

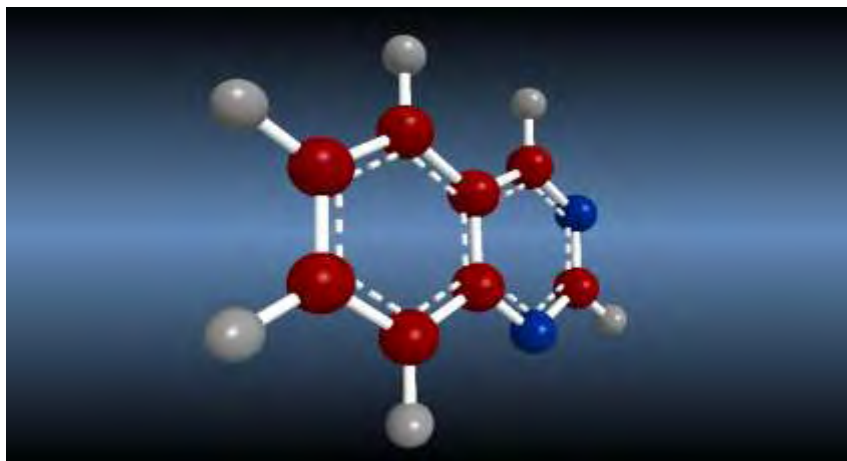


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟ-ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*“Σύνθεση και ταυτοποίηση, μέσω φασματοσκοπικών τεχνικών, νέων
αλκυνολο-υποκατεστημένων παραγώγων κιναζολίνης ως εν δυνάμει
αντικαρκινικών παραγόντων”*



ΑΝΑΓΝΩΣΤΟΠΟΥΛΟΣ ΑΝΔΡΕΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2019

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κοιμώτης Δημήτριος: Καθηγητής Οργανικής Χημείας με έμφαση στη Σύνθεση Βιοδραστικών Μορίων, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Μήτσος Χρήστος: Μέλος Εργαστηριακού Διδακτικού Προσωπικού (Ε.ΔΙ.Π), Εργαστήριο Βιο-οργανικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Τζιουμάκη Νίκη: Διδάσκουσα Π.Δ. 407, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιο-οργανικής χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, με επιβλέποντα καθηγητή τον κ. Χρήστο Μήτσο. Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Κομιώτη Δημήτρη που δέχτηκε να πραγματοποιήσω την διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο του, για την ανάθεση του θέματος και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά Μήτσο Χρήστο και για την υπομονή που υπέδειξε, για τις επικοινωνητικές υποδείξεις και συμβουλές που μου παρείχε, για το χρόνο που διέθεσε και την προσπάθεια που κατέβαλε καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων και για όλες τις γνώσεις που μου μεταλαμπάδευσε.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου, τον κ. Κολλάτο Νικόλαο και την κ. Τζιουμάκη Νίκη, για την άψογη συνεργασία και τη βοήθεια που μου παρείχαν κάθε φορά που τη χρειάστηκα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT.....	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1 Το ετεροκυκλικό σύστημα της κιναζολίνης	7
1.2 Παράγωγα κιναζολίνης εγκεκριμένα ως φάρμακα	9
1.3 Αντικαρκινικά παράγωγα κιναζολίνης αναστολείς του EGFR	12
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	16
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	17
3.1 Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας	17
3.2 Χρωματογραφία στήλης.....	18
3.3 Σημείο τήξεως (Tm).....	19
3.4 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)	20
3.5 Συσκευή μικροκυμάτων	21
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	22
4.1 Επισκόπηση συνθετικής πορείας	22
4.2 Μεθοδολογία σύνθεσης	23
4.3 Επιμέρους αντιδράσεις.....	25
5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΕΛΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ	36
5.1 NMR πρωτονίου	36
5.2 NMR άνθρακα-13	39
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	42
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	43

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κιναζολίνη είναι μια αρωματική ετεροκυκλική οργανική ένωση που προκύπτει από τη συμπύκνωση ενός βενζολίου και μίας πυριμιδίνης. Πολλά παράγωγα που χρησιμοποιούν ως βάση την κιναζολίνη έχουν χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή φαρμάκων με ποικίλες δράσεις.

Οι EGFR είναι μια οικογένεια κινασών τυροσίνης οι μεταλλάξεις των οποίων έχει αποδειχθεί ότι συνδέονται με τον καρκίνο καθώς προκαλούν ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αποτροπή της απόπτωσης, αγγειογένεση, κυτταρική μετανάστευση και μετάσταση καρκινικών κυττάρων. Ορισμένα παράγωγα της κιναζολίνης με υποκαταστάτη μια ανιλίνη στη θέση 4 και μια πλευρική πλευρική αλυσίδα στη θέση 6 ή και 7 αποτελούν αναστολείς των EGFR και χρησιμοποιούνται ως αντικαρκινικοί παράγοντες. Τέτοια παράγωγα είναι η γεφτινίμη, η ερλοτινίμη, η λαπατινίμη και η αφατινίμη.

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας σειράς νέων ενώσεων με βάση την κιναζολίνη, αναλόγων των παραπάνω εγκεκριμένων αντικαρκινικών παραγόντων, καθώς και η ταυτοποίησή τους με φασματοσκοπικές μεθόδους, με σκοπό την μελλοντική βιολογική τους αποτίμηση ως προς τις αντικαρκινικές του ιδιότητες.

ABSTRACT

Quinazoline is an aromatic heterocyclic organic compound made from fusion of a benzene and a pyrimidine ring. Many derivatives that use quinazoline as a base have been used for the manufacture of drugs with varying effects.

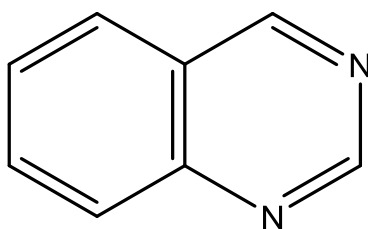
EGFRs are a family of tyrosine kinases whose mutations have been shown to be linked to cancer as they cause uncontrolled cell proliferation, apoptosis prevention, angiogenesis, cell migration and cancer cell metastasis. Some quinazoline derivatives with an aniline substituted at position 4 and a side chain at the 6 and / or 7 positions are EGFR inhibitors and are being used as anticancer agents. Such derivatives are gefitinib, erlotinib, lapatinib and afatinib.

In the present thesis, we achieved the synthesis of a series of novel quinazoline-based compounds, analogs of the above approved anticancer agents, and their structural confirmation through spectroscopic methods, with a view to their future biological evaluation of their potential anticancer properties.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Το ετεροκυκλικό σύστημα της κιναζολίνης

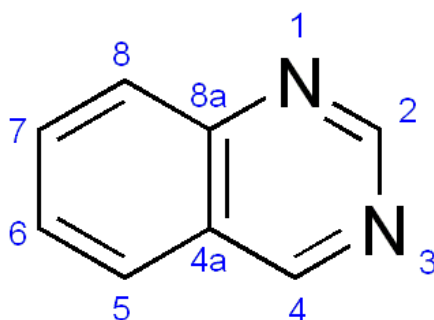
Η κιναζολίνη είναι μια αρωματική ετεροκυκλική οργανική ένωση που έχει μοριακό τύπο $C_8H_6N_2$. Η κιναζολίνη είναι ένα στερεό κίτρινου χρώματος, το οποίο έχει κρυσταλλική φύση και επίσης διαλύεται στο νερό. Η κιναζολίνη προκύπτει από τη συμπύκνωση ενός βενζολίου και μίας πυριμιδίνης. Η παρουσία του βενζολικού δακτυλίου επηρεάζει τις ιδιότητες του δακτυλίου πυριμιδίνης. Επίσης, τα δύο άτομα αζώτου στην κιναζολίνη δεν είναι ισοδύναμα. [1]



Εικόνα 1: Δομή Κιναζολίνης

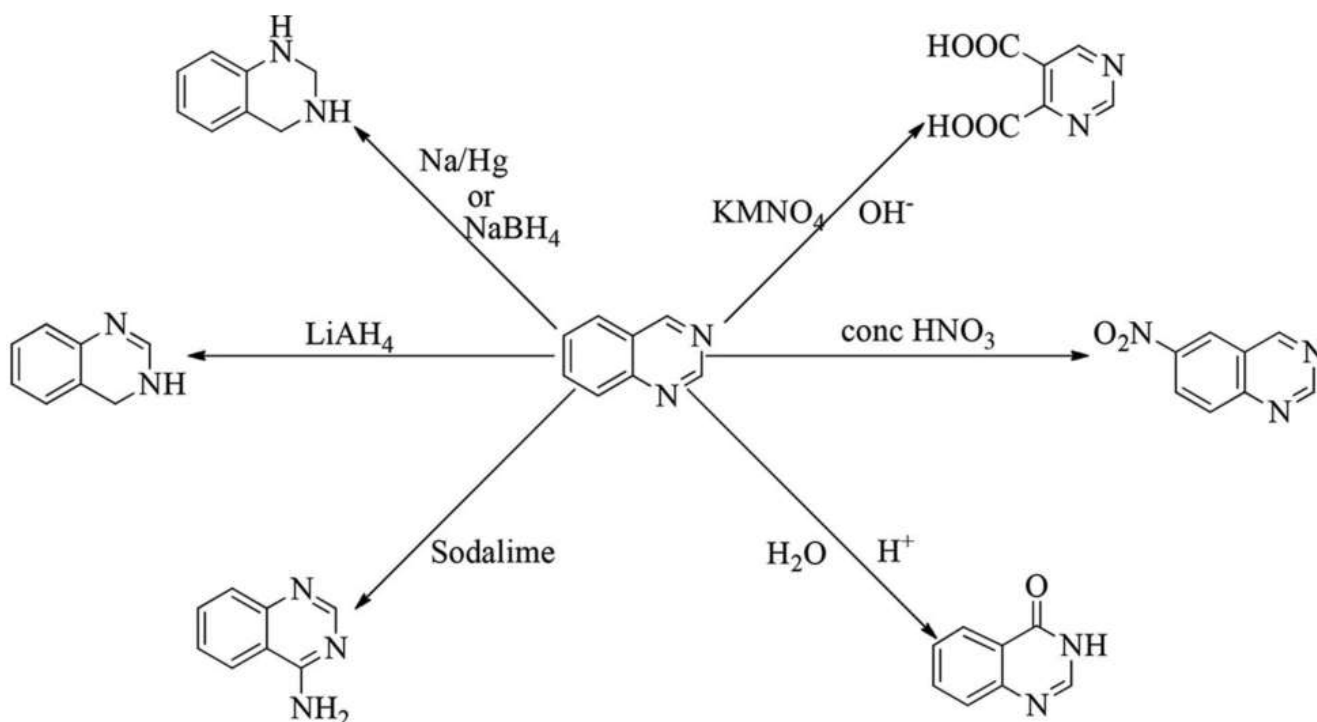
Το 1869 ο Griess παρασκεύασε το πρώτο παράγωγο κιναζολίνης, την 2-κυανο-3,4-διϋδρο-4-οξοκιναζολίνη, με την αντίδραση των κυανογόνων με ανθρανικό οξύ. Το δικυκλικό προϊόν ονομάστηκε δικυανοαμιδο-βενζοϋλιο και χρησιμοποίησε αυτό το όνομα μέχρι το 1885. Η παρασκευή της κιναζολίνης ήρθε πολλά χρόνια αργότερα, όταν οι Bischler και Lang παρέλαβαν την κιναζολίνη με αποκαρβοξυλίωση του 2-καρβοξυ παραγώγου. Μια πιο ικανοποιητική σύνθεση της κιναζολίνης επινοήθηκε στη συνέχεια από τον Gabriel το 1903. Το όνομα της ένωσης προτάθηκε από την Widdege. Άλλες ονομασίες όπως φαινιμζίνη, βενζυλεναμιδίνη, βενζο-1,3-διαζίνη, 5,6-βενζοπυριμιδίνη και 1,3-διαζαναφθαλίνη έχουν χρησιμοποιηθεί περιστασιακά. [2]

