



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας**

**ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΕΛΕΝΗ ΚΑΦΦΕΣΑΚΗ

Διπλωματική Εργασία

**«N-ΜΕΘΥΛΟ-4-ΧΛΩΡΟ-ΦΑΙΝΥΛΟ ΠΥΡΡΟΛΕΣ ΩΣ ΝΕΟΙ
ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ»**



Λάρισα 2013

Διπλωματική Εργασία

**«N-μεθυλο-4-χλωρο-φαινυλο πυρρόλες ως νέοι αντικαρκινικοί
παράγοντες»**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κομιώτης Δημήτριος — Καθηγητής Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μαρκουλάτος Παναγιώτης — Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μπαλατσός Νικόλαος — Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Οργανικής Χημείας κ. Δημητρίου Κομιώτη.

Με την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Δημήτριο Κομιώτη, για την ανάθεση της διπλωματικής εργασίας και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά την εκπόνησή της.

Τις θερμές ευχαριστίες μου οφείλω στη μεταδιδακτορική ερευνήτρια κα. Στυλιανή Μαντά για τη συνεχή παρακολούθηση και υποστήριξή της.

Τέλος, δεν θα ήθελα να παραλείψω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την θερμή υποδοχή τους και το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1.Πυρρολιδίνες.....	8
1.1.1.Παραδείγματα ενώσεων με πυρρολιδινικό δακτύλιο και βιολογική δράση.....	10
1.2.Κιναζολινικά και Κινοξαλινικά παράγωγα.....	14
2.ΣΚΟΠΟΣ	19
3.ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	20
3.1.Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC).....	20
3.2.Χρωματογραφία στήλης.....	21
3.3.Ταυτοποίηση ενώσεων.....	22
4.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	24
4.1.Επισκόπηση συνθετικής οδού.....	24
4.2.Σύνθεση του 3-υδροξυ-1-μεθυλο-2-οξο-5-(4-χλωροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα.....	27
4.3.Σύνθεση του αιθυλο-2-(4-χλωροφαινυλο)-2,4-διυδρο-1-μεθυλο-1H-πυρρολο[2,3-b]κίνοξαλινο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα.....	28
4.4.Σύνθεση του αιθυλο-2-(4-χλωροφαινυλο)-1-μεθυλο-1H-πυρρολο[2,3-b]κίνοξαλινο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα.....	30
5.ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ¹H NMR	32
6.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	35
7.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	37

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η σύνθεση της 2,3-διοξοπυρρολιδίνης. Αυτό επετεύχθη στο πρώτο μέρος του πειράματος με μία αντίδραση ενός σταδίου τριών αντιδραστηρίων. Τα αντιδραστήρια αυτά ήταν διαιθυλικό οξαλοξικό άλας, μεθυλαμίνη και 4-χλωρο βενζαλδεΰδη. Στο δεύτερο μέρος της εργασίας πραγματοποιήθηκε σύζευξη της 2,3-διοξοπυρρολιδίνης με την ο-φαινυλο-διαμίνη. Από το δεύτερο στάδιο του πειράματος απομονώσαμε δύο επιθυμητά προϊόντα. Όλες οι ενώσεις μελετήθηκαν ως προς την κυτταροτοξική τους δράση έναντι μίας σειράς καρκινικών κυτταρικών σειρών. Οι δομές των προϊόντων ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR.

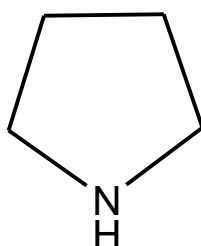
ABSTRACT

The main focus of the present thesis was the synthesis of ethyl 2-(4-chlorophenyl)-2,5-dihydro-4-hydroxy-1-methyl-5-oxo-1H-pyrrole-3-carboxylate for the first part. There were three reagents in one step reaction to achieve the first part of this experiment. The reagents were diethyl oxalacetate, methyl amine and 4-chlorobenzaldehyde. The second part of the current thesis was the conjugation of ethyl 2-(4-chlorophenyl)-2,5-dihydro-4-hydroxy-1-methyl-5-oxo-1H-pyrrole-3-carboxylate to o-phenyl diamine. From the second part we managed to isolate two different products. All the newly synthesized compounds were evaluated for their cytotoxic activity against a series of cancer cell lines. The structures of all the newly synthesized products were determined by using ^1H NMR spectroscopy.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

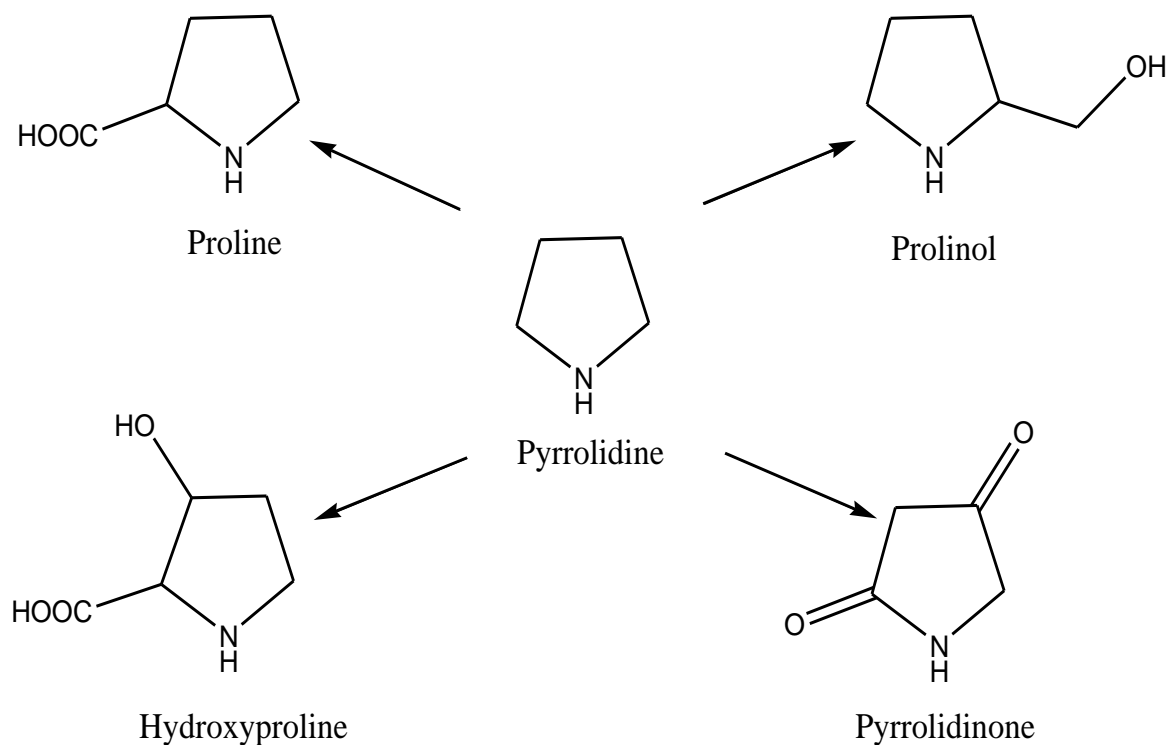
1.1 Πυρρολιδίνες

Σημαντικός αριθμός ενώσεων στη βιβλιογραφία, συνθετικών και μη, αναφέρουν την πυρρολιδίνη ως βασικό δομικό συστατικό. Πρόκειται για δευτεροταγή κυκλική αμίνη, που συνίστανται από ετεροκυκλικό δακτύλιο με τέσσερα άτομα άνθρακα και ένα άτομο αζώτου (Εικ. 1.1). Η ύπαρξη του ατόμου αζώτου προσδίδει στον πυρρολιδινικό δακτύλιο βασικό χαρακτήρα. Οι πυρρολιδίνες αποτελούν ένα από τα πιο βασικά δομικά στοιχεία σε πλήθος ενώσεων. Αποτελούνται από έναν πενταμελή δακτύλιο που περιέχει ένα άτομο αζώτου (N). Συνήθως ο πυρρολιδινικός δακτύλιος έχει βασικό χαρακτήρα λόγω της ύπαρξης του αζώτου (N).



Εικόνα 1.1 Πυρρολιδινικός δακτύλιος

Ο πυρρολιδινικός δακτύλιος αποτελεί δομικό στοιχείο των αμινοξέων προλίνη και υδροξυπρολίνη, στα οποία ο πενταμελής δακτύλιος έχει υποκατασταθεί με τις λειτουργικές ομάδες του υδροξυλίου και του καρβοξυλίου. Επίσης, στη βιβλιογραφία αναφέρονται ενώσεις πυρρολιδίνης άλλες με υποκατεστημένη πλευρική αλειφατική αλυσίδα και άλλες με καρβονύλιο επί του δακτυλίου (Εικ. 1.2). Στο παρακάτω σχήμα απεικονίζονται η υδροξυπρολίνη, η πυρρολιδινόνη, η προλινόλη και η προλίνη.



Εικόνα 1.2 Παραδείγματα ενώσεων με πυρρολιδινικό δακτύλιο

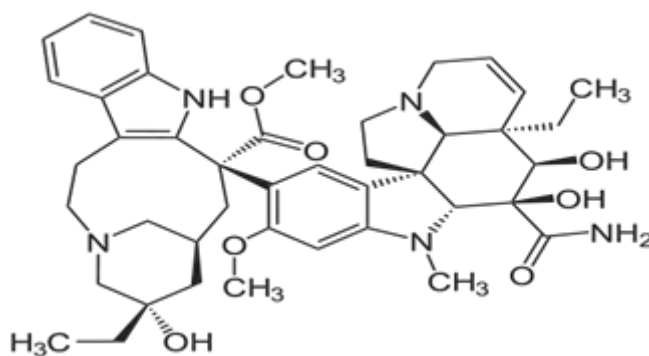
Πολλές ενώσεις με σημαντική βιολογική δράση που απαντώνται στη φύση φέρουν τον βασικό δακτύλιο της πυρρολιδίνης. Παραδείγματα τέτοιων ενώσεων αποτελούν οι vandesine, piracetam, clausenamide και atorvastatin, για τις οποίες έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζουν αντιμυτωτικές, αντιβακτηριακές και άλλες ιδιότητες. Οι ίδιες πάλι ενώσεις, αποτελούν ενδιάμεσα για τη σύνθεση πιο περίπλοκων και σημαντικών φαρμακευτικά ενώσεων όπως οι detoxine, lactacystin και πολλών άλλων (Yaakob, 2009).

1.1.1 Παραδείγματα ενώσεων με πυρρολιδινικό δακτύλιο και βιολογική δράση

Όπως αναφέρθηκε στη προηγούμενη παράγραφο αρκετές ενώσεις με σημαντική φαρμακολογική δράση εμπεριέχουν τον πυρρολιδινικό δακτύλιο και χρησιμοποιούνται σήμερα για τη θεραπευτική αντιμετώπιση ασθενειών. Παρακάτω αναφέρονται παραδείγματα αυτών και η εφαρμογή τους στη θεραπευτική (Yaakov, 2009).

