυκινολιν-2(1H)-όνης. Οι πιο σημαντικοί παραθέτονται παρακάτω και σε όλους χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη η ανιλίνη.

- I. Κύκλωση με μηλονικό οξύ παρουσία χλωριούχου ψευδαργύρου και οξυχλωριούχου φωσφώρου⁷³
- II. Συμπύκνωση με μηλονικό οξύ⁷⁴ ή μηλονικό διαιθυλεστέρα⁷⁵ παρουσία διμεθυλοφορμαμίδιου και χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας
- III. Κύκλωση με χρήση 2,2-διμεθυλο-1,3-διοξανο-4,6-διόνης (Meldrum's acid) παρουσία πολυφωσφορικού οξέος ή αντιδραστηρίου Eaton's σε ένα ή σε δύο στάδια^{76,77}

Από τους παραπάνω τρόπους επιλέχθηκε ο τελευταίος, δηλαδή με χρήση του Meldrum's acid και αντιδραστηρίου Eaton's λόγω της απλότητας της αντίδρασης αλλά της επακόλουθης κατεργασίας.

Αρχικά, η σύνθεση του παραγώγου **23** πραγματοποιείται με θέρμανση του παραγώγου **22** με το Meldrum's acid και μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, χωρίς να προηγηθεί απομόνωση του σχηματιζόμενου προϊόντος, ακολουθεί η προσθήκη του αντιδραστηρίου Eaton's. Η επιλογή του Eaton's (πεντοξείδιο του φωσφώρου και μεθανοσουλφονικό οξύ-MSA- σε αναλογία 1 προς 7) έναντι του πολυφωσφορικού οξέος έγινε λόγω του χαμηλότερου ιξώδους του και της καλύτερης απόδοσης της αντίδρασης⁷⁸. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε και σε δύο στάδια και το ενδιάμεσο I (Σχήμα 23) απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε. Βέβαια λόγω της χαμηλής διαλυτότητας του ενδιάμεσου και της χαμηλότερης συνολικής απόδοσης των δύο αντιδράσεων, αποφασίσθηκε τα δύο στάδια να διαδεχθούν το ένα το άλλο χωρίς να προηγηθεί κατεργασία στο ενδιάμεσο προϊόν.

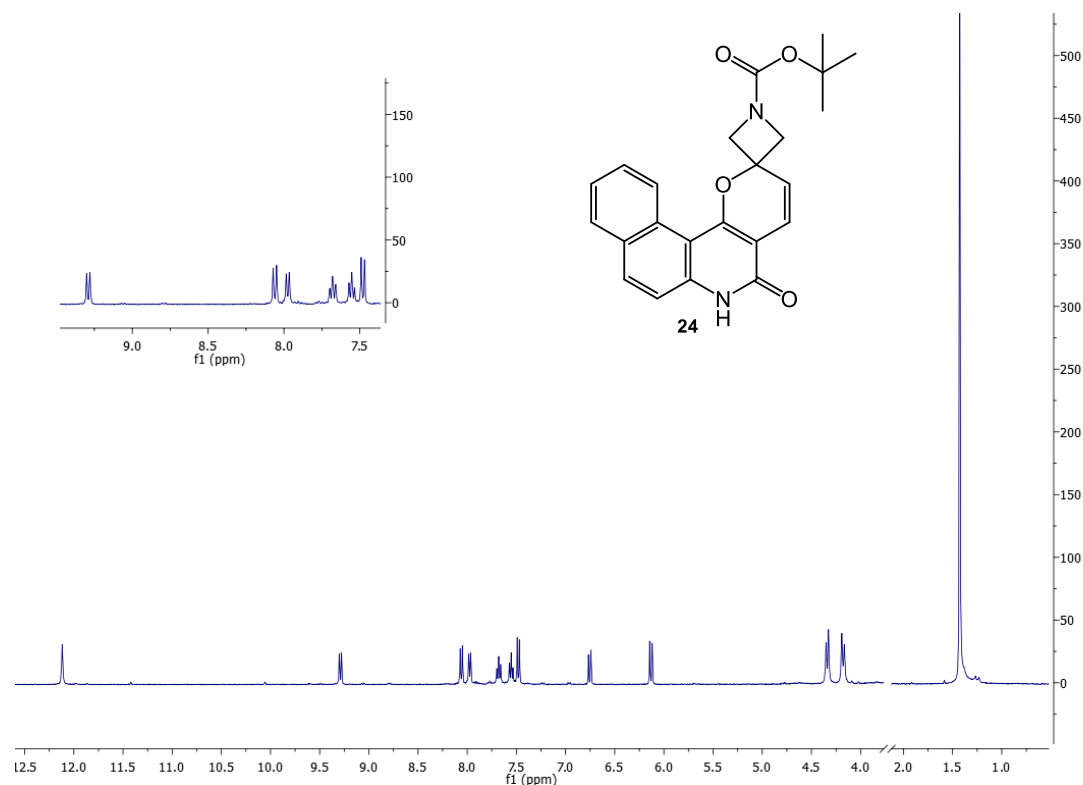


Σχήμα 23: Μηχανισμός κύκλωσης με Meldrum's acid.

Στο μηχανισμό της αντίδρασης όπως φαίνεται και στο σχήμα 23, αρχικά λαμβάνει χώρα μία S_N2 αντίδραση της αμινομάδας της ναφθυλαμίνης στο καρβονύλιο του αντιδραστηρίου Meldrum's. Το σχηματιζόμενο ενδιάμεσο I στη συνέχεια κυκλώνει προς το επιθυμητό παράγωγο **23** μέσω ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης, παρουσία αντιδραστηρίου Eaton's, μια κλασική αντίδραση τύπου Friedel-Crafts.

Στη συνέχεια της συνθετικής πορείας ο σχηματισμός του πυρανικού δακτυλίου πραγματοποιείται κατά αντίστοιχο τρόπο, με τα παράγωγα της πρώτης σειράς. Έτσι, μέσω

αντίδρασης της α,β -ακόρεστης αλδεύδης **2** και του αναλόγου **23** παρουσία χλωριούχου αμμωνίου και πυριδίνης, παραλαμβάνεται το ενδιάμεσο **24**.

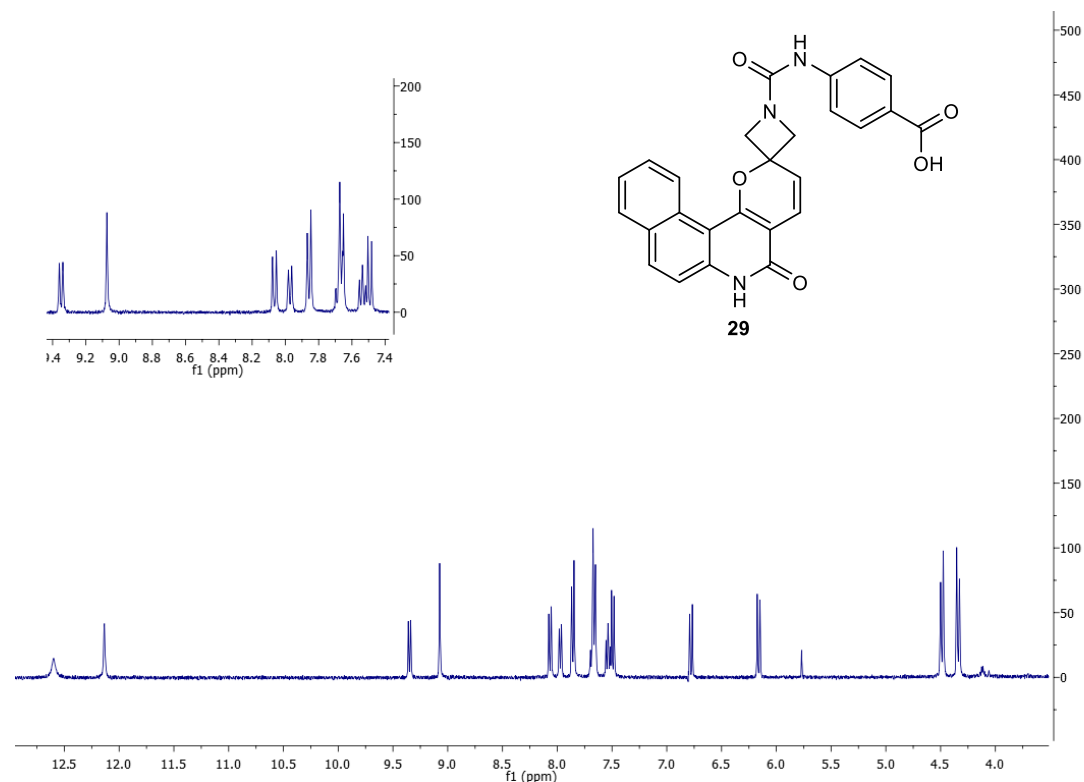


Εικόνα 11: Φάσμα παραγώγου **24** σε DMSO-d⁶.

Στο φάσμα του αναλόγου **24** (Εικόνα 11) παρατηρούμε τέσσερις διπλές και δύο τριπλές κορυφές με αναλογία 1:1 στην περιοχή απορρόφησης των αρωματικών πρωτονίων, οι οποίες αποδίδονται στα πρωτόνια του αρωματικού πυρήνα της βενζοκινολίνης.

Η αντίδραση αποπροστασίας και ο σχηματισμός της αμίνης **25** που ακολουθεί, πραγματοποιείται εντός τριφθοροξικού οξέος. Το επόμενο στάδιο της συνθετικής πορείας αφορά τη σύνθεση των τελικών παραγώγων **26-29**. Έτσι λοιπόν, απομακρύνεται η περίσσεια του οξέος και χωρίς απομόνωση του ενδιάμεσου **25**, προστίθεται ο κατάλληλος ισοκυανικός εστέρας σε βασικό περιβάλλον, γεγονός που οδηγεί στη παραλαβή των παραγώγων ασύμμετρης ουρίας **26**, **27** και **28**. Το παράγωγο **29** λαμβάνεται μετά από σαπωνοποίηση του εστέρα **28** σε αλκαλικό περιβάλλον σε σχετικά καλή απόδοση.