Το σύστημα αρίθμησης του μορίου της κιναζολίνης που χρησιμοποιείται σήμερα προτάθηκε από τους Paal και Busch.[3]



Εικόνα 2: Αρίθμηση Κιναζολίνης

Σε ψυχρά διαλύματα οξέων και αλκαλίων, οι κιναζολίνες παραμένουν σταθερές ενώ αποσυντίθενται σε ζέοντα όξινα και αλκαλικά διαλύματα. Όταν οι κιναζολίνες βράζονται με HCl τότε λαμβάνει χώρα ο σχηματισμός αμμωνίας, ο-αμινοβενζαλδεΐδης και μυρμηκικού οξέος. Η κιναζολίνη παρουσιάζει αντιδράσεις οξειδωσης, αναγωγής, αμίνωσης και νίτρωσης όπως απεικονίζεται παρακάτω στην εικόνα 3. [1]



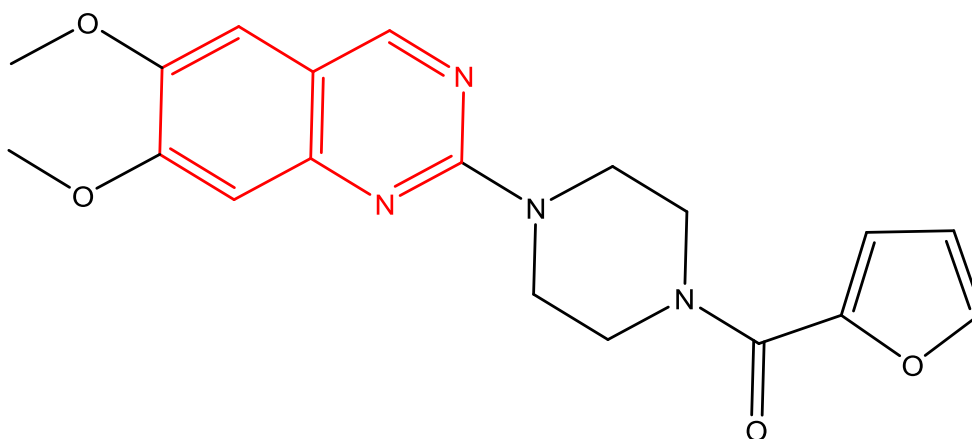
Εικόνα 3: Αντιδράσεις Κιναζολίνης

1.2 Παράγωγα κιναζολίνης εγκεκριμένα ως φάρμακα

Τα παράγωγα κιναζολίνης έχουν προσελκύσει σημαντικό ενδιαφέρον λόγω των ποικίλων φαρμακολογικών τους δράσεων όπως για παράδειγμα ανθελονοσιακές, αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις, αντισπασμωδικές, αντιυπερτασικές, αντιδιαβητικές και αντικαρκινικές ιδιότητες καθώς και αναστολή της χολινεστεράσης. Επιπλέον διάφορα παράγωγα της κιναζολίνης παρουσιάζουν αναστολή της αναγωγής του διυδροφυλλικού οξέος, και χρησιμοποιήθηκαν επίσης ως αναστολείς κινασών[4], ιδιότητες οι οποίες μπορούν να αξιοποιηθούν για τη θεραπεία διαφόρων μορφών καρκίνου. Παρακάτω παρουσιάζονται ορισμένα χαρακτηριστικά παραδείγματα παραγώγων κιναζολίνης που έχουν εγκριθεί προς χρήση.

Πραζοσίνη (Prazosin)

Η πραζοσίνη είναι ένα φάρμακο που λαμβάνεται από το στόμα και χρησιμοποιείται κυρίως για τη θεραπεία της υψηλής αρτηριακής πίεσης, των συμπτωμάτων διευρυμένου προστάτη, της καρδιακής ανεπάρκειας και του συνδρόμου Raynaud.[5] Μια ακόμα πιθανή εφαρμογή της πραζοσίνης είναι η θεραπεία για τους εφιάλτες που προκαλούνται από το σύνδρομο μετατραυματικού στρες.[6]

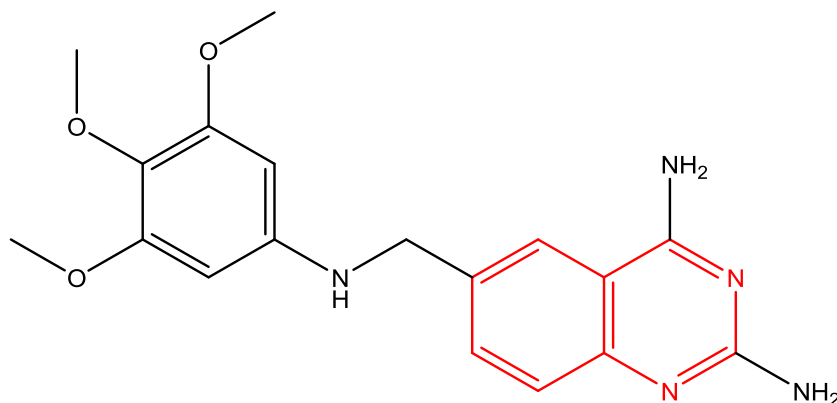


Εικόνα 4: Δομή Πραζοσίνης

Η πραζοσίνη είναι ένας μετασυναπτικός α_1 -blocker ο οποίος δρα ως ένας αντίστροφος αγωνιστής στους α_1 αδρενεργικούς υποδοχείς.[5] Οι υποδοχείς αυτοί είναι υποδοχείς συνδεδεμένοι με G-πρωτεΐνη (GPCR) και βρίσκονται στους λείους αγγειακούς μύες. Είναι υπεύθυνοι για την αγγειοσυσταλτική δράση της νορεπινεφρίνης. Μπορούν επίσης να εντοπιστούν σε διάφορα σημεία ολόκληρου του κεντρικού νευρικού συστήματος.[7]

Τριμετρεξάτη (Trimetrexate)

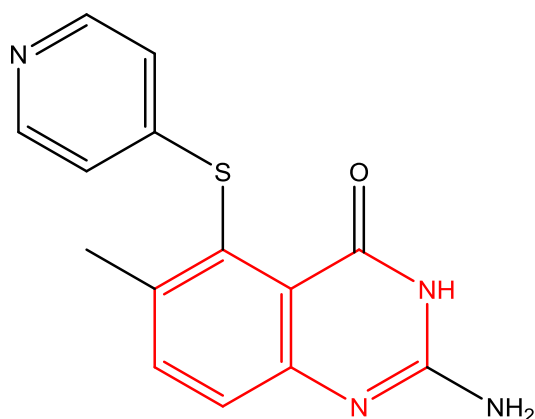
Η τριμετρεξάτη χρησιμοποιείται ως αντινεοπλασματικός αλλά και ως αντιπαρασιτικός παράγοντας για την πνευμονία από πνευμονοκύστη σε άτομα που πάσχουν από AIDS. Η τριμετρεξάτη αναστέλλει το φυλλικό οξύ μέσω της αναστολής της αναγωγής του διυδροφυλικού οξέος, αποτρέποντας έτσι τη σύνθεση πουρινών. Κατ' επέκταση λοιπόν αναστέλλεται η σύνθεση DNA σε ανθρώπινα κύτταρα λευχαιμίας.[8]



Εικόνα 5: Δομή Τριμετρεξάτης

Nolatrexed

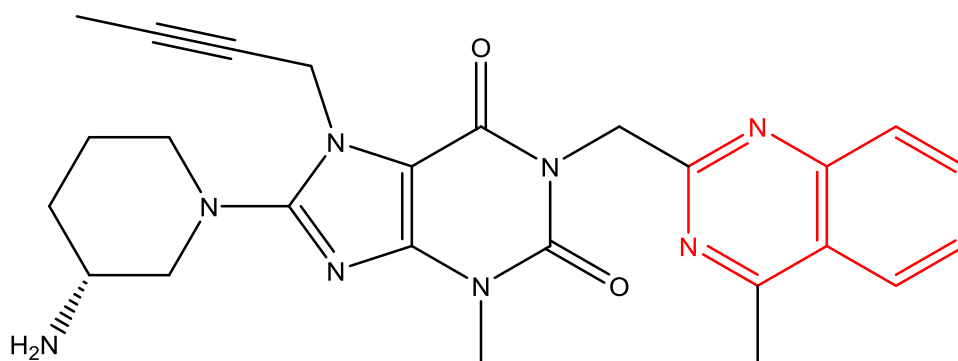
Το nolatrexed βρίσκεται ακόμα στο στάδιο των κλινικών μελετών όπου εξετάζεται η αντικαρκινική του δράση σε ηπατικά καρκινικά κύτταρα. Έχει δράση αναστολέα της συνθάσης του θυμιδικού οξέος καταλαμβάνοντας τη θέση του φυλλικού οξέος με αποτέλεσμα την αναστολή της σύνθεσης νουκλεοτιδίων θυμίνης και κατ' επέκταση την αναστολή της αντιγραφής DNA, την πρόκληση σφαλμάτων στο DNA, διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση S και τελικά την πρόκληση απόπτωσης μέσω καταρράκτη κασπασών.[9]



Εικόνα 6: Δομή του Nolatrexed

Λιναγλιπτίνη (Linagliptin)