- **Vindesine**

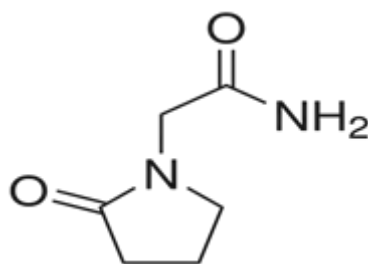
Λειτουργεί ως αναστολέας της μίτωσης και χρησιμοποιείται στην χημειοθεραπεία για την αντιμετώπιση πολλών μορφών καρκίνου όπως είναι η λευχαιμία, το λέμφωμα, το μελάνωμα, ο καρκίνος του μαστού και του πνεύμονα.



Εικόνα 1.3 Μοριακή δομή του Vindesine

- **Piracetam**

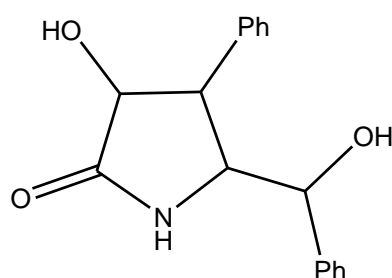
Εμφανίζει ιδιότητες ενίσχυσης της νόησης και χρησιμοποιείται για τη θεραπεία νευροεκφυλιστικών νοσημάτων όπως το Alzheimer.



Εικόνα 1.4 Μοριακή δομή του Piracetam

- **Clausenamide**

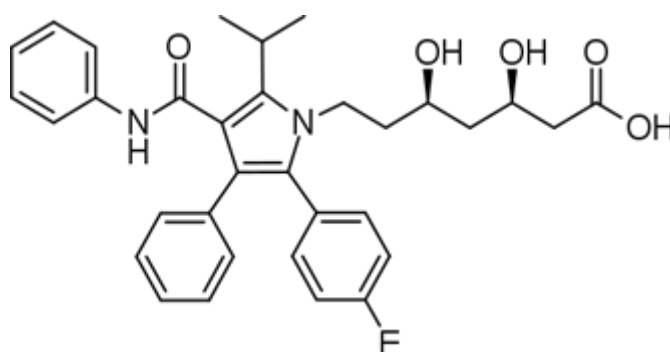
Παράγοντας προστασίας του ήπατος που χρησιμοποιείται συνήθως στην θεραπεία κατά της οξείας και χρόνιας ιογενούς ηπατίτιδας.



Εικόνα 1.5 Μοριακή δομή του Clausenamide

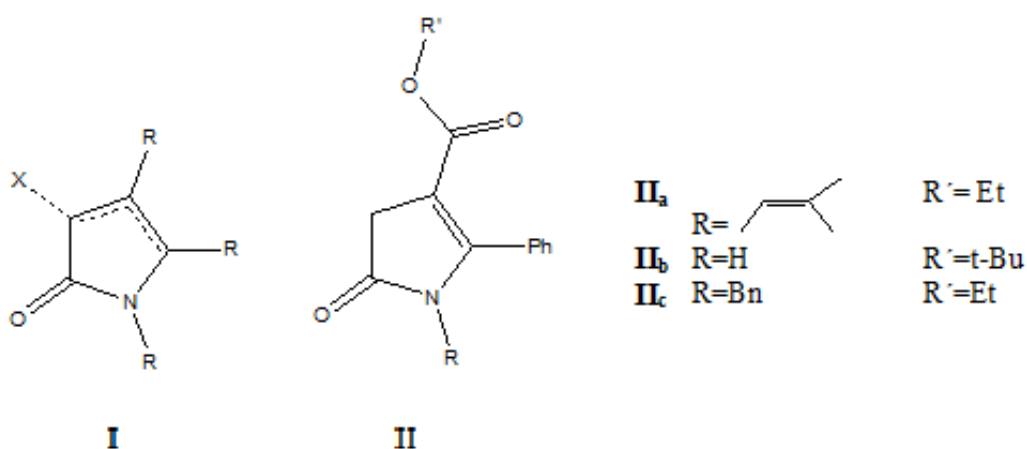
- **Atorvastatin**

Χρησιμοποιείται για τη μείωση των επιπέδων χοληστερόλης και είναι ανταγωνιστικός αναστολέας της HMG-CoA αναγωγάσης εμποδίζοντας τη de novo σύνθεση χοληστερόλης στον οργανισμό.



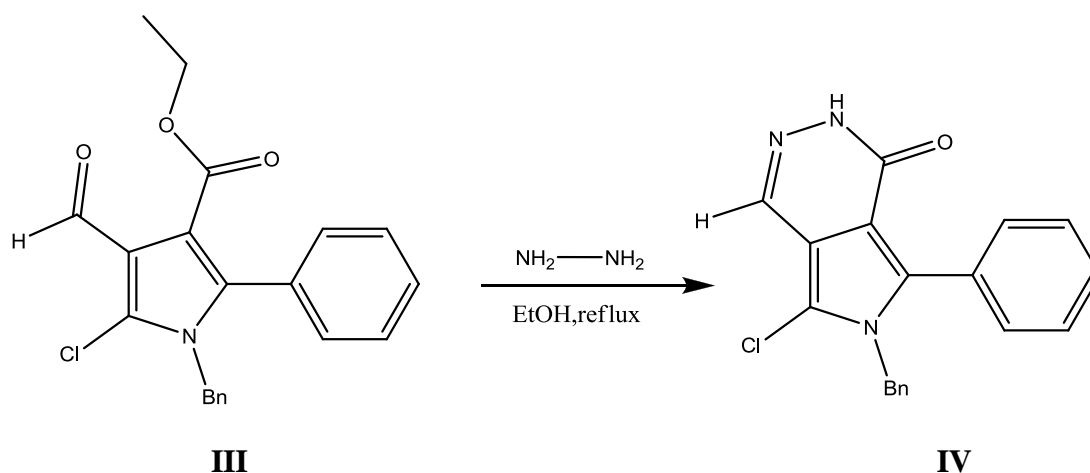
Εικόνα 1.6 Μοριακή δομή του Atorvastatin

Εκτός των παραπάνω φυσικών παραγώγων, άλλα ανάλογα που φέρουν στη δομή τους τον πυρρολιδινικό δακτύλιο, διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο τόσο για τη σύνθεση νέων θεραπευτικών ενώσεων όσο και για την αξιολογή αντική και αντικαρκινική τους δράση. Συγκεκριμένα, οι 2-οξοπυρρόλες **I** (Εικ. 1.7) χρησιμοποιούνται ευρέως και αποτελούν τη βασική δομή σε πολλά φάρμακα, συμπεριλαμβανομένων και προϊόντων που έχουν ενεργή δράση ενάντια σε ιικές μολυσματικές ασθένειες (HIV, γρίπη), αντικαρκινικούς παράγοντες και προϊόντα που δρουν ενάντια σε ασθένειες μικροβιολογικής φύσεως (είτε βακτηριακής, είτε μυκητιακής). Επιπλέον, οι 2-οξοπυρρόλες είναι γνωστές ως θεμέλιοι λίθοι για τη σύνθεση των αλκαλοειδών, καθώς και προϊόντων όπως οι 2,2'-διπυρρόλες, οι τετραπυρρόλες και κάποιες χρωστικές. Πέρα από τις πολύ γνωστές 5-αλκυλο-2-οξοπυρρόλες, που πρωτοαναφέρθηκαν το 1890 από τον Emery, στην βιβλιογραφία έχει γίνει ελάχιστη αναφορά στα 5-αρυλο-2-πυρρολο παράγωγα **II** (Εικ. 1.7). Οι 5-αρυλο-2-οξοπυρρόλες χρησιμοποιήθηκαν ως πρώτη ύλη για τη σύνθεση δικετοπυρρολοπυρρολών ως πιθανοί μη νουκλεοζιτικοί αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (NNRTIs), με φθορίζουσα ικανότητα (Dehaen et al., 2006).



Εικόνα 1.7 2-οξοπυρρόλες **I** και 5-αρυλο-2-οξοπυρρόλες **II**

Στο σημείο αυτό είναι άξιο λόγου να αναφερθεί η δημιουργία παραγώγων του 2-οξοπυρρολίου με αλδεύδες, διαζωνιακά άλατα, ενεργούς εστέρες και διθειάνθρακα με στόχο τη σύνθεση νέων ενώσεων. Επίσης, η χλωροφορμυλίωση του **IIc** παρείχε τις πυρρολο-καρβαλδεύδες **III** (Σχ. 1.1). Ένας μεγάλος αριθμός πυρρολο-καρβαλδευδών χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση πολυκυκλικών ενώσεων. Για παράδειγμα, οι πυρρολο [3,4-d] πυριδαζιόνες **IV** απομονώθηκαν με σύντηξη αλδευδικού και εστερικού δακτυλίου του **III** μέσω υδραζίνης (Σχ. 1.1).



Σχήμα 1.1 Παράδειγμα σύνθεσης ετεροκυκλικής ένωσης **IV** από πυρρολο-καρβαλδεύδη **III**

Συνεπώς, απεδείχθη ότι οι οξοπυρρόλες και τα ανάλογά τους αποτελούν ενδιαφέροντες και πολύπλευρους δομικούς λίθους στη Συνθετική Οργανική Χημεία. Επίσης πολλές από αυτές τις ενώσεις απεδείχθησαν νέα ενδιάμεσα στη σύνθεση πολυυποκατεστημένων πυρρολίων (Dehaen et al., 2006).

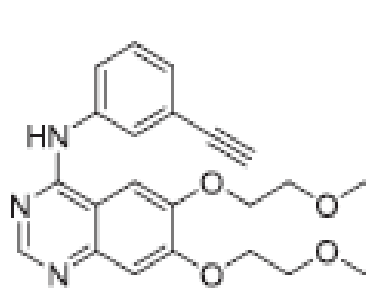
1.2 Κιναζολινικά και Κινοξαλινικά παράγωγα

Στην προσπάθεια εύρεσης διαφόρων χημικών ενώσεων με στόχο το σχεδιασμό νέων αντικαρκινικών φαρμάκων, αποδείχθηκε πως τα κιναζολινικά και κινοξαλινικά παράγωγα αποτελούν μία νέα τάξη χημειοθεραπευτικών αναλόγων που είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά έναντι των καρκινικών όγκων.

