



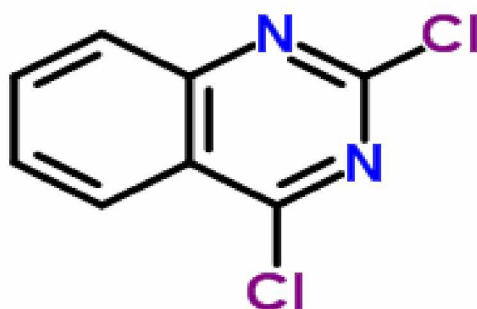
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟ-ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Σύνθεση 2-τριαζολυλο-υποκατεστημένων παραγώγων κιναζολίνης ως πιθανών αναστολέων της p97 AAA+ ATPάσης με κυτταροτοξική δράση»

«Synthesis of 2-triazolyl- substituted quinazoline derivatives as potential inhibitors of p97 AAA+ ATPase with cytotoxic activity»



Αμάραντος Γεώργιος του Χρήστου

ΛΑΡΙΣΑ 2021

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κομιώτης Δημήτριος : Καθηγητής Οργανικής Χημείας, με έμφαση στη Σύνθεση Μορίων, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μήτσος Χρήστος : Μέλος Εργαστηριακού Διδακτικού Προσωπικού (Ε. ΔΙ. Π.) στο εργαστήριο της Οργανικής και Βιο-οργανικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κολλάτος Νικόλαος : Ακαδημαϊκός Υπότροφος, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Κομιώτη Δημήτριο για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία σε έναν τομέα, ο οποίος με ενθουσίασε ιδιαίτερα από το πρώτο έτος.

Η διπλωματική μου εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο της Οργανικής και Βιο-οργανικής Χημείας, με επιβλέποντα καθηγητή τον κύριο Χρήστο Μήτσο, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον για όλη τη βοήθεια και την καθοδήγηση που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της πτυχιακής εργασίας, για όλο το χρόνο που αφιέρωσε, καθώς και για όλες τις γνώσεις που με βοήθησε να αποκτήσω κατά τη διάρκεια πραγματοποίησης της πτυχιακής εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	5
Abstract	6
1.Εισαγωγή.....	
1.1 Το μόριο της Κιναζολίνη	7
1.2 Πρωτεΐνη p97.....	8
1.2.1 Δομή πρωτεΐνης p97.....	9
1.2.2 Δράση πρωτεΐνης p97	10
1.2.3 p97 και ασθένειες.....	11
1.2.4 Παραδείγματα αναστολέων της πρωτεΐνης p97 έναντι του καρκίνου.....	12
2. Σκοπός	13
3. Πειραματικές Τεχνικές	
3.1. Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC)	15
3.2. Χρωματογραφία Στήλης	16
3.3. Rotary Evaporator	17
3.4. Φασματοσκοπία Πυρινικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)	18
3.5. Μικροκύματα	18
4.Πειραματική Διαδικασία	
4.1. Συνθετική Πορεία	19
4.2 Σύντομη Ανάπτυξη των Αντιδράσεων	20
4.3 Αντιδράσεις	21
5. Φάσματα NMR	27
6. Συμπεράσματα	33
Βιβλιογραφία	34

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κιναζολίνη είναι μία δικυκλική ετεροκυκλική ένωση η οποία περιέχει έναν βενζολικό δακτύλιο. Σχηματίζεται από τη συμπύκνωση ενός βενζολίου και μίας πυριμιδίνης. Η κιναζολίνη ως μόριο δεν έχει κάποια σημαντική δράση. Ωστόσο, η προσθήκη στο μόριο της κιναζολίνης κατάλληλων ομάδων και υποκαταστατών, οδηγεί στον σχηματισμό μορίων τα οποία έχουν παρατηρηθεί να εμφανίζουν ιατροφαρμακευτική δράση.

Η p97 είναι μία AAA+ ATPάση, η οποία συνδεδεμένη με συγκεκριμένους συμπαράγοντες και άλλα μόρια οδηγεί σε μία σειρά βιολογικών λειτουργιών και αντιδράσεων , με απώτερο στόχο την μεταβολή της σταθερότητας συγκεκριμένων μεμβρανών , οργανιδίων, ακόμα και της ίδιας της χρωματίνης. Η αύξηση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης παρατηρείται έντονα σε αρκετούς καρκινικούς τύπους, καθώς και σε αρκετές ασθένειες.

Στην αναγραφόμενη διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε ο σχηματισμός νέων παραγώγων με αρχικό αντιδρόν τη 2,4 – διχλωρο- κιναζολίνη, τα οποία πιθανότατα να εμφανίζουν κάποια βιολογική δράση έναντι της πρωτεΐνης p97 ως αντιστρεπτός αναστολέας της. Η ταυτοποίηση των συγκεκριμένων μορίων πραγματοποιήθηκε με κατάλληλες φασματοσκοπικές μεθόδους.

ABSTRACT

Quinazoline is a bicyclic heterocyclic compound containing a benzene ring. It is formed by the fusion of benzyne and pyrimidine. Quinazoline as a molecule doesn't have any significant effect. However, the addition to quinazoline molecule of appropriate groups and substituents, leads to the formation of molecules that have been observed to show medical and clinical activity.

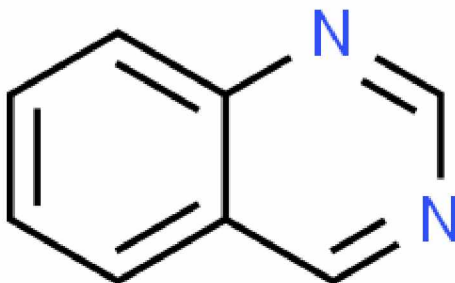
P97 is an AAA + ATPase, which binds to specific cofactors and other molecules leading to a series of biological functions and reactions, with the aim of altering the stability of specific membranes, organelles, and even chromatin itself. The increase of this protein is strongly observed in several types of cancer, as well as in several diseases.

In the thesis, new derivatives were formed with first molecule the 2,4-dichloro-quinazoline, which of them probably have a biological activity against the protein p97 as its reversible inhibitor. The identification of these molecules was performed by appropriate spectroscopic methods.

1. Εισαγωγή

1.1 Κιναζολίνη

Η κιναζολίνη είναι μία δικυκλική ετεροκυκλική ένωση, της οποίας ο μοριακός τύπος είναι $C_8H_6N_2$. Το μόριο της κιναζολίνης αποτελείται από έναν βενζολικό και έναν πυριμιδινικό δακτύλιο. Η συγκεκριμένη ένωση μπορεί να προκύψει με μία εκτενή ποικιλία αντιδράσεων, με κυριότερη αυτών την σύντηξη ενός βενζολίου και μιας πυριμιδίνης. Η χημική αυτή ένωση είναι στερεά και έχει κίτρινο χρώμα.



Εικόνα 1: Κιναζολίνη

Η κιναζολίνη από την πρώτη παρασκευή της σε εργαστήριο μέχρι σήμερα έχει χρησιμοποιήσει αρκετά διαφορετικά ονόματα, όπως φαινιμίζινη, 5,6-βενζυλαμίνη, 1,3-διαζαναφθαλίνη κ.α.

1.2 Valosin containing protein (VCP) or p97

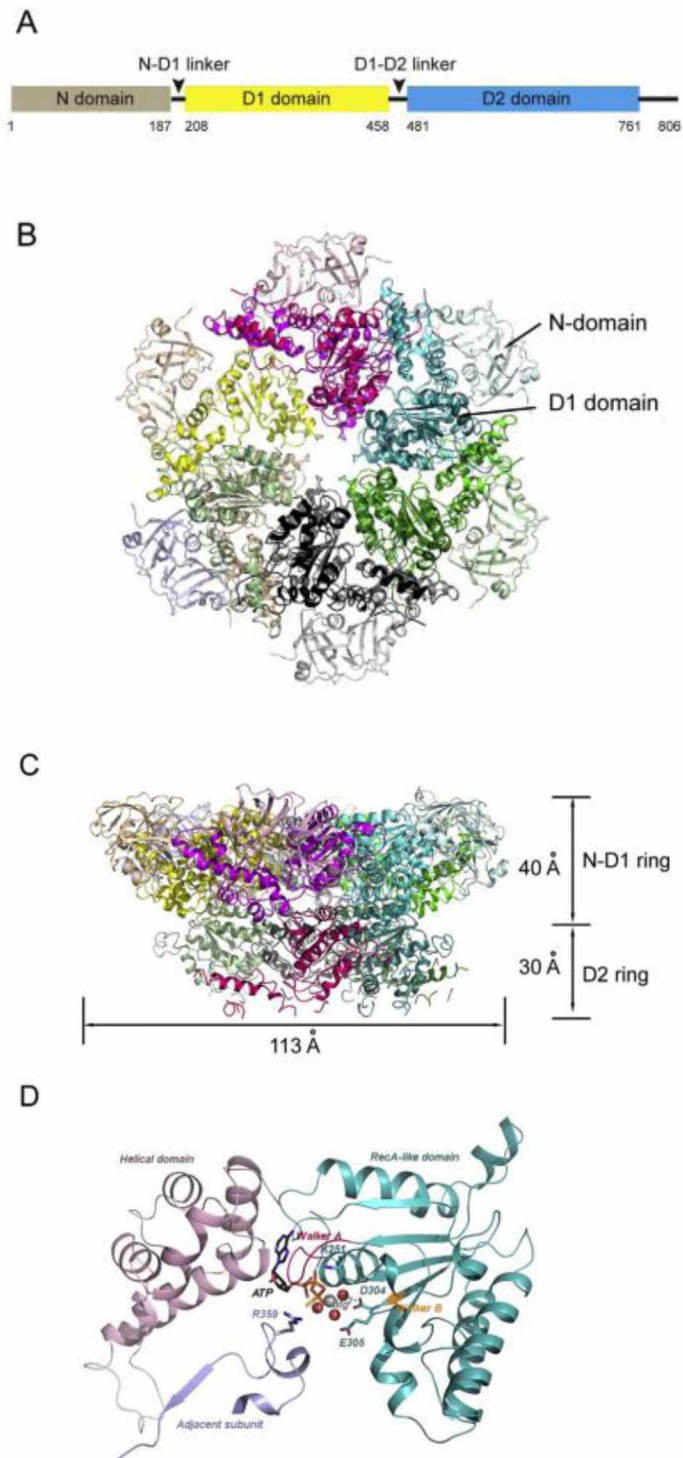
Γενικά

Η p97 (γνωστή και ως VCP στα θηλαστικά) είναι εξελικτικά διατηρημένη πρωτεΐνη, συγκεκριμένα ATPάση, της οικογένειας των AAA+ ATPασών, η οποία εμφανίζεται τόσο σε ευκαρυωτικά κύτταρα όσο και σε αρχαία. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη όταν συζεύγνεται με συγκεκριμένους συμπαράγοντες και προσαρμοστές οδηγεί σε μία σειρά βιολογικών λειτουργιών και αντιδράσεων, οι οποίες έχουν ως στόχο την μεταβολή της σταθερότητας συγκεκριμένων πρωτεϊνών (λειτουργία πρωτεΐνης συνοδού). Αντλώντας ενέργεια από την υδρόλυση του ATP, η p97 οδηγεί στον διαχωρισμό των ακίνητων μορίων, όπως συγκροτήματα πρωτεϊνών, οργανίδια και τη χρωματίνη, με τελικό αποτέλεσμα τα ελεύθερα αυτά πεπτίδια να μπορούν να ανακυκλωθούν ή να αποδομηθούν από το σύστημα του πρωτεασώματος-ουβικιτίνης.

1.2.1 Δομή

Η p97 είναι μία τύπου II AAA+ ATPάση καθώς αποτελείται από δύο δομικές υπομονάδες, τις D1 και D2, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με ένα μικρό πολυπεπτίδιο. Η υπομονάδα D1 συνδέεται μέσω ενός άλλου πολυπεπτιδίου στο αμινοτελικό άκρο της ATPάσης, το οποίο είναι αρκετά μεγάλο. Από την άλλη, η υπομονάδα D2 προσαρτάται με μία πολλή κοντή ουρά περίπου 40 αμινοξέων στο καρβοξυτελικό άκρο. Η λειτουργικότητα της ATPάσης παρατηρείται κυρίως με το αμινοτελικό άκρο, καθώς εκεί προσδένονται οι περισσότεροι κατάλληλοι προσαρμοστές και συμπαράγοντες, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι δεν υπάρχουν και μόρια τα οποία να δεσμεύουν την p97 στο καρβοξυτελικό άκρο. Οι δύο υπομονάδες D1 και D2 είναι ομόλογες τόσο στην αλληλουχία τους όσο και στη δομή τους.