Η λιναγλιπτίνη είναι ένας αναστολέας της διπεπτιδυλ-πεπτιδάσης 4 (DPP-4), ενός ενζύμου το οποίο εμπλέκεται στην απενεργοποίηση των ινκρετινών ορμονών GLP-1 και GIP (παρόμοιο με τη γλυκαγόνη πεπτιδιο-1, γλυκοζοεξαρτώμενο ινσουλινοτροπικό πολυπεπτίδιο). Αυτές οι ορμόνες αποδομούνται ταχέως από το ένζυμο DPP-4. Έτσι, η λιναγλιπτίνη αυξάνει τις συγκεντρώσεις ενεργών ορμονών ινκρετίνης, διεγείρει την απελευθέρωση της ινσουλίνης με τρόπο εξαρτώμενο από τη γλυκόζη και μειώνει τα επίπεδα γλυκαγόνης στην κυκλοφορία.[10]



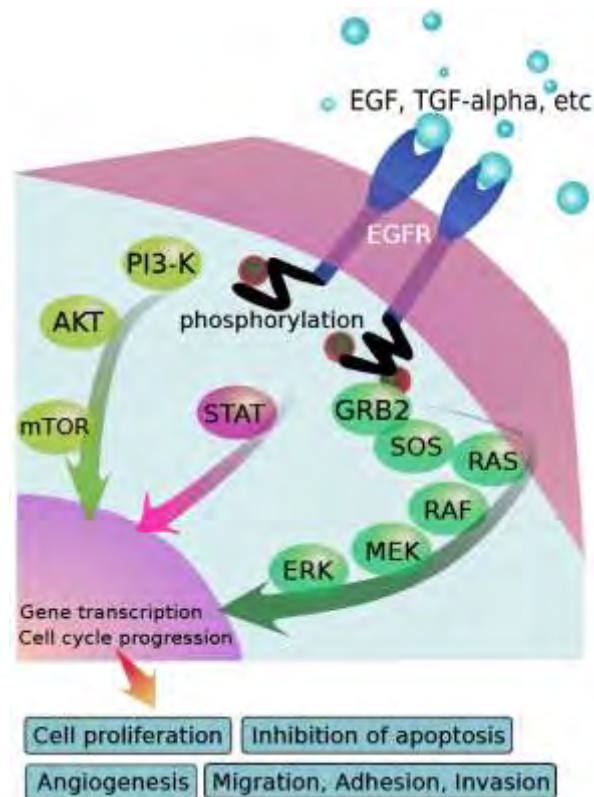
Εικόνα 7: Δομή Λιναγλιπτίνης

Η λιναγλιπτίνη εγκρίθηκε το 2011 από την Αμερικανική Υπηρεσία Φαρμάκων και Φαρμάκων ως βοηθητικό φάρμακο σε συνδυασμό με άσκηση για τη βελτίωση του γλυκαιμικού ελέγχου σε ενήλικες που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη τύπου II και είναι ευρύτερα γνωστή με την εμπορική της ονομασία Tradjenta.[11]

1.3 Αντικαρκινικά παράγωγα κινιζολίνης αναστολείς του EGFR

Οι κινάσες τυροσίνης ρυθμίζουν πολλούς φυσιολογικούς καταρράκτες, συμπεριλαμβανομένου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης, της μετανάστευσης και του μεταβολισμού, μέσω της μεταφοράς του τελικού φωσφορικού άλατος του ATP σε κατάλοιπα τυροσίνης πρωτεϊνικών υποστρωμάτων.[12] Ο ρόλος των πρωτεϊνικών κινασών στην ογκογένεση είναι εμφανής στην ικανότητά τους να μετασχηματίζουν κανονικά κύτταρα σε καρκινογόνους φαινότυπους όταν εκφράζονται σε μεταλλαγμένες, μη ρυθμισμένες μορφές ή όταν παράγονται σε ασυνήθιστα υψηλά επίπεδα. Οι πρωτεϊνικές κινάσες όχι μόνο ελέγχουν την κυτταρική διαίρεση αλλά επίσης βοηθούν στην αγγειογένεση που απαιτείται για την ανάπτυξη και τη μετάσταση του όγκου και έτσι η ανάπτυξη μη τοξικών και επιλεκτικών αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών σε καρκινικά κύτταρα αποτελεί έναν στόχο για θεραπεία καρκίνου που αξίζει περαιτέρω διερεύνηση.[13]

Οι erbB ή αλλιώς HER είναι μια οικογένεια υποδοχέων με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης τύπου 1, που αποτελείται από τέσσερις υποοικογένειες, τον επιδερμικό υποδοχέα αυξητικού παράγοντα EGFR (γνωστό και ως erbB-1/HER-1), τον erbB-2/Neu/HER-2, τον erbB-3/HER-3 και τον erbB-4/HER-4.[14]



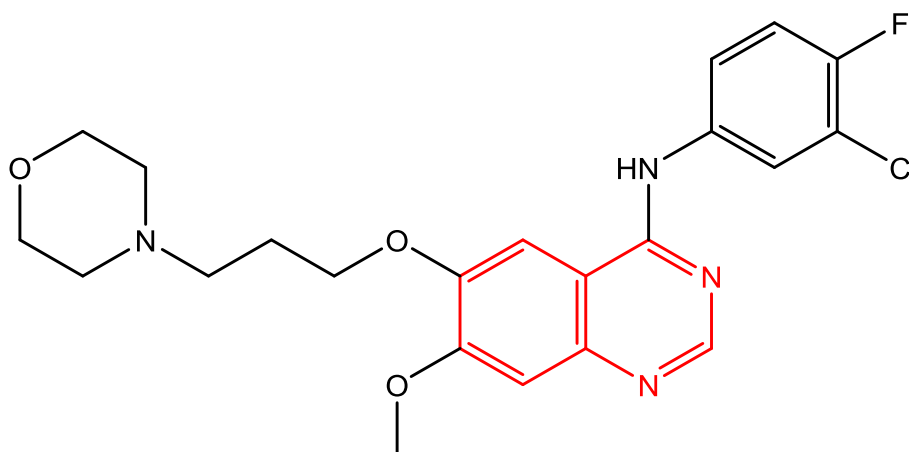
Εικόνα 8: Σηματοδοτικό μονοπάτι του EGFR

Η μη φυσιολογική σηματοδότηση των οδών που περιλαμβάνουν αυτές τις υποοικογένειες έχει σαν αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την αποτροπή της απόπτωσης, την αγγειογένεση, την κυτταρική μετανάστευση και την μετάσταση καρκινικών κυττάρων.[15] Σε πολλές περιπτώσεις ανθρώπινων όγκων συμπεριλαμβανομένων των καρκίνων του μαστού, της ουροδόχου κύστεως, του παχέος εντέρου και των πνευμόνων, έχει εντοπιστεί υπερέκφραση του EGFR και του HER-2.[16]

Οι κλινικά διαθέσιμοι αναστολείς των EGFR γεφτινίμη, ερλοτινίμη, λαπατινίμη και αφατινίμη βασίζονται σε ένα βασικό σκελετό κιναζολίνης με υποκαταστάτη μια ανιλίνη στη θέση 4. Ένα κοινό γνώρισμα αυτών των φαρμάκων είναι η τοποθέτηση μιας πλευρικής αλυσίδας στις θέσεις 6 ή και 7 του πυρήνα της κιναζολίνης η οποία αυξάνει τη διαλυτότητα της ένωσης. Αυτές οι πλευρικές αλυσίδες βελτιώνουν τις φυσικές ιδιότητες της ένωσης και δημιουργούν ένα πιο ευνοϊκό φαρμακοκινητικό προφίλ, αν και είναι πιθανό να συμβάλλουν επίσης στην βελτίωση της απόδοσης και της επιλεκτικότητας των φαρμάκων.[17] Παρακάτω παρουσιάζονται συνοπτικά τα προαναφερθέντα εγκεκριμένα αντι-καρκινικά φάρμακα.

Γεφτινίμη (Gefitinib)

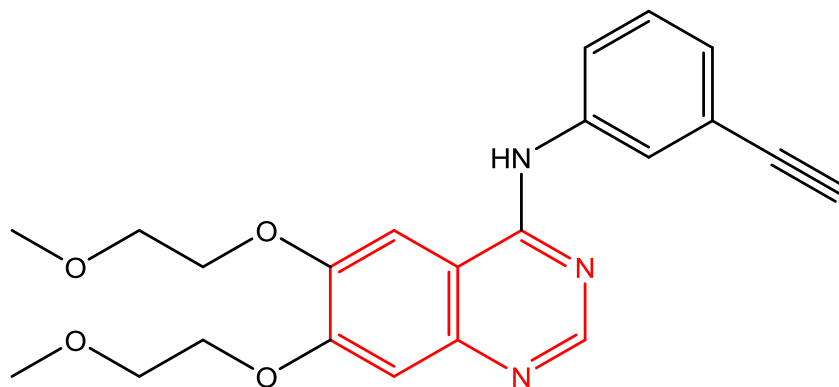
Η γεφτινίμη εγκρίθηκε από το εθνικό οργανισμό φαρμάκων της αμερικής (FDA) το 2003 και είναι εμπορικά διαθέσιμη με την ονομασία Iressa[®]. Είναι αναστολέας του EGFR και χρησιμοποιείται για τη θεραπεία ενηλίκων ασθενών με τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.[13]



Εικόνα 9: Δομή Γεφτινίμης

Ερλοτινίμη (Erlotinib)

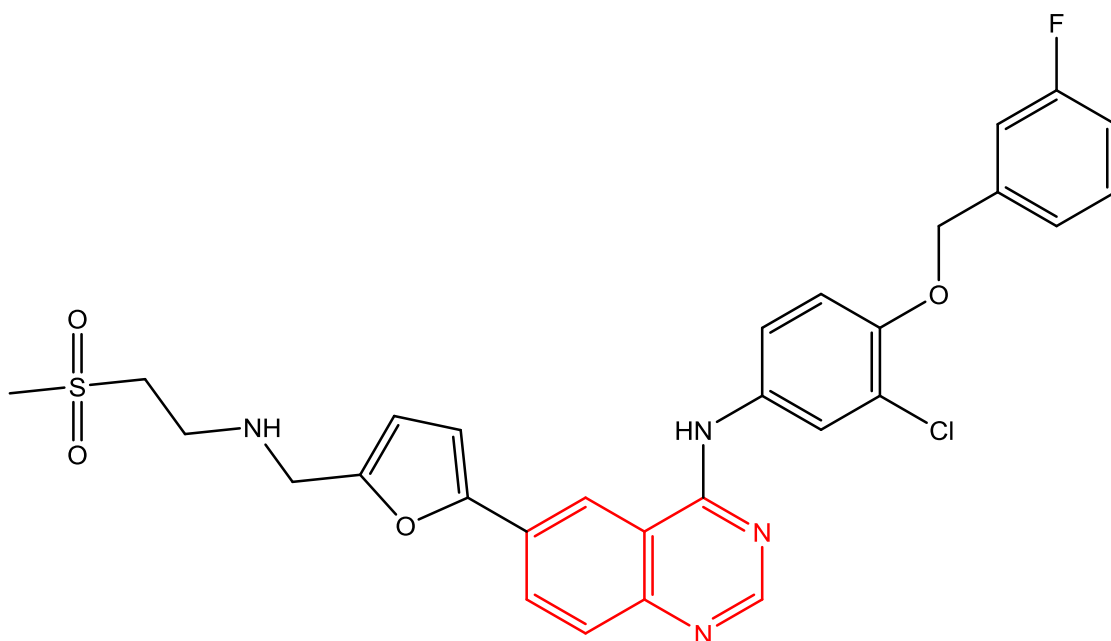
Η ερλοτινίμη εγκρίθηκε από το εθνικό οργανισμό φαρμάκων της αμερικής (FDA) το 2004 και είναι εμπορικά διαθέσιμη με την ονομασία Tarceva[®]. Όπως και η γεφιτινίμη αποτελεί έναν αναστολέα του EGFR και χρησιμοποιείται για τη θεραπεία ενηλίκων ασθενών με τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα καθώς επίσης και του καρκίνου του παγκρέατος.[13]