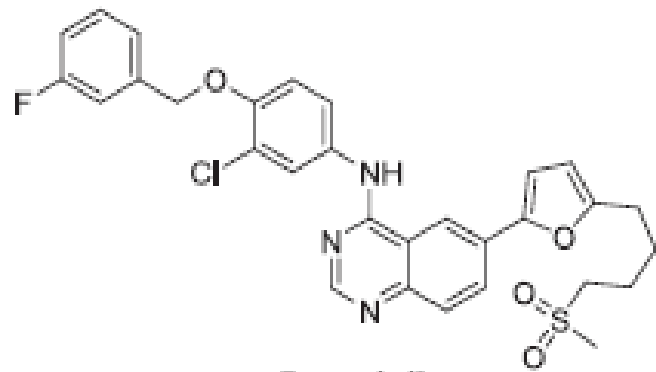
Είναι ευρέως γνωστό ότι τα κιναζολινικά παράγωγα είναι ισχυροί αναστολείς του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR). Ο συγκεκριμένος υποδοχέας είναι διαμεμβρανική κινάση της τυροσίνης και υπερεκφράζεται σε σημαντικό αριθμό καρκινικών όγκων (π.χ. του στήθους, των ωοθηκών, του προστάτη και του κόλον). Συνεπώς, οι αναστολείς του EGFR αναμένεται να έχουν θεραπευτικές δυνατότητες έναντι κακοηθών και μη κακοηθών επιθηλιακών νοσημάτων.

Έχει καταγραφεί ένας μεγάλος αριθμός αναστολέων της κινάσης της τυροσίνης με διαφορετικά δομικά στοιχεία. Οι περισσότεροι υποσχόμενοι εκλεκτικοί αναστολείς, μικρής μοριακής δομής, περιέχουν κιναζολίνες και κινοξαλίνες στο μόριό τους. Παρακάτω δίνονται μερικά παραδείγματα τέτοιων αναστολέων που είτε βρίσκονται υπό κλινικές δοκιμές είτε έχουν πρόσφατα εγκριθεί από τη Διεύθυνση Ελέγχου Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (Food and Drug Administration, FDA) (Noolvi et al., 2011).

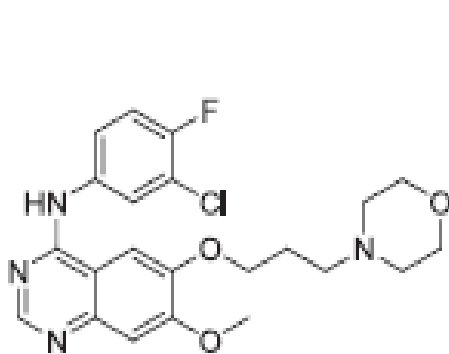
Το Gefitinib (Εικ. 1.8) εγκρίθηκε τον Μάιο του 2003 ως μονοθεραπεία για την αντιμετώπιση τοπικά προχωρημένου ή μεταστατικού μη μικροκυτταρικού καρκίνου των πνευμόνων σε ασθενείς όπου η χημειοθεραπεία ήταν μη αποτελεσματική. Συνεπώς, υιοθετήθηκαν διάφορες προσεγγίσεις με σκοπό την αύξηση της εκλεκτικότητας αυτού του αναστολέα. Αυτές οι προσπάθειες οδήγησαν στην ανακάλυψη του Lapatinib (Εικ. 1.8) που βρίσκεται υπό κλινικές δοκιμές. Η εντατική έρευνα στον τομέα των αναστολέων της κινάσης της τυροσίνης οδήγησε στην ανάπτυξη μεγάλου αριθμού δραστικών ενώσεων. Εκτός από τις κιναζολίνες, έχει αποδειχθεί ότι και οι κινοξαλίνες αποτελούν εκλεκτικούς ανταγωνιστικούς αναστολείς του ATP. Τα κινοξαλινικά παράγωγα AG 1295 αναστέλλουν εκλεκτικά την κινάση του EGFR. Τα μόρια αυτά αντιστρέφουν το μετασηματισμένο φαινότυπο των cis-trans NIH 3T3 κυττάρων και καθυστερούν την αύξηση όγκων που έχουν προκληθεί από το γλοίωμα C6 σε ποντίκια (Εικ. 1.8) (Noolvi et al., 2011).



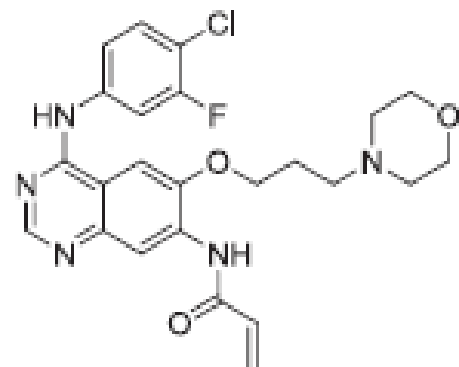
Erlotinib (Tarceva)



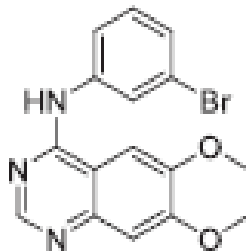
Lapatinib



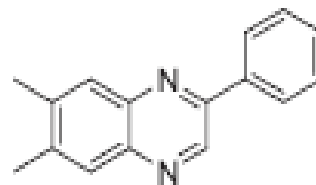
Gefitinib (Iressa)



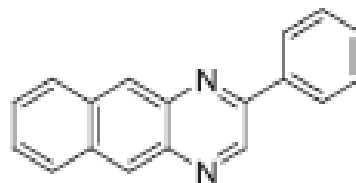
Caneratinib (CI 1033)



PD 153035



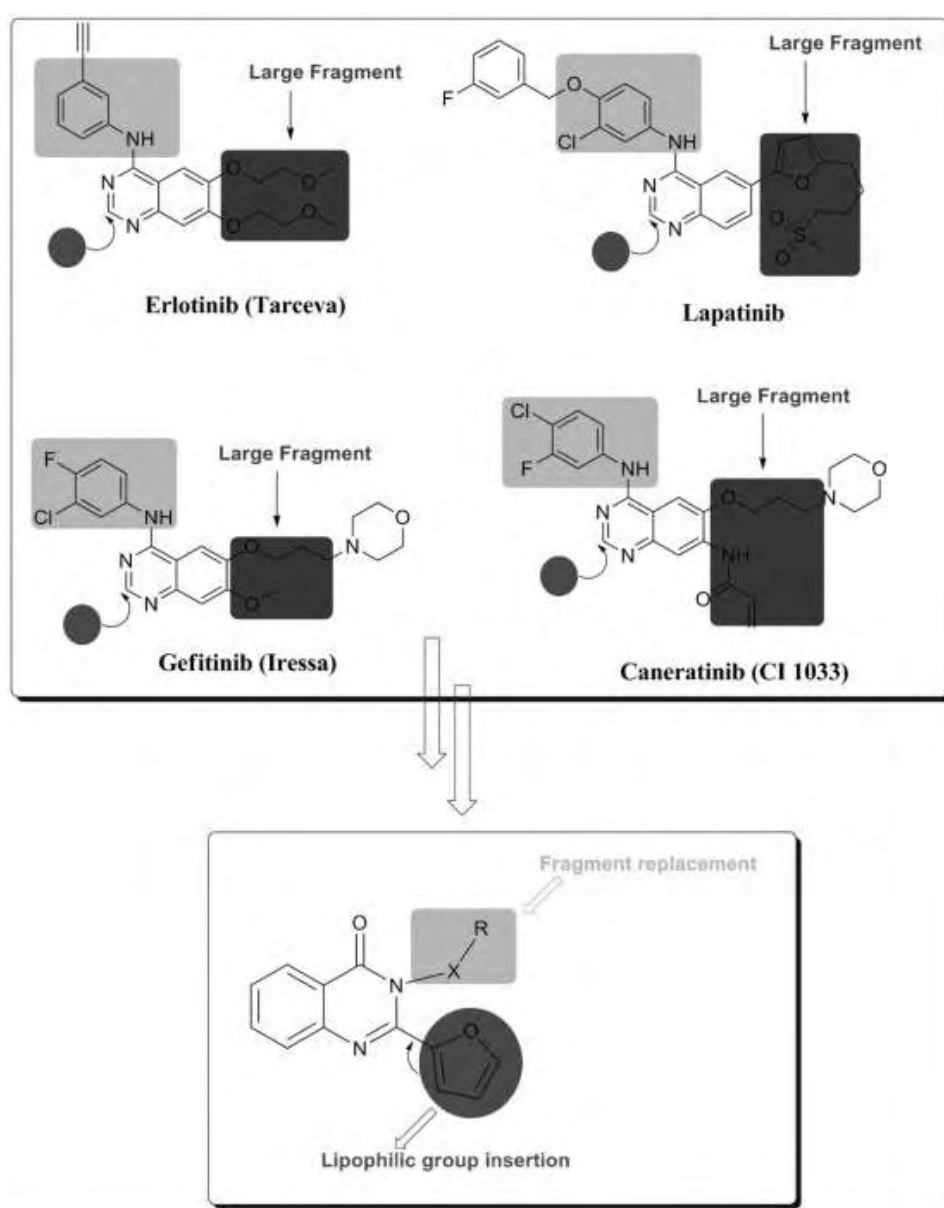
AG 1295



AG 1385

Εικόνα 1.8 Παραδείγματα αναστολέων της κινάσης της τυροσίνης του EGFR

Στα πλαίσια εύρεσης νέων δομών με αντικαρκινική δράση, συντέθηκε μία σειρά κιναζολινών και κινόξαλινών που περιλαμβάνει τα 2,3-διυποκατεστημένα κιναζολινικά και κινόξαλινικά παράγωγα τα οποία εμφανίζουν δομή παρόμοια με το Erlotinib και το Lapatinib. Η υποκατάσταση σε αυτή τη θέση επιλέχθηκε ώστε να παρέχει διαφορετικό ηλεκτρονιακό περιβάλλον το οποίο επηρεάζει τη λιποφιλικότητα και ως εκ τούτου τη δραστηριότητα των μορίων στόχων. Ο στόχος της σύνθεσης των συγκεκριμένων μορίων αποτελεί την προσπάθεια εύρεσης ενός ενεργού αντικαρκινικού παράγοντα με αυξημένη δράση και εκλεκτικότητα έναντι των καρκινικών κυττάρων (Εικ. 1.9) (Noolvi et al., 2011).