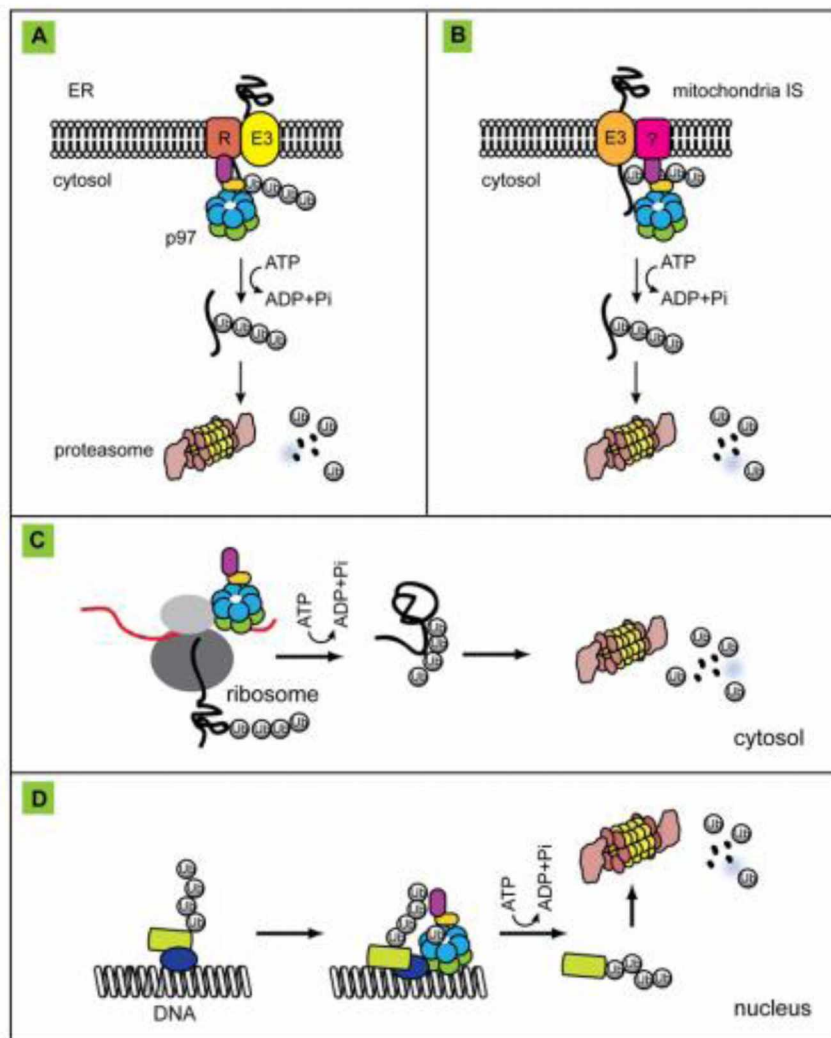
Διαφοροποιούνται, παρ' όλα αυτά στη λειτουργία τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η συναρμολόγηση του εξαμερούς της πρωτεΐνης, στο οποίο χρειάζεται μόνο η μία από τις δύο υπομονάδες και συγκεκριμένα η D1. Όπως και οι υπόλοιπες AAA+ ATPάσες της οικογένειας αυτής, έτσι και η p97, φέρει μία καλά συντηρημένη περιοχή RecA και ένα ελικοειδές πεδίο. Κάθε πεδίο RecA φέρει μία ενεργή θέση η οποία παρατηρείται στη διεπαφή των δύο γειτονικών ενισχυτών του εξαμερικού συστήματος της πρωτεΐνης. Το ενεργό σημείο της πρωτεΐνης σχηματίζεται με τη χρήση μοτίβων τύπου Walker A, αποτελούμενο από P-βρόγχους, και μοτίβων τύπου Walker B, το οποίο φέρει ιστιδίνη (h) ως υδρόφοβο αμινοξύ, το οποίο είναι υπεύθυνο για την πρόσδεση των νουκλεοτιδίων και κατά συνέπεια την αποικοδόμησή τους. Η ενεργή αυτή διαμόρφωση επιτρέπει την εμφάνιση δύο καταλοίπων αργινίνης ένα στην D1 (R359) και έναν στη D2 (R635), τα οποία οδηγούν στη διέγερση της πρωτεΐνης. Η δομή της πρωτεΐνης εντοπίστηκε αρχικά με ηλεκτρονική μικροσκοπία και στην συνέχεια με κρυσταλλογραφία με τη χρήση ακτίνων X.



Εικόνα 2: Δομή Πρωτεΐνης p97

1.2.2 Δράση

Η πρωτεΐνη p97 βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και είναι προσδεμένη πάνω σε συγκεκριμένα υποκυτταρικά οργανίδια, όπως στο Golgi, στο ενδοπλασματικό δίκτυο, στα ριβοσώματα, αλλά εμφανίζεται και στον πυρήνα. Η κύρια δράση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης είναι να οδηγεί μη λειτουργικές, καθώς και λανθασμένα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες προς αποικοδόμηση μέσω της σύμπραξης του με το σύστημα ουβικιτίνης πρωτεασώματος. Εντοπίζοντας τις μη λειτουργικές πρωτεΐνες, προσελκύει μόρια ουβικιτίνης πάνω στην επιλεγμένη πρωτεΐνη. Στη συνέχεια, την αποκόβει με τη βοήθεια της E3 λιγάσης και οδηγούνται στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και με τις πρωτεΐνες που είναι συνδεδεμένες με τη χρωματίνη. Η απαραίτητη ενέργεια, την οποία χρειάζεται η συγκεκριμένη πρωτεΐνη για να δράσει αντλείται από την υδρόλυση του ATP.



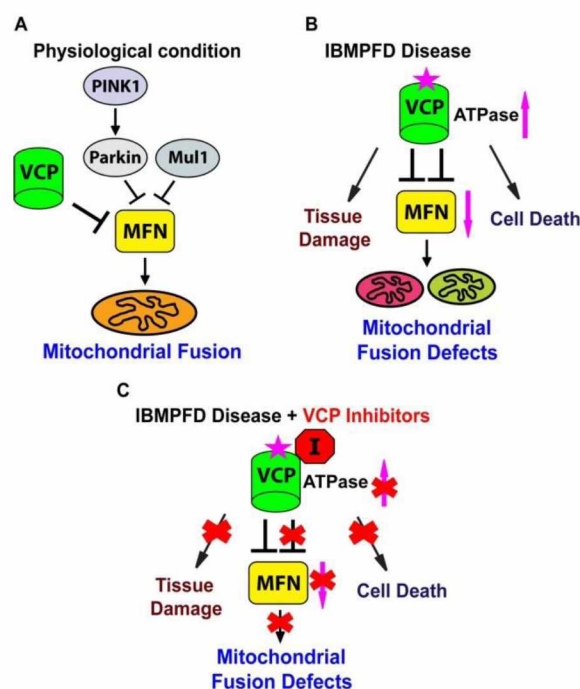
Εικόνα 3: Ενδοκυτταρική Δράση της p97

1.2.3 P97 και Ασθένειες

Η πρωτεΐνη p97 είναι μία ζωτικής σημασίας πρωτεΐνη για το κύτταρο, καθώς οδηγεί στην αποικοδόμηση και ανακύκλωση μη λειτουργικών πρωτεϊνών. Σε αρκετές ασθένειες οι οποίες εμφανίζονται στον άνθρωπο παρατηρείται κάποια μετάλλαξη στην ίδια την πρωτεΐνη. Οι μεταλλάξεις που μπορούν να εμφανιστούν στη συγκεκριμένη πρωτεΐνη είναι ποικίλλες και μπορούν να οδηγήσουν σε πληθώρα ασθενειών, ακόμα και στον καρκίνο. Μία από τις πιο διαδεδομένες ασθένειες στην οποία συμμετέχει η πρωτεΐνη p97 είναι η IBMPFD. Η ασθένεια αυτή σχετίζεται με πρόωμη έναρξη της νόσου Paget και της άνοιας. Είναι μία κατάσταση η οποία δείχνει να επηρεάζει του μυς (μυοπάθειες), τα οστά (νόσος του Paget στα οστά) και τον εγκέφαλο (frontotemporal dementia). Οι περισσότερες από αυτές τις μεταλλάξεις εμφανίζονται στην D1 υπομονάδα και στο αμινοτελικό άκρο, τα οποία είναι απαραίτητα για τη σωστή διαμόρφωση και κατ' επέκταση λειτουργία της πρωτεΐνης.

P97 ως στόχος για την αντιμετώπιση ασθενειών και καρκίνου

Η p97, καθώς εμφανίζεται ευρύτατα σε όλους τους τύπους κυττάρων και συνδέεται έντονα με αρκετές ασθένειες, αποτελεί έναν στόχο για αρκετά φάρμακα, καθώς με την απορύθμιση – αναστολή της συγκεκριμένης πρωτεΐνης με τη βοήθεια κατάλληλων μορίων (αναστολέων), προκαλείται στα κύτταρα Stress το οποίο πιθανότατα οδηγεί στην απόπτωσή τους. Κύτταρα που είναι δυσλειτουργικά (καρκινικά ή μη λειτουργικά) οδηγούνται στον κυτταρικό θάνατο ή αποπίπτουν.

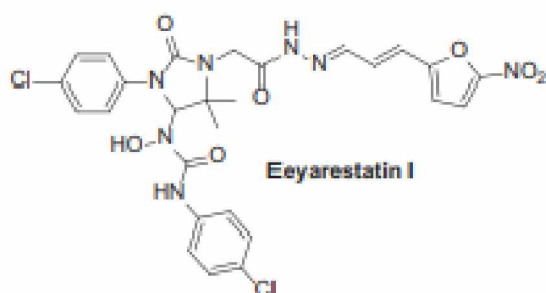


Εικόνα 4: Δράση Αναστολέα p97 στη νόσο IBMPFD

1.2.4 Παραδείγματα αναστολέων της πρωτεΐνης p97 έναντι του καρκίνου

Eeyarestatin (EerI)

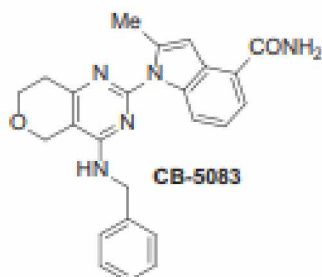
Ο πρώτος αναστολέας που χρησιμοποιήθηκε έναντι της p97 ήταν ο Eeyarestatin (EerI). Ο αναστολέας αυτός έχει δύο λειτουργικά τμήματα: Το ένα είναι ένας δακτύλιος νιτροφουρανίου, ο οποίος προσδένεται στην D1 υπομονάδα της p97, και το δεύτερο περιέχει ένα αρωματικό δακτύλιο ο οποίος δίνει τη δυνατότητα στο μόριο να προσαρμόσει και να εισάγει τον αναστολέα κατάλληλα σε κυτταρικές μεμβράνες, συμπεριλαμβανομένης αυτής του ενδοπλασματικού δικτύου.



Εικόνα 5: Eeyarestatin (EerI)

CB – 5083

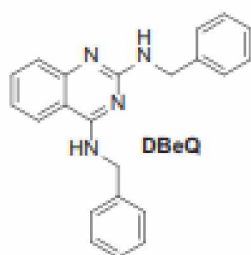
Ο CB – 5083 είναι ένας ισχυρός και τρομερά επιλεκτικός αναστολέας μικρομορίων, ο οποίος στοχεύοντας την p97, οδηγεί τα καρκινικά κύτταρα σε καταστροφή. Έχει παρατηρηθεί ότι έχει αντικαρκινική δράση καθώς μέσα από μία ισχυρή απόκριση πρωτεϊνών, οδηγεί τα καρκινικά κύτταρα σε κυτταρικό θάνατο. Το συγκεκριμένο φάρμακο έχει δείξει αποτέλεσμα έναντι του πολλαπλού μυελώματος και των συμπαγών όγκων in vivo.



Εικόνα 6: CB – 5083

DBeQ

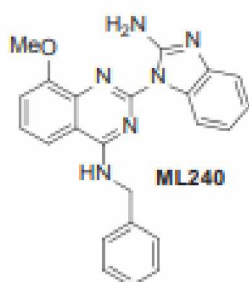
Ταυτοποιήθηκε ως ένας ισχυρός, εξαιρετικά εκλεκτικός, αντιστρεπτός και ανταγωνιστικός του ATP αναστολέας της p97. Παρά τη δράση του ως αναστολέας, έπαιξε καταλυτικό ρόλο και στον προσδιορισμό των διεργασιών που πραγματοποιούνται από την p97, στις οποίες μέχρι τότε επικρατούσε σύγχυση (2011). Το DBeQ δρα κατά της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων ταχύτατα, υπερβαίνοντας την ταχύτητα των αναστολέων του πρωτεασώματος, πυροδοτώντας και κινητοποιώντας τη δράση των κασπασών 3 και 7, οι οποίες οδηγούν τα κύτταρα, και συγκεκριμένα τα καρκινικά, σε θάνατο.