Εικόνα 10: Δομή Ερλοτινίμης

Λαπατινίμη (Lapatinib)

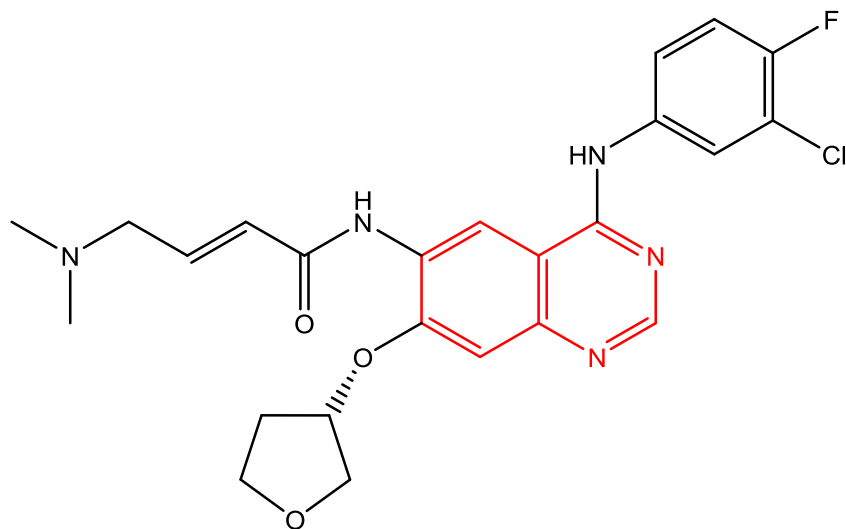
Η λαπατινίμη εγκρίθηκε από το εθνικό οργανισμό φαρμάκων της αμερικής (FDA) το 2010 και είναι εμπορικά διαθέσιμη με την ονομασία Tyverb[®]. Είναι αναστολέας του EGFR και του HER-2 και χρησιμοποιείται σε ενήλικες ασθενείς για τη θεραπεία του προχωρημένου ή μεταστατικού καρκίνου του μαστού όταν οι όγκοι υπερεκφράζουν τον HER-2.[13]



Εικόνα 11: Δομή Λαπατινίμης

Αφατινίμπη (Afatinib)

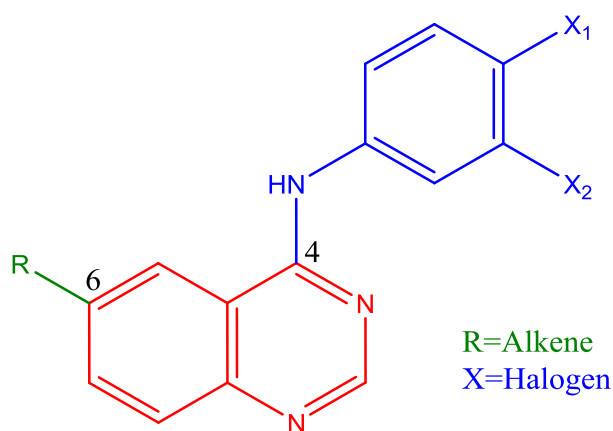
Η αφατινίμπη εγκρίθηκε από το εθνικό οργανισμό φαρμάκων της αμερικής (FDA) το 2013 και είναι εμπορικά διαθέσιμη με την ονομασία Giotrif[®]. Είναι αναστολέας του EGFR και του HER-2 και χρησιμοποιείται για τη θεραπεία ενηλίκων ασθενών με τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.[18]



Εικόνα 12: Δομή Αφατινίμπης

2. ΣΚΟΠΟΣ

Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, τα 4-ανιλο-υποκατεστημένα παράγωγα της κιναζολίνης έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να αξιοποιηθούν ως αντικαρκινικοί παράγοντες. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η σύνθεση νέων παραγώγων κιναζολίνης τα οποία, εκτός από μια αλογονο-υποκατεστημένη ανιλίνη στη θέση 4, θα περιέχουν διάφορα αλκίνια ως υποκαταστάτες στη θέση 6 και θα είναι ανάλογα των ήδη υπαρχόντων αντικαρκινικών φαρμάκων που παρουσιάστηκαν στην ενότητα 1.3 (εικόνα 13). Την σύνθεση αυτών των αναλόγων θα ακολουθήσει η ταυτοποίηση τους με τη χρήση της μεθόδου φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) πρωτονίου και άνθρακα.



Εικόνα 13: Διάγραμμα δομής παραγώγων κιναζολίνης

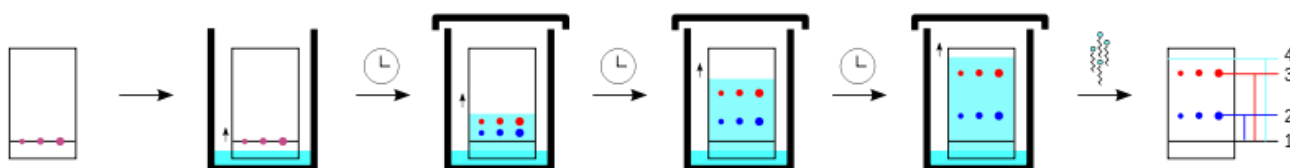
Η σύνθεση αυτών των παραγώγων κιναζολίνης πραγματοποιήθηκε με σκοπό την μελλοντική βιολογική αποτίμηση τους. Η αποτίμηση αυτή θα εξετάσει αρχικά τις πιθανές κυτταροτοξικές ιδιότητες των παραγώγων και στη συνέχεια την επιλεκτικότητα τους σε καρκινικά κύτταρα, ώστε να αξιολογηθεί η πιθανότητα χρήσης τους ως αντικαρκινικών παραγόντων.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Στη συγκεκριμένη ενότητα, αναλύονται οι αρχές των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραματικών μελετών. Σκοπός αυτών των μεθόδων είναι η ταυτοποίηση, ο καθαρισμός και ο χαρακτηρισμός των εκάστοτε νεοσυντιθέμενων ενώσεων.

3.1 Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας

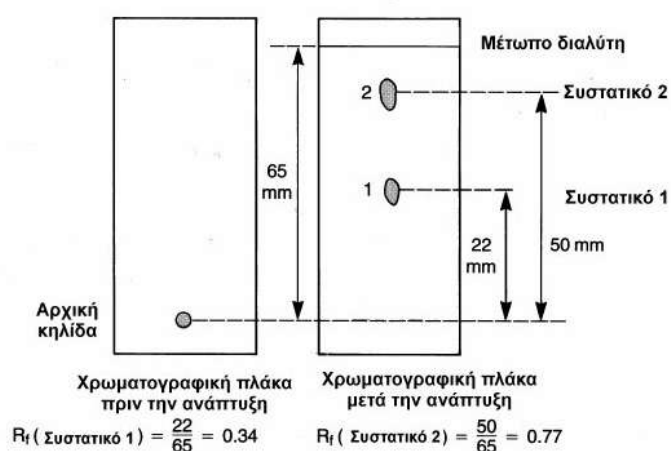
Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας είναι μια τεχνική χρωματογραφίας που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό μη πτητικών μιγμάτων. Με την συγκεκριμένη μέθοδο είναι δυνατός ο διαχωρισμός ουσιών με βάση τη διαφορά στη πολικότητά τους. Αυτό επιτυγχάνεται με την κατανομή των ουσιών μεταξύ μιας στατικής και μιας κινητής φάσης. Ως στατική φάση χρησιμοποιείται συνήθως ένα μίγμα γύψου και διοξειδίου του πυριτίου (silica gel) είτε τριοξειδίου του αργιλίου (alumina), το οποίο επιστρώνεται είτε σε γυαλί είτε σε φύλλα αλουμινίου ή πλαστικού, συνθέτοντας έτσι τον φορέα επίστρωσης. Η κινητή φάση αποτελείται από έναν οργανικό διαλύτη ή σύστημα διαλυτών (διαλύτης ανάπτυξης) οι οποίοι επιλέγονται με βάση την πολικότητα του εκάστοτε μίγματος.



Εικόνα 14: Αναπαράσταση της πορείας μιας TLC

Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει τα εξής βήματα. Αρχικά σε ένα πλακίδιο σημειώνεται, σε απόσταση 2 εκατοστά από τη βάση, μια γραμμή πάνω στην οποία σημειώνονται επίσης, σε απόσταση περίπου μισού εκατοστού μεταξύ τους, οι κουκίδες πάνω στις οποίες θα εναποθετηθούν οι προς διαχωρισμό ουσίες. Στη συνέχεια εναποθέτονται κηλίδες των εν λόγω ουσιών στις αντίστοιχες κουκίδες, πράγμα που επιτυγχάνεται με την χρήση τριχοειδούς σωλήνα. Εφόσον οι κηλίδες στεγνώσουν είτε στον ατμοσφαιρικό αέρα είτε με τη χρήση θερμού αέρα στους 400°C, το πλακίδιο τοποθετείται σε ένα γυάλινο κυλινδρικό δοχείο (θάλαμος ανάπτυξης), το οποίο περιέχει τον κατάλληλο διαλύτη ανάπτυξης. Το δοχείο αυτό καλύπτεται με καπάκι ώστε να διασφαλιστεί η σταθερότητα των ατμών στο εσωτερικό του. Ο διαλύτης στο εσωτερικό του δοχείου αρχίζει να κινείται κατά μήκος του πλακιδίου λόγω τριχοειδών φαινομένων, παρασύροντας τα συστατικά του μίγματος και διαχωρίζοντάς τα. Όταν το μέτωπο του διαλύτη φτάσει περίπου ένα εκατοστό από την κορυφή του πλακιδίου, τότε αυτό απομακρύνεται από το δοχείο και αφήνεται να στεγνώσει στον ατμοσφαιρικό αέρα. Τέλος ο προσδιορισμός των θέσεων των κηλίδων γίνεται με υπεριώδη ακτινοβολία όπου οι κηλίδες παρουσιάζουν φθορισμό.