Εικόνα 1.9 Παράγωγα κιναζολινών με αντικαρκινική δράση

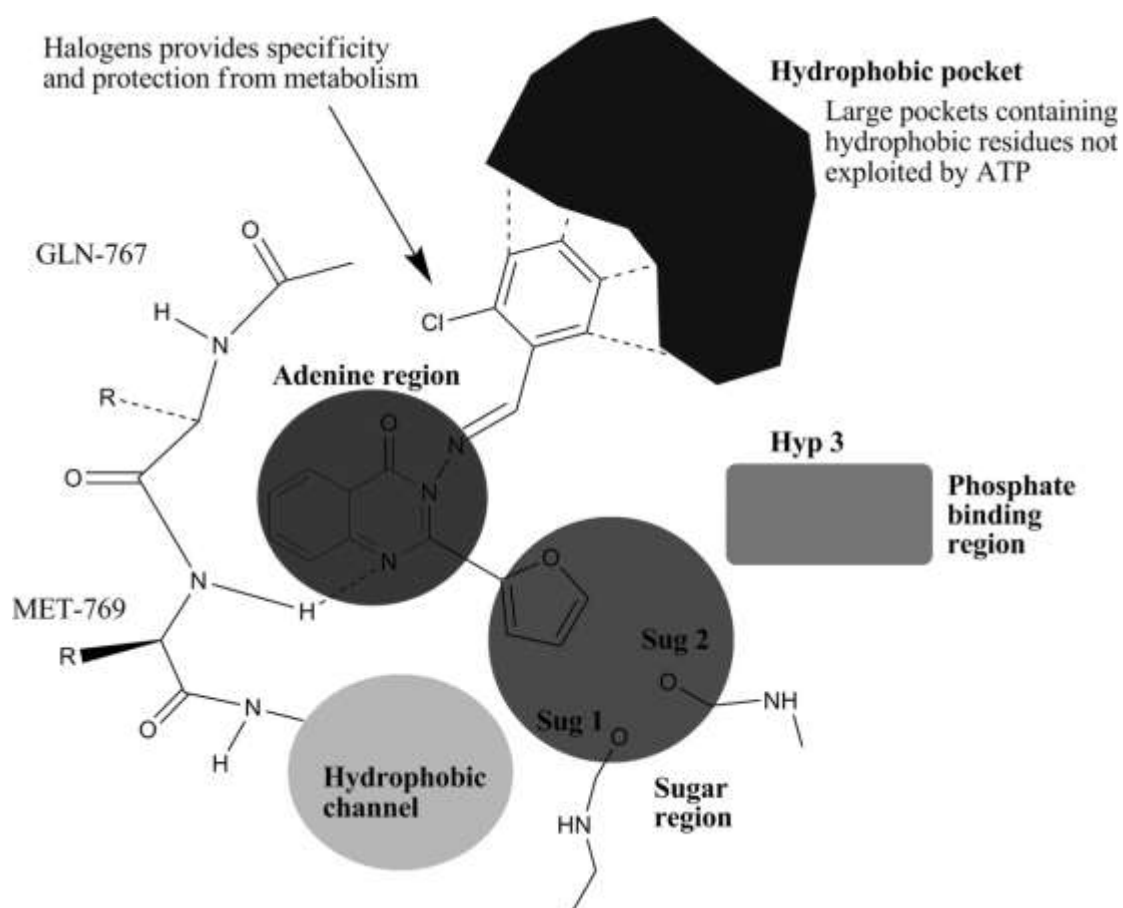
Μεταγενέστερες έρευνες οδήγησαν στην ανακάλυψη ενώσεων με υψηλή εκλεκτικότητα που έχουν ως στόχο τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR). Αυτές οι ενώσεις δρουν μέσω ανταγωνισμού με το ATP για την πρόσδεση στο καταλυτικό κέντρο της κινάσης της τυροσίνης. Αργότερα, μια μεγάλη ποικιλία ενώσεων με δομική ανομοιογένεια απεδείχθησαν ότι εμφανίζουν υψηλή εκλεκτικότητα ως ανταγωνιστικοί αναστολείς του ATP.

Το σημείο πρωτεϊνικής σύνδεσης του ATP έχει τα εξής χαρακτηριστικά: 1) την περιοχή της αδενίνης η οποία περιέχει δύο δεσμούς υδρογόνου που σχηματίστηκαν από την αλληλεπίδραση των N-1 και N-6 του αδενινικού δακτυλίου. Αυτοί οι δεσμοί υδρογόνου χρησιμοποιούνται από πολλούς ισχυρούς αναστολείς. 2) την περιοχή του σακχάρου (ριβόζη) η οποία είναι υδρόφιλη. 3) την υδροφοβική περιοχή η οποία παρόλο που δεν χρησιμοποιείται από το ATP, παίζει σημαντικό ρόλο στην εκλεκτικότητα των αναστολέων. 4) τα υδροφοβικά κανάλια τα οποία επίσης δεν χρησιμοποιούνται από το ATP αλλά μπορούν να αξιοποιηθούν από τους αναστολείς. 5) την περιοχή πρόσδεσης των φωσφορικών ομάδων η οποία χρησιμοποιείται για τη βελτίωση της εκλεκτικότητας των αναστολέων (Εικ. 1.10) (Noolvi et al., 2011).

Σε μελέτες που έχουν γίνει, παρουσιάστηκε μια νέα ομάδα ενώσεων που περιέχουν 2,3-διυποκατεστημένο κιναζολινικό και κιννοξαλινικό πυρήνα ως αναστολέα του EGFR. Η στρατηγική αυτών των μελετών κατευθύνθηκε προς το σχεδιασμό διαφόρων υποκαταστατών με διαφορετικές χημικές ιδιότητες υποθέτοντας ότι η δραστηριότητα αυτών των μορίων μπορεί να ενισχυθεί με την προσθήκη εναλλακτικών συνδετικών ομάδων όπως ο φουρανικός δακτύλιος στη θέση 2-, ουρία, θειουρία, θειοσεμικαρβαζίδιο, φαινυλο υδραζίνη, υδροξυλαμίνη, π-αμινο βενζοϊκό οξύ, σουλφοναμίδιο και ιμίνες στη θέση 3- του κιναζολινικού δακτυλίου, υποκατεστημένο στυρύλιο στη θέση 3- και θειο μεθυλο βενζιμιδαζόλιο στη θέση 2- του κιννοξαλινικού δακτυλίου. Αυτό το μοτίβο υποκατάστασης είχε ως στόχο τις διάφορες περιοχές πρόσδεσης του ATP με την πρωτεϊνική κινάση ώστε να δημιουργηθούν μόρια με διαφορετική εκλεκτικότητα ως αναστολείς του EGFR.

Προτάθηκαν μεγαλύτερα τμήματα για τη θέση 3- των κιναζολινών και των κιννοξαλινών όπως τα υποκατεστημένα αρυλιδένια, τα σουλφοναμίδια, τα υποκατεστημένα στυρύλια, τα θειο μεθυλο βενζιμιδαζόλια και οι υποκατεστημένες

χαλκόνες, τα οποία εισήχθησαν σε κιναζολίνες με ανοιχτό δακτύλιο, τις [N-2-(φαινυλο καρβαμύλο) φαινυλο) φουρανο-2-καρβοξυαμίδιο και 2-βενζάμιδο-N-φαινυλοβενζαμίδιο], με τρόπο παρόμοιο με το Lapatinib το οποίο συνδέεται με το ATP έτσι ώστε η ογκώδης ομάδα να προσανατολιστεί στο πίσω μέρος του συνδετικού τμήματος του ATP και να κάνει κυρίως υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με την πρωτεΐνη μιμούμενη την 3'-χλωρο-4'-[(3-φθοροβενζυλο)οξυ]ανιλίνη του Lapatinib (Noolvi et al., 2011).



Εικόνα 1.10 Υποθετικό μοντέλο της 2,3-διυποκατεστημένης κιναζολίνης ενωμένης με το ATP σημείο σύνδεσης της κινάσης της τυροσίνης του EGFR.

2.ΣΚΟΠΟΣ

Η ανάγκη για την εύρεση νέων χημειοθεραπευτικών ουσιών, με αυξημένη βιολογική δράση, ελαττωμένη τοξικότητα και λιγότερες ανοσοκατασταλτικές παρενέργειες καθώς και η ραγδαία και συνεχής ανάπτυξη της φαρμακευτικής χημείας επέτρεψε τη μελέτη, τη σύνθεση και την προώθηση στην αγορά, πληθώρας φαρμάκων που περιέχουν ως δραστική ουσία κάποιο πυρρολο ή κινόξαλινικό ανάλογο.

Σκοπός αυτής της μελέτης είναι:

- ✓ Η σύνθεση της 2,3-διοξοπυρρολιδίνης μέσω μιας αντίδρασης ενός σταδίου τριών συστατικών με θέρμανση με επαναρροή και διαλύτη αιθανόλη, η οποία διακόπτεται με προσθήκη υδροχλωρικού οξέως (37%).
- ✓ Η σύζευξη της 2,3-διοξοπυρρολιδίνης με ο-φαινυλο διαμίνη με θέρμανση με επαναρροή χρησιμοποιώντας ως διαλύτη οξικό οξύ.
- ✓ Η ταυτοποίηση των προϊόντων με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR.
- ✓ Η αποτίμηση της ανασταλτικής τους δράσης έναντι μιας σειράς καρκινικών κυτταρικών σειρών.

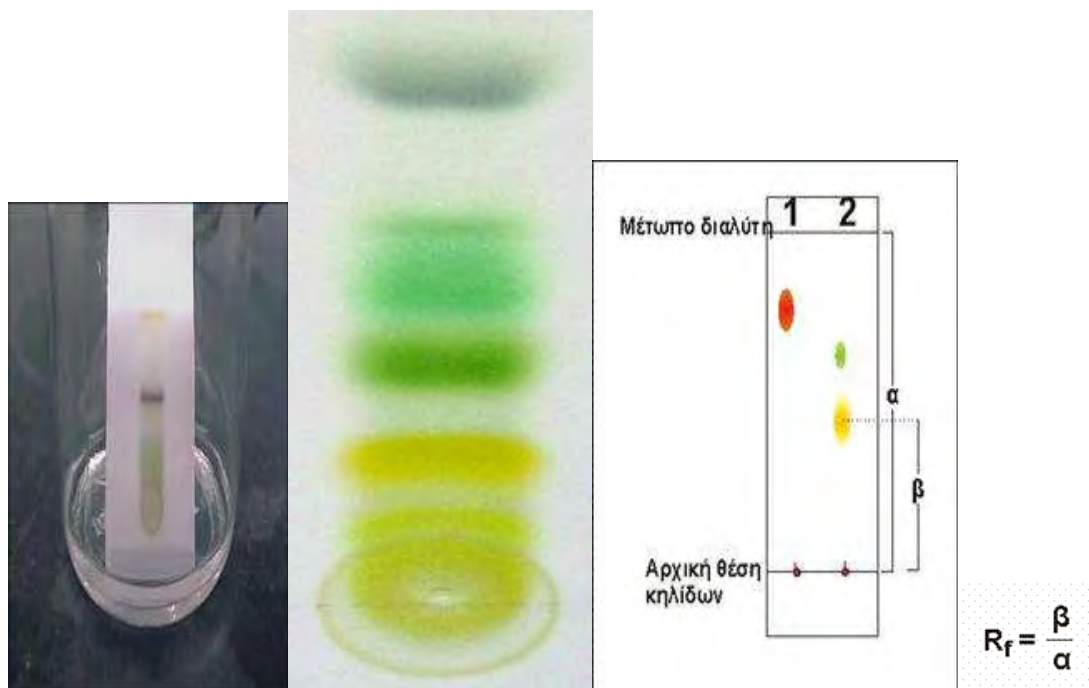
3.ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC: Thin Layer Chromatography)

Ο έλεγχος των αντιδράσεων έγινε με τη χρήση επίπεδης χρωματογραφίας λεπτής στιβάδος (TLC). Κατά τη τεχνική αυτήν χρησιμοποιούνται πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με Silica gel (Merck Kieselgel 60F24) πάχους 0.2 mm.