Εικόνα 7: N2,N4 - διβενζυλοκιναζολιν - 2,4 – διαμίνη, DBeQ

ML240

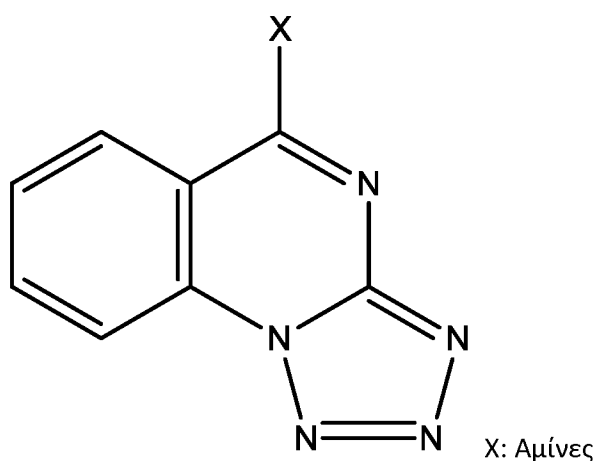
Ένας ακόμη αναστολέας της p97, ο οποίος δρα συσσωρεύοντας ταχύτατα την LC3-II, και κινητοποιεί τις κασπάσες 3 και 7. Οι δύο αυτοί παράγοντες οδηγούν τα καρκινικά κύτταρα στην καταστροφή. Εμφανίζει σημαντικά ταχύτερη δραστηριότητα έναντι των αναστολέων του πρωτεασώματος. Φέρει έντονη αντιπολλαπλασιαστική δράση έναντι αρκετών καρκινικών κυττάρων και όχι τόσο φυσιολογικών κυττάρων, πράγμα που τον καθιστά εκλεκτικό. Χρησιμοποιείται σε συνδυασμό και με άλλους αναστολείς σε μορφή χημειοθεραπείας έναντι ποικίλων μορφών καρκίνου, με κυριότερη εφαρμογή έναντι του καρκίνου του παγκρέατος.



Εικόνα 8: ML240

2. Σκοπός

Όπως αναγράφεται και στο θέμα της διπλωματικής εργασίας, σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας είναι η σύνθεση 2-τριαζόλυλο υποκατεστημένων παραγώγων της κιναζολίνης. Όλες οι ενώσεις ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση κατάλληλης φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR.



Τα παράγωγα αυτά της κιναζολίνης, θα ελεγχθούν ως προς τα βιολογικά τους αποτελέσματα και την πιθανή κυτταροτοξική τους δράση, ως πιθανοί αναστολείς της πρωτεΐνης p97. Εφόσον τα αποτελέσματα που εμφανιστούν είναι θετικά, οι ενώσεις αυτές πιθανότατα να αποτελέσουν καινούργια αντικαρκινικά φάρμακα, έναντι περιπτώσεων στα οποία εμφανίζεται δράση από την p97.

3. Πειραματικές Τεχνικές

Όλες οι χρησιμοποιηθέντες πειραματικές διαδικασίες που ακολουθήθηκαν κατά τη διάρκεια της διεκπεραίωσης της πτυχιακής εργασίας ήταν για την ταυτοποίηση των ενώσεων τόσο σε ποιοτικό όσο και σε ποσοτικό επίπεδο.

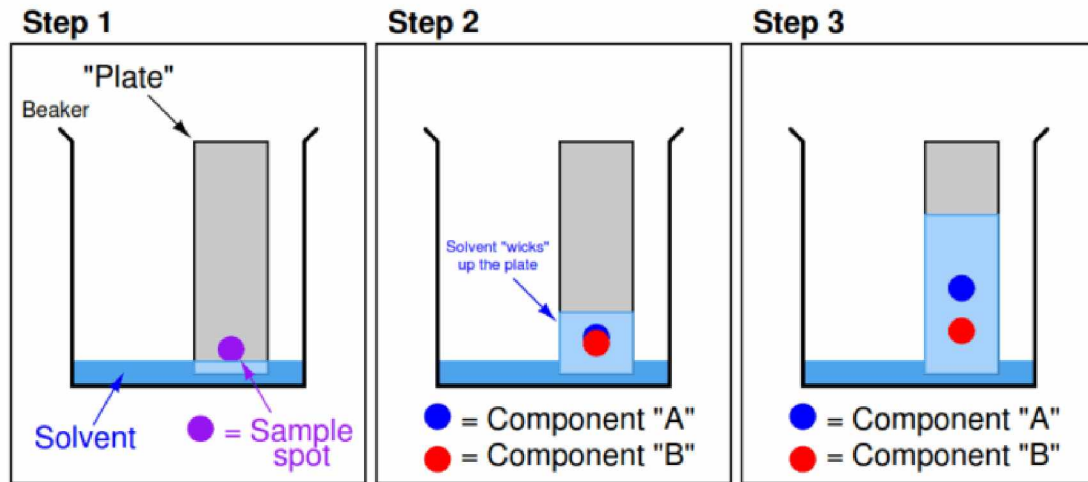
3.1 Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC)

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας ή αλλιώς TLC, είναι μία μέθοδος ποιοτικού ελέγχου, κυρίως της πορείας μιας αντίδρασης. Αποτελεί μία μέθοδο διαχωρισμού μη πτητικών ενώσεων, οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την πολικότητα. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται μεταξύ δύο φάσεων, μιας στατικής και μιας κινητής πάνω στις οποίες προστίθενται οι προς διαχωρισμό ουσίες. Η πιο συνήθης στατική φάση που χρησιμοποιείται είναι το διοξείδιο του φωσφόρου ή silica gel, το οποίο επιστρώνεται συνήθως πάνω σε φύλλα αλουμινίου (εμφανίζεται ωστόσο και επιστρωμένο σε γυαλί). Η κινητή φάση αποτελείται από έναν ή περισσότερους οργανικούς διαλύτες, ανάλογα με την πολικότητα των ουσιών που επρόκειτο να διαχωριστούν.

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται ως εξής: Παραλαβή του επιθυμητού πλακιδίου στο οποίο θα πραγματοποιηθεί ο διαχωρισμός και σημείωση του στο σημείο όπου θα τοποθετηθούν οι ενώσεις που θα διαχωριστούν. Το σημείο αυτό βρίσκεται λίγο πριν τη βάση του πλακιδίου. Στη συνέχεια, σχηματίζεται το επιθυμητό σύστημα διαλυτών, μέσω του οποίου θα πραγματοποιηθεί ο επιθυμητός διαχωρισμός. Αφού οι ουσίες έχουν προσροφήσει στη στατική φάση, το πλακίδιο εισέρχεται στο διαλύτη, και ο διαλύτης αρχίζει να ρέει με φορά από κάτω (σημείο που βρίσκονται κοντά οι ουσίες) προς τα πάνω. Έτσι, ο διαλύτης λόγω τριχοειδών φαινομένων αρχίζει να κινείται κατά μήκος του πλακιδίου συμπαρασύρωντας και τις ενώσεις. Μόλις φτάσει περίπου ένα εκατοστό από την κορυφή του πλακιδίου, η διαδικασία του TLC έχει ολοκληρωθεί. Το πλακίδιο αφαιρείται από το διαλύτη και εισέρχεται κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία για να παρατηρηθεί η θέση των ουσιών.

Με τη μέθοδο είναι δυνατή η παρακολούθηση και της πορείας της αντίδρασης, καθώς η αντιδρούσα ουσία διαφέρει από τη συντιθέμενη ως προς την πολικότητα, και συνεπώς θα εμφανίζεται σε διαφορετική θέση η μία από την άλλη. Έτσι, λαμβάνοντας δείγμα από την αντίδραση μπορούμε να παρατηρήσουμε την παρουσία ή όχι του αντιδρόντος, με τη χρήση του ίδιου του αντιδρόντος ως μάρτυρα. Η απουσία του σε δείγμα από την αντίδραση, υποδηλώνει την ολοκλήρωση της αντίδρασης και την πλήρη μετατροπή του αντιδρόντος στη νέα ουσία.

Thin-layer chromatography



Εικόνα 10: Thin – Layer Chromatography (TLC)

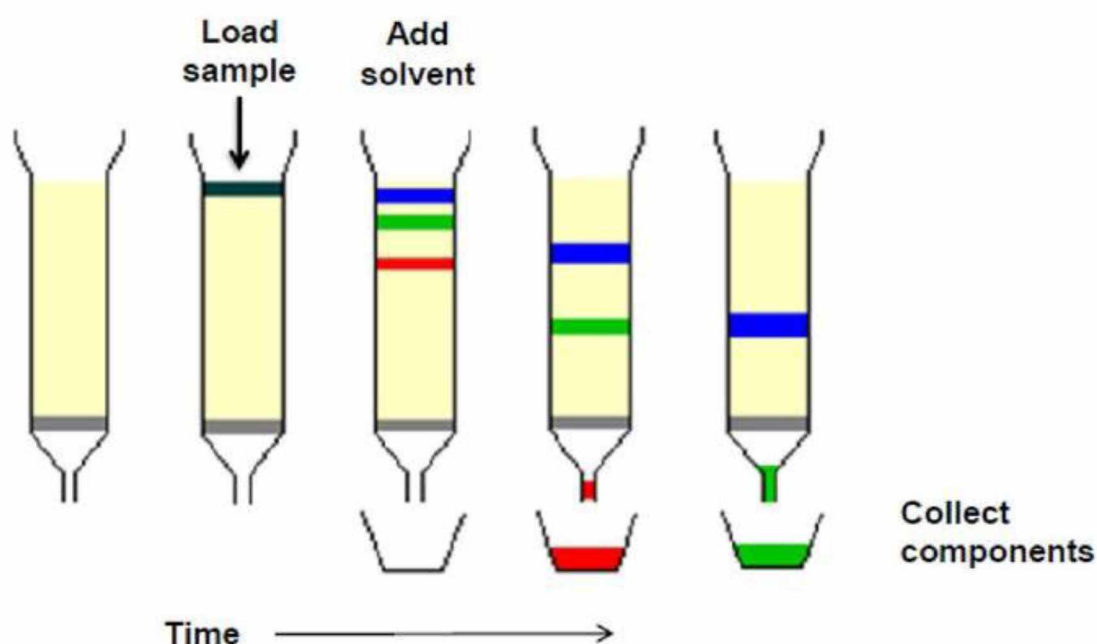
Από τη συγκεκριμένη διαδικασία υπολογίζεται και η σταθερά επιβράδυνσης R_f η οποία ορίζεται ως ο λόγος της απόστασης που διένυσε η ουσία προς την απόσταση που διένυσε ο διαλύτης. Η τιμή του R_f είναι μοναδική για κάθε ουσία.

3.2 Χρωματογραφία Στήλης

Η χρωματογραφία στήλης αποτελεί μία εύκολη και αρκετά αξιόπιστη μέθοδο διαχωρισμού ενώσεων και καθαρισμού τυχών προσμίξεων διαλυμάτων. Και αυτή η διαδικασία βασίζεται στην πολικότητα των ενώσεων, αλλά διαφέρει από την χρωματογραφία λεπτής στιβάδας ως προς την κλίμακα, καθώς η συγκεκριμένη γίνεται σε πολύ μεγαλύτερη κλίμακα από την TLC.

Η χρωματογραφία στήλης είναι μία διαδικασία η οποία πραγματοποιείται ως εξής. Αρχικά, επιλέγεται στήλη για τη χρωματογραφία, κατάλληλη σε μήκος και σε διάμετρο. Στη συνέχεια, βρίσκεται το κατάλληλο σύστημα διαλυτών, του οποίου η πολικότητα θα είναι κατάλληλη για τον καλύτερο διαχωρισμό των ενώσεων. Το σύστημα αυτό βρίσκεται με την προηγούμενη μέθοδο TLC, στην οποία βρίσκεται η σταθερά επιβράδυνσης (R_f). Αφού επιλεγεί το σύστημα, σε αυτό διαλύεται ποσότητα από τη στατική φάση, η οποία και στη συγκεκριμένη χρωματογραφία είναι το διοξείδιο του φωσφόρου (Silica gel). Αυτό τοποθετείται στη στήλη και με τη βοήθεια είτε της βαρύτητας είτε αέρα (Flash chromatography) πακετάρεται. Απομένει μόνο ελάχιστη ποσότητα διαλύτη πάνω από τη silica, έτσι ώστε να αποφευχθεί η πλήρης αφυδάτωση της στατικής φάσης. Έπειτα, σε ελάχιστη ποσότητα διαλύτη εισέρχεται η προς διαχωρισμό ουσία και τοποθετείται πάνω από τη στατική φάση με ιδιαίτερη προσοχή, καθώς η στατική φάση δεν πρέπει να διαταραχθεί.