Ενδεικτικά, στο φάσμα του παραγώγου **29** σε DMSO-d⁶ (Εικόνα 12) παρατηρούμε δύο απλές κορυφές στα 9.1 που αντιστοιχεί στα άζωτο-υδρογόνο της ουρίας και στα 12.6 ppm η ευρεία κορυφή, του ευκίνητου πρωτονίου του οξέος.



Εικόνα 12: Φάσμα του παραγώγου 29 σε d⁶-DMSO.

Συνοπτικά, στην παρούσα διπλωματική εργασία συντέθηκαν 21 νέα μόρια, εκ των οποίων τα 16 αποτελούν τελικά παράγωγα προς φαρμακολογικό έλεγχο και εξαγωγή συμπερασμάτων για την περαιτέρω βελτιστοποίηση της ένωσης-οδηγού. Επίσης, αναπτύχθηκαν δύο συνθετικές οδοί, για δύο σειρές παραγώγων, από τις οποίες μπορούν να συντεθούν πλήθος μορίων με υποκατάσταση επί της αζετιδίνης, γεγονός που επιτρέπει την ανάπτυξη σχέσεων δομής δράσης για τον επιθυμητό στόχο. Τέτοιους είδους νέα παράγωγα μπορούν να συντεθούν και για τις δύο σειρές μορίων που παρουσιάστηκαν και να συμβάλλουν στην περαιτέρω βελτιστοποίηση της δράσης και εκλεκτικότητας προς τον επιθυμητό στόχο.

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η παρακολούθηση των αντιδράσεων έγινε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) Silica gel 60F254. Οι χρωματογραφικές στήλες πραγματοποιήθηκαν με Silica gel 60 AC (SDS35-70 mm) ή Silica gel 200 mm. Τα φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR λήφθηκαν σε φασματοφωτόμετρο Bruker Avance 400 στα 400 MHz και Bruker Avance III στα 600 MHz. Ως διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3) και διμεθυλοσουλφοξείδιο ($\text{DMSO}-d_6$). Τα σημεία τήξεως λήφθηκαν σε συσκευή Büchi και δεν είναι διορθωμένα.

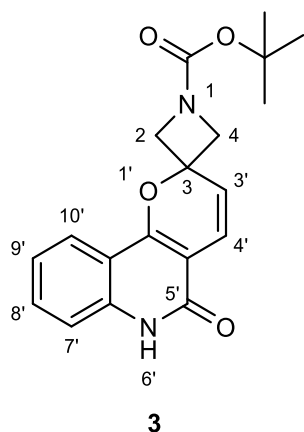
4.1 Σύνθεση τ-βουτυλοκαρβαμιδικού εστέρα της 3-(2-οξοαιθυλιδενο)αζετιδίνης (**2**)⁶¹

Εναιώρημα του τ-βουτυλοκαρβαμιδικού εστέρα της 3-οξοαζετιδίνης (0.68 g, 3.97 mmol, **1**) και της 2-(τριφαινυλοφωσφορανυλιδενο)ακεταλδεΐδης (1.37 g, 4.37 mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (15 mL) θερμαίνεται στους 40 °C για 5 hrs. Μετά το τέλος της αντίδρασης, το μίγμα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση και καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (silica gel) χρησιμοποιώντας ως σύστημα έκλουσης κυκλοεξάνιο/οξικό αιθυλεστέρα 2/1. Λαμβάνονται 0.79 g (93%) του επιθυμητού προϊόντος **2**. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του παραγώγου βρίσκονται σε συμφωνία με αυτά της βιβλιογραφίας.

4.2 Σύνθεση του 1-τ-βουτυλοκαρβαμιδικού εστέρα της σπειρο[αζετιδινο-3,2'-πυρανο[3,2-c]κινολιν]-5'(6'H)-όνης (**3**)

Εναιώρημα της αλδεΐδης **2** (254 mg, 1.24 mmol), χλωριούχου αμμωνίου (209mg, 3.92 mmol) και 2,4-διϋδροξυκινολίνης (200 mg, 1.24 mmol) σε άνυδρη πυριδίνη (8 mL), αναδεύεται στους 110 °C για 4 hrs. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης η μεγαλύτερη ποσότητα της πυριδίνης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα που λαμβάνεται καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (silica gel) χρησιμοποιώντας ως σύστημα έκλουσης διχλωρομεθάνιο/οξικό αιθυλεστέρα 9/1 ως 7/3 . Λαμβάνονται 260 mg (61.6 %) του επιθυμητού προϊόντος **3**.

Σ.Τ. 224 °C dec (Μεθανόλη)



^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 11.60 (s, 1H, NH), 7.87 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-10'), 7.53 (t, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-8'), 7.28 (d, $J = 8.3$, 1H, H-7'), 7.21 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-9'), 6.65 (d, $J = 9.9$

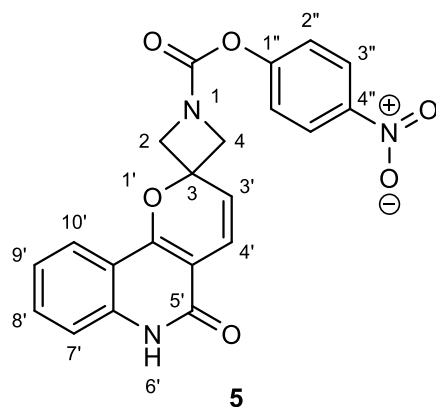
Hz, 1H, H-4'), 6.07 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H, H-3'), 4.17 (d, $J = 9.8$ Hz, 2H, H-2, H-4), 4.08 (d, $J = 9.8$ Hz, 2H, H-2, H-4), 1.41 (s, 9H, CH₃).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 159.86 (CONH), 155.52 (NCOO), 154.86 (C-10'b), 138.20 (C-6'a), 131.28 (C-8'), 122.08 (C-10'), 121.86 (C-9'), 121.50 (C-3'), 118.68 (C-4'), 115.35 (C-7'), 113.36 (C-10'b), 105.76 (C-4'), 79.20 (C(CH₃)₃), 75.54 (C-3), 67.01 (C-2, C-4), 28.02 (CH₃)

4.3 Σύνθεση του 4-νιτροφαινυλοκαρβαμιδικού εστέρα της της σπειρο[αζετιдино-3,2'-πυρανο[3,2-*c*]κινολιν]-5'(6'*H*)-όνης (5)

Σε σφαιρική που φέρει τριφθοροξικό οξύ (1.35 g, 11.6 mmol) προστίθεται ο καρβαμιδικός εστέρας **3** (102 mg, 0.33 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος υπό ατμόσφαιρα αργού για 40 min. Στη συνέχεια, το οξύ εκδιώκεται υπό ελαττωμένη πίεση και στο ελαιώδες υπόλειμμα που λαμβάνεται προστίθεται άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10 mL), N,N-διϊσοπροπυλαιθυλαμίνη (0.17 mL, 0.99 mmol) και χλωροφορμικός 4-νιτροφαινυλεστέρας (80 mg, 0.40 mmol). Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ατμόσφαιρα αργού για 90 min. Μετά το τέλος της αντίδρασης προστίθεται διαιθυλαιθέρας (3 ml) και το στερεό που σχηματίζεται διηθείται υπό κενό, εκπλένεται με νερό και ξηραίνεται σε ξηραντήρα κενού παρουσία πεντοξειδίου του φωσφόρου (P₂O₅). Λαμβάνονται 71 mg (84,6 %) του επιθυμητού προϊόντος, τα οποία χρησιμοποιούνται ως έχει στο επόμενο στάδιο της συνθετικής πορείας.

Σ.Τ.>280 °C



¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm): 11.63 (s, 1H, NH), 8.31 (m, 2H, H-3''), 7.95 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-10'), 7.56 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-8'), 7.51 – 7.47 (m, 2H, H-2''), 7.31 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-7'), 7.25 (t, $J = 8.1$, 1H, H-9'), 6.71 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H, H-4'), 6.17 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H, H-3'), 4.55 (s, 1H, H-2, H-4), 4.49 (s, 1H, H-2, H-4), 4.38 (s, 1H, H-2, H-4), 4.30 (s, 1H, H-2, H-4).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm): 160.31 (CONH), 156.17 (NCOO), 155.28 (C-10'b), 147.23 (C-1''), 145.00 (C-4''), 138.73 (C-6'a), 131.84 (C-8'), 125.65 (C-3''), 123.24 (C-2''), 122.64 (C-10'), 122.35 (C-9'), 121.61 (C-3'), 119.37 (C-4'), 115.85 (C-7'), 113.80 (C-10'a), 106.17 (C-4'a), 76.25 (C-3), 66.09 (C-2, C-4).

4.4 Σύνθεση του N-(3-μεθοξυπροπυλ)-5'-οξο-5',6'-διϋδροσπειρο[αζετιδινο-3,2'-πυρανο[3,2-c]κινολιν-1-καρβοξαμιδίου (6)

Μίγμα του καρβαμιδικό εστέρα **5** (71 mg, 0.16 mmol) και 3-μεθοξυπροπυλαμίνη (0.24 ml, 2.4 mmol) αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Στη συνέχεια εκδιώκεται η περίσσεια της αμίνης υπό ελαττωμένη πίεση και το ελαιώδες υπόλειμμα που λαμβάνεται διαλύεται σε μεθανόλη και προστίθεται ενεργοποιημένη ρητίνη Amberlite IRA-400. Το μίγμα που λαμβάνεται αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 30 λεπτά, ακολούθως διηθείται προς απομάκρυνση της ρητίνης και το διήθημα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Τελικά λαμβάνονται 32mg (53%) του παραγώγου **6**, ως λευκό στερεό, πρακτικά καθαρό.