Το διάλυμα του υπό εξέταση δείγματος τοποθετείται υπό τη μορφή κηλίδας στην αρχή της πλάκας σε απόσταση περίπου 2 cm. Στη συνέχεια η πλάκα τοποθετείται όρθια εντός αεροστεγούς κορεσμένου με ατμούς διαλύτη θαλάμου. Ως διαλύτης χρησιμοποιείται σύστημα δύο διαλυτών μεταβλητούς αναλογίας. Το ύψος της στάθμης του διαλύτη δεν πρέπει να καλύπτει τις κηλίδες της υπό εξέταση ουσίας, διότι υπάρχει κίνδυνος διάλυσης αυτών. Ακολούθως ο διαλύτης αφήνεται να ανέλθει με τη βοήθεια τριχοειδών φαινομένων μέχρι το μέτωπο του διαλύτη να φθάσει λίγα εκατοστά πριν το τέλος της πλάκας. Ύστερα, η πλάκα αποσύρεται και στεγνώνεται με ρεύμα αέρα. Οι διάφορες ουσίες που περιέχονται στο υπό εξέταση δείγμα μετακινούνται επί της πλάκας με διαφορετική ταχύτητα ανάλογα με την πολικότητα τους και εμφανίζονται με τη μορφή διακριτών κηλίδων. Με βάση τη διανυθείσα απόσταση κάθε μορίου στη στατική φάση πραγματοποιείται και ο προσδιορισμός του συντελεστή κατακράτησης R_f , που ορίζεται από το λόγο: απόσταση που διανύθηκε από την ένωση (β) προς την απόσταση που διανύθηκε από το διαλύτη (α). Η τιμή R_f ενός συγκεκριμένου μορίου χρησιμεύει για την ταυτοποίηση μιας άγνωστης ουσίας. Η παρατήρηση των κηλίδων γίνεται με εξέταση στο υπεριώδες φως (254 ή 356 nm) ή μετά από ψεκασμό με διάλυμα H_2SO_4 (θεικού οξέος) 30%.

Μια χρωματογραφία λεπτής στιβάδας απεικονίζεται στην εικόνα 3.1 που δίνεται παρακάτω.



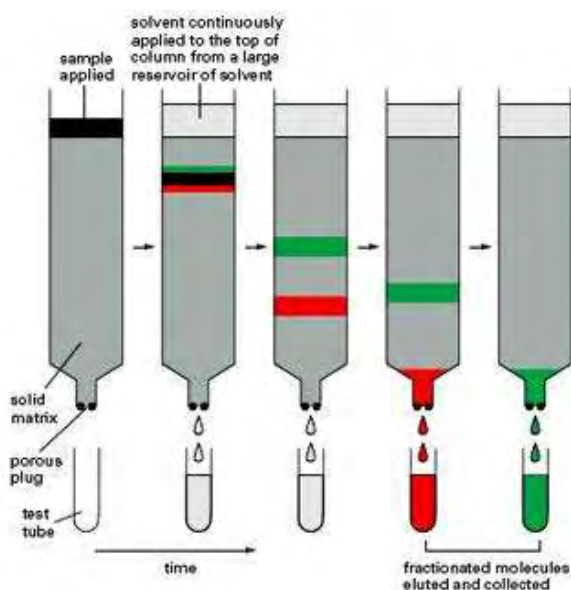
Εικόνα 3.1 Παράδειγμα χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας

3.2 Χρωματογραφία στήλης

Όταν μια χημική ένωση απομονώνεται, η ένωση στόχος θα πρέπει να καθαριστεί από διαλύτες και παραπροϊόντα. Η τεχνική που χρησιμοποιείται για να επιτευχθεί αυτό είναι η χρωματογραφία στήλης κανονικής φάσης και επιτυγχάνεται με την εισαγωγή αέρα υπό πίεση (flash chromatography) σε silica gel (240-400, Merck grade).

Η χρωματογραφία στήλης κανονικής φάσης είναι μια τεχνική διαχωρισμού που βασίζεται στην προσρόφηση των συστατικών ενός δείγματος πάνω σε μια ακίνητη φάση, συνήθως silica gel και την έκλουση τους με μια ακίνητη φάση, που είναι ένας διαλύτης ή μείγμα διαλυτών. Οι πολικές ουσίες προσροφούνται και κολλούν στην αφετηρία, κορυφή, της στήλης και χρειάζονται πιο πολικό διαλύτη για να προχωρήσουν. Οι άπολες ουσίες συνήθως προχωρούν ή κατεβαίνουν πιο εύκολα ακόμη και με διαλύτες χαμηλής πολικότητας. Για την έκλουση των ουσιών από το silica gel χρειάζεται να γίνει έκλουση της στήλης με διάφορους διαλύτες αρχίζοντας από τους λιγότερο πολικούς και καταλήγοντας στους περισσότερο πολικούς.

Στη χρωματογραφία στήλης κανονικής φάσης η στατική φάση τοποθετείται σε μια στήλη κατασκευασμένη από αδρανές υλικό (ύαλος, πηκτή πυριτίας, ανοξείδωτος χάλυβας). Το δείγμα τοποθετείται στην αρχή (κορυφή) της στήλης και η κινητή φάση διέρχεται εξαναγκασμένα μέσω της στατικής φάσης με την εφαρμογή πίεσης σε αυτήν ή λόγω της βαρύτητας. Τα συστατικά του δείγματος μετακινούνται κατά μήκος της στήλης με διαφορετικές ταχύτητες εξαρτώμενες από την συγγένεια των συστατικών ως προς την στατική φάση όπως φαίνεται και παρακάτω στην εικόνα 3.2.



Εικόνα 3.2

3.3 Ταυτοποίηση ενώσεων

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) αποτελεί την πρώτη και χρησιμότερη φασματοσκοπική τεχνική προσδιορισμού της δομής των μορίων καθώς παρέχει ένα χάρτη του ανθρακικού σκελετού μαζί με τα υδρογόνα σε ένα οργανικό μόριο.

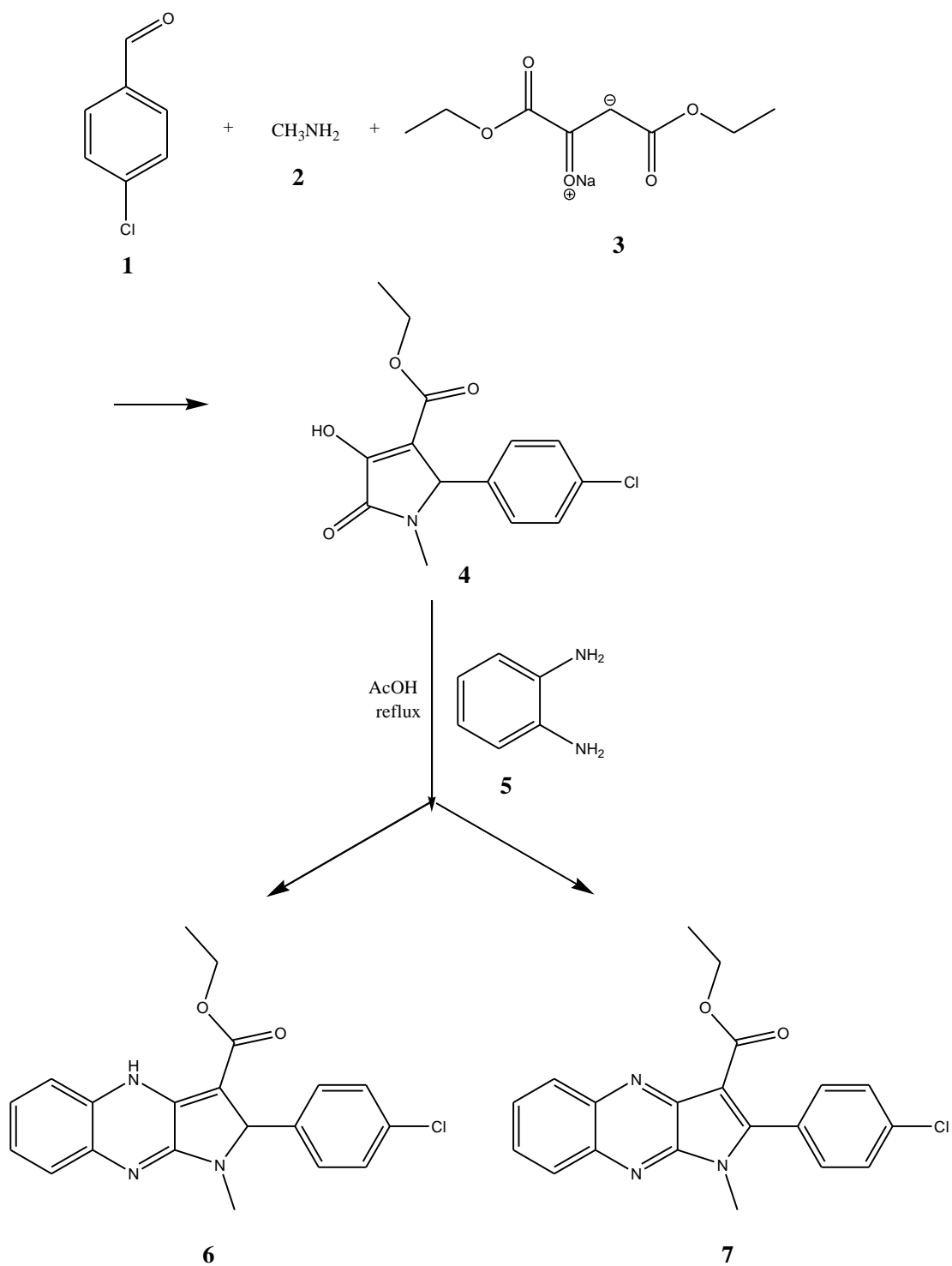
Ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός NMR, είναι ένα φαινόμενο που συμβαίνει όταν πυρήνες ορισμένων ατόμων τοποθετούνται εντός ενός ομογενούς, στατικού μαγνητικού πεδίου και διεγείρονται από ένα δεύτερο ταλαντευόμενο μαγνητικό πεδίο. Οι περισσότεροι πυρήνες εμφανίζουν το φαινόμενο NMR, άλλοι, οι λιγότεροι όχι. Αυτό εξαρτάται από το εάν οι πυρήνες έχουν μαγνητικές ιδιότητες, όπως αυτές

αντανεκλώνται στην ιδιότητα του σπίν. Στη φασματοσκοπία NMR μελετάται η αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη, για την μελέτη των χημικών, φυσικών και βιολογικών ιδιοτήτων της.