Αφού προστεθεί και η κινητή φάση, η διαδικασία διαχωρισμού ξεκινάει με την προσθήκη του επιλεχθέντος διαλύτη πάνω από τις δύο φάσεις, και λήψη δειγμάτων τα οποία εκλούνται κάθε συγκεκριμένο όγκο έκλουσης. Οι περισσότερο πολικές ενώσεις συγκρατώνται καλύτερα επάνω στη στατική φάση, πράγμα που καθυστερεί την έξοδο τους από τη στήλη της χρωματογραφίας. Τέλος, ο έλεγχος των ληφθέντων δειγμάτων γίνεται με τη χρήση χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας, για να βρεθούν τα δείγματα στα οποία υπάρχει η επιθυμητή ουσία. Τα δείγματα αυτά συλλέγονται και υποβάλλονται σε διαδικασία απομάκρυνσης των διαλυτών, για πλήρη καθαρισμό της επιθυμητής ουσίας.



Εικόνα 11: Χρωματογραφία Στήλης

3.3 Rotary Evaporator / Rotavap / Rotovap

Ο Rotary Evaporator, είναι μία συσκευή η οποία χρησιμεύει σε εργαστήρια χημείας για την απομάκρυνση των διαλυτών από ουσίες. Η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιείται μετά από ποικιλία αντιδράσεων για τον καθαρισμό της επιθυμητής ουσίας και τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της αντίδρασης. Συνήθως αναφέρεται και ως εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση.



Εικόνα 12: Rotary Evaporator

3.4 Μικροκύματα

Τα μικροκύματα είναι μία συσκευή η οποία βοηθά στη διατήρηση θερμοκρασίας , πίεσης και ισχύος σταθερά καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης , στον επιλεχθέντα χρόνο.



Εικόνα 13: Συσκευή Μικροκυμάτων

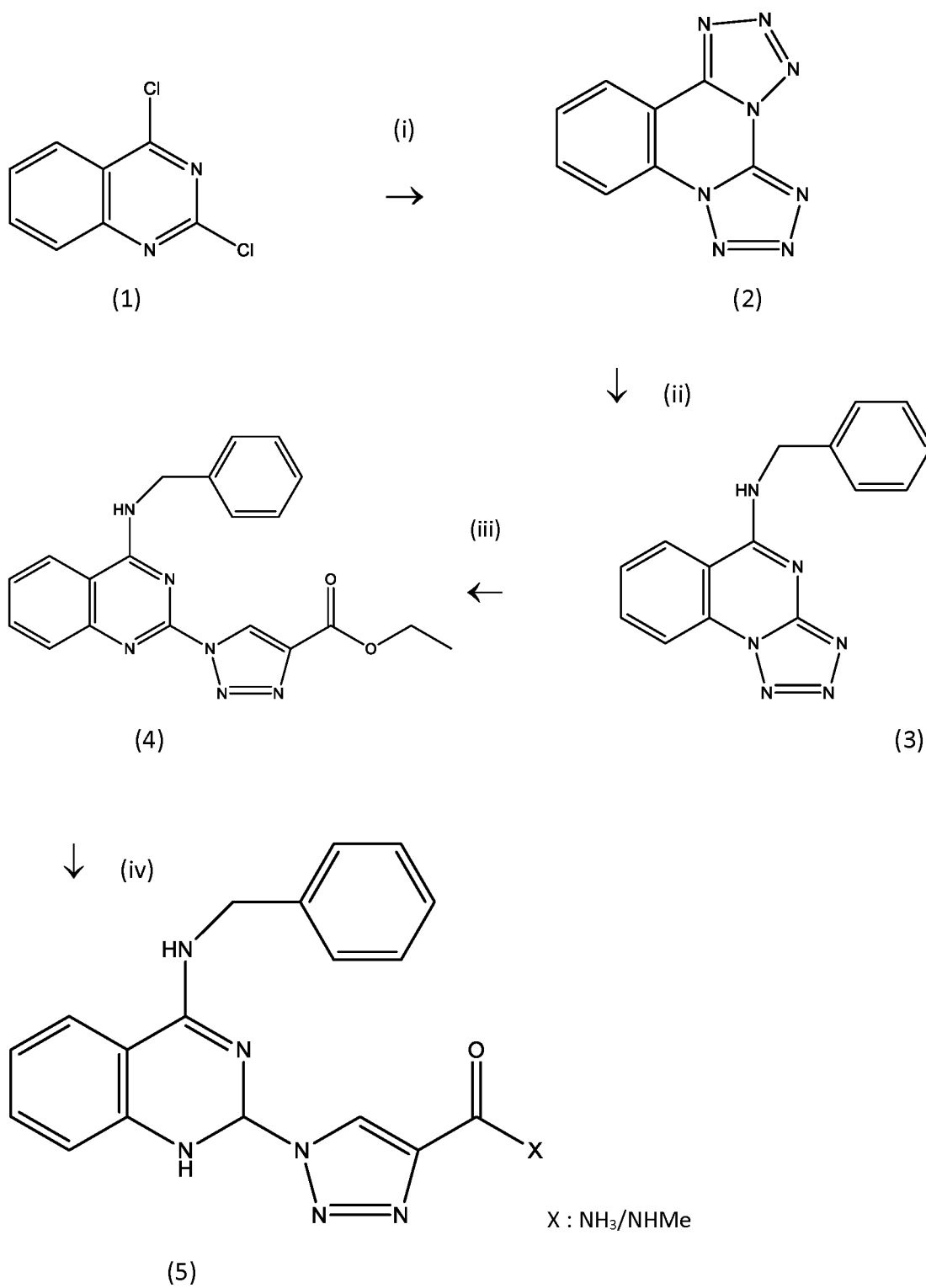
Η συσκευή αυτή λειτουργεί σε συχνότητα 2,45 GHz, και διαθέτει ακτινοβολία από 0 έως 300 Watt, ισχύ που κυμαίνεται από 0 έως 300 Watt, σταθερή πίεση στα 250 PSI και θερμοκρασία ανάλογη της ρύθμισης που θα του δωθεί.

3.5 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού NMR

Είναι μία διαδικασία ευρέως χρησιμοποιούμενη στην οργανική χημεία, καθώς οδηγεί στην ταυτοποίηση και τον έλεγχο του αποτελέσματος αντιδράσεων, με παράλληλη ταυτοποίηση της ένωσης που εμπεριέχεται στο δείγμα. Αυτή η τεχνική εφαρμόζει ακτινοβολία σε μεγάλα μήκη κύματος, με χαμηλή ενέργεια στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων. Η συγκεκριμένη τεχνική βασίζεται στη διέγερση των πυρήνων, οι οποίοι βρίσκονται σε ισχυρό μαγνητικό πεδίο. Οι πιο σημαντικές για την οργανική χημεία αναλύσεις NMR είναι αυτές του ^1H και του ^{13}C . Μέσω της τεχνικής αυτής προσδιορίζεται εύκολα και η δομή της μελετώμενης ουσίας, μέσω του τελικού φάσματος, το οποίο θα παραχθεί μετά το πέρας της διαδικασίας.

4. Πειραματικό Μέρος

4.1 Συνθετική Πορεία



(i) → NaN_3 , DMF

(ii) → DMF, dH_2O

(iii) → CuSO_4 , $5\text{H}_2\text{O}$, NaAsc, THF: H_2O 4:1

(iv) → MeNH_2 , EtOH (για προσθήκη μεθυλαμίνης)/ NH_3 , MeOH (για προσθήκη αμμωνίας)

4.2 Σύντομη Ανάπτυξη των Αντιδράσεων

Η πρώτη ύλη (1) που χρησιμοποιήθηκε ήταν η 2,4-δίχλωρο-κιναζολίνη, η οποία υπήρχε στο εργαστήριο.

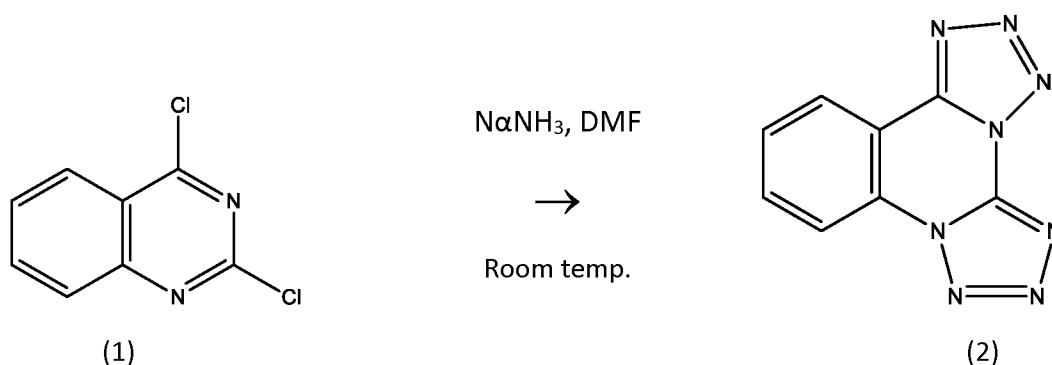
Στην πρώτη αντίδραση (i) πραγματοποιήθηκε πρώτα η προσθήκη του τριαζολίου στην 2,4-δίχλωρο-κιναζολίνη(1), διότι η προσθήκη του τριαζολίου και στις δύο θέσεις ήταν πολύ πιο εύκολη από την προσθήκη εξ αρχής της βενζυλαμίνης ή οποιασδήποτε άλλης αμίνης στη θέση 4 και έπειτα προσθήκη του τριαζολίου. Αυτό γίνεται λόγω της απενεργοποίησης του δακτυλίου της πυριμιδίνης μετά την προσθήκη μία βάσης στη θέση 4, πράγμα το οποίο δυσχεραίνει την είσοδο εκ των υστέρων άλλης ένωσης λιγότερο δραστηκής στη θέση 2.

Έπειτα προσθήκη στην 4-βένζυλάμινο-2-τριαζόλυλο-κιναζολίνη κατάλληλου εστέρα(αντίδραση iii), ο οποίος φέρει αλκίνιο στην πλευρά του οξέως, για να του δίνεται η δυνατότητα προσβολής του τριαζολίου. Η αντίδραση αυτή είναι γνωστή ως CuAAC (copper catalyzed alkyne-azide cycloaddition), η οποία καθώς φαίνεται και από την ονομασία της είναι η υποβοηθούμενη από χαλκό κυκλοπροσθήκη αλκινίου σε αζίδια.

Τέλος η τελευταία αντίδραση (iv), είναι η αντικατάσταση του αλκοολικού τμήματος του εστέρα από αμίνες ή από αμμωνία. Στην παρούσα διπλωματική πραγματοποιήθηκε αντικατάσταση από αμμωνία (NH_3) και από μεθυλαμίνη (MeNH_2).

4.3 Αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν

Αντίδραση (i)



(1): $M_r=199,03 \text{ g/mol}$

NaNH_3 : $M_r=65,01 \text{ g/mol}$

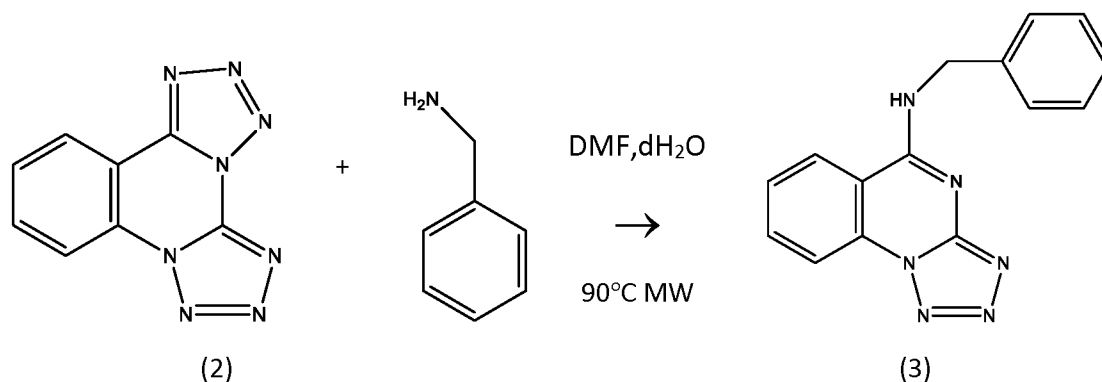
Διαδικασία

Για την προσθήκη και στις δύο θέσεις του NaN_3 , χρειάζεται προσθήκη διπλάσιας ποσότητας από την ποσότητα της (1). Ζύγιση 40mg (0,20 mmol) της (1) και 31 mg (0,48mmol) του NaN_3 , και ανάμιξή τους με 0,4 mL DMF. Υπό ανάδευση εξέλιξη της αντίδρασης, σε θερμοκρασία δωματίου για μία ώρα. Λήψη κατάλληλου TLC, σε σύστημα 3:1 Hex:AcOEt. Παρατήρηση ολοκλήρωσης της αντίδρασης. Προσθήκη κρύου απιοντισμένου νερού (dH_2O), για καθίζηση του προϊόντος. Είσοδος στο ψυγείο για περαιτέρω καθίζηση. Τέλος, διήθηση υπό κενό σε χωνί Buchner.