Με την μέθοδο αυτή ήταν δυνατός ο έλεγχος της πορείας των ατιδράσεων αλλά και της καθαρότητας των προϊόντων, χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα τα αντιδρώντα κάθε αντίδρασης. Η απόσταση που διένυσε η ουσία πάνω στο πλακίδιο σχετίζεται άμεσα με την πολικότητά της. Όσο πιο πολική είναι μια ουσία, τόσο περισσότερο προσροφάται στην στατική φάση και συνεπώς τόσο χαμηλότερα εμφανίζεται. Αντίθετα, οι λιγότερο πολικές ουσίες προσροφώνται λιγότερο και έτσι διανύουν μεγαλύτερη απόσταση κατά μήκος του πλακιδίου. Με τα στοιχεία, λοιπόν, που συλλέγονται από την μέθοδο υπολογίζεται η σταθερά επιβράδυνσης R_f κάθε ουσίας. Η σταθερά επιβράδυνσης R_f ορίζεται ως ο λόγος της απόστασης που διένυσε η ουσία προς την απόσταση που διένυσε ο οργανικός διαλύτης (μέτωπο διαλύτη), και η τιμή της είναι χαρακτηριστική για την κάθε ουσία.



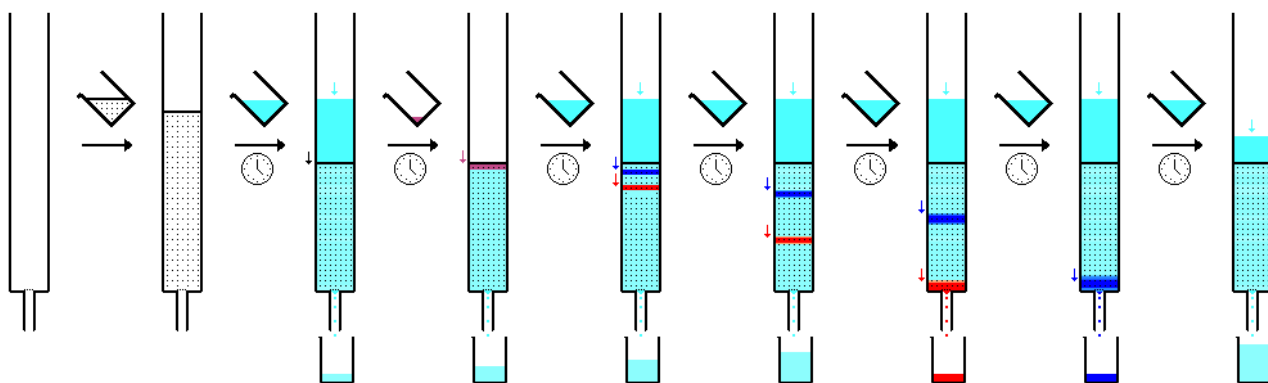
Εικόνα 15: Υπολογισμός R_f

3.2 Χρωματογραφία στήλης

Η χρωματογραφία στήλης είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον σχετικά εύκολο και αξιόπιστο καθαρισμό και διαχωρισμό μιγμάτων. Ο μηχανισμός αυτής της μεθόδου βασίζεται στην ίδια αρχή με αυτή της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας, με τη διαφορά ότι η διαδικασία πραγματοποιείται σε μεγαλύτερη κλίμακα.

Συνηθέστερα, όπως και στην συγκεκριμένη περίπτωση, ως στατική φάση χρησιμοποιείται silica gel, μιας και αποτελεί ένα προσροφητικό υλικό με υψηλή πολικότητα, και εξού αξιοποιείται πολύ συχνά στην οργανική χημεία. Ως κινητή φάση από την άλλη χρησιμοποιείται ένα μίγμα οργανικών διαλυτών.

Παρακάτω αναλύεται η διαδικασία την εν λόγω μεθόδου. Αρχικά επιλέγεται μια γυάλινη στήλη με κατάλληλο ύψος και διάμετρο, με βάση τη μάζα του προς διαχωρισμού μίγματος. Στη συνέχεια ετοιμάζεται εναιώρημα του διαλύτη με το silica gel, το οποίο μεταφέρεται στη στήλη προσεκτικά ώστε να κατανεμηθεί ομοιόμορφα κατά μήκος του σωλήνα. Με την βοήθεια αέρα υπό πίεση (flash chromatography) ο διαλύτης διέρχεται από τον σωλήνα μέχρις ότου να παραμείνει μόνο μια μικρή ποσότητα του στην επιφάνεια του silica gel ώστε αυτό να μην στεγνώσει. Το προς διαχωρισμό μίγμα, αφού πρώτα διαλυθεί σε μικρή ποσότητα κατάλληλου διαλύτη, τοποθετείται στην κορυφή της στήλης και αφήνεται να εισέλθει στο silica gel. Έπειτα προστίθεται στην στήλη η κινητή φάση η οποία διαπερνά την silica με την χρήση αέρα υπό πίεση, ώστε αυτή να εκλουσθεί. Τα δείγματα που εκρέουν από την στήλη συλλέγονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες σε ποσότητα αντίστοιχη με την ποσότητα του silica gel. Τέλος στα δείγματα αυτά εκτελείται TLC ώστε να ταυτοποιηθεί η επιθυμητή ουσία, και συνεπώς επιλέγονται τα αντίστοιχα δείγματα που περιέχουν το καθαρισμένο πλέον προϊόν, απομονώνονται και συμπυκνώνονται. Σε αυτή την μορφή χρωματογραφίας, η υψηλή πολικότητα της στατικής φάσης είναι υπεύθυνη για τον σχηματισμό ισχυρών δεσμών μεταξύ της στατικής φάσης και των πιο πολικών ενώσεων του μίγματος, με αποτέλεσμα οι πιο πολικές ενώσεις να εξέρχονται πιο αργά από την στήλη σε αντίθεση με τις λιγότερο πολικές ενώσεις.

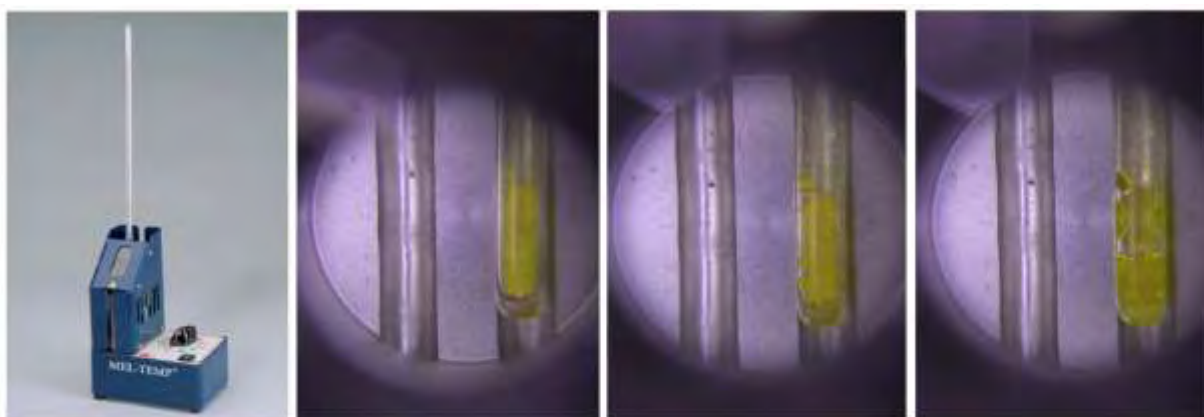


Εικόνα 16: Αναπαράσταση Χρωματογραφίας στήλης

3.3 Σημείο τήξεως (Tm)

Το σημείο τήξεως αποτελεί ένα φυσικό μέγεθος το οποίο είναι χαρακτηριστικό για κάθε ένωση. Συνεπώς η μέτρηση του σημείου τήξεως μια ένωσης είναι απαραίτητο μέρος για τον πλήρη χαρακτηρισμό της. Σε κάθε ένωση αντιστοιχεί μια θερμοκρασία στην οποία η ένωση αυτή μεταβαίνει από στερεή σε υγρή κατάσταση. Η τιμή αυτή μπορεί να έχει εύρος της τάξης των 2-3°C. Εάν το εύρος είναι μεγαλύτερο, αυξάνεται η πιθανότητα μια ένωση να περιέχει προσμίξεις, πράγμα που μας βοηθά να εξακριβώσουμε την καθαρότητα μιας ένωσης.

Για να γίνει η μέτρηση του σημείου τήξεως, μια μικρή ποσότητα της ένωσης σε στερεή μορφή, αφού κονιοποιηθεί με τη χρήση γουδιού από νεφρίτη, τοποθετείται σε τριχοειδή σωληνάκια. Ύστερα, τα σωληνάκια αφήνονται να πέσουν από κάποιο ύψος, με σκοπό να πακεταρισθεί καλά η ένωση στο εσωτερικό τους και να αφαιρεθούν τυχόν φυσαλίδες αέρα. Στη συνέχεια επιστρατεύεται η χρήση μιας ειδικής συσκευής, στο εσωτερικό της οποίας τοποθετούνται τα σωληνάκια. Η συσκευή αυτή επιτρέπει την χειροκίνητη ρύθμιση της θερμοκρασίας και περιέχει θερμομέτρο υδραργύρου για την παρακολούθηση της μεταβολής της θερμοκρασίας. Η παρακολούθηση του σωληναρίου γίνεται με τη βοήθεια ενσωματωμένου μεγεθυντικού φακού. Η πρώτη καταμέτρηση της θερμοκρασίας γίνεται όταν παρατηρηθεί ο σχηματισμός του πρώτου σταγονιδίου στο εσωτερικό του κάθε σωληναρίου, ενώ η δεύτερη και τελευταία καταγράφεται όταν η ένωση ρευστοποιηθεί πλήρως.



Εικόνα 17: Συσκευή μέτρησης σημείου τήξεως και απεικόνιση δειγμάτων κατά τη διαδικασία μέτρησης (στερεό, πρώτες σταγόνες, υγρό)

3.4 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού είναι μια τεχνική ανάλυσης, η οποία αξιοποιεί ακτινοβολία σε μεγάλα μήκη κύματος, με χαμηλή ενέργεια, στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στις διεγέρσεις πυρηνών που βρίσκονται σε ισχυρό μαγνητικό πεδίο, οι οποίες προκαλούνται από ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων. Οι πυρήνες που παρουσιάζουν μεγαλύτερο ενδιαφέρον είναι το ^1H και το ^{13}C , καθώς αυτοί βρίσκονται εξ ορισμού σε όλες τις οργανικές ενώσεις.