Η ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν έγινε με τη χρήση του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Τα φάσματα ^1H -NMR καταγράφηκαν στα 300MHz στο φωτόμετρο BrukerAVAMCEIII 300 και τα φάσματα ^{13}C -NMR καταγράφηκαν στα 75.5MHz στο ίδιο φωτόμετρο, χρησιμοποιώντας δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3), και διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO-d_6). Το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς και η πολλαπλότητα των καμπύλων φαίνεται με s (single), d (double), t (triple), q (quadruple), m (multiple). Οι συχνότητες J μετρήθηκαν σε Hz.

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

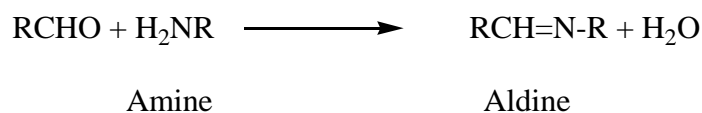
4.1. Επισκόπηση συνθετικής οδού



Το προϊόν **4** σχηματίστηκε μέσω μιας αντίδρασης πυρηνόφιλης προσθήκης. Πυρηνόφιλο είναι ένα άτομο ή μόριο που περιέχει ένα ελεύθερο ζεύγος ηλεκτρονίων, το οποίο μπορεί να προσφέρει για να σχηματίσει δεσμό σε μια χημική αντίδραση. Το πυρηνόφιλο είναι αρνητικά φορτισμένο και αναζητά ένα θετικά φορτισμένο κέντρο για να προσφέρει το ελεύθερο ζεύγος ηλεκτρονίων του. Συνεπώς, η πυρηνόφιλη προσθήκη είναι μια αντίδραση προσβολής ενός ηλεκτρονιόφιλου από ένα πυρηνόφιλο.

Τα πυρηνόφιλα του Αζώτου όπως η αμμωνία και τα παράγωγά της $H_2N - Z$ προστίθενται στην ομάδα του καρβονυλίου των αλδευδών και των κετονών. Η αντίδραση καταλύεται από οξύ. Η ισορροπία της αντίδρασης ευνοεί το σχηματισμό του προϊόντος εξαιτίας της ταχείας αφυδάτωσης του ενδιάμεσου τετραεδρικού προϊόντος προσθήκης. Το αποτέλεσμα είναι η αντικατάσταση της ομάδας του $C = O$ από την ομάδα $C = N - Z$.

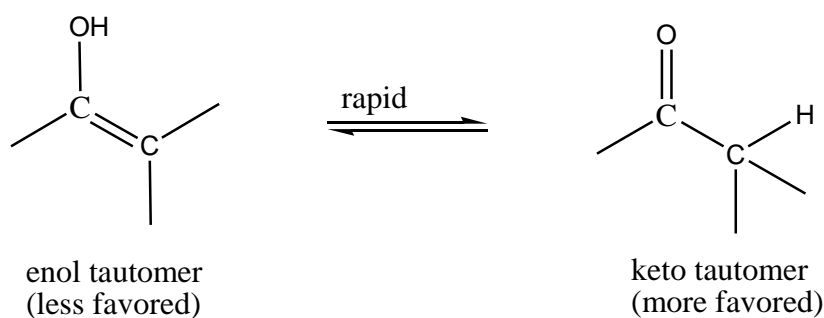
Οι αλδεύδες και οι κετόνες αντιδρούν με πρωτοταγείς αμίνες σχηματίζοντας βάσεις του Schiff. Αυτές οι ενώσεις λέγονται επίσης και ιμίνες (Σχ. 4.1)(Yaakob, 2009).



Σχήμα 4.1 Παράδειγμα αλδεύδης και αμίνης μέσω πυρηνόφιλης προσθήκης.

Επίσης στην παραπάνω αντίδραση πυρηνόφιλης προσθήκης εμφανίζεται το φαινόμενο της κετο-ενολικής ταυτομέρειας. Μια ένωση που περιέχει καρβονύλιο ($C=O$) είναι σε ταχεία ισορροπία με ένα ενολικό ταυτομέρες, το οποίο περιέχει ένα ζεύγος ατόμων άνθρακα ενωμένων με διπλό δεσμό που γειτνιάζουν με μία υδροξυλική ομάδα ($-OH$), $C=C-OH$. Στις περισσότερες κετόνες επικρατεί η κετομορφή. Αυτή η διαδικασία λέγεται ταυτομέρεια και καταλύεται τόσο από οξέα όσο και από βάσεις.

Γενικά οι ενόλες είναι ασταθείς ενώσεις και είναι σε ισορροπία με μία ευνοϊκότερη καρβονυλική ομάδα. Η ενολική μορφή είναι σημαντική σε μερικές αντιδράσεις. Επιπλέον, το αποπρωτονιωμένο ενδιάμεσο στην αλληλομετατροπή των δύο μορφών, που αναφέρεται ως ενολικό ανιόν, είναι σημαντικό στη χημεία του καρβονυλίου, κυρίως λόγω του ότι αποτελεί ισχυρό πυρηνόφιλο (Yaakob, 2009).

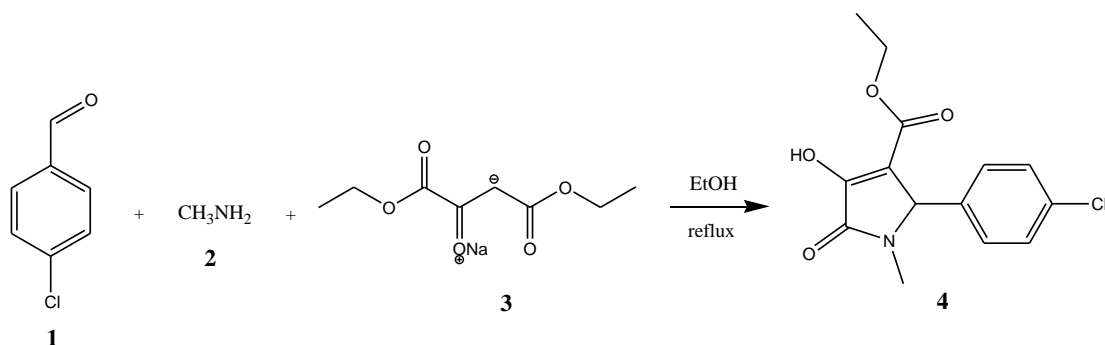


Σχήμα 4.2 Παράδειγμα κετο-ενολο αντίδρασης

Σε αυτή την έρευνα, χρησιμοποιήθηκαν διαιθυλικό οξαλοξικό άλας του νατρίου, μεθυλαμίνη και 4-χλωρο βενζαλδεΰδη ως πρώτη ύλη για τη σύνθεση των 2,3-πυρρολιδινών μέσω μιας αντίδρασης τριών συστατικών. Έπειτα το προϊόν **4** του πρώτου μέρους υπόκειται σε σύζευξη με ο-φαινυλο διαμίνη απ'όπου προκύπτουν δύο επιθυμητά προϊόντα **6** και **7**.

4.2 Σύνθεση του 3-υδροξυ-1-μεθυλο-2-οξο-5-(4-χλωροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα **4** μέσω αντίδρασης τριών αντιδρώντων.

Αντίδραση:



Πρωτόκολλο:

7.11 mmol 4-χλωρο-βενζαλδεϋδης **1** απαιτούν : 7.11 mmol μεθυλαμίνης **2** , 7.11 mmol διαιθυλικού οξαλοξικού άλατος του νατρίου **3** και 25 ml αιθανόλη.

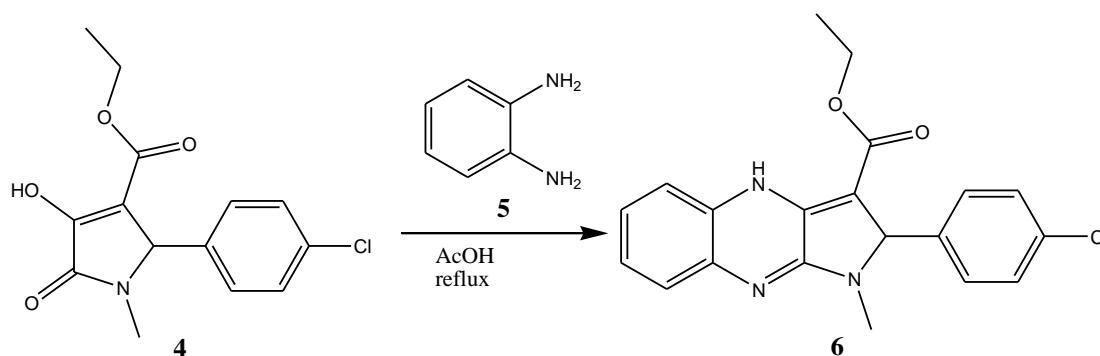
Πειραματική διαδικασία:

Σε εσφυρισμένη σφαιρική φιάλη προστέθηκαν 4-χλωρο-βενζαλδεϋδη **1** (167 μ l, 1.42 mmol), μεθυλαμίνη **2** (59 μ l, 1.42 mmol), διαιθυλικό οξαλοξικό άλας του νατρίου **3** (300 mg, 1.42 mmol) και αιθανόλη (5.5 ml, 1.42 mmol) .Στη φιάλη εφαρμόστηκε κάθετος ψυκτήρας και το διάλυμα θερμάνθηκε με επαναρροή για 2 ώρες στους 95°C. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με TLC. Μετά τις 2 ώρες προστίθεται στη φιάλη παγωμένο απιονισμένο H₂O και μερικές σταγόνες πυκνού διαλύματος HCl (37%) ώστε το pH του διαλύματος της αντίδρασης να είναι περίπου 4-5. Το επιθυμητό προϊόν πέφτει ως ίζημα το οποίο διηθείται υπό κενό και ξεπλένεται αρκετές φορές με παγωμένο H₂O και εξάνιο ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα 4-χλωρο-βενζαλδεϋδης που δεν αντέδρασαν. Το προϊόν παραλαμβάνεται ως λευκό στερεό.

TLC (9.5 CH ₂ Cl ₂ /0.5 CH ₃ OH)	R _f = 0.3
Απόδοση	70%

4.3 Σύνθεση του αιθυλο-2-(4-χλωροφαινυλο)-2,4-δihδρο-1-μεθυλο-1H-πυρρολο[2,3-b]κινόξαλινο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα **6** μέσω σύζευξης του 3-υδροξυ-1-μεθυλο-2-οξο-5-(4-χλωροφαινυλο)-2,5-δihδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα **4**.

Αντίδραση:



Πρωτόκολλο:

3 mmol 3-υδροξυ-1-μεθυλο-2-οξο-5-(4-χλωροφαινυλο)-2,5-δihδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα **4** απαιτούν : 3 mmol ο-φαινυλο-διαμίνης **5** και 40 ml οξικού οξέως.