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά του (2)

Μοριακό Βάρος (M_r)	212,18 g/mol
Διαλύτης	DMF
R_f από TLC 3:1 Hex:AcOEt	~0,3
Απόδοση της αντίδρασης	75,4%

Αντίδραση (ii)



Βενζυλαμίνη : Mr = 107,15 g/mol , d = 0,981 g/mL

Διαδικασία

Ζύγιση 32mg (0,15 mmol) της (2) και διάλυση τους σε 0,1 mL DMF και 0,2 mL dH₂O, σε κατάλληλο σωληνάκι των μικροκυμάτων. Έπειτα, προσθήκη και της βενζυλαμίνης, η οποία βρίσκεται σε υγρή μορφή. Ολιγόλεπτη ανάδευση των συστατικών για βέλτιστη ομογενοποίηση και εισαγωγή στα μικροκύματα σε συνθήκες:

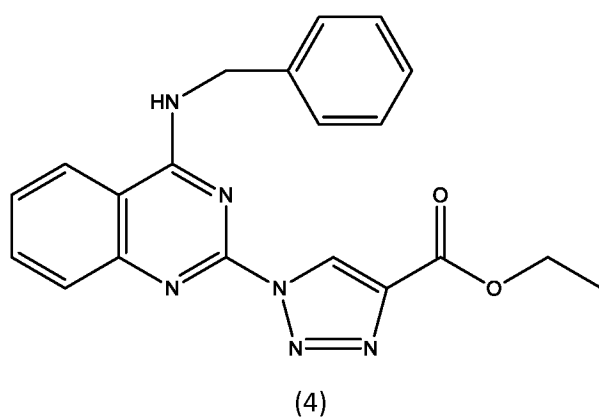
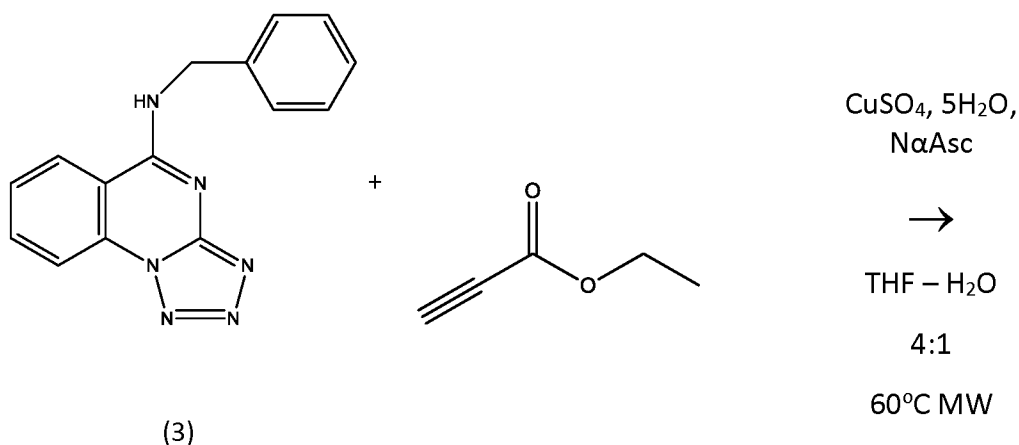
- Θερμοκρασία=90°C
- Πίεση = 250 PSI
- Ισχύς = 200 W

Για 30 λεπτά. Λήψη TLC σε σύστημα 1:1 Hex : AcOEt, και παρατήρηση της ολοκλήρωσης της διαδικασίας. Εξουδετέρωση με αραιό CH₃COOH (10%), για μεταβολή του pH από 10 σε 7. Είσοδος στο ψυγείο για περίπου 20 λεπτά, για περαιτέρω καταβύθιση του προϊόντος. Προσθήκη ελάχιστου dH₂O, και διήθηση υπό κενό σε χωνί Buchner. Περιέγχυση δύο φορές dH₂O ακόμη, και ανασκάλεμα του ήδη υπάρχοντος προϊόντος. Ξήρανση και προσθήκη σε erpendorf.

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά της 3

Μοριακό Βάρος (Mr)	276,30 g/mol
Διαλύτης	THF
Rf από TLC 1:1 Hex : AcOEt	~0,5
Απόδοση	96,6%

Αντίδραση (iii)



Προπυλικός αιθυλεστέρας: Mr=98,10 g/mol , d=0,968 g/mL

Διαδικασία

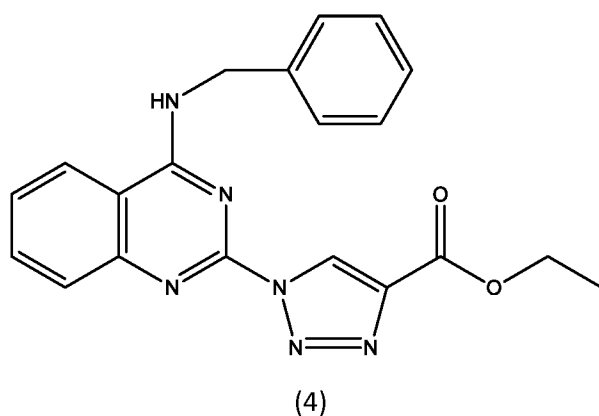
Αρχικά, ζύγιση των στερεών . 14 mg από την (3) (0,05 mmol), 5mg Ασκορβικό Νάτριο (NaAsc), 3mg Θεικό Χαλκό (CuSO₄). Τοποθέτηση της (3) σε κατάλληλη φιάλη για τα μικροκύματα, μαζί με 0,4 mL THF και 10,13 μL (0,1 mmol) από το αλκίνιο. Διοχέτευση αέτιου αζώτου για προστασία, και πομάτισμα της φιάλης. Διάλυση του NaAsc και του CuSO₄ σε erpendorf, με προσθήκη 50 μL dH₂O. Προσθήκη και των δύο αυτών διαλυμένων στερεών στη φιάλη, και είσοδος στα μικροκύματα για την εκκίνηση της αντίδρασης, η οποία πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες: T = 60 °C, Πίεση = 250 PSI, Ισχύς = 200 Watt. Κατόπιν μισής ώρας, λήψη TLC και παρατήρηση της ολοκλήρωσης της αντίδρασης, με την πλήρη μετατροπή του αντιδρόντος σε προϊόν. Κατεργασία με διάλυμα 10ml NaCl και 1ml NH₄OH για δύο φορές. Έπειτα προσθήκη 5ml AcOEt για άλλες δύο φορές. Απομάκρυνση της υγρασίας με τη βοήθεια του θειϊκού νατρίου (Na₂SO₄) . Απομάκρυνση του διαλύτη με εξάτμιση υπό χαμηλή πίεση.

Πίνακας 3: Χαρακτηρισμός της 4

Μοριακό Βάρος (Mr)	374,40 g/mol
Διαλύτης	MeOH/CH ₂ Cl ₂
Rf από TLC, 1:1 Hex:AcOEt	~0,4
Απόδοση	~90%

Στη συγκεκριμένη αντίδραση , παρά τον περαιτέρω καθαρισμό της με χρωματογραφία στήλης, παρατηρήθηκε συγκράτηση του διαλύτη (AcOEt), με αποτέλεσμα να χρειαστεί και δεύτερη χρωματογραφία στήλης για τον καλύτερο καθαρισμό του προϊόντος.

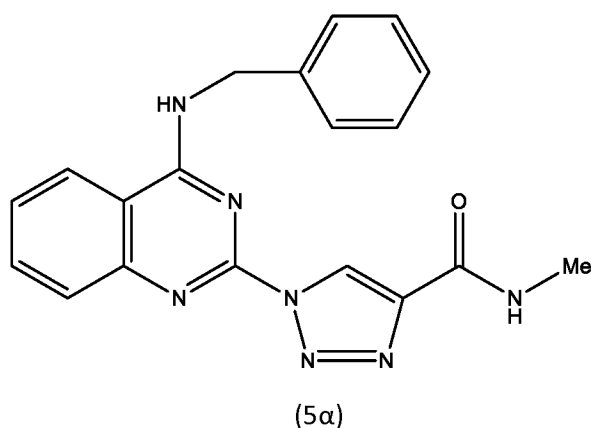
Αντίδραση (iv - a)



MeNH₂, EtOH



Room temp.



Μεθυλαμίνη: Mr = 31,06 g/mol (33% w/v) , d=0,756 g/ml

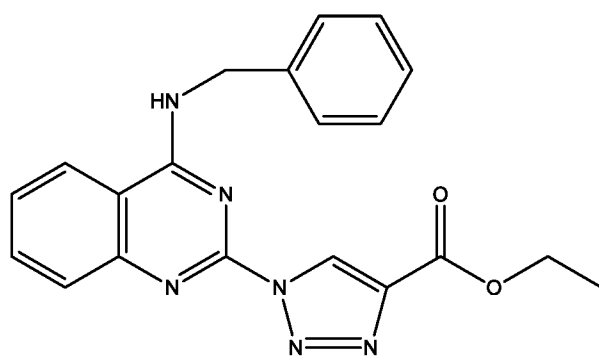
Διαδικασία

Ζύγιση 18 mg (0,051 mmol) της (4) και διάλυση του σε διαλύτη EtOH(αιθανόλη). Προσθήκη σε αυτή 80 ισοδύναμων της μεθυλαμίνης (MeNH₂), δηλαδή 0,5 mL. Διοχέτευση αερίου αζώτου για προστασία της αντίδρασης και πομάτισμα της φιάλης. Λήψη TLC μετά από 30 λεπτά εξέλιξης της αντίδρασης σε σύστημα διαλυτών 1:9 Hex:AcOEt. Παρατήρηση της υπό εξέλιξη αντίδρασης, καθώς παρατηρείται η εμφάνιση του προϊόντος, όχι όμως η πλήρης μετατροπή του αντιδρόντος. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 48 ώρες, πράγμα το οποίο ελέγχθηκε με χρήση TLC στο ίδιο σύστημα διαλυτών. Εξάτμιση των διαλυτών υπό ελαττωμένη πίεση στο rotary evaporator.

Πίνακας 4: Χαρακτηριστικά της 5α

Μοριακό Βάρος (Mr)	359,58 g/mol
Διαλύτης	MeOH/CH ₂ Cl ₂
R _f από TLC 1:9 Hex:AcOEt	~0,2
Απόδοση	87,21%

Αντίδραση (iv – θ)

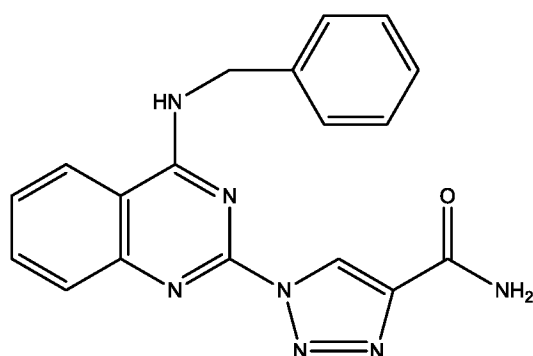


(4)

NH₃, MeOH



Room temp.



(5β)

Διαδικασία

Ζύγιση 16 mg (0,043 mmol) της (4) και προσθήκη αυτών σε κατάλληλο φιαλίδιο. Προσθήκη επαρκούς ποσότητας διαλύματος αμμωνίας σε μεθανόλη, για να κορεστεί το διάλυμα. Λήψη TLC σε σύστημα 1:9 Hex:AcOEt μετά το πέρας μισής ώρας. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε μετά από 24 ώρες, όπου στο TLC παρατηρήθηκε η πλήρης μετατροπή του αντιδρόντος σε προϊόν.