Σ.Τ. 192-194 °C (Τετραϋδροφουράνιο/ Διαιθυλαιθέρας)

¹H NMR (600 MHz, Methanol-*d*₄) δ(ppm): 8.00 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-10'), 7.59 (t, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-8'), 7.36 – 7.28 (m, 2H, H-7', H-9'), 6.81 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, H-4'), 6.05 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, H-3'), 4.30 (d, *J* = 9.3, 2H, H-2, H-4), 4.15 (d, *J* = 9.3 Hz, 2H, H-2, H-4), 3.47 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, CH₂OCH₃), 3.36 (s, 3H, OCH₃), 3.25 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, NCH₂CH₂CH₂), 1.74 (p, *J* = 6.6 Hz, 2H, NCH₂CH₂CH₂).

¹³C NMR (151 MHz, Methanol-*d*₄) δ(ppm): 162.82 (CONH), 162.03 (NCONH), 157.82 (C-10'b), 139.35 (C-6'a), 132.77 (C-8'), 123.90 (C-10'), 123.48 (C-9'), 122.59 (C-3'), 119.93 (C-4'), 115.53 (C-7'), 114.11 (C-10'a), 106.94 (C-4'a), 77.12 (C-3), 71.52 (CH₂OCH₃), 66.03 (C-2, C-4), 58.86 (OCH₃), 38.65 (NCH₂CH₂CH₂), 31.22 (NCH₂CH₂CH₂).

4.5 Σύνθεση του N-(3-(διδιαιθυλαμινο)προπυλ)-5'-οξο-5',6'-διϋδροσπειρο[αζετιδινο-3,2'-πυρανο[3,2-c]κινολιν-1-καρβοξαμιδίου (7)

Η σύνθεση του παραγώγου **7** γίνεται κατά αντίστοιχο τρόπο με αυτόν που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του παραγώγου **6**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το ενδιάμεσο **5** (80 mg, 0.20 mmol) και την 3-(διδιαιθυλαμινο)προπυλαμίνη (0.48 ml, 3mmol). Μετά το πέρας 12 hrs, η περίσσεια της αμίνης εκδιώκεται και στο ελαιώδες υπόλειμμα προστίθεται μεθανόλη, ισχυρά βασική ρητίνη Amberlite IRA-400 και το μίγμα αναδεύεται για 15 min. Ακολουθεί διήθηση της ρητίνης και εξάτμιση του διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση και τελικώς λαμβάνονται 48 mg (60 %) του αναλόγου **7**, ως υποκίτρινο στερεό, πρακτικά καθαρό.

Σ.Τ. 154-156°C (Τετραϋδροφουράνιο/ Διαιθυλαιθέρας)

¹H NMR (600 MHz, Methanol-*d*₄) δ(ppm): 7.97 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-10'), 7.57 (t, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-8'), 7.32 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-7'), 7.29 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-9'), 6.80 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, H-4'), 6.03 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, H-3'), 4.29 – 4.26 (m, 2H, H-2, H-4), 4.14 (d, *J* = 9.4 Hz, 2H, H-2, H-4), 3.19 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂NH), 2.66 (q, *J* = 7.2 Hz, 4H, CH₂CH₃), 2.62 – 2.58 (m, 2H, CH₂N(CH₂CH₃)₂), 1.71 (m, 2H, NHCH₂CH₂CH₂), 1.10 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H, CH₃CH₂).

¹³C NMR (151 MHz, Methanol-*d*₄) δ(ppm): 162.83 (CONH), 162.05 (NCONH), 157.81 (C-10'b), 139.37 (C-6'b), 132.80 (C-8'), 123.91 (C-10'), 123.45 (C-9'), 122.56 (C-3'), 119.98 (C-4'), 116.79 (C-7'), 115.52 (C-10'a), 106.96 (C-4'a), 77.13 (C-3), 66.07 (C-2, C-4), 51.17 (CH₂N(CH₂CH₃)₂), 47.77 (CH₂CH₃), 39.62 (CH₂NH), 27.63 (NHCH₂CH₂CH₂), 11.08 (CH₃).

4.6 Σύνθεση του του 5'-οξο-N-φαινυλο-5',6'-διϋδροσπειρο[αζετιδινο-3,2'-πυρανο[3,2-c]κινολιν-1-καρβοξαμιδίου (8)

Σε σφαιρική φιάλη που περιέχει τριφθοροξικό οξύ (1.54 g, 13.7 mmol), προστίθεται ο εστέρας **4** (120 mg, 0.39 mmol) και αναδεύεται για 40 min υπό ατμόσφαιρα αργού, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Έπειτα εκδιώκεται η περίσσεια του οξέος υπό ελαττωμένη πίεση, προστίθεται άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10 mL), N,N-διϊσοπροπυλαιθυλαμίνη (0.20 mL, 1.17 mmol) και ισοκυανικός φαινυλεστέρας (55 mg, 0.468 mmol) και το μίγμα αναδεύεται για 90 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, υπό ατμόσφαιρα αργού. Μετά το πέρασμα της αντίδρασης, προστίθεται διαιθυλαιθέρας και το σχηματιζόμενο ίζημα διηθείται υπό κενό. Εκπλένεται με νερό και ξηραίνεται σε ξηραντήρα παρουσία πεντοξειδίου του φωσφόρου (P₂O₅). Λαμβάνονται 80 mg (63 %) του επιθυμητού προϊόντος **8**.

Σ.Τ. >280 °C

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm): 11.63 (s, 1H, NH), 8.63 (s, 1H, NCONH), 7.90 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-10'), 7.58 – 7.49 (m, 3H, H-8', H-2''), 7.33 – 7.20 (m, 4H, H-7', H-9', H-3''), 6.96 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, H-4''), 6.69 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, H-3'), 6.13 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, H-4'), 4.31 (d, *J* = 9.6 Hz, 2H, H-2, H-4), 4.22 (d, *J* = 9.6 Hz, 2H, H-2, H-4).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm): 159.86 (CONH), 156.66 (NCONH), 154.93 (C-10'b), 140.32 (C-1''), 138.21 (C-6'a), 131.28 (C-8'), 128.44 (C-3''), 122.08 (C-10'), 121.87 (C-9', C-4''), 121.78 (C-3'), 118.87 (C-2''), 118.63 (C-4'), 115.35 (C-7'), 113.38 (C-10'a), 105.76 (C-4'a), 75.39 (C-3), 64.68 (C-2, C-4).

4.7 Σύνθεση του N-(3-χλωρο-4-φθοροφαινυλο)-5'-οξο-5',6'-διϋδροσπειρο[αζετιδινο-3,2'-πυρανο[3,2-c]κινολιν-1-καρβοξαμιδίου (9)

Η σύνθεση του παραγώγου **9** έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για την σύνθεση του παραγώγου **8**. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το ίζημα που λαμβάνεται καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (silica gel) χρησιμοποιώντας ως σύστημα έκλυσης αρχικά διχλωρομεθάνιο και στη συνέχεια διχλωρομεθάνιο/μεθανόλη από 10/0.1 έως 10/0.3. Λαμβάνονται 22 mg (15 %) του επιθυμητού προϊόντος **9**.

Σ.Τ. 265 °C dec

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm): 11.62 (s, 1H, NH), 8.84 (s, 1H, NCONH), 7.89 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-10'), 7.80 (dd, *J* = 6.9, 2.6 Hz, 1H, H-2''), 7.53 (t, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-8'), 7.43 (ddd, *J* = 9.1, 4.3, 2.6 Hz, 1H, H-6''), 7.33 – 7.27 (m, 2H, H-7', H-5''), 7.22 (t, *J* = 8.2, Hz, 1H, H-9'), 6.67 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, H-4'), 6.11 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, H-3'), 4.30 (d, *J* = 10.0 Hz, 2H, H-2, H-4), 4.22 (d, *J* = 10.0 Hz, 2H, H-2, H-4).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm): 160.27 (CONH), 156.72 (NCONH), 155.31 (C-10'b), 153.50 (C-4''), 151.90 (C-4''), 138.62 (C-6'a), 137.69 (C-1''), 131.70 (C-8'), 122.49 (C-9'), 122.29 (C-9'), 122.05 (C-3'), 120.36 (C-2''), 119.26 (C-6''), 119.22 (C-6''), 119.16 (C-3''), 119.09 (C-4'), 117.09 (C-5''), 116.95 (C-5''), 115.76 (C-7'), 113.77 (C-10'), 106.14 (C-4'a), 75.81 (C-3), 65.12 (C-2, C-4).

4.8 Σύνθεση του N-(4-κυανοφαιnyλο)-5'-οξο-5',6'-διϋδροσπειρο[αζετιδινο-3,2'-πυρανο[3,2-c]κινολιν-1-καρβοξαμιδίου (10)

Η σύνθεση του παραγώγου **10**, έγινε με τρόπο όμοιο με τη σύνθεση του παραγώγου **8**. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το ίζημα που σχηματίζεται μετά την προσθήκη διαιθυλαιθέρα, εκπλένεται με διχλωρομεθάνιο και κατόπιν με νερό. Τέλος ξηραίνεται σε ξηραντήρα παρουσία πεντοξειδίου του φωσφόρου (P₂O₅). Λαμβάνονται 79 mg καστανόχρωμου στερεού (79 %) πρακτικά καθαρό.

Σ.Τ. 275 °C

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm): 11.62 (s, 1H, NH), 9.11 (s, 1H, NCONH), 7.89 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-10'), 7.71 (s, 4H, H-2'', H-3''), 7.53 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-8'), 7.29 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-7'), 7.21 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-9'), 6.68 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, H-4'), 6.11 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, H-3'), 4.33 (d, *J* = 9.8 Hz, 2H, H-2, H-4), 4.26 (d, *J* = 9.8 Hz, 2H, H-2, H-4).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm): 159.89 (CONH), 155.90 (NCONH), 154.92 (C-10'b), 144.52 (CN), 138.23 (C-6'a), 133.02 (C-3''), 131.32 (C-8'), 122.10 (C-10'), 121.91 (C-9'), 121.59 (C-3'), 119.33 (C-4''), 118.73 (C-4'), 118.46 (C-4'), 115.38 (C-7'), 113.38 (C-10'b), 105.75 (C-4'a), 103.26 (C-1''), 75.40 (C-3), 64.80 (C-2, C-4).