Πειραματική διαδικασία:

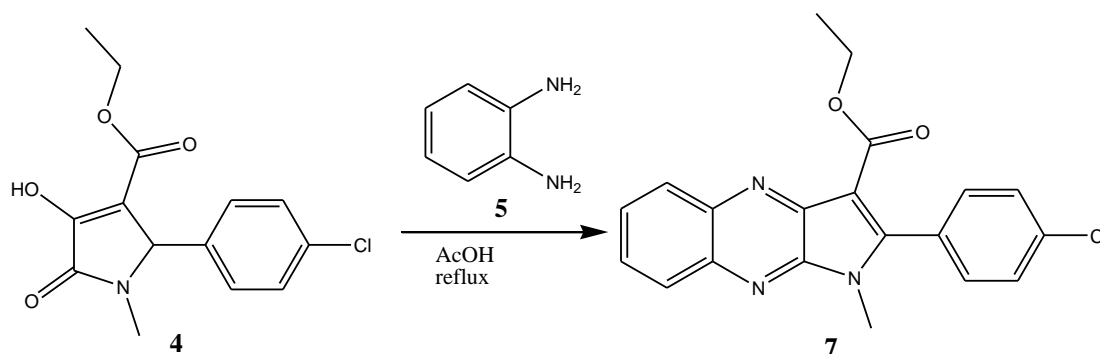
Σε εσμυρισμένη σφαιρική φιάλη προστέθηκαν 3-υδροξυ-1-μεθυλο-2-οξο-5-(4-χλωροφαινυλο)-2,5-δihδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρας **4** (200 mg, 0.68 mmol), ο-φαινυλο-διαμίνη **5** (74 mg, 0.68 mmol), και οξικό οξύ (9.5 ml, 0.68 mmol). Στη φιάλη εφαρμόστηκε κάθετος ψυκτήρας και το διάλυμα θερμάνθηκε με επαναροή για 45 λεπτά στους 130°C. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με TLC. Μετά τα 45 λεπτά προστίθεται στη φιάλη της αντίδρασης μεθανόλη ώστε να απομακρυνθεί το οξικό οξύ. Στη συνέχεια οι διαλύτες απομακρύνονται υπό κενό και το προκύπτον υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υψηλής πίεσης

(HPFC) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα 7Hexane/3AcOEt. Το επιθυμητό προϊόν παραλαμβάνεται ως υποκίτρινο στερεό.

TLC (7 Hexane/3 AcOEt)	Rf = 0.65
Απόδοση	65%

4.4 Σύνθεση του αιθυλο-2-(4-χλωροφαινυλο)-1-μεθυλο-1H-πυρρολο[2,3-b]κινολινο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα **7** μέσω σύζευξης του 3-υδροξυ-1-μεθυλο-2-οξο-5-(4-χλωροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα **4**.

Αντίδραση:



Πρωτόκολλο:

3 mmol 3-υδροξυ-1-μεθυλο-2-οξο-5-(4-χλωροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα **4** απαιτούν : 3 mmol ο-φαινυλο-διαμίνης **5** και 40 ml οξικού οξέως.

Πειραματική διαδικασία:

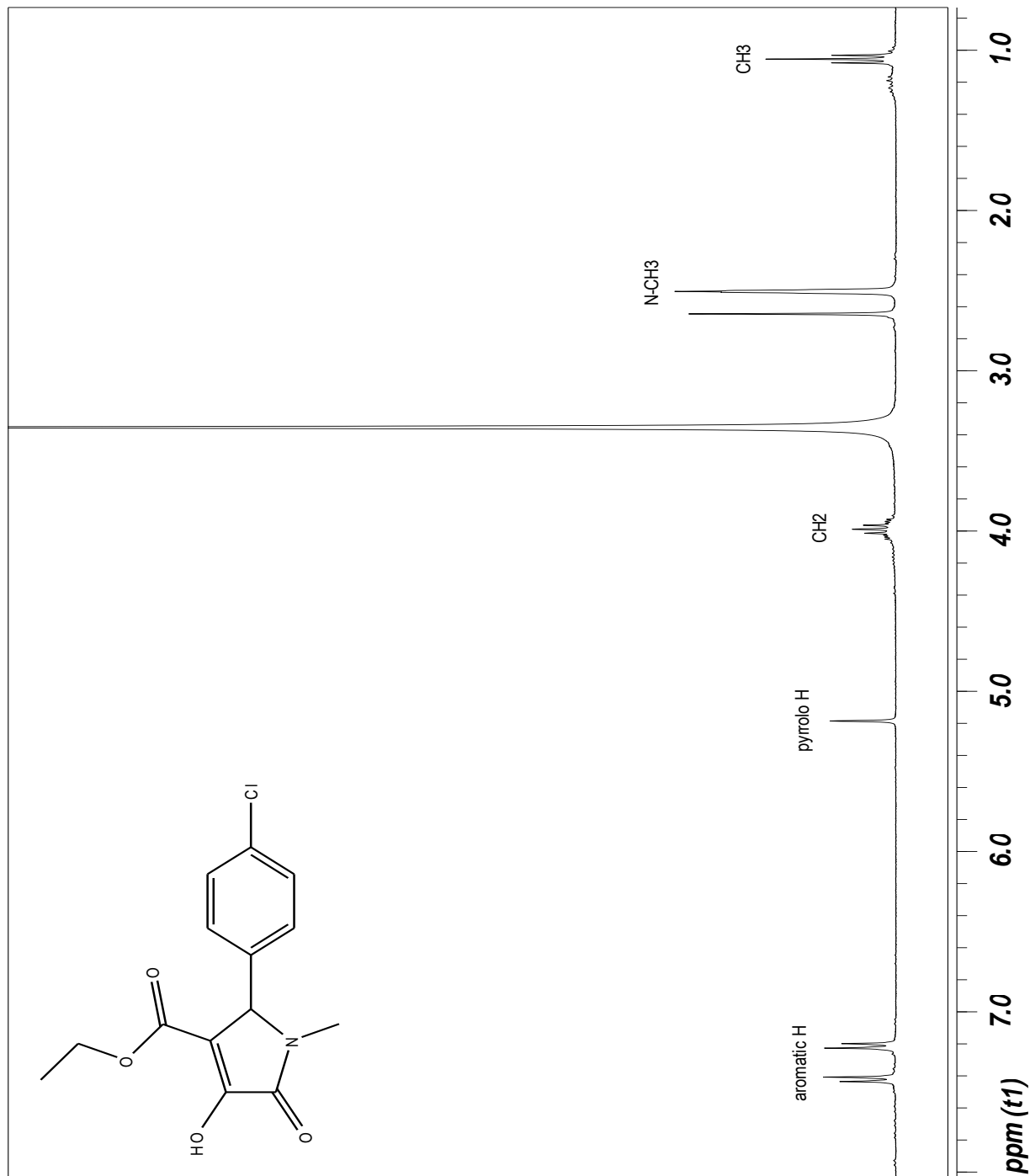
Σε εσμυρισμένη σφαιρική φιάλη προστέθηκαν 3-υδροξυ-1-μεθυλο-2-οξο-5-(4-χλωροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρας **4** (200 mg, 0.68 mmol), ο-φαινυλο-διαμίνης **5** (74 mg, 0.68 mmol), και οξικό οξύ (9.5 ml, 0.68 mmol). Στη φιάλη εφαρμόστηκε κάθετος ψυκτήρας και το διάλυμα θερμάνθηκε με επαναροή για 1 ώρα και 15 λεπτά στους 130⁰C. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με TLC. Μετά τη 1 ώρα και 15 λεπτά προστίθεται στη φιάλη της αντίδρασης μεθανόλη ώστε να απομακρυνθεί το οξικό οξύ. Στη συνέχεια οι διαλύτες απομακρύνονται υπό κενό και το προκύπτον υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υψηλής πίεσης (HPFC) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη

έκλουσης το σύστημα 7Hexane/3AcOEt. Το επιθυμητό προϊόν παραλαμβάνεται ως υποκίτρινο στερεό.

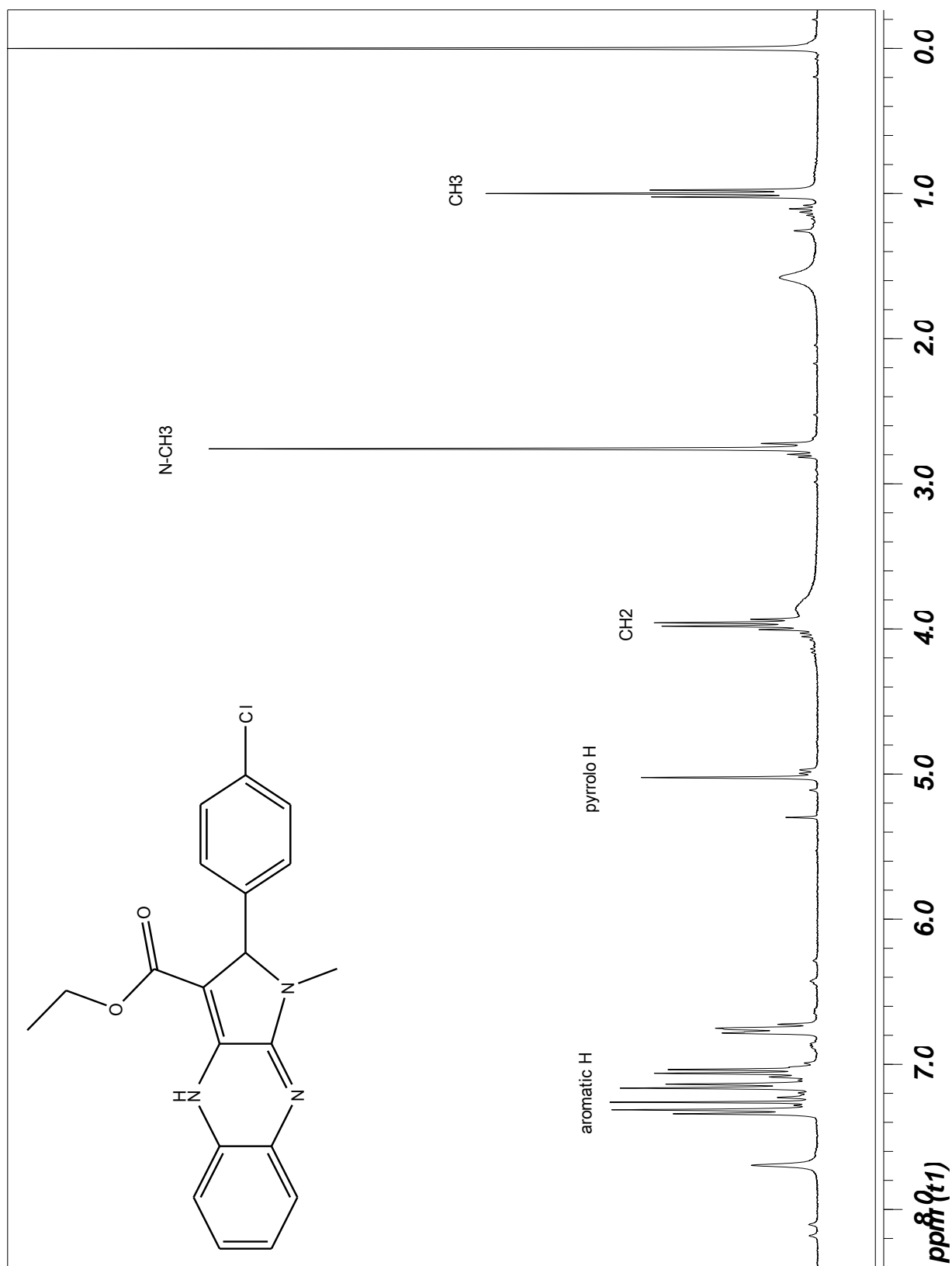
TLC (7 Hexane/3 AcOEt)	Rf = 0.3
Απόδοση	60%