Η κύρια εφαρμογή της NMR στην οργανική σύνθεση είναι ο προσδιορισμός της δομής και η ταυτοποίηση της νεοσυντιθέμενης ένωσης. Το φάσμα NMR του ^1H , του ^{13}C ή και των δύο αποτελεί βασικό στοιχείο για την ταυτοποίηση της ένωσης. Ένας βασικός λόγος, που καθιστά την μέθοδο αυτή ιδιαίτερα δημοφιλή στον τομέα της οργανικής χημείας, είναι η απλότητα της ερμηνείας των φασμάτων τους.

3.5 Συσκευή μικροκυμάτων

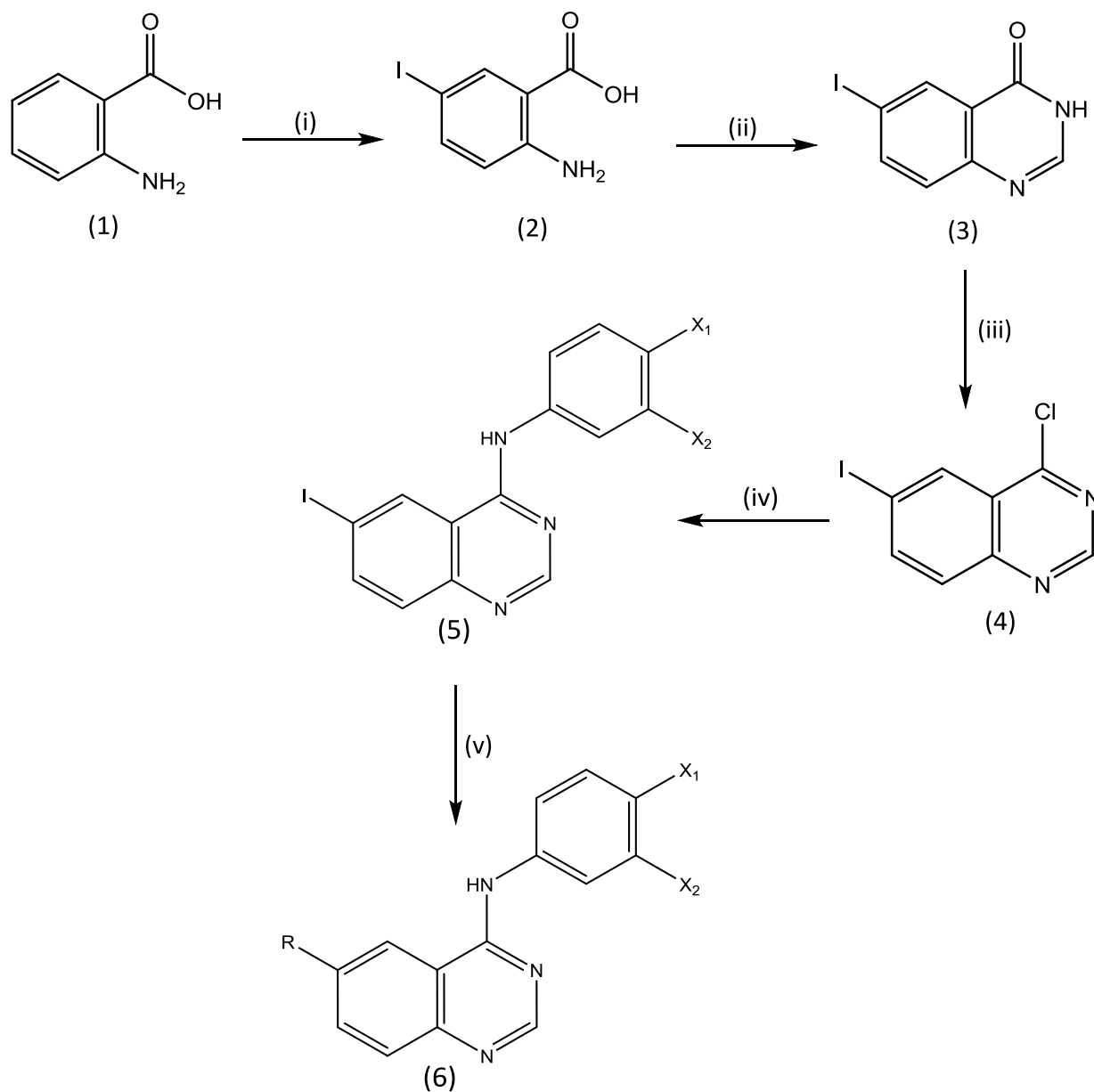
Όλες οι αντιδράσεις που απαιτούσαν τη χρήση μικροκυμάτων πραγματοποιήθηκαν στη συσκευή μικροκυμάτων CEM Discover με προσάρτηση Explorer που λειτουργεί σε συχνότητα 2,45 GHz με συνεχή δύναμη ακτινοβολίας από 0 έως 300 Watt με μέγιστη εκπεμπόμενη ισχύ της τάξης των 300 Watt και μέγιστη επιτρεπτή πίεση της τάξης των 250 PSI. [19]



Εικόνα 18: Συσκευή μικροκυμάτων CEM Discover

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1 Επισκόπηση συνθετικής πορείας



(i): KI (ιωδιούχο κάλιο), H_2O_2 (υπεροξειδίο του υδρογόνου), CH_3COOH (οξικό οξύ)

(ii): HCONH_2 (φορμαμίδιο)

(iii): SOCl_2 (θειονυλο χλωρίδιο), DMF (N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο)

(iv): αλογονο-υποκατεστημένη ανιλίνη, i-PrOH (ισοπροπανόλη)

(v): $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (τετράκις-τριφαινυλο φωσφινο παλλάδιο), CuI (ιωδιούχος χαλκός), Et_3N (τριαιθυλαμίνη), DMF (N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο), R (υποκαταστάτες ακετυλενίου)

4.2 Μεθοδολογία σύνθεσης

Στο πρώτο μέρος των αντιδράσεων (αντιδράσεις i ,ii , iii και iv) πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της *N*-(3-χλωροφαινυλο)-6-ιωδοκιναζολίν-4-αμίνης (**5**) η οποία αποτέλεσε την πρώτη ύλη για τις τελικές αντιδράσεις.

Στην αντίδραση (i) χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη το εμπορικά διαθέσιμο 2-αμινοβενζοϊκό οξύ ή αλλιώς ανθρανιλικό οξύ (**1**) στο οποίο έγινε υποκατάσταση με ιώδιο στη θέση 5 ώστε να προκύψει το 2-αμινο-5-ιωδο-βενζοϊκό οξύ (**2**) με τη χρήση ιωδιούχου καλίου (KI), υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) και οξικού οξέος (CH₃COOH).

Η αντίδραση (ii) ονομάζεται σύνθεση Niementowski και είναι η κυκλοποίηση του προϊόντος (**2**) ώστε να προκύψει η 6-ιωδο κιναζολίν-4(3H)-όνη (**3**) χρησιμοποιώντας φορμαμίδιο (HCONH₂). [3]

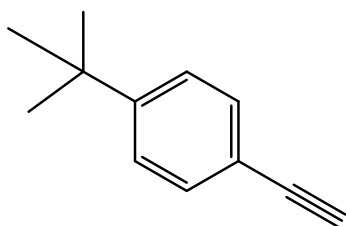
Στην αντίδραση (iii) χρησιμοποιήθηκε θειονυλοχλωρίδιο (SOCl₂) ώστε να επιτευχθεί χλωρίωση του προϊόντος (**3**) προς την 6-ιωδο-4-χλωροκιναζολίνη (**4**). Η αντίδραση καταλύθηκε από το *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) και θερμάνθηκε με reflux.

Η αντίδραση (iv) και (iv)' είναι η πυρηνόφιλη αντικατάσταση του χλωρίου της ένωσης (**4**) με μια 3-χλώρο ανιλίνη και 4-φθόρο ανιλίνη αντίστοιχα, με ισοπροπανόλη (*i*-PrOH) ως διαλύτη ώστε να προκύψει η *N*-(3-χλωροφαινυλο)-6-ιωδοκιναζολίν-4-αμίνη (**5**) και η *N*-(4-φθοροφαινυλο)-6-ιωδοκιναζολίν-4-αμίνη (**5**').

Στο δεύτερο μέρος πραγματοποιήθηκαν έξι αντιδράσεις Sonogashira χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το προϊόν (**5**) και (**5**') καθώς και πέντε διαφορετικά αλκίνια ώστε να προκύψουν τα τελικά προϊόντα (**6a**), (**6a**'), (**6b**), (**6c**), (**6d**) και (**6e**). Η αντίδραση Sonogashira είναι μια διασταυρούμενη σύζευξη ενός αλογονιδίου με ένα αλκίνιο, η οποία πραγματοποιείται παρουσία τριαιθυλαμίνης (Et₃N) και χρησιμοποιεί ως καταλύτη το τετράκις-τριφαινυλο φωσφορικό παλλάδιο (Pd(PPh₃)₄) και συγκαταλύτη τον ιωδιούχο χαλκό (CuI), σε άνυδρο διαλύτη *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF). Η όλη διαδικασία της αντίδρασης Sonogashira απαιτεί ξηρές συνθήκες.

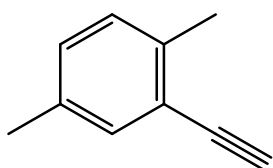
Τα αλκίνια που χρησιμοποιήθηκαν ως υποκαταστάτες R είναι τα εξής:

(a): 4-tert-butylphenylacetylene



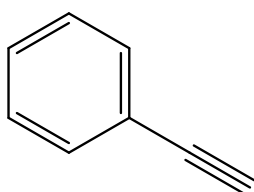
(a)

(b): 2,5-dimethyl phenylacetylene



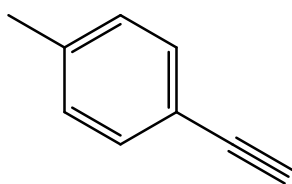
(b)

(c): phenylacetylene



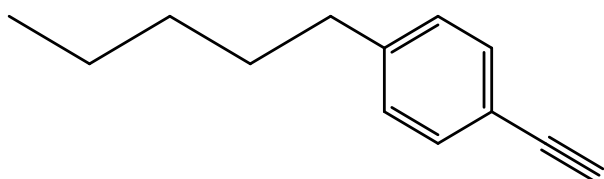
(c)

(d): 4-methyl phenylacetylene



(d)