4.9 Σύνθεση του N-(4-ακετυλοφαιnyλο)-5'-οξο-5',6'-διϋδροσπειρο[αζετιδινο-3,2'-πυρανο[3,2-c]κινολιν-1-καρβοξαμιδίου (11)

Η σύνθεση του παραγώγου **11** έγινε με τον τρόπο που περιγράφεται και για τον παράγωγο **8**. Μετά το πέρας 90 min, προστίθεται διαιθυλαιθέρας, και το στερεό που σχηματίζεται διηθείται υπό κενό και εκπλένεται με θερμό οξικό αιθυλεστέρα. Στη συνέχεια καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (silica gel) χρησιμοποιώντας ως σύστημα έκλουσης διχλωρομεθάνιο/μεθανόλη 100/1. Τελικώς λαμβάνονται 45 mg (50 %) στερεού.

Σ.Τ. >280 °C (Μεθανόλη/Ακετόνη)

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm): 11.63 (s, 1H, NH), 9.03 (s, 1H, NCONH), 7.92 – 7.87 (m, 3H, H-10', H-3''), 7.67 (m, 2H, H-2''), 7.54 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-8'), 7.30 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-7'), 7.22 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-9'), 6.69 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, H-4'), 6.13 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, H-3'), 4.34 (d, *J* = 9.7 Hz, 2H, H-2, H-4), 4.26 (d, *J* = 9.7 Hz, 2H, H-2, H-4).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm): 196.81 (COCH₃), 160.35 (CONH), 156.54 (NCONH), 155.39 (C-10'b), 145.14 (C-1''), 138.71 (C-6'a), 131.78 (C-8'), 130.90 (C-4''), 129.82 (C-3''), 122.57 (C-10'), 122.36 (C-9'), 122.13 (C-3'), 119.18 (C-4'), 118.12 (C-2''), 115.84 (C-7'), 113.85 (C-10'a), 106.23 (C-4'a), 75.87 (C-3), 65.25 (C-2, C-4), 26.80 (CH₃).

4.10 Σύνθεση του αιθυλο 4-(5'-οξο-5',6'-διϋδροσπειρο[αζετιδινο-3,2'-πυρανο[3,2-c]κινολιν-1-καρβοξάμιδο)βενζοϊκού εστέρα (12)

Για τη σύνθεση του παραγώγου **12** ακολουθήθηκε η ίδια συνθετική πορεία όπως και για το παράγωγο **8**. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης η προσθήκη διαιθυλαιθέρα οδηγεί στο σχηματισμό ιζήματος, το οποίο διηθείται και εκπλένεται με νερό. Κατόπιν ξηραίνεται σε

ξηραντήρα κενού παρουσία πεντοξειδίου του φωσφόρου (P_2O_5) και λαμβάνονται 95 mg (71 %) λευκού στερεού.

Σ.Τ. 270 °C dec (Διμεθυλοφορμαμίδιο/Νερό)

1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 11.63 (s, 1H, NH), 9.03 (s, 1H, NCONH), 7.94 – 7.85 (m, 3H, H-10', H-3''), 7.71 – 7.65 (m, 2H, H-2''), 7.55 (t, J = 8.5 Hz, 1H, H-8'), 7.31 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-7'), 7.23 (t, J = 8.1 Hz, 1H, H-9'), 6.69 (d, J = 9.9 Hz, 1H, H-4'), 6.13 (d, J = 9.9 Hz, 1H, H-3'), 4.34 (d, J = 9.7 Hz, 2H, H-2, H-4), 4.32 – 4.24 (m, 4H, H-2, H-4, CH_2CH_3), 1.32 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 165.45 ($COOCH_2CH_3$), 159.85 (CONH), 156.09 (NCONH), 154.90 (C-10'b), 144.62 (C-1''), 138.22 (C-6'a), 131.28 (C-8'), 130.04 (C-3''), 122.70 (C-4''), 122.08 (C-10'), 121.86 (C-9'), 121.64 (C-3'), 118.68 (C-4'), 117.77 (C-2''), 115.35 (C-7'), 113.36 (C-10'a), 105.74 (C-4'a), 75.38 (C-3), 64.77 (C-2, C-4), 60.21 (CH_2CH_3), 14.22 (CH_3).

4.11 Σύνθεση του 4-(5'-οξο-5',6'-διϋδροσπειρο[αζετιδινο-3,2'-πυρανο[3,2-c]κινολιν-1-καρβοξάμιδο)βενζοϊκού οξέος (13)

Σε σφαιρική που φέρει το παράγωγο **12** (62 mg, 0.14 mmol) και αιθανόλη (~10mL), προστίθεται υδατικό διάλυμα καυστικού νατρίου 20 % (33.6 mg, 0.84 mmol) και το μίγμα αναδεύεται για 12 hr σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Προστίθεται διάλυμα υδροχλωρικού οξέος 9 % μέχρι οξίνισης (pH ~2) και το σχηματιζόμενο ίζημα διηθείται υπό κενό. Λαμβάνονται 12 mg (21 %) λευκού στερεού, πρακτικά καθαρού.

Σ.Τ. >280 °C

1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 12.57 (s, D2O exchang, 1H, COOH), 11.63 (s, 1H, NH), 8.99 (s, 1H, NCONH), 7.90 (d, J = 8.1, 1H, H-10'), 7.87 – 7.82 (m, 2H, H-4''), 7.64 (m, 2H, H-2''), 7.54 (t, J = 7.8 Hz, 1H, H-8'), 7.30 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-7'), 7.22 (t, J = 7.6 Hz, 1H, H-9'), 6.68 (d, J = 9.9 Hz, 1H, H-4'), 6.12 (d, J = 9.9 Hz, 1H, H-3'), 4.33 (d, J = 9.6 Hz, 2H, H-2, H-4), 4.25 (d, J = 9.6 Hz, 2H, H-2, H-4).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 167.01 (COOH), 160.24 (CONH), 156.13 (NCONH), 154.83 (C-10'b), 144.23 (C-1''), 138.19 (C-6'a), 131.15 (C-8'), 130.14 (C-3''), 123.72 (C-4''), 121.99 (C-10'), 121.90 (C-9'), 121.35 (C-3'), 118.16 (C-4'), 117.44 (C-2''), 115.09 (C-7'), 113.71 (C-10'a), 105.71 (C-4'a), 75.36 (C-3), 61.50 (C-2, C-4).

4.12 Σύνθεση του 1-βενζοϋλοσπειρο[αζετιδινο-3,2'-πυρανο[3,2-c]κινολιν]-5'(6'H)-ονη (14)

Η σύνθεση του παραγώγου **14**, ακολουθεί την ίδια διαδικασία με αυτή του παραγώγου **8**, με μόνη διαφορά ότι αντί του ισοκυανικού εστέρα χρησιμοποιείται ως αντιδραστήριο το βενζοϋλοχλωρίδιο. Μετά το τέλος της αντίδρασης, παρατηρείται ο σχηματισμός ιζήματος το οποίο διηθείται υπό κενό, εκπλένεται με νερό και ξηραίνεται σε ξηραντήρα κενού. Λαμβάνονται 85 mg (70 %) λευκού στερεού.

Σ.Τ. 273 °C dec (Μεθανόλη/Ακετόνη)

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 11.61 (s, 1H, NH), 7.91 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-10'), 7.74 – 7.68 (m, 2H, H-2''), 7.57 – 7.50 (m, 2H, H-8', H-4''), 7.50 – 7.44 (m, 2H, H-3''), 7.29 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H-7'), 7.22 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-9'), 6.67 (d, J = 9.9 Hz, 1H, H-4'), 6.13 (d, J = 9.9 Hz, 1H, H-3'), 4.70 (d, J = 9.9 Hz, 1H, H-2, H-4), 4.55 (d, J = 9.9 Hz, 1H, H-2, H-4), 4.39 (d, J = 11.2 Hz, 1H, H-2, H-4), 4.32 (d, J = 11.2 Hz, 1H, H-2, H-4).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 169.09 (NCO), 159.84 (CONH), 154.88 (C-10'b), 138.21 (C-6'a), 132.72 (C-1''), 131.28 (C-4''), 131.20 (C-8'), 128.44 (C-3''), 127.84 (C-2''), 122.19 (C-10'), 121.83 (C-9'), 121.42 (C-3'), 118.74 (C-4'), 115.32 (C-7'), 113.36 (C-10'a), 105.78 (C-4'a), 75.91 (C-3), 67.89 (C-2, C-4), 64.01 (C-2, C-4).

4.13 Σύνθεση του 1-(4-(χλωρομεθυλ)βενζοϋλο)σπειρο[αζετιδινο-3,2'-πυρανο[3,2-c]κινολιν]-5'(6'H)-ονη (15)

Για τη σύνθεση του παραγώγου **15**, ακολουθείται η ίδια πορεία με το παράγωγο **8**, όμως αντί του ισοκυανικού εστέρα χρησιμοποιείται το 4-(χλωρομεθυλο)βενζοϋλοχλωρίδιο. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, προστίθεται διαιθυλαιθέρας και ως αποτέλεσμα σχηματίζεται κιτρινόχρωμο στερεό. Το στερεό διηθείται υπό κενό, εκπλένεται με νερό και ξηραίνεται σε ξηραντήρα κενού παρουσία πεντοξειδίου του φωσφόρου (P_2O_5). Τελικά λαμβάνονται 100 mg (62 %) λευκού στερεού.

Σ.Τ. >280 °C (Διμεθυλοφορμαμίδιο/Νερό)

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 11.63 (s, 1H, NH), 7.92 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H-10'), 7.73 (m, 2H, H-2''), 7.55 (m, 3H, H-8', H-3''), 7.30 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H-7'), 7.23 (t, J = 7.6 Hz, 1H, H-9'), 6.68 (d, J = 9.9 Hz, 1H, H-4'), 6.14 (d, J = 9.9 Hz, 1H, H-3'), 4.82 (s, 2H, CH_2Cl), 4.73 (d, J = 9.9 Hz, 1H, H-2, H-4), 4.57 (d, J = 9.9 Hz, 1H, H-2, H-4), 4.41 (d, J = 11.2 Hz, 1H, H-2, H-4), 4.33 (d, J = 11.2 Hz, 1H, H-2, H-4).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 168.62 (NCO), 159.87 (CONH), 154.90 (C-10'b), 140.67 (C-4''), 138.23 (C-6'a), 132.57 (C-1''), 131.31 (C-8'), 128.84 (C-2''), 128.25 (C-3''), 122.21 (C-10'), 121.86 (C-9'), 121.41 (C-3'), 118.76 (C-4'), 115.35 (C-7'), 113.38 (C-10'a), 105.78 (C-4'a), 75.91 (C-3), 67.90 (C-2, C-4), 64.08 (C-2, C-4), 45.38 (CH_2Cl).