Πίνακας 5: Χαρακτηριστικά 5β

Μοριακό Βάρος (Mr)	345,36 g/mol
Διαλύτης	MeOH/CH ₂ Cl ₂
R _f από TLC 1:9 Hex:AcOEt	0,2
Απόδοση	83,68%

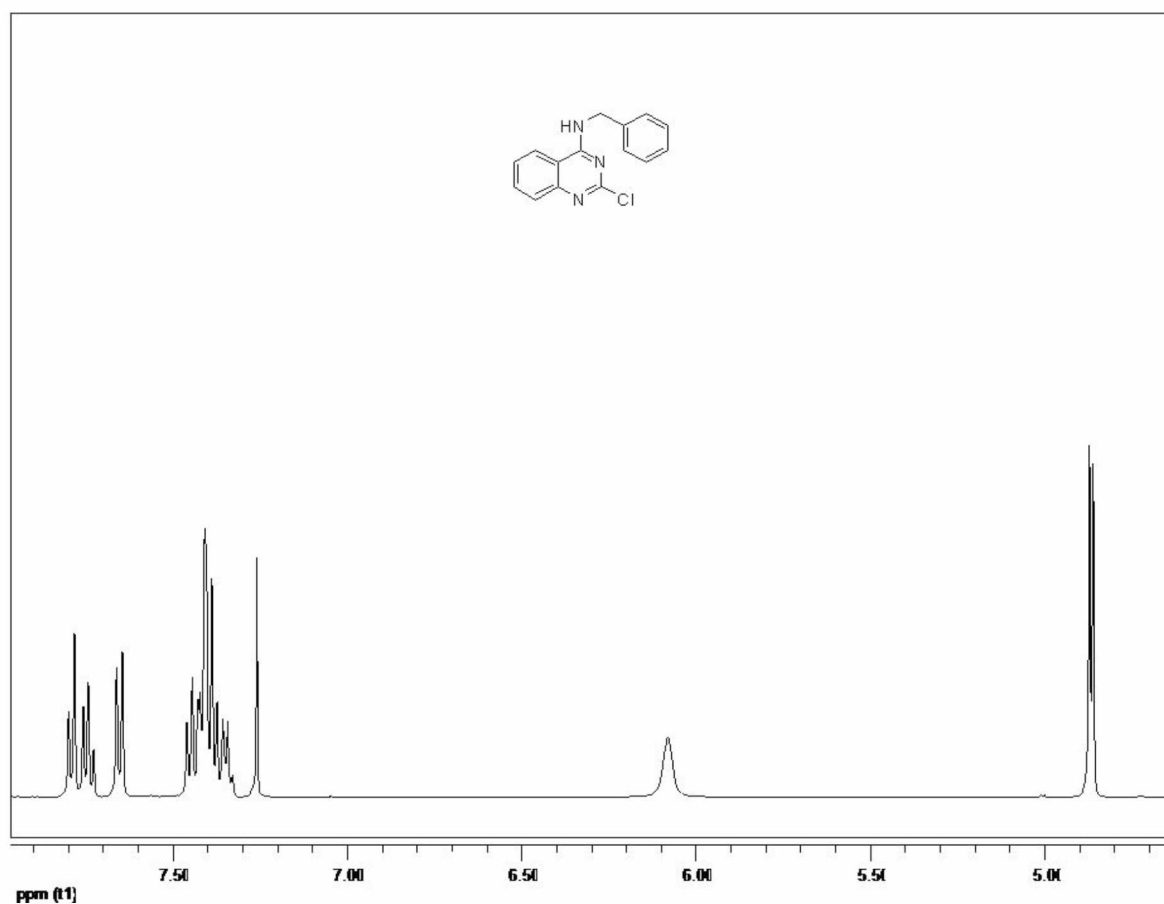
Στη συγκεκριμένη αντίδραση λόγω της περίσσειας της αμμωνίας στη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας παρατηρήθηκε και η εμφάνιση ενός παραπροϊόντος του μεθυλαμιδίου. Πιθανότατα η αντίδραση να είχε ολοκληρωθεί σε μικρότερο χρονικό διάστημα από τις 24 ώρες.

5. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού NMR - Φάσματα

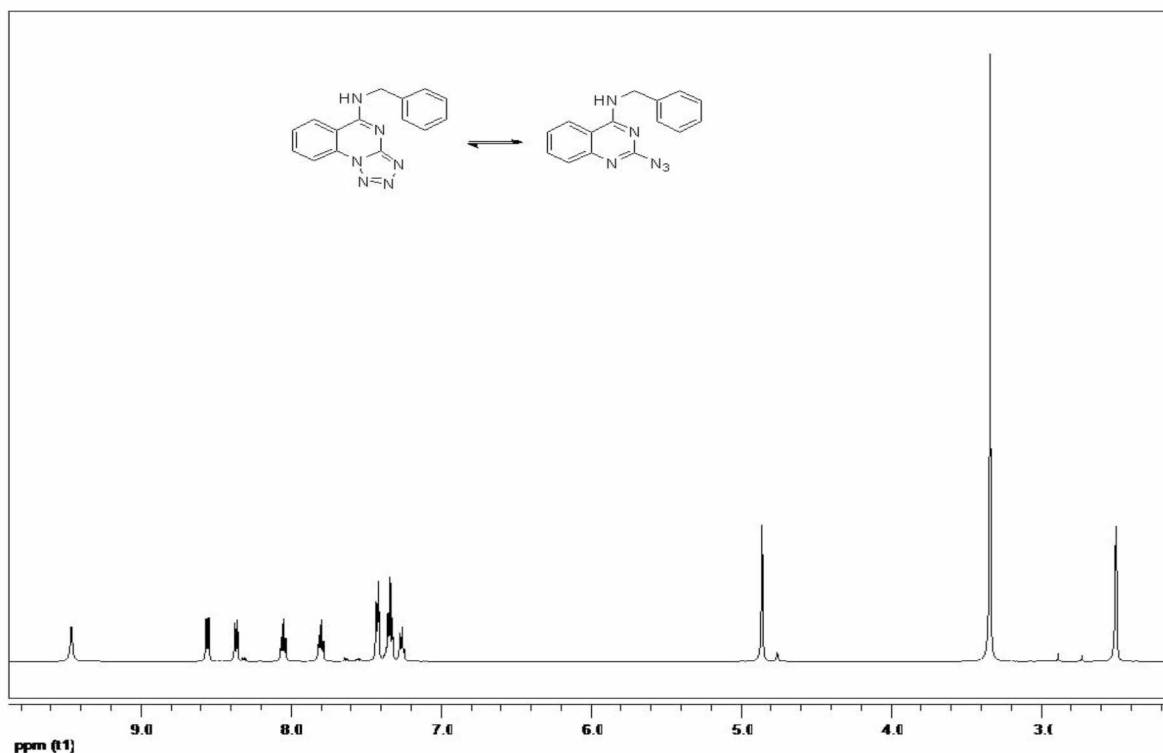
Στην ενότητα αυτή παρίστανται τα φάσματα που λήφθηκαν κατά τη διάρκεια της διεκπερέωσης της διπλωματικής εργασίας και επιβεβαιώνουν τον σχηματισμό των παραπάνω ενώσεων.

Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού τα οποία είναι τα ευρέως χρησιμοποιούμενα στην οργανική και βιο-οργανική χημεία είναι αυτά του ^{13}C και του ^1H . Για κάθε μία από τις παραπάνω ενώσεις υπάρχει αντίστοιχο φάσμα ^{13}C και ^1H , με την κάθε ένωση αποτυπωμένη στο επάνω μέρος του φάσματος.

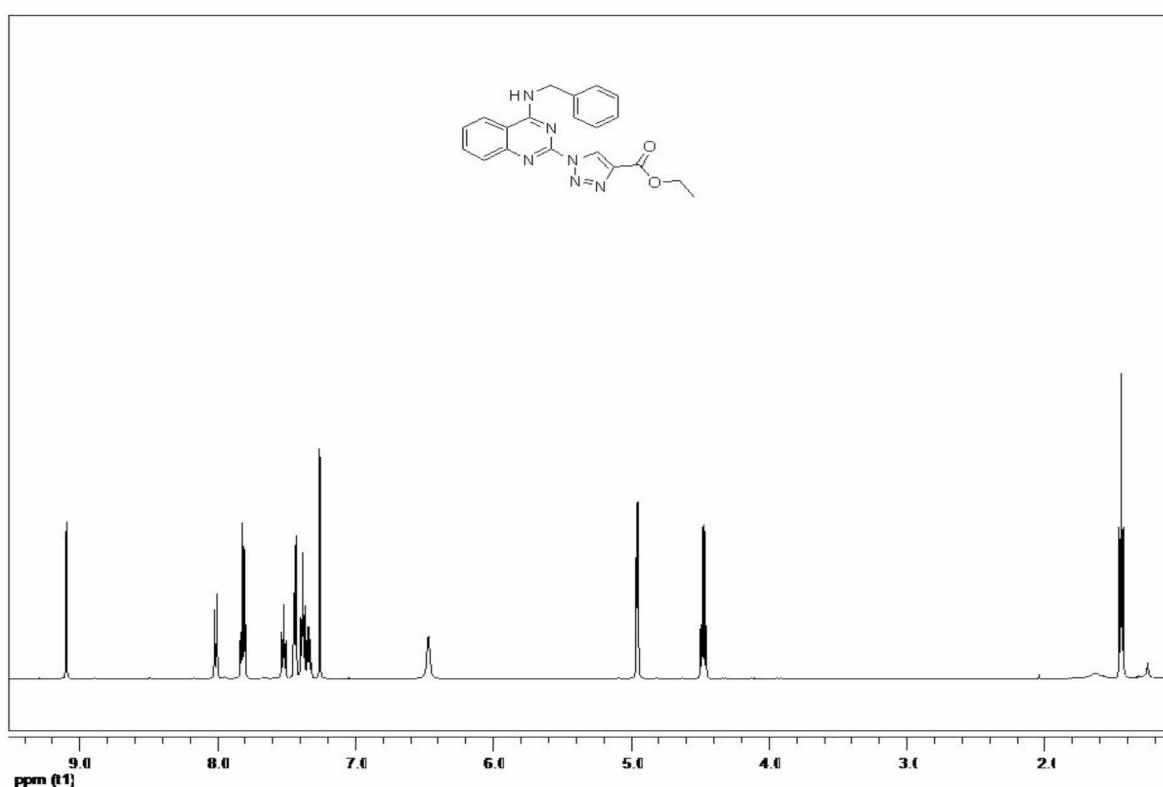
Φάσματα ^1H



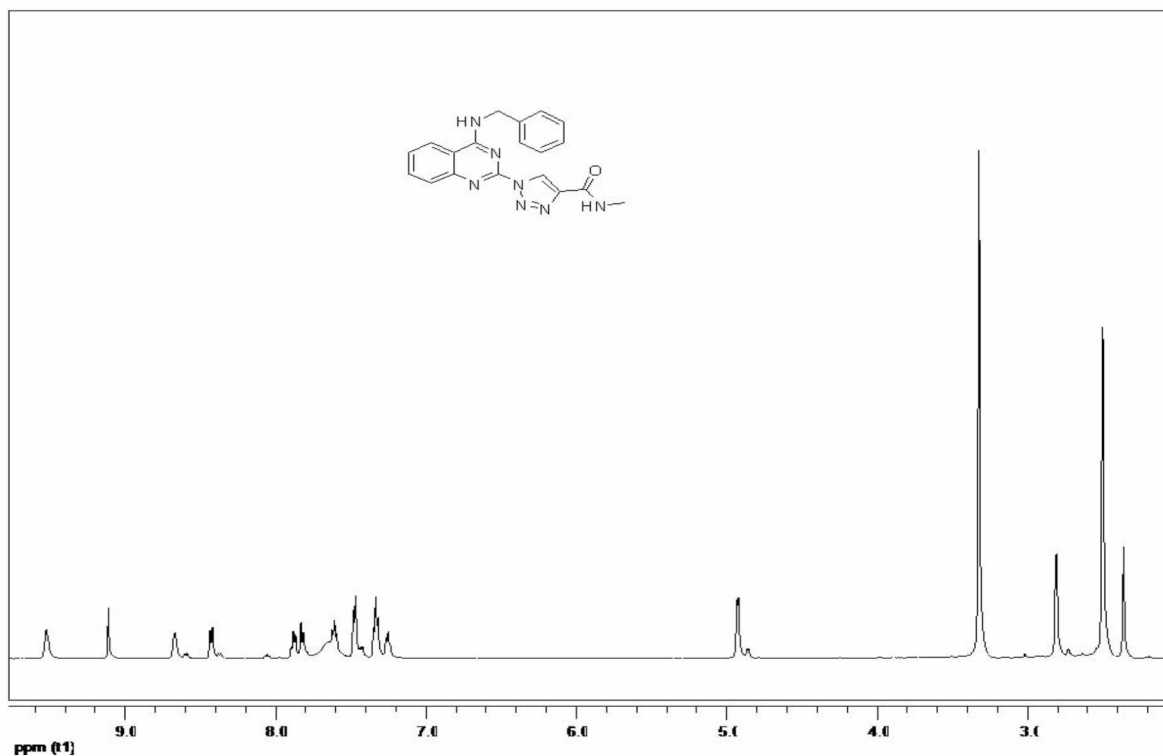
Φάσμα 1 : N – Benzyl – 2 – chloroquinazoline – 4 – amine