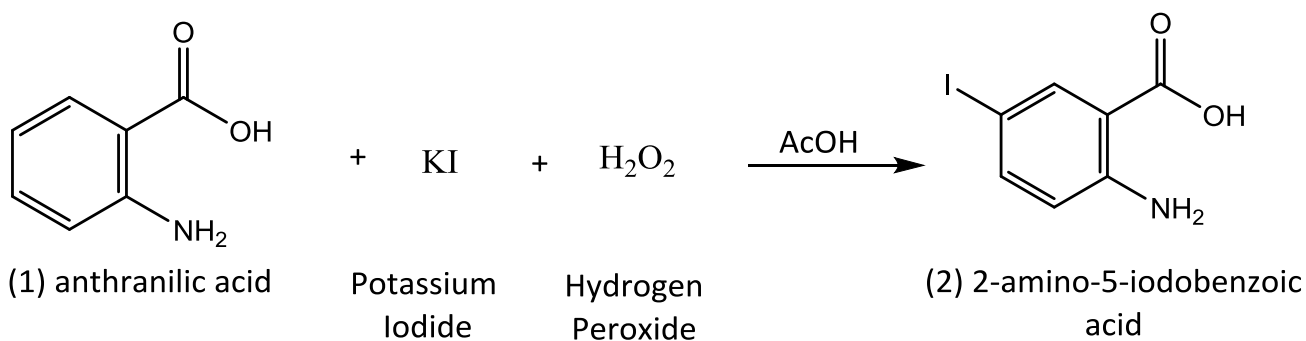
(e): 4-pentyl phenylacetylene



(e)

4.3 Επιμέρους αντιδράσεις

Αντίδραση (i): σύνθεση του 2-αμινο-5-ιωδοβενζοϊκού οξέος (2)



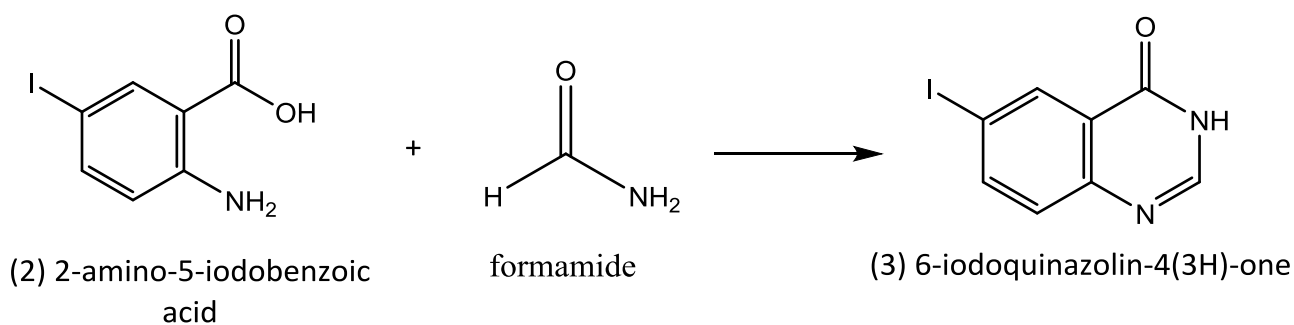
Πειραματική πορεία για την (i)

Αρχικά σε διάλυμα 2-αμινοβενζοϊκού οξέος (**1**) (m=5,49 g, n=40,0 mmol) σε οξικό οξύ (AcOH, V=50 mL) προστέθηκε ιωδιούχο κάλιο KI (m=6,65 g, n=40,0 mmol), το μίγμα ψύχθηκε σε υδρόλουτρο θερμοκρασίας 5°C και ακολούθησε στάγδην προσθήκη διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου 30% κ.β. (V=4,5 mL, n=44mmol), σε χρονικό διάστημα 5 λεπτών. Στη συνέχεια το υδρόλουτρο αποσύρθηκε και το διάλυμα παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου ενώ η ανάδευση συνεχιζόταν. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχθηκε με TLC (1:1 hexanes-AcOEt), ενώ παρατηρήθηκε σχηματισμός στερεού προϊόντος. Όταν διαπιστώθηκε η πλήρης κατανάλωση του (**1**) (μετά από 1,5 με 2 ώρες) προστέθηκε νερό (65 mL) και το μίγμα ψύχθηκε στους 0-4 °C για μισή ώρα. Τέλος έγινε διήθηση υπό κενό στο μίγμα, το στερεό ξεπλύθηκε 4-5 φορές με κρύο νερό και αφέθηκε να ξηραθεί προστατευμένο από φως, αρχικά σε ρεύμα αέρα και μετά εντός ξηραντήρα.

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά του (2)

Μοριακό Βάρος (Mr)	263,03 g/mol
Σημείο Τήξεως (Tm)	217-219°C [20]
Σταθερά Επιβράδυνσης (Rf) TLC: 1:3 Hexanes-AcOEt	0,44
Απόδοση	94%

Αντίδραση (ii): σύνθεση της 6-ιωδοκιναζολιν-4(3H)-όνης (3)



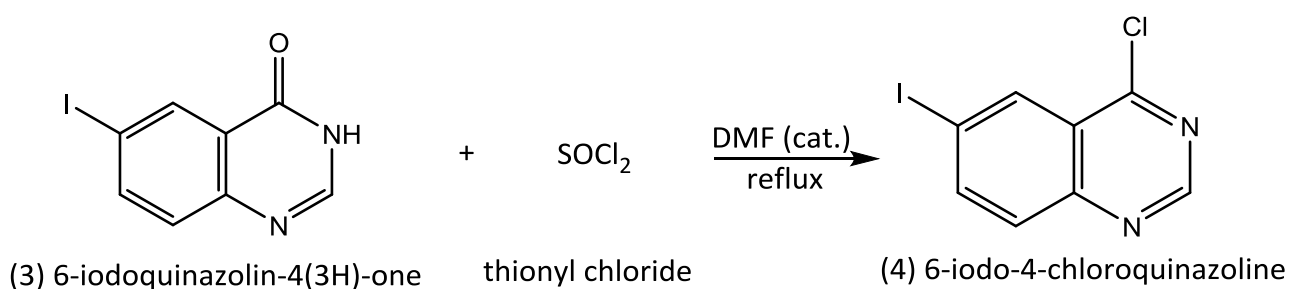
Πειραματική πορεία για την (ii)

Αρχικά μίγμα 2-αμινο-5-ιωδοβενζοϊκού οξέος (**2**) ($m=2,63\text{g}$, $n=10,0\text{mmol}$) και φορμαμιδίου HCONH_2 ($V=3,2\text{mL}$, $n=81\text{mmol}$) θερμάνθηκε σε ελαιόλουτρο στους $130\text{-}140^\circ\text{C}$, υπό ισχυρή ανάδευση. Κατά τη θέρμανση αρχικά προέκυψε διάλυμα και στη συνέχεια παρατηρήθηκε σχηματισμός στερεού. Μετά από θέρμανση για 24 ώρες διαπιστώθηκε με TLC (1:3 hexanes-AcOEt) η πλήρης κατανάλωση του (**2**). Το μίγμα αφέθηκε να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια προστέθηκε μίγμα πάγου-νερού (20mL). Μετά από ανάδευση για 15 λεπτά το μίγμα διηθήθηκε, το στερεό ξεπλύθηκε 3 φορές με κρύο νερό και αφέθηκε να ξηραθεί προστατευμένο από φως, αρχικά σε ρεύμα αέρα και μετά εντός ξηραντήρα.

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά του (3)

Μοριακό Βάρος (Mr)	272,05 g/mol
Σημείο Τήξεως (Tm)	274-276°C [21]
Σταθερά Επιβράδυνσης (Rf) TLC: 1:4 Hexanes-AcOEt	0,13
Απόδοση	86%

Αντίδραση (iii): σύνθεση της 6-ιωδο-4-χλωροκιναζολίνης (4)



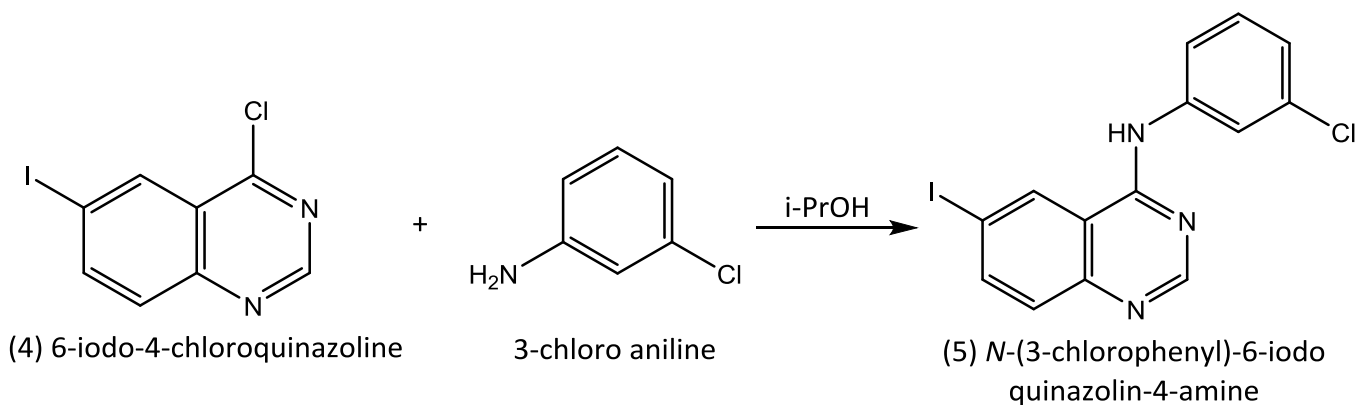
Πειραματική πορεία για την (iii)

Αρχικά μίγμα 6-ιωδοκιναζολιν-4(3*H*)-όνης (3) ($m=1,09\text{g}$, $n=4,0\text{mmol}$), θειονυλοχλωριδίου SOCl_2 ($V=7,0\text{mL}$) και *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιου (DMF, 3 σταγόνες) θερμάνθηκε με reflux σε ελαιόλουτρο θερμοκρασίας 95°C . Μετά από 1 ώρα προέκυψε ένα σκούρο καφέ διάλυμα. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχθηκε με TLC (1:4 hexanes-AcOEt) και στις 5 ώρες θέρμανσης διαπιστώθηκε η πλήρης κατανάλωση της ένωσης (3). Έπειτα το μίγμα αφέθηκε να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου, στη συνέχεια απομακρύνθηκε το θειονυλοχλωρίδιο υπό κενό και το στερεό υπόλειμμα διαλύθηκε σε CH_2Cl_2 ($V=50\text{mL}$). Το διάλυμα ξεπλύθηκε διαδοχικά με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaHCO_3 ($2\times 30\text{ mL}$) και με κορεσμένο αλατόνερο ($1\times 30\text{ mL}$), ξηράθηκε με Na_2SO_4 , και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το καφέ στερεό (βάρους περίπου 1.2g) καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (silica gel, έκλουση με CH_2Cl_2) για να δώσει την (4) ως κιτρινωπό στερεό.