4.14 Σύνθεση του 1-(4-((διμεθυλαμινο)μεθυλ)βενζοϋλο)σπειρο[αζετιδινο-3,2'-πυρανο[3,2-c]κινολιν]-5'(6'H)-ονη (16)

Σε σφαιρική που περιέχει το παράγωγο **15** (50 mg, 0.13 mmol) και απόλυτη αιθανόλη (7 mL), προστίθεται αιθανολικό διάλυμα διμεθυλαμίνης (12.75 mmol, 0.85 mL) και το εναιώρημα θερμαίνεται σε θερμοκρασία βρασμού για 24h. Στη συνέχεια εκδιώκεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση και το ελαιώδες υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (silica gel 40mm) και σύστημα έκλουσης οξικό αιθυλεστέρα/μεθανόλη 10/0.3. Τελικά, λαμβάνονται 25 mg (49 %) κιτρινόχρωμου στερεού.

Σ.Τ. 243 °C dec (Μεθανόλη/Χλωροφόρμιο)

^1H NMR (600 MHz, Methanol- d_4) δ (ppm): 7.91 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-10'), 7.62 – 7.60 (m, 2H, H-2''), 7.46 (t, J = 8.4 Hz, 1H, H-8'), 7.35 (m, 2H, H-3''), 7.23 – 7.17 (m, 2H, H-7', H-9'), 6.72 (d, J = 10.0 Hz, 1H, H-4'), 6.00 (d, J = 10.0 Hz, 1H, H-3'), 4.66 (d, J = 10.1 Hz, 1H, H-2, H-4), 4.54 –

4.41 (m, 2H, H-2, H-4), 4.32 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H, H-2, H-4), 3.44 (s, 2H, H-CH₂), 2.16 (s, 6H, CH₃).

¹³C NMR (151 MHz, Methanol-*d*₄) δ(ppm): 170.72 (CO), 161.38 (CONH), 156.33 (C-10'b), 141.49 (C-4''), 137.98 (C-6'a), 131.56 (C-1''), 131.40 (C-8'), 129.41 (C-2'), 127.75 (C-3'), 122.50 (C-10'), 122.16 (C-9'), 120.63 (C-3'), 118.76 (C-4'), 115.34 (C-7'), 114.08 (C-10'a), 105.46 (C-4'a), 76.22 (C-3), 68.58 (C-2, C-4), 63.04 (C-2, C-4), 43.89 (CH₂), 29.31 (CH₃).

4.15 Σύνθεση του 1-(2-χλωρακετυλο)σπειρο[αζετιδινο-3,2'-πυρανο[3,2-c]κινολιν]-5'(6'H)-ονη (17)

Η σύνθεση του παραγώγου **17**, γίνεται κατά όμοιο τρόπο όπως περιγράφεται και για το παράγωγο **8**, με διαφορά ότι ως αντιδραστήριο χρησιμοποιείται το χλωρακέτυλο χλωρίδιο έναντι του ισοκυανικού εστέρα. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, απομακρύνεται ο διαλύτης και ύστερα από προσθήκη διαθυλαιθέρα σχηματίζεται στερεό, το οποίο και διηθείται υπό κενό. Έπειτα εκπλένεται με νερό και λαμβάνονται 139 mg (83 %) υπόλευκου στερεού.

Σ.Τ. 241°C dec (Διμεθυλοφορμαμίδιο/Νερό)

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm): 11.64 (s, 1H, NH), 7.89 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-10'), 7.55 (t, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-8'), 7.30 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-7'), 7.24 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-9'), 6.70 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H, H-4'), 6.10 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H, H-3'), 4.57 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H, H-2, H-4), 4.45 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H, H-2, H-4), 4.31 – 4.18 (m, 4H, H-2, H-4, CH₂).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm): 166.03 (CO), 159.80 (CONH), 154.76 (C-10'b), 138.23 (C-6'a), 131.35 (C-8'), 122.07 (C-10'), 121.86 (C-9'), 121.20 (C-3'), 118.91 (C-4'), 115.36 (C-7'), 113.28 (C-10'a), 105.77 (C-4'a), 75.61 (C-3), 65.53 (C-2, C-4), 63.81 (C-2, C-4), 40.34 (CH₂).

4.16 Σύνθεση του 1-(διμεθυλογλυκυλ)σπειρο[αζετιδινο-3,2'-πυρανο[3,2-c]κινολιν]-5'(6'H)-ονη (18)

Η σύνθεση του μορίου **18**, ακολούθησε την ίδια πορεία με αυτή του παραγώγου **16** με τη διαφορά ό,τι η αντίδραση ολοκληρώθηκε εντός 2h. Μετά το πέρας της αντίδρασης, ο διαλύτης εκδιώχθηκε υπό ελαττωμένη πίεση και ύστερα από προσθήκη διαιθυλαιθέρα, το στερεό το οποίο σχηματίστηκε διηθήθηκε υπό κενό. Ακολούθως, έγινε έκπλυση του στερεού με νερό και έπειτα ξήρανση σε ξηραντήρα κενού. Τελικώς λαμβάνονται 65 mg (79 %) λευκού στερεού πρακτικά καθαρού. .

Σ.Τ. 239 °C dec (Μεθανόλη/Χλωροφόρμιο)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm): 11.65 (s, 1H, NH), 7.87 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-10'), 7.54 (t, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-8'), 7.33 – 7.18 (m, 2H, H-7', H-9'), 6.67 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H, H-4'), 6.09 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H, H-3'), 4.52 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H, H-2, H-4), 4.40 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H, H-2, H-4), 4.21 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H-2, H-4), 4.13 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H-2, H-4), 2.98 (d, $J = 4.3$ Hz, 2H, CH₂), 2.20 (s, 6H, CH₃).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm): 170.34 (CO), 160.32 (CONH), 155.33 (C-10'b), 138.69 (C-6'), 131.78 (C-8'), 122.53 (C-10'), 122.34 (C-9'), 121.99 (C-3'), 119.20 (C-4'), 115.84 (C-7'),

113.82 (C-10'a), 106.31 (C-4'a), 76.42 (C-3), 66.23 (C-2, C-4), 63.72 (C-2, C-4), 60.59 (CH₂), 45.61(CH₃).

4.17 Σύνθεση του 1-τοσυλοσπειρο[αζετιδινό-3,2'-πυρανο[3,2-c]κινόλιν]-5'-(6'H)-ονη (19)

Η σύνθεση του παραγώγου **19**, έγινε με τον τρόπο που περιγράφεται και για το παράγωγο **8** με μόνη διαφορά ό, τι χρησιμοποιήθηκε π-τολουολοσουφόνυλο χλωρίδιο έναντι του ισοκυανικού εστέρα. Μετά το πέρας της αντιδράσεως, το σχηματιζόμενο στερεό διηθείται υπό κενό και εκπλένεται με νερό. Κατόπιν γίνεται ξήρανση σε ξηραντήρα κενού, παρουσία πεντοξειδίου του φωσφόρου (P₂O₅). Λαμβάνονται 90 mg (78 %) λευκού στερεού, πρακτικά καθαρό.

Σ.Τ. 275 °C dec (Διμεθυλοφορμαμίδιο/Νερό)

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm): 11.59 (s, 1H, NH), 7.87 – 7.82 (m, 2H, H-3''), 7.64 – 7.60 (m, 2H, H-2''), 7.52 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-8'), 7.25 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-7'), 7.13 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-9'), 7.02 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-10'), 6.61 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, H-4'), 5.85 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, H-3'), 4.12 (d, *J* = 10.7 Hz, 2H, H-2, H-4), 4.08 – 4.01 (m, 2H, H-2, H-4), 2.58 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm): 159.63 (CONH), 154.07 (C-10'b), 144.41 (C-4''), 138.18 (C-6'a), 131.37 (C-8'), 130.35 (C-1''), 130.03 (C-2''), 128.64 (C-3''), 121.59 (C-10'), 121.45 (C-9'), 120.71 (C-3'), 119.14 (C-4'), 115.37 (C-7'), 112.91 (C-10'a), 105.59 (C-4'a), 74.24 (C-3), 65.80 (C-2, C-4), 21.20 (CH₃).

4.18 Σύνθεση του τ-βουτυλοκαρβαμιδικού εστέρα της ναφθυλ-2-αμίνης (21)⁷⁰

Εναιώρημα του 2-ναφθοϊκού οξέος (200 mg, 1.16 mmol), διφαινυλοφωσφόρυλο αζιδίου (352 mg, 1.28 mmol) και τριαιθυλαμίνης (0.18 mL, 1.28 mmol) σε τολουόλιο, αναδεύεται στους 110 °C για 24 hrs. Μετά το πέρας της αντίδρασης, ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό και στο ελαιώδες υπόλειμμα προστίθεται οξικός αιθυλεστέρας. Έπειτα γίνεται εκχύλιση με διάλυμα υδροχλωρικού οξέος 9 % και ακολούθως με διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου 10 %. Η οργανική στιβάδα ξηραίνεται με θειικό μαγνήσιο και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Λαμβάνονται 200 mg (71 %) λευκού στερεού πρακτικά καθαρού. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του παραγώγου βρίσκονται σε συμφωνία με αυτά της βιβλιογραφίας.