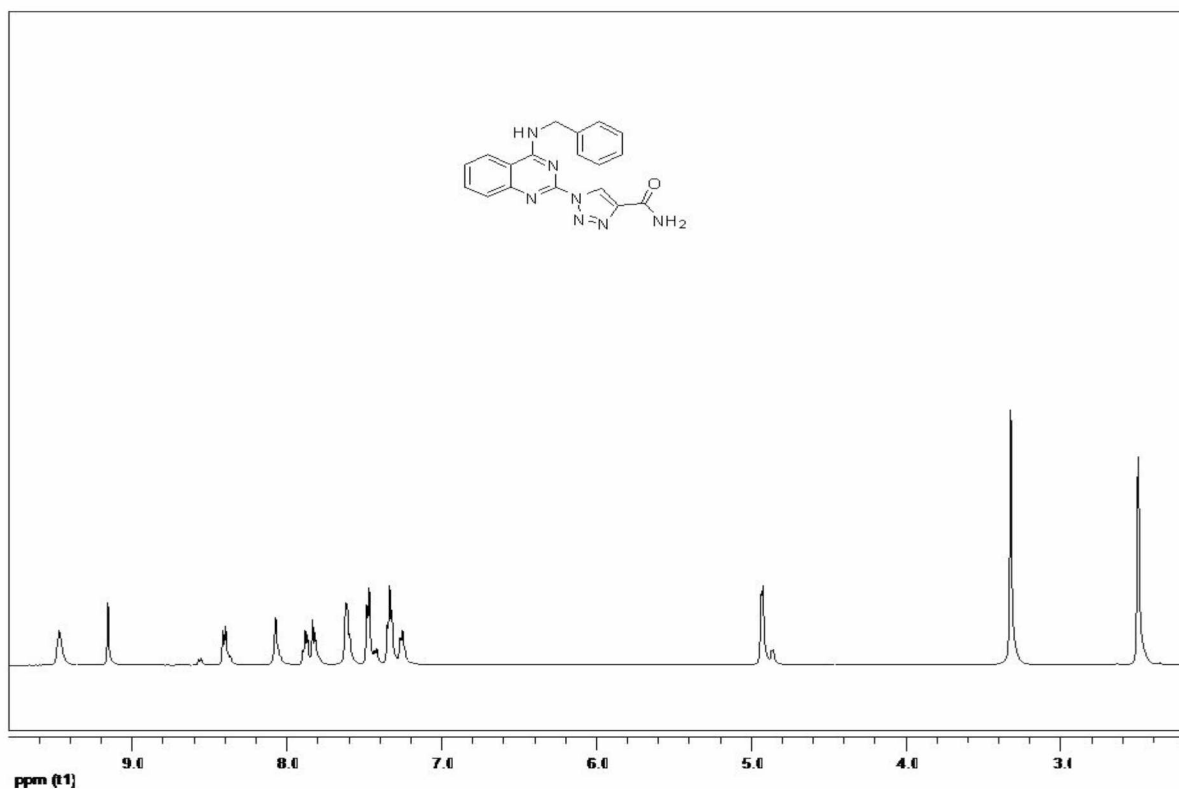
Φάσμα 2 : *N* – Benzyltertazolyl[1,5 a]quinazolin – 5 – amine



Φάσμα 3 : Ethyl 1(4 – benzylamino)quinazolin – 2 – yl) – 1H – 1,2,3 – triazolyl – 4 – carboxylate

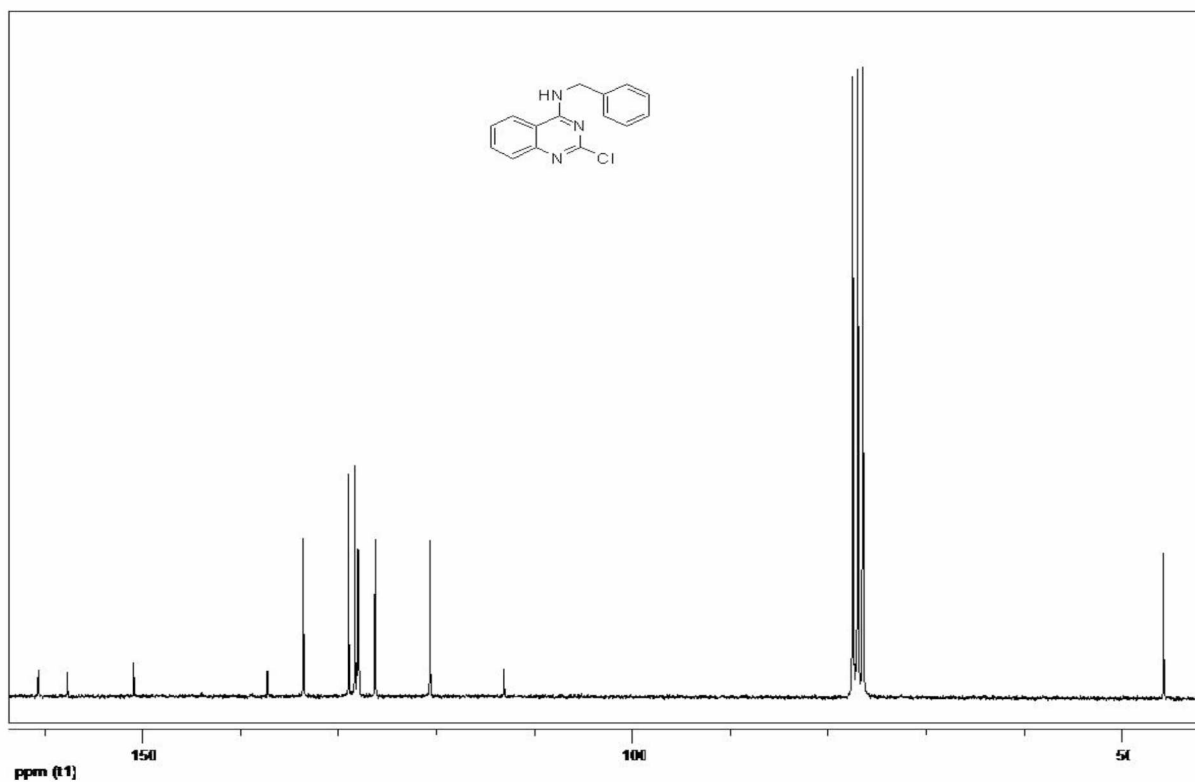


Φάσμα 4 : 1(4 – benzylamino)quinazolin – 2 – yl) – N methyl – 1H – 1,2,3 – triazolyl – 4 – carboxamide

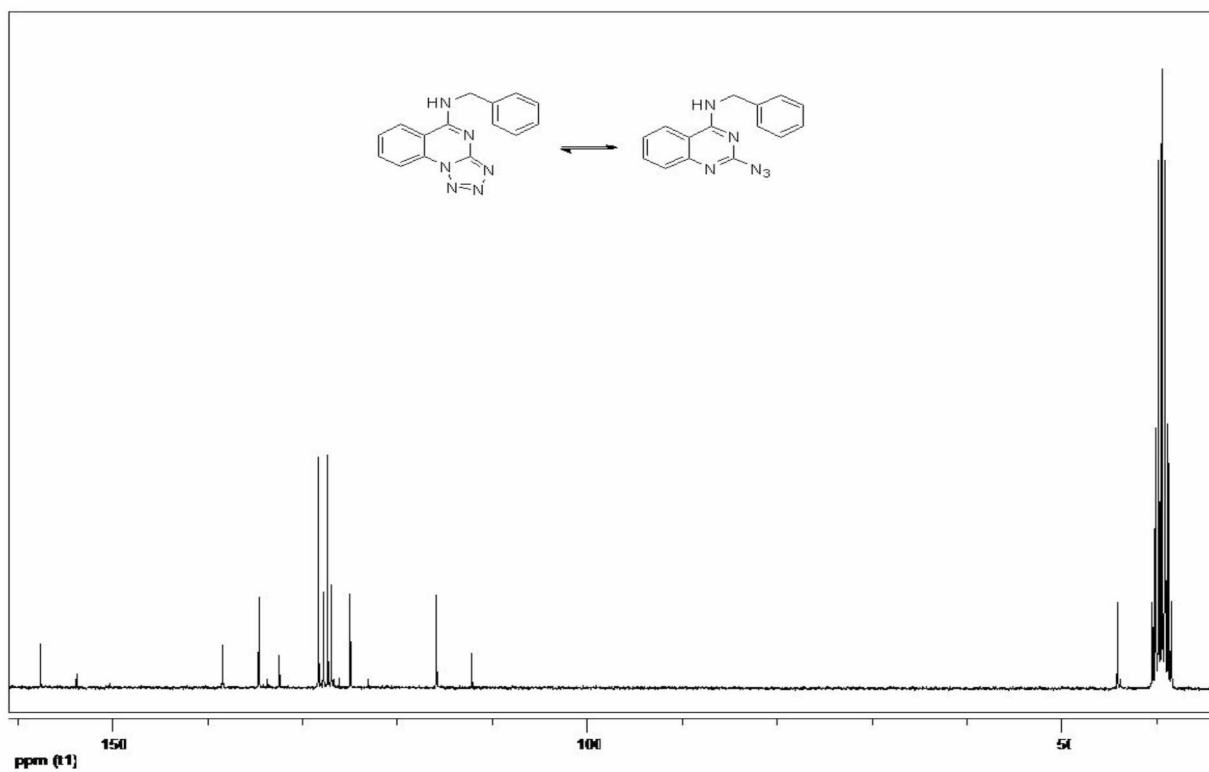


Φάσμα 5 : Ethyl 1(4 – benzylamino)quinazolin – 2 – yl) – 1H – 1,2,3 – triazolyl – 4 – carboxamide