5.ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ^1H NMR

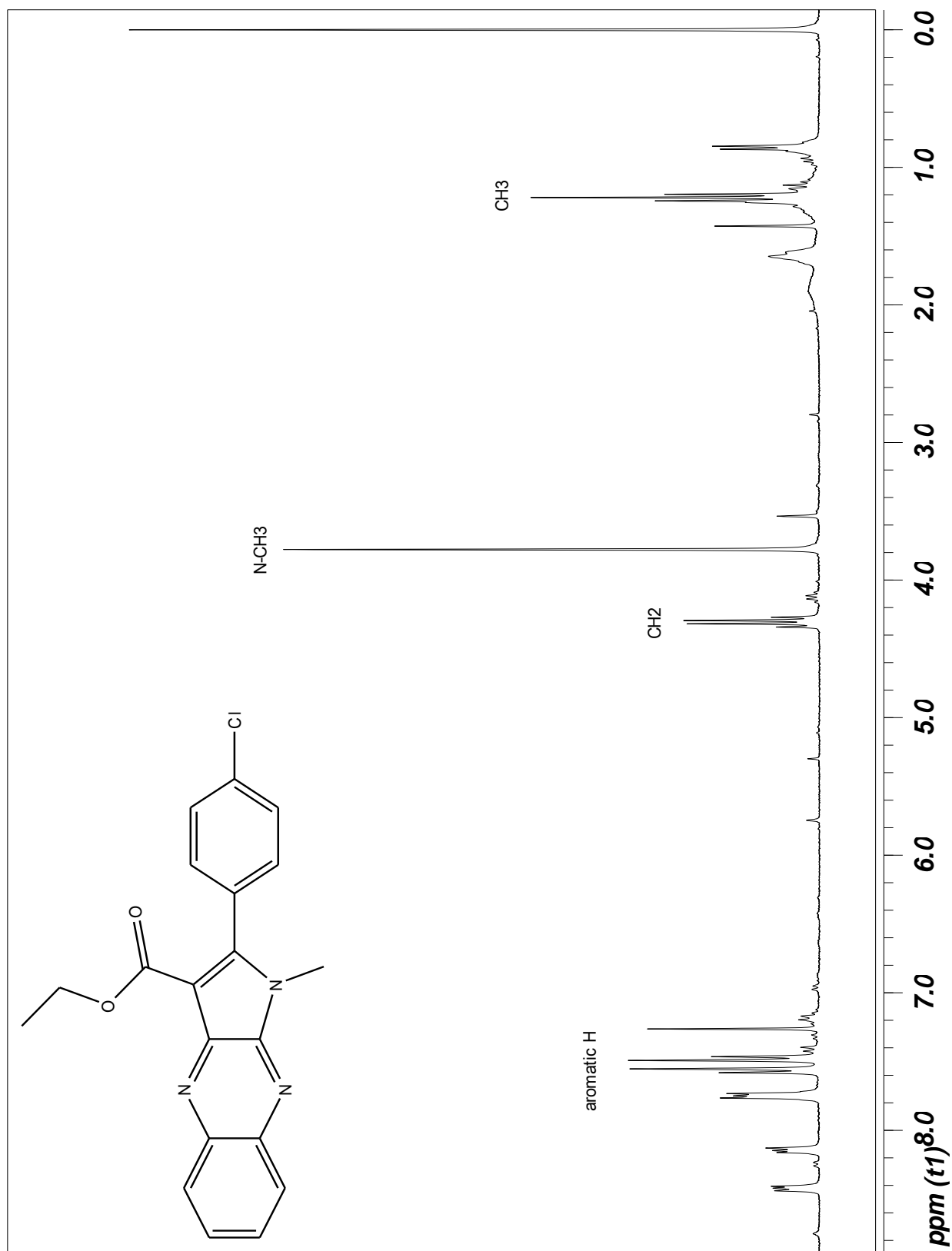
Όλα τα προϊόντα ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ^1H NMR και δίνονται παρακάτω.



Εικόνα 5.1 Φάσμα ^1H NMR του 3-υδροξυ-1-μεθυλο-2-οξο-5-(4-χλωροφαινυλο)-2,5-δωδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα (**4**) σε DMSO.



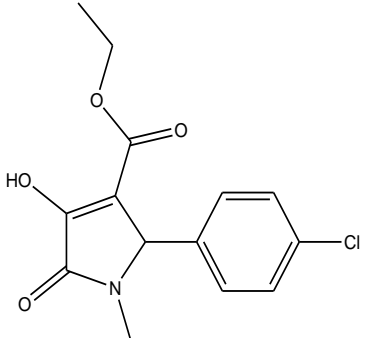
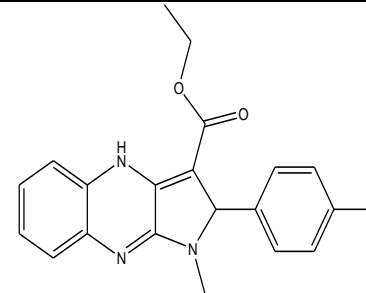
Εικόνα 5.2 Φάσμα ¹H NMR του αιθυλο-2-(4-χλωροφαιτυλο)-2,4-διυδρο-1-μεθυλο-1H-πυρρολο[2,3-b]κινόξαλινο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα (**6**) σε CDCl₃.

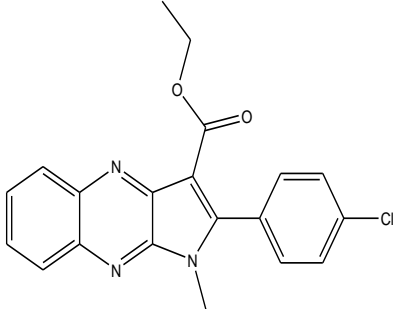


Εικόνα 5.3 Φάσμα ^1H NMR του αιθυλο-2-(4-χλωροφαινυλο)-1-μεθυλο-1H-πυρρολο[2,3-b]κτινοξαλινο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα (**7**) σε CDCl_3 .

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όλα τα μόρια αξιολογήθηκαν για την κυτταροτοξική και κυτταροστατική τους δράση έναντι κυττάρων λευχαιμίας ποντικού (L1210), ανθρώπινου λεμφώματος (CEM) καθώς και των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας (HeLa). Για την εκτίμηση της κυτταροστατικής δράσης χρησιμοποιήθηκε η παράμετρος IC_{50} , η οποία αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του φάρμακου που απαιτείται για την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης κατά 50%.

Προϊόν	IC_{50}^* (μM)		
	L1210	CEM	HeLa
 4	274 ± 8	175 ± 6	118 ± 26
 6	43 ± 1	35 ± 2	35 ± 1

 <p style="text-align: center;">7</p>	216 ± 1	93 ± 28	54 ± 9
---	---------	---------	--------

Όπως βλέπουμε από τον παραπάνω πίνακα, όλες οι εξετασθείσες ενώσεις παρουσίασαν αξιοσημείωτη ανασταλτική δράση έναντι της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων. Τα καλύτερα αποτελέσματα εμφάνισε η ένωση **6**, παρουσιάζοντας τιμές IC_{50} μεταξύ 35-43 μ M.

7.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Yaakob I.U., Degree of Bachelor of Science (Hons.), 2009.
- Dehaen W.; Metten B.; Kostermans M.; Van Baelen G. and Smet M., *Tetrahedron* 62 (2006) 6018–6028.
- Noolvi M. N.; Patel H. M.; Bhardwaj V.; Chauhan A., *Europ. Jour. of Med. Chem.* 46 (2011) 2327-2346.
- McMurry J. *Οργανική Χημεία, τόμος I, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, σελ.334-336.*
- Wade L.G.Jr, *Οργανική Χημεία, Εκδόσεις Τζιόλα.*
- Παπαδογιάννης I.N., Σαμανίδου Β.Φ., *Ενόργανη Χημική Ανάλυση, Εκδόσεις Πήγασος.*
- Diana P.; Martorana A.; Barraja P.; Montalbano A.; Dattolo G.; Cirrincione G.; Dall’Acqua F.; Salvador A.; Vedaldi D.; Basso G. and Viola G., *J. Med. Chem.* 2008, 51, 2387–2399.
- Aldana I.; Zarranz B.; Jaso A.; Lima L.M.; Monge A.; Maurel S. and Sauvain M., *Brazilian Jour. of Pharmaceutical Sciences*, vol. 42, n. 3, jul./set., 2006.
- Garofalo A.; Neamati N.; Grande F.; Aiello F.; De Grazia O. and Brizzi A., *Bioorg. & Med. Chem.* 15 (2007) 288–294.
- Hamzah A.S.; Mohammat M.F. and Shaameri Z., *Molecules* 2009, 14, 250-256.
- Anslyn E.V.; Krug R.M.; You L.; Jeong Cho E.; Leavitt J.; Mad L.C.; Montelione G.T.; Ellington A. and Robertus J.D., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 21 (2011) 3007–3011.
- Pujol M.D.; Harrak Y.; Weber S.; Gómez A.B. and Rosell G., *Arkivoc* 2007 (iv) 251-259.
- Vennerstrom J.L.; Cheruku S.R. and Padmanilayam M.P., *Tetrahedron Letters* 44 (2003) 3701–3703.
- Florio S.; Epifani E.; Ingrosso G.; Sgarra R. and Stasi F., *Tetrahedron Vol. 43, No 12 (1987) 2769-2778.*

- Sobolev A.; Cekavicus B.; Kore K.; Jakovele L.; Plotniece A.; Pajuste K.; Petrova M. and Belyakov S., *Tetrahedron Letters* 52 (2011) 6246–6249.
- Rampa A.; Piazzzi L.; Belluti F.; Bisi A.; Gobbi S.; Rizzo S.; Bartolini M.; Andrisano V. and Recanatini M., *Bioorg. & Med. Chem.* 15 (2007) 575–585.
- Omar M.A.; Shaker Y.M.; Galal S.A.; Ali M.M.; Kerwin S.M.; Rodriguez M.L.; Tokuda H.; Ramadan R.A. and El Diwani H.I., *Bioorg. & Med. Chem.* (2012).