4.19 Σύνθεση της ναφθυλ-2-αμίνης (22)⁷⁰

Σε σφαιρική που φέρει το παράγωγο **21** (200 mg, 0.82 mmol), προστίθεται τριφθοροξικό οξύ (3.36 mg, 28.9 mmol) απουσία διαλύτη και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ατμόσφαιρα αργού για 30 min. Κατόπιν το οξύ εκδιώκεται υπό ελαττωμένη πίεση και στο υπόλειμμα προστίθεται οξικός αιθυλεστέρας. Η οργανική στιβάδα εκχυλίζεται με υδατικό διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου 10 % και στη συνέχεια, ξηραίνεται με θειικό μαγνήσιο και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Λαμβάνεται λευκό στερεό 100 mg (85 %), πρακτικά καθαρό. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του παραγώγου βρίσκονται σε συμφωνία με αυτά της βιβλιογραφίας.

4.20 Σύνθεση της 1-υδροξυβενζο[f]κινόλιν-3(4H)-ονης (23)^{76,79}

Μίγμα του παραγώγου **22** (98 mg, 0.69 mmol) και της 2,2-διμεθυλο-1,3-διοξαν-4,6-διόνης (99 mg, 0.69 mmol) θερμαίνεται στους 110 °C για 90 min. Στη συνέχεια προστίθεται αντιδραστήριο Eaton's (2 mL) και το μίγμα αναδεύεται στους 50 °C για 2 hrs. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το μίγμα αποχύνεται σε παγόνερο και το σχηματιζόμενο ίζημα διηθείται υπό κενό και ξηραίνεται σε ξηραντήρα κενού. Λαμβάνονται 80 mg (55 %) λευκού στερεού, πρακτικά καθαρό το οποίο χρησιμοποιείται ως έχει για το επόμενο στάδιο.

4.21 Σύνθεση του 1-τ-βουτυλοκαρβαμιδικού εστέρα της 5'-οξο-5',6'-διυδροσπειρο[αζετιδινο-3,2'-βενζο[f]πυρανο[3,2-c]κινολιν]-5'(6'H)-όνης (**24**)

Εναιώρημα της αλδεΐδης **2** (65 mg, 0.33 mmol), του παραγώγου **23** (70 mg, 0.33 mmol) και χλωριούχου αμμωνίου (53 mg, 0.99 mmol) σε άνυδρη πυριδίνη (15 mL) αναδεύεται για 5 hr σε θερμοκρασία βρασμού. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το μίγμα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση και το ελαιώδες υπόλειμμα καθαρίζεται σε χρωματογραφία στήλης (silica gel) με σύστημα έκλουσης αρχικά διχλωρομεθάνιο και ακολούθως μίγμα διχλωρομεθάνιο/ μεθανόλη 10/0.3. Λαμβάνονται 81 mg (63 %) λευκού στερεού πρακτικά καθαρό.

Σ.Τ.>280 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm): 12.12 (s, 1H), 9.29 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-12'), 8.06 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H-8'), 7.98 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-9'), 7.68 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-11'), 7.55 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-10'), 7.48 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H-7'), 6.76 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H, H-4'), 6.13 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H, H-3'), 4.34 (d, *J* = 10.0 Hz, 2H, H-2, H-4), 4.18 (d, *J* = 10.0 Hz, 2H, H-2, H-4), 1.43 (s, 9H, CH₃).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159.69 (CONH), 158.87 (OC=ON), 156.28 (C-12'c), 139.61 (C-6'a), 133.51 (C-8'), 130.16 (C-9'), 129.65 (C-8'a), 129.21 (C-11'), 128.66 (C-12'a), 125.87 (C-12'), 125.44 (C-10'), 121.32 (C-3'), 119.97 (C-4'), 117.12 (C-7'), 107.67 (C-4'a), 106.62 (C-12'b), 79.76 ((C)CH₃), 76.66 (C-3), 64.79(C-2, C-4), 28.49 (CH₃).

4.22 Σύνθεση του N-(4-κυανοφαινυλο)-5'-οξο-5',6'-διυδροσπειρο[αζετιδινο-3,2'-βενζο[f]πυρανο[3,2-c]κινολινη]-1-καρβοξαμιδίου (**26**)

Σε σφαιρική που περιέχει τον καρβαμιδικό εστέρα **24** (70 mg, 0.18 mmol) προστίθεται τριφθοροξικό οξύ (708 mg, 6.3 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ατμόσφαιρα αργού για 40 min. Στη συνέχεια η περίσσεια του οξέος απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση και στο υπόλειμμα προστίθεται άνυδρο τετραϋδροφουράνιο, N,N-διϊσοπροπυλοαιθυλαμίνη (0.052 mL, 0.54 mmol) και 4-κυανοφαινυλοισοκυανικός εστέρας (30 mg, 0.21 mmol) και το μίγμα αναδεύεται για 2 hrs, υπό ατμόσφαιρα αργού και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μετά το τέλος της αντίδρασης παρατηρείται σχηματισμός ιζήματος, το οποίο διηθείται υπό κενό και εκπλένεται με διαιθυλαιθέρα και νερό. Τέλος ξηραίνεται σε ξηραντήρα κενού και λαμβάνονται 41 mg (53 %) του επιθυμητού παραγώγου.

Σ.Τ.>280 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm): 12.14 (s, 1H, NH), 9.34 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-12'), 9.20 (s, 1H, H-NCONH), 8.07 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H-8'), 7.97 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-9'), 7.73 (s, 4H, H-2'),

H-3''), 7.67 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-11'), 7.48- 7.56 (m, 2H, H-7', H-10'), 6.78 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H, H-4'), 6.16 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H, H-3'), 4.50 (d, $J = 9.8$ Hz, 2H, H-2, H-4), 4.35 (d, $J = 9.8$ Hz, 2H, H-2, H-4).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 159.71 (CONH), 158.93 (NCONH), 156.68 (C-12'c), 144.99 (CN), 139.64 (C-6'a), 133.51 (C-8', C-3''), 130.15 (C-9'), 129.65 (C-8'a), 129.21 (C-11'), 128.71 (C-12'a), 125.90 (C-12'), 125.44 (C-10'), 121.33 (C-3'), 119.94 (C-4'), 119.79 (C-4''), 118.87 (C-2''), 117.12 (C-7'), 107.56 (C-4'a), 106.59 (C-12'b), 103.73 (C-1''), 76.51 (C-3), 64.83 (C-2, C-4).

4.23 Σύνθεση του N-(4-ακετυλοφαινυλο)-5'-οξο-5',6'-διυδροσπειρο[αζετιδινό-3,2'-βενζο[f]πυρανο[3,2-c]κινολινη]-1-καρβοξαμιδίου (27)

Η σύνθεση του παραγώγου **27** γίνεται με τρόπο ανάλογο με αυτό του παραγώγου **26** με χρήση του 4-ακετυλοφαινυλο ισοκυανικού εστέρα. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το σχηματιζόμενο στερεό διηθείται υπό κενό και εκπλένεται με με διχλωρομεθάνιο και νερό. Ακολούθως ξηραίνεται σε ξηραντήρα κενού παρουσία πεντοξειδίου του φωσφώρου (P_2O_5) και λαμβάνονται 22 mg (32 %) στερεού.

Σ.Τ.>280 °C (Διμεθυλοφορμαμίδιο/Νερό)

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 12.11 (s, 1H, NH), 9.35 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-12'), 9.08 (s, 1H, NCONH), 8.06 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-8'), 7.97 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-9'), 7.95 – 7.87 (m, 2H, H-3''), 7.71 – 7.64 (m, 3H, H-11'/2''), 7.53 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H-10'), 7.49 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-7'), 6.78 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H, H-4'), 6.16 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H, H-3'), 4.49 (d, $J = 9.8$ Hz, 2H, H-2, H-4), 4.35 (d, $J = 9.8$ Hz, 2H, H-2, H-4).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 196.81 (COCH₃), 159.72 (CONH), 158.95 (NCONH), 156.84 (C-12'c), 145.13 (C-1''), 139.64 (C-6'a), 133.55 (C-8'), 130.91 (C-4''), 130.16 (C-9'), 129.84 (C-3''), 129.66 (C-8'a), 129.23 (C-11'), 128.72 (C-12'a), 125.91 (C-12'), 125.45 (C-10'), 121.41 (C-3'), 119.92 (C-4'), 118.07 (C-2''), 117.13 (C-7'), 107.58 (C-4'a), 106.60 (C-12'b), 76.52 (C-3), 64.80 (C-2, C-4), 26.80 (CH₃).

4.24 Σύνθεση του αίθυλο 4-(5'-οξο-5',6'-διυδροσπειρο[αζετιδινό-3,2'-βενζο[f]πυρανο[3,2-c]κινολινο]-1-καρβοξαμιδο)βενζοϊκού εστέρα (28)

Για τη σύνθεση του παραγώγου **28**, ακολουθείται η πορεία που περιγράφεται για το παράγωγο **26**. Μετά το πέρας της αντίδρασης, παρατηρείται ο σχηματισμός στερεού, το οποίο και διηθείται υπό κενό, εκπλένεται με νερό και ξηραίνεται σε ξηραντήρα κενού. Λαμβάνονται 65 mg (53 %) καστανόχρωμου στερεού πρακτικά καθαρού.

Σ.Τ.>280 °C (Διμεθυλοφορμαμίδιο/Νερό)

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 12.14 (s, 1H, NH), 9.35 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-12'), 9.11 (s, 1H, NCONH), 8.07 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-8'), 7.98 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-9'), 7.93 – 7.83 (m, 2H, H-3''), 7.73 – 7.63 (m, 3H, H-11', H-2''), 7.58 – 7.46 (m, 2H, H-7', H-10'), 6.78 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H, H-4'), 6.16 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H, H-3'), 4.49 (d, $J = 9.8$ Hz, 2H, H-2, H-4), 4.34 (d, $J = 9.8$ Hz, 2H, H-2, H-4), 4.28 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH₂), 1.32 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 165.96 (COCH_2CH_3), 159.72 (CONH), 158.96 (NCONH), 156.88 (C-12'c), 145.11 (C-1''), 139.64 (C-6'a), 133.55 (C-8'), 130.56 (C-3''), 130.16 (C-9'), 129.66 (C-8'a), 129.23 (C-11'), 128.72 (C-12'a), 125.90 (C-10'), 125.45 (C-12'), 123.21 (C-4''), 121.41 (C-3'), 119.92 (C-4'), 118.21 (C-2''), 117.12 (C-7'), 107.58 (C-4'a), 106.60 (C-12'b), 76.53 (C-3), 64.81 (C-2, C-4), 60.71 (CH_2), 14.72 (CH_3).