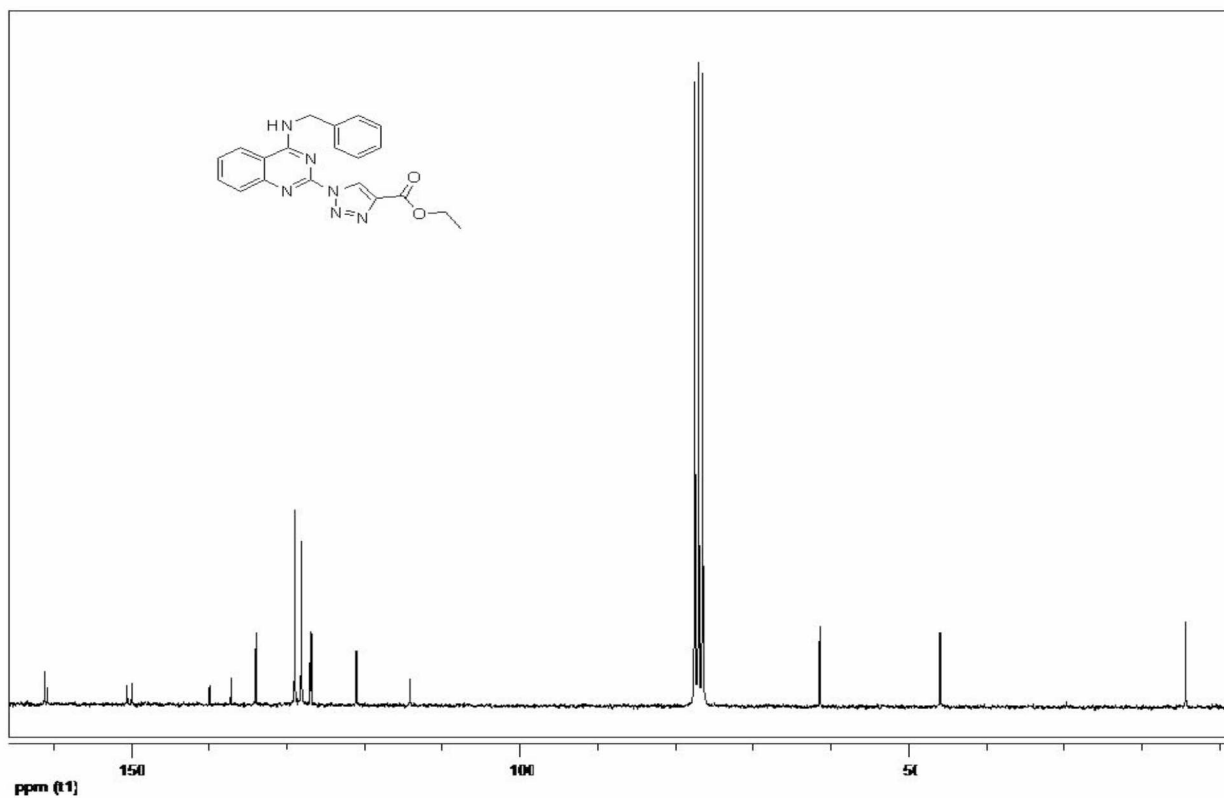
Φάσματα ¹³C



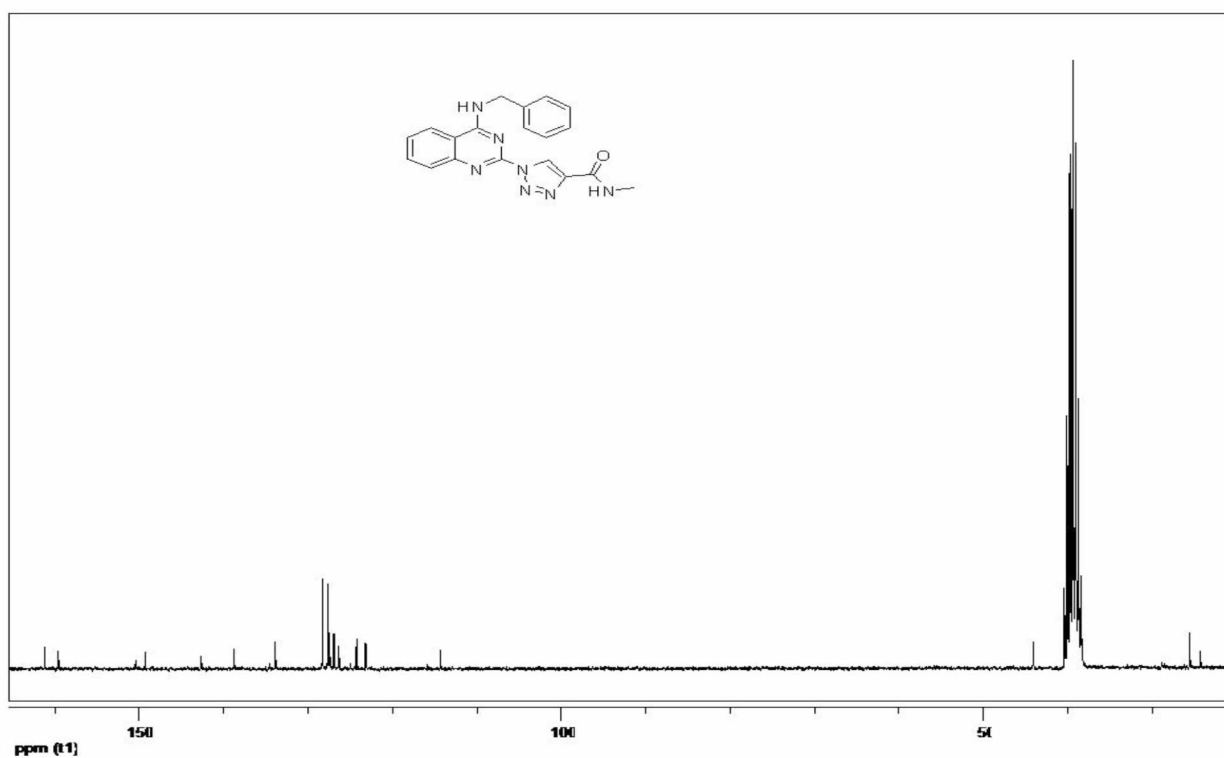
Φάσμα 6 : N – Benzyl – 2 – chloroquinazoline – 4 – amine



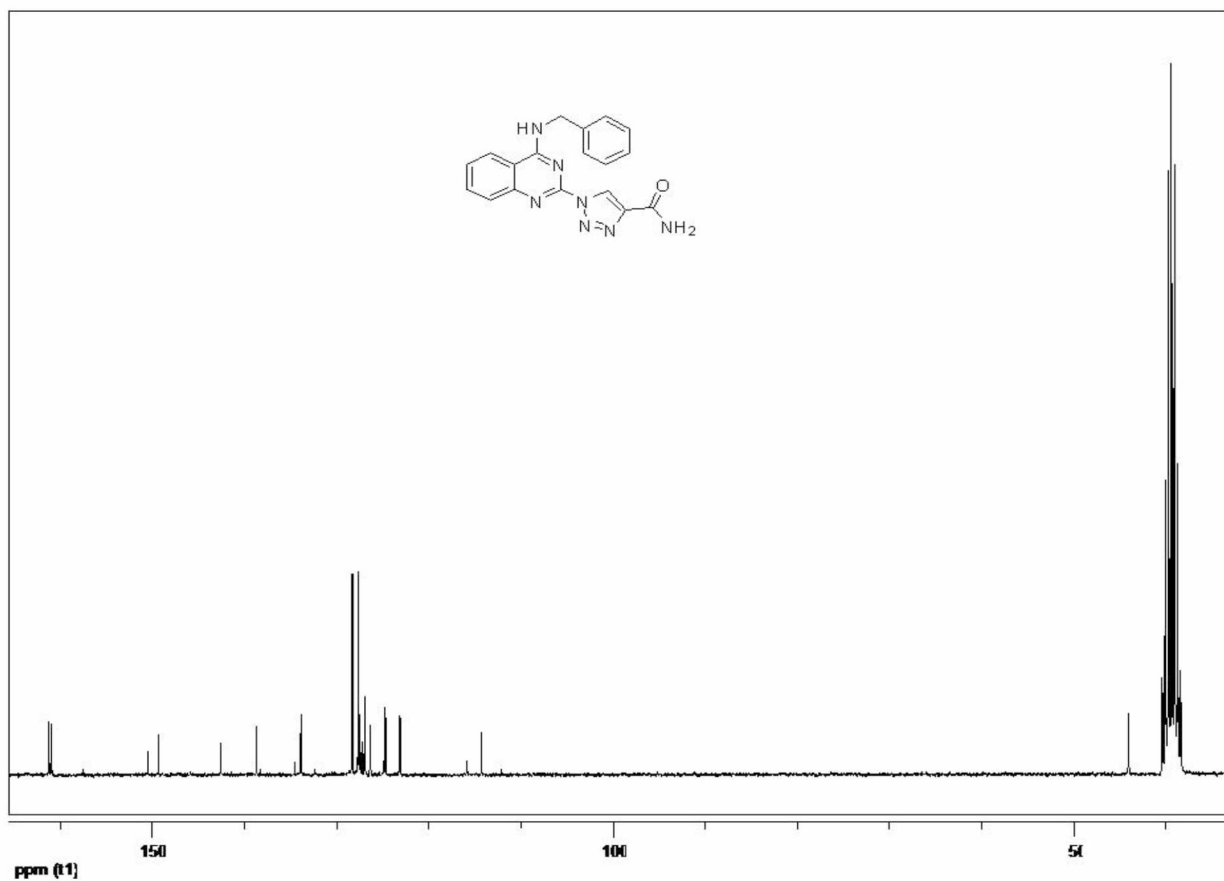
Φάσμα 7 : N – Benzyltertazoly[1,5 a]quinazolin – 5 – amine



Φάσμα 8 : Ethyl 1(4 – benzylamino)quinazolin – 2 – yl) – 1H – 1,2,3 – triazolyl – 4 – carboxylate



Φάσμα 9 : 1(4 – benzylamino)quinazolin – 2 – yl) – N methyl – 1H – 1,2,3 – triazolyl – 4 – carboxamide



Φάσμα 10 : Ethyl 1(4 – benzylamino)quinazolin – 2 – yl) – 1H – 1,2,3 – triazolyl – 4 – carboxamide

6. Συμπεράσματα

Κατά τη διάρκεια της εξέλιξης της παρούσας πορείας σύνθεσης των παραπάνω αναφερθέντων ενώσεων, ανιχνεύθηκαν μέθοδοι επιτάχυνσης των παραπάνω αντιδράσεων καθώς και τρόποι βελτίωσης της απόδοσης αυτών. Οι παραπάνω αντιδράσεις ελέγχθηκαν ως προς την καθαρότητα τους με την τεχνική της χρωματογραφίας στήλης πράγμα που τα καθιστά αρκετά καθαρά από τυχόν προσμίξεις. Παρότι στην χρωματογραφία λεπτής στιβάδας όπου υποβλήθηκαν οι μη επιθυμητές προσμίξεις είναι μηδαμινές έως ανύπαρκτες. Μία από τις πιο σημαντικές συσκευές που χρησιμοποιήθηκε όπου ήταν εφικτό, αποτέλεσαν τα μικροκύματα, τόσο για την εξοικονόμηση χρόνου, όσο και για την καλύτερη πορεία της αντίδρασης και την ελαχιστοποίηση τυχόν εξωτερικών παραγόντων που μπορεί να οδηγούσαν σε λανθασμένο αποτέλεσμα.

Κάποιες από τις παραπάνω ενώσεις υποβλήθηκαν σε διαδικασία αύξησης της ήδη υπάρχουσας ποσότητάς τους (scale up) και τα δείγματά τους εστάλησαν στο εξωτερικό για περαιτέρω μελέτη της δραστηριότητάς τους. Οι συγκεκριμένες ενώσεις πιθανόν να εμφανίζουν κυτταροτοξικότητα και να είναι πιθανός τρόπος καταπολέμησης συγκεκριμένων ειδών καρκίνου, οι οποίοι να σχετίζονται με την αύξηση της πρωτεΐνης p97, καθώς οι ενώσεις αυτές έχει παρατηρηθεί ότι εμφανίζουν δράση αντιστρεπτού αναστολέα της παραπάνω αναφερθείσας πρωτεΐνης.

Βιβλιογραφία

1. Armarego W.L.F, 1963, "Quinazolines", *Advances in Heterocyclic Chemistry*, vol 1, pg 253-309
doi:10.1016/S0065-2725(08)60527-9
2. Di Xia, 2016, "Structure and function of the AAA+ ATPase p97/Cdc48", *Gene*, vol 583,pg 64-67
3. Yihong Ye, 2017, "A Mighty "Protein Extractor" of the Cell: Structure and Function of the p97/CDC48 ATPase", *frontiers in Molecular Biosciences*
doi: 10.3389/fmolb.2017.00039
4. Stach Lasse, Freemont S. P., 2017, "The AAA+ ATPase p97, a cellular multitool", *Biochemical Journal*, vol 474, pg 2953-2976
doi: 10.1042/BCJ20160783
5. Johannes van den Boom, Hemmo Meyer, 2018, "VCP/p97-Mediated Unfolding as a Principle in Protein Homeostasis and Signaling", *Cell*, vol 69, pg 182-194
6. Daniel J. Anderson et al., 2015, "Targeting the AAA ATPase p97 as an Approach to Treat Cancer through Disruption of Protein Homeostasis", *Cell*, vol 28, pg 653-665
7. Pratikkumar Harsukhbhai Vekaria et al., 2016, "Targeting p97 to Disrupt Protein Homeostasis in Cancer" , *frontiers in Oncology*, vol 6
8. Eli Chapman et al., 2015, "Inhibitors of the AAA+ Chaperone p97", *Molecules*, vol 20, pg 3027-3049
9. Tsui-Fen Chou et al., 2011, "Reversible inhibitor of p97, DBeQ, impairs both ubiquitin-dependent and autophagic protein clearance pathways", *PNAS*, vol 102, 4834-4839
10. Tsui-Fen Chou et al., 2013, "Structure–Activity Relationship Study Reveals ML240 and ML241 as Potent and Selective Inhibitors of p97 ATPase", *ChemMedChem*, vol 8, pg 297-312
doi: 10.1002/cmdc.201200520
11. Han-Jie Zhou et al., 2015, "Discovery of a First-in-Class, Potent, Selective, and Orally Bioavailable Inhibitor of the p97 AAA ATPase (CB-5083)", *Journal of Medical Chemistry*, vol 58, pg 9480-9497
doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b01346
12. Xueyuan Wang et al., 2018, "Discovery of a new class of valosine containing protein (VCP/P97) inhibitors for the treatment of non-small cell lung cancer" , *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, pg 534-544

13. Rui Ding et al., 2019, "Discovery of Irreversible p97 Inhibitors", *Journal of Medical Chemistry*, vol 62, pg 2814-2829
doi: 10.1021/acs.jmedchem.9b00144

14. Wenbo Shi et al., 2020, "Coordinated Actions Between p97 and Cullin-RING Ubiquitin Ligases for Protein Degradation", *Cullin-RING Ligases and Protein Neddylation*, pg 61-78
doi: 10.1007/978-981-15-1025-0_5