4.25 Σύνθεση του 4-(5'-οξο-5',6'-διϋδροσπειρο[αζετιδino-3,2'-βενζο[f]πυρανο[3,2-c]κινολino]-1-καρβοξαμιδο)βενζοϊκού οξέος (29).

Σε σφαιρική που περιέχει τον εστέρα **28** (40 mg, 0.08 mmol) και αιθανόλη (10 mL), προστίθεται υδατικό διάλυμα καυστικού νατρίου 20% (0.2 mL, 1 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 hr. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το μίγμα εξουδετερώνεται με τριφθοροξικό οξύ και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Στη συνέχεια προστίθεται μεθανόλη και πεντάνιο και παρατηρείται ο σχηματισμός ιζήματος, το οποίο διηθείται και εκπλένεται με νερό. Λαμβάνονται 24 mg (52 %) λευκού στερεού.

Σ.Τ.>280 °C

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 12.60 (s, D₂O exchange, 1H, COOH), 12.14 (s, 1H, NH), 9.35 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-12'), 9.07 (s, 1H, NCONH), 8.07 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-8'), 7.97 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-9'), 7.87- 7.85 (m, 2H, H-3''), 7.72 – 7.63 (m, 3H, H-11', H-2''), 7.58 – 7.46 (m, 2H, H-7', H-10'), 6.78 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H, H-4'), 6.16 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H, H-3'), 4.49 (d, $J = 9.8$ Hz, 2H, H-2, H-4), 4.34 (d, $J = 9.8$ Hz, 2H, H-2, H-4).

^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 167.52 (COOH), 159.72 (CONH), 158.96 (NCONH), 156.95 (C-12'c), 144.77 (C-1''), 139.64 (C-6'a), 133.55 (C-8'), 130.72 (C-3''), 130.16 (C-9'), 129.66 (C-8'a), 129.39 (C-11'), 128.72 (C-12'a), 125.90 (C-12'), 125.45 (C-10'), 124.11 (C-4''), 121.42 (C-3'), 119.91 (C-4'), 118.14 (C-2''), 117.12 (C-7'), 107.58 (C-4'a), 106.61 (C-12'b), 76.54 (C-3), 64.80 (C-2, C-4).

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Cragg, G. M. & Newman, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1830**, 3670–3695 (2013).
2. Waterman, P. G. Alkaloids of the rutaceae: their distribution and systematic significance. *Biochem. Syst. Ecol.* **3**, 149–180 (1975).
3. Jansen, O. *et al.* Screening of 14 alkaloids isolated from *Haplophyllum* A. Juss. for their cytotoxic properties. *J. Ethnopharmacol.* **105**, 241–245 (2006).
4. Durairandiyar, V. & Ignacimuthu, S. Antibacterial and antifungal activity of Flindersine isolated from the traditional medicinal plant, *Toddalia asiatica* (L.) Lam. *J. Ethnopharmacol.* **123**, 494–498 (2009).
5. Hanawa, F., Fokialakis, N. & Skaltsounis, A.-L. Photo-Activated DNA Binding and Antimicrobial Activities of Furoquinoline and Pyranoquinolone Alkaloids from Rutaceae. *Planta Med.* **70**, 531–535 (2004).
6. Rahmani, M., Ling, C. Y., Meon, S., Mohd Ismail, H. B. & Sukari, M. A. The Antifungal Activity of *Glycosmis calcicola* and *G. rupestris* Extracts. *Pharm. Biol.* **42**, 430–433 (2004).
7. Kamikawa, T. *et al.* SRS-A antagonist pyranoquinolone alkaloids from East African *Fagara* plants and their synthesis. *Bioorg. Med. Chem.* **4**, 1317–1320 (1996).
8. Cantrell, C. L. *et al.* Isolation and Identification of Antifungal and Antialgal Alkaloids from *Haplophyllum sieversii*. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 7741–7748 (2005).
9. Christopher, E. *et al.* Indoloquinazoline Alkaloids from *Araliopsis tabouensis*. *Helv. Chim. Acta* **86**, 2914–2918 (2003).
10. Chen, I.-S. *et al.* Pyranoquinoline alkaloids from *Zanthoxylum simulans*. *Phytochemistry* **46**, 525–529 (1997).
11. Chen, I.-S. *et al.* Chemical and Bioactive Constituents from *Zanthoxylum simulans*. *J. Nat. Prod.* **57**, 1206–1211 (1994).

12. Matthes, H., and E. Schreiber. 'über hautreizende Hölzer.' *Ber Dtsch Pharm Ges* 24 (1914): 385-444.
13. Duraipandiyar, V., Ayyanar, M. & Ignacimuthu, S. Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India. *BMC Complement. Altern. Med.* **6**, (2006).
14. Stephen Irudayaraj, S., Sunil, C., Duraipandiyar, V. & Ignacimuthu, S. Antidiabetic and antioxidant activities of *Toddalia asiatica* (L.) Lam. leaves in Streptozotocin induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* **143**, 515–523 (2012).
15. Banbury, L. K. *et al.* Compounds from *Geijera parviflora* with prostaglandin E2 inhibitory activity may explain its traditional use for pain relief. *J. Ethnopharmacol.* **163**, 251–255 (2015).
16. Aranda, S., Laguna, A. & de la Luna, S. DYRK family of protein kinases: evolutionary relationships, biochemical properties, and functional roles. *FASEB J.* **25**, 449–462 (2011).
17. Kentrup, H. *et al.* Dyrk, a dual specificity protein kinase with unique structural features whose activity is dependent on tyrosine residues between subdomains VII and VIII. *J. Biol. Chem.* **271**, 3488–3495 (1996).
18. Becker, W. & Sippl, W. Activation, regulation, and inhibition of DYRK1A: Activation, regulation, and inhibition of DYRK1A. *FEBS J.* **278**, 246–256 (2011).
19. Adayev, T. *et al.* Dual-Specificity Tyrosine Phosphorylation-Regulated Kinase 1A Does Not Require Tyrosine Phosphorylation for Activity in Vitro †. *Biochemistry (Mosc.)* **46**, 7614–7624 (2007).
20. Sitz, J. H., Tigges, M., Baumgartel, K., Khaspekov, L. G. & Lutz, B. Dyrk1A Potentiates Steroid Hormone-Induced Transcription via the Chromatin Remodeling Factor Arip4. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 5821–5834 (2004).

21. Yang, E. J., Ahn, Y. S. & Chung, K. C. Protein Kinase Dyrk1 Activates cAMP Response Element-binding Protein during Neuronal Differentiation in Hippocampal Progenitor Cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 39819–39824 (2001).
22. de Graaf, K. *et al.* The protein kinase DYRK1A phosphorylates the splicing factor SF3b1/SAP155 at Thr434, a novel in vivo phosphorylation site. *BMC Biochem.* **7**, 7 (2006).
23. Huang, Y. *et al.* Mnb/Dyrk1A phosphorylation regulates the interaction of dynamin 1 with SH3 domain-containing proteins. *Biochemistry (Mosc.)* **43**, 10173–10185 (2004).
24. Woods, Y. L. *et al.* The kinase DYRK1A phosphorylates the transcription factor FKHR at Ser329 in vitro, a novel in vivo phosphorylation site. *Biochem. J.* **355**, 597–607 (2001).
25. Skurat, A. V. & Dietrich, A. D. Phosphorylation of Ser⁶⁴⁰ in Muscle Glycogen Synthase by DYRK Family Protein Kinases. *J. Biol. Chem.* **279**, 2490–2498 (2004).
26. Gwack, Y. *et al.* A genome-wide Drosophila RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT. *Nature* **441**, 646–650 (2006).
27. Kelly, P. A. DYRK1A Enhances the Mitogen-activated Protein Kinase Cascade in PC12 Cells by Forming a Complex with Ras, B-Raf, and MEK1. *Mol. Biol. Cell* **16**, 3562–3573 (2005).
28. Matsuo, R., Ochiai, W., Nakashima, K. & Taga, T. A new expression cloning strategy for isolation of substrate-specific kinases by using phosphorylation site-specific antibody. *J. Immunol. Methods* **247**, 141–151 (2001).
29. Woods, Y. L. *et al.* The kinase DYRK phosphorylates protein-synthesis initiation factor eIF2Bepsilon at Ser539 and the microtubule-associated protein tau at Thr212: potential role for DYRK as a glycogen synthase kinase 3-priming kinase. *Biochem. J.* **355**, 609–615 (2001).
30. Tejedor, F. *et al.* minibrain: a new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in Drosophila. *Neuron* **14**, 287–301 (1995).

31. Götz, M. & Huttner, W. B. The cell biology of neurogenesis: Developmental cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 777–788 (2005).
32. Hämmerle, B. *et al.* Mnb/Dyrk1A Is Transiently Expressed and Asymmetrically Segregated in Neural Progenitor Cells at the Transition to Neurogenic Divisions. *Dev. Biol.* **246**, 259–273 (2002).
33. Dierssen, M. & de Lagrán, M. M. DYRK1A (Dual-Specificity Tyrosine-Phosphorylated and -Regulated Kinase 1A): A Gene with Dosage Effect During Development and Neurogenesis. *Sci. World J.* **6**, 1911–1922 (2006).
34. Song, W. J. *et al.* Isolation of human and murine homologues of the Drosophila minibrain gene: human homologue maps to 21q22.2 in the Down syndrome ‘critical region’. *Genomics* **38**, 331–339 (1996).
35. Sadowski, M. *et al.* Entorhinal cortex of aged subjects with Down’s syndrome shows severe neuronal loss caused by neurofibrillary pathology. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **97**, 156–164 (1999).
36. LaFerla, F. M. & Oddo, S. Alzheimer’s disease: A β , tau and synaptic dysfunction. *Trends Mol. Med.* **11**, 170–176 (2005).
37. Cataldo, A. M. *et al.* App Gene Dosage Modulates Endosomal Abnormalities of Alzheimer’s Disease in a Segmental Trisomy 16 Mouse Model of Down Syndrome. *J. Neurosci.* **23**, 6788–6792 (2003).
38. Ryoo, S.-R. *et al.* Dual-specificity tyrosine(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A-mediated phosphorylation of amyloid precursor protein: evidence for a functional link between Down syndrome and Alzheimer’s disease. *J. Neurochem.* **104**, 1333–1344 (2008).
39. Guo, T., Noble, W. & Hanger, D. P. Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **133**, 665–704 (2017).

40. Woods, Y. L. *et al.* The kinase DYRK phosphorylates protein-synthesis initiation factor eIF2Bε at Ser539 and the microtubule-associated protein tau at Thr212: potential role for DYRK as a glycogen synthase kinase 3-priming kinase. *Biochem. J.* **355**, 609–615 (2001).
41. Göckler, N. *et al.* Harmine specifically inhibits protein kinase DYRK1A and interferes with neurite formation: Harmine, a specific inhibitor of DYRK1A. *FEBS J.* **276**, 6324–6337 (2009).
42. McLAUCHLAN, H., Elliott, M. & Cohen, P. The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem. J.* **371**, 199–204 (2003).
43. De la Torre, R. *et al.* Epigallocatechin-3-gallate, a DYRK1A inhibitor, rescues cognitive deficits in Down syndrome mouse models and in humans. *Mol. Nutr. Food Res.* **58**, 278–288 (2014).
44. Koo, K. A. *et al.* QSAR analysis of pyrazolidine-3,5-diones derivatives as Dyrk1A inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 2324–2328 (2009).
45. Ogawa, Y. *et al.* Development of a novel selective inhibitor of the Down syndrome-related kinase Dyrk1A. *Nat. Commun.* **1**, 1–9 (2010).
46. Giraud, F. *et al.* Synthesis, Protein Kinase Inhibitory Potencies, and in Vitro Antiproliferative Activities of Meridianin Derivatives. *J. Med. Chem.* **54**, 4474–4489 (2011).
47. Neagoie, C. *et al.* Synthesis of chromeno[3,4-b]indoles as Lamellarin D analogues : A novel DYRK1A inhibitor class. *Eur. J. Med. Chem.* **49**, 379–396 (2012).
48. Smith, B., Medda, F., Gokhale, V., Dunckley, T. & Hulme, C. Recent Advances in the Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Selective DYRK1A Inhibitors: A New Avenue for a Disease Modifying Treatment of Alzheimer's? *ACS Chem. Neurosci.* **3**, 857–872 (2012).

49. Hlubucek, J., Ritchie, E. & Taylor, W. Synthesis of 2,2-dimethylchromens. *Aust. J. Chem.* **24**, 2347 (1971).
50. Iyer, M. & Trivedi, G. K. Synthesis of 2, 2-Dimethyl-2H-chromenes via a Palladium (II) Catalysed Reaction. *Synth. Commun.* **20**, 1347–1351 (1990).
51. Talley, J. J. Synthesis of 4- and 6-Substituted 2,2-Dimethyl-2 H -chromenes. *Synthesis* **1983**, 845–847 (1983).
52. Chauder, B. A., Lopes, C. C., Lopes, R. S. C., da Silva, A. J. M. & Snieckus, V. Phenylboronic Acid-Mediated Synthesis of 2H-Chromenes. *Synthesis* **1998**, 279–282 (1998).
53. Cossy, J., Rakotoarisoa, H., Kahn, P. & Desmurs, J.-R. A one-pot synthesis of functionalized 2,2-disubstituted 2H-1-benzopyrans. *Tetrahedron Lett.* **39**, 9671–9674 (1998).
54. Bandaranayake, W. M., Crombie, L. & Whiting, D. A. 3-Hydroxy-3-methyl-1,1-dimethoxybutane, a new reagent for dimethylchromenylation: synthesis of lonchocarpin, jacareubin, evodionol methyl ether, and other chromens. *J. Chem. Soc. C Org.* 811 (1971). doi:10.1039/j39710000811
55. Mondal, M., Puranik, V. G. & Argade, N. P. Facile Synthesis of 1,3,7-Trihydroxyxanthone and Its Regioselective Coupling Reactions with Prenal: Simple and Efficient Access to Osajaxanthone and Nigrolineaxanthone F[†]. *J. Org. Chem.* **71**, 4992–4995 (2006).
56. Li, Y., Luo, Y., Huang, W., Wang, J. & Lu, W. Total synthesis of mallotophilippen C. *Tetrahedron Lett.* **47**, 4153–4155 (2006).
57. Adler, M. J. & Baldwin, S. W. Direct, regioselective synthesis of 2,2-dimethyl-2H-chromenes. Total syntheses of octandrenolone and precocenes I and II. *Tetrahedron Lett.* **50**, 5075–5079 (2009).
58. Wittig, G. & Haag, A. Über Phosphin-alkylene als olefinbildende Reagenzien, VIII. Allenderivate aus Ketenen. *Chem. Ber.* **96**, 1535–1543 (1963).

59. Vedejs, E. & Marth, C. F. Mechanism of Wittig reaction: evidence against betaine intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 3905–3909 (1990).
60. Byrne, P. A. & Gilheany, D. G. The modern interpretation of the Wittig reaction mechanism. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 6670 (2013).
61. Burkhard, J. A., Guérot, C., Knust, H., Rogers-Evans, M. & Carreira, E. M. Synthesis and Structural Analysis of a New Class of Azaspiro[3.3]heptanes as Building Blocks for Medicinal Chemistry. *Org. Lett.* **12**, 1944–1947 (2010).
62. Jung, E. J., Park, B. H. & Lee, Y. R. Environmentally benign, one-pot synthesis of pyrans by domino Knoevenagel/6π-electrocyclization in water and application to natural products. *Green Chem.* **12**, 2003 (2010).
63. Van De Water, R. W. & Pettus, T. R. R. o-Quinone methides: intermediates underdeveloped and underutilized in organic synthesis. *Tetrahedron* **58**, 5367–5405 (2002).
64. Singh, M. S., Nagaraju, A., Anand, N. & Chowdhury, S. ortho-Quinone methide (o-QM): a highly reactive, ephemeral and versatile intermediate in organic synthesis. *RSC Adv* **4**, 55924–55959 (2014).
65. Ramesh, M., Mohan, P. S. & Shanmugam, P. A convenient synthesis of flindersine, atanine and their analogues. *Tetrahedron* **40**, 4041–4049 (1984).
66. Lee, Y. R. *et al.* One-Pot Preparation of Pyranoquinolinones by Ytterbium(III) Trifluoromethanesulfonate-Catalyzed Reactions: Efficient Synthesis of Flindersine, N-Methylflindersine, and Zanthosimuline Natural Products. *Synthesis* **2001**, 1851–1855 (2001).
67. Shobana, N., Yeshoda, P. & Shanmugam, P. A convenient approach to the synthesis of prenyl-, furo- and pyrano-quinoline alkaloids of the rutaceae. *Tetrahedron* **45**, 757–762 (1989).

68. Wang, X. & Lee, Y. Efficient Synthesis of Substituted Pyranoquinolinones from 2,4-Dihydroxy-quinoline: Total Synthesis of Zanthosimuline, *cis*-3',4'-Dihydroxy-3',4'-di-hydroflindersine, and Orixalone D. *Synthesis* **2007**, 3044–3050 (2007).
69. Liu, Q., Luedtke, N. W. & Tor, Y. A simple conversion of amines into monosubstituted ureas in organic and aqueous solvents. *Tetrahedron Lett.* **42**, 1445–1447 (2001).
70. Jin, W. *et al.* A Unique Class of Duocarmycin and CC-1065 Analogues Subject to Reductive Activation. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 15391–15397 (2007).
71. Shioiri, Takayuki. Diphenyl Phosphorazidate (DPPA)- More Than Three Decades Later. *TCI MAIL* **134**, 2–19 (2007).
72. Ninomiya, K., Shioiri, T. & Yamada, S. Phosphorus in organic synthesis—VII. *Tetrahedron* **30**, 2151–2157 (1974).
73. Zhang, S.-L., Huang, Z.-S., Li, Y.-M., Chan, A. S. C. & Gu, L.-Q. Synthesis of zwitterionic 4-hydroxy-2(1H)-quinolinone derivatives. *Tetrahedron* **64**, 4403–4407 (2008).
74. Arya, K. & Agarwal, M. Microwave prompted multigram synthesis, structural determination, and photo-antiproliferative activity of fluorinated 4-hydroxyquinolinones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17**, 86–93 (2007).
75. Ahmed, N. *et al.* Synthesis and anti-HIV activity of alkylated quinoline 2,4-diols. *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 2872–2879 (2010).
76. Gao, W.-T., Hou, W.-D., Zheng, M.-R. & Tang, L.-J. Clean and Convenient One-Pot Synthesis of 4-Hydroxycoumarin and 4-Hydroxy-2-quinolinone Derivatives. *Synth. Commun.* **40**, 732–738 (2010).
77. Kumar, M., Kumawat, L. K., Gupta, V. K. & Sharma, A. Rational design of the first furoquinolinol based molecular systems for easy detection of Cu²⁺ with potential applications in the area of membrane sensing. *RSC Adv.* **5**, 106030–106037 (2015).

78. Zewge, D., Chen, C., Deer, C., Dormer, P. G. & Hughes, D. L. A Mild and Efficient Synthesis of 4-Quinolones and Quinolone Heterocycles. *J. Org. Chem.* **72**, 4276–4279 (2007).
79. Dong, Y. *et al.* Antitumor Agents. 272. Structure–Activity Relationships and In Vivo Selective Anti-Breast Cancer Activity of Novel Neo-tanshinlactone Analogues. *J. Med. Chem.* **53**, 2299–2308 (2010).