Πίνακας 3: Χαρακτηριστικά του (4)

Μοριακό Βάρος (Mr)	290,49 g/mol
Σημείο Τήξεως (Tm)	178-179°C [21]
Σταθερά Επιβράδυνσης (Rf) TLC: CH_2Cl_2	0,22
Απόδοση	88%

Αντίδραση (iv): σύνθεση της *N*-(3-χλωροφαινυλο)-6-ιωδοκιναζολίν-4-αμίνης (5)



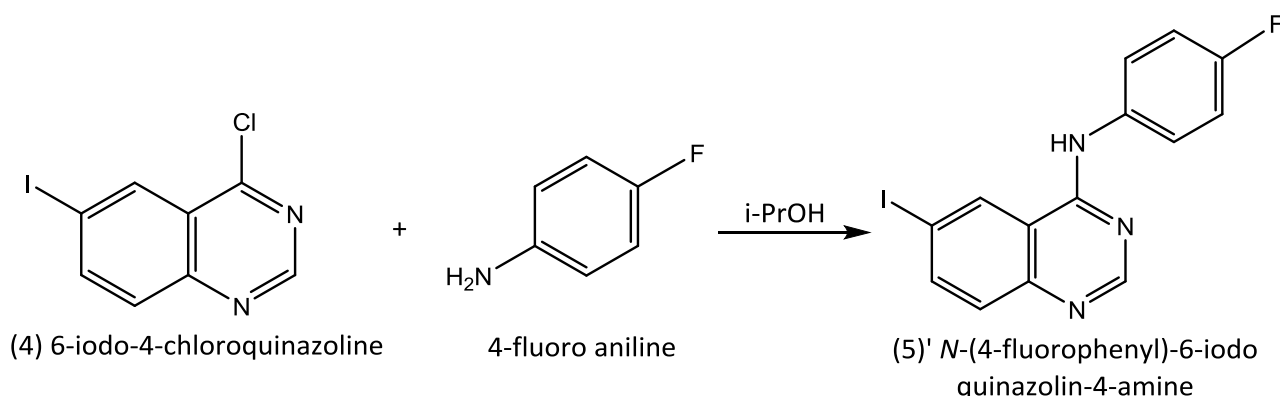
Πειραματική πορεία για την (iv)

Η 6-ιωδο-4-χλωροκιναζολίνη (**4**) ($m=523\text{mg}$, $n=1,80\text{mmol}$) αναμείχθηκε με ισοπροπανόλη *i*-PrOH ($V=7,0\text{mL}$), προστέθηκε διάλυμα 3-χλωροανιλίνης ($m=253\text{ mg}$, $n=1,98\text{ mmol}$) σε ισοπροπανόλη ($2,0\text{mL}$) και το μίγμα θερμάνθηκε με reflux σε ελαιόλουτρο θερμοκρασίας 95°C . Σταδιακά η (**4**) διαλύθηκε και σχηματίστηκε κίτρινο στερεό. Μετά από 1 ώρα διαπιστώθηκε με TLC (1:1 hexanes-AcOEt) η πλήρης κατανάλωση της (**4**). Το μείγμα αφέθηκε να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου, ύστερα ψύχθηκε στους $0\text{-}4^\circ\text{C}$ για 2 ώρες και διηθήθηκε υπό κενό. Τέλος το στερεό προϊόν ξεπλύθηκε 3 φορές με ισοπροπανόλη και ξηράνθηκε προστατευμένο από φως, αρχικά σε ρεύμα αέρα και μετά εντός ξηραντήρα.

Πίνακας 4: Χαρακτηριστικά του (5)

Μοριακό Βάρος (Mr)	381,60 g/mol
Σημείο Τήξεως (Tm)	380-381°C
Σταθερά Επιβράδυνσης (Rf) TLC: 1:1 Hexanes-AcOEt	0,57
Απόδοση	97%

Αντίδραση (iv)': σύνθεση της *N*-(4-φθοροφαινυλο)-6-ιωδοκιναζολίν-4-αμίνης (5)'



Πειραματική πορεία για την (iv)'

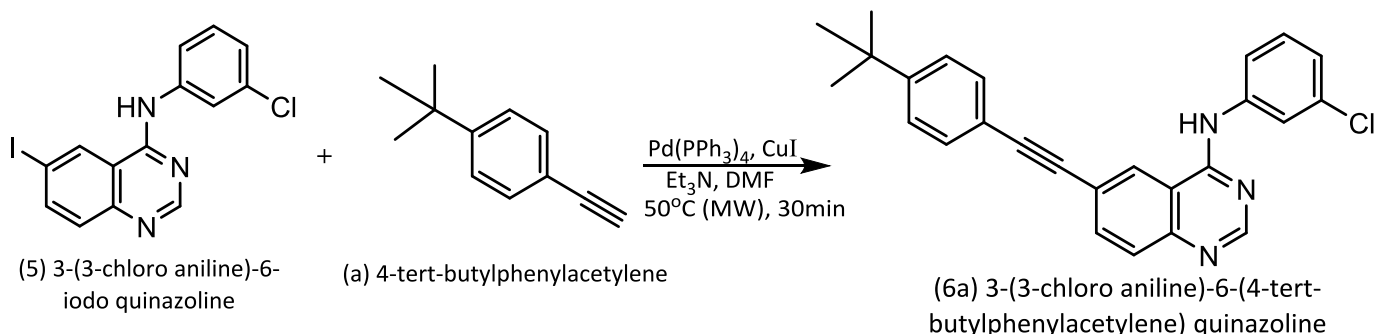
Η 6-ιωδο-4-χλωροκιναζολίνη (**4**) ($m=278\text{mg}$, $n=1\text{mmol}$) αναμείχθηκε με ισοπροπανόλη *i*-PrOH ($V=7,0\text{mL}$), προστέθηκε διάλυμα 3-φθορο-ανιλίνης ($m=117\text{mg}$, $n=1\text{mmol}$) σε ισοπροπανόλη ($5,0\text{mL}$) και το μίγμα θερμάνθηκε με reflux σε ελαιόλουτρο θερμοκρασίας 95°C . Σταδιακά η (**4**) διαλύθηκε και σχηματίστηκε κίτρινο στερεό. Μετά από 1 ώρα διαπιστώθηκε με TLC (1:1 hexanes-AcOEt) η πλήρης κατανάλωση της (**4**). Το μείγμα αφέθηκε να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου, ύστερα ψύχθηκε στους $0-4^\circ\text{C}$ για 2 ώρες και διηθήθηκε υπό κενό. Τέλος το στερεό προϊόν ξεπλύθηκε 3 φορές με ισοπροπανόλη και ξηράνθηκε προστατευμένο από φως, αρχικά σε ρεύμα αέρα και μετά εντός ξηραντήρα.

Πίνακας 5: Χαρακτηριστικά του (5)'

Μοριακό Βάρος (Mr)	365,15 g/mol
Σημείο Τήξεως (Tm)	349-350°C
Σταθερά Επιβράδυνσης (Rf) TLC: 1:1 Hexanes-AcOEt	0,60
Απόδοση	82%

Αντιδράσεις (v) για τη σύνθεση των τελικών προϊόντων

Αντίδραση (a): σύνθεση της 3-(3-χλωρο-ανιλίνο)-6-(4-τερτ-βουτυλφαινυλακετυλενο) κιναζολίνης (6a)



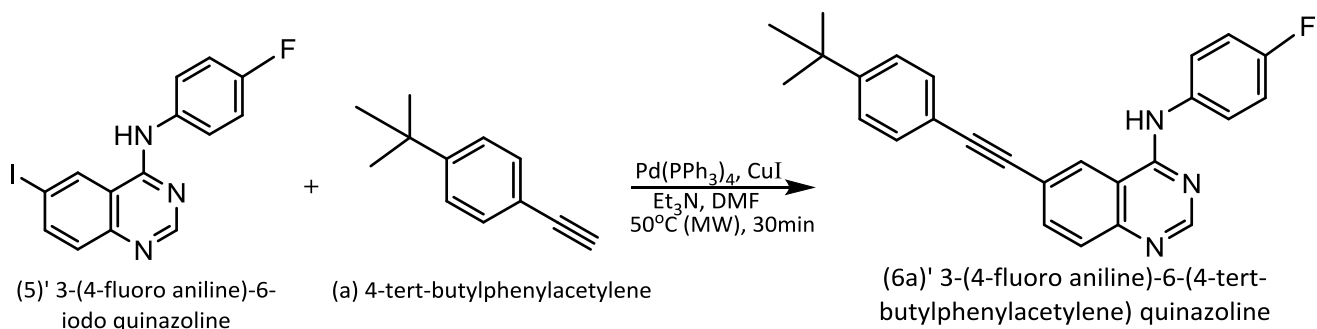
Πειραματική πορεία για την (6a)

Σε ξηρές συνθήκες προστέθηκαν αρχικά 1 ισοδύναμο από την ένωση (5) ($n=0,20\text{mmol}$, $m=76\text{mg}$, $M_r=381,60\text{g/mol}$), 0,1 ισοδύναμο καταλύτης παλλαδίου $\text{Pd(PPh}_3)_4$ ($n=0,02\text{mmol}$, $m=24\text{mg}$, $M_r=1155,58\text{g/mol}$) και 0,1 ισοδύναμο CuI ($n=0,02\text{mmol}$, $m=4\text{mg}$, $M_r=190,45\text{g/mol}$). Στη συνέχεια προστέθηκαν 3 ισοδύναμα του ακετυλένιου (a) ($n=0,60\text{mmol}$, $d=0,877\text{mg/}\mu\text{l}$, $m=94,94\text{mg}$, $V=108\mu\text{l}$, $M_r=158,24\text{g/mol}$) και άνυδρος διαλύτης DMF ($V=1\text{ml}$). Τέλος προστέθηκαν 3 ισοδύναμα τριαιθυλαμίνης Et_3N ($n=0,6\text{mmol}$, $d=0,727\text{mg/}\mu\text{l}$, $V=84\mu\text{l}$, $M_r=101,19\text{g/mol}$). Η αντίδραση έλαβε χώρα στη συσκευή μικροκυμάτων όπου θερμάνθηκε στους 60°C για 30 λεπτά. Η παραλαβή του προϊόντος (6a) έγινε μετά από αραιώση με $10\text{ml CH}_2\text{Cl}_2$, έκπλυση του διαλύματος 5 φορές με $10\text{ml H}_2\text{O}$ κάθε φορά, ξήρανση του με NaSO_4 , απομάκρυνση του διαλύτη υπό κενό και τέλος καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης με σύστημα εξάνιο-οξικός αιθυλεστέρας αναλογίας 9 προς 1 (silica gel, έκλυση με το ίδιο σύστημα διαλυτών).

Πίνακας 6: Χαρακτηριστικά του (6a)

Μοριακό Βάρος (M_r)	411,93 g/mol
Σημείο Τήξεως (T_m)	αποσύνθεση στους 215°C
Σταθερά Επιβράδυνσης (R_f) TLC: 99% CH_2Cl_2 /1% MeOH	0,13
Απόδοση	85%

Αντίδραση (a)': σύνθεση της 3-(4-φθορο-ανιλίνο)-6-(4-τερτ-βουτυλφαινυλακετυλενο) κιναζολίνης (6a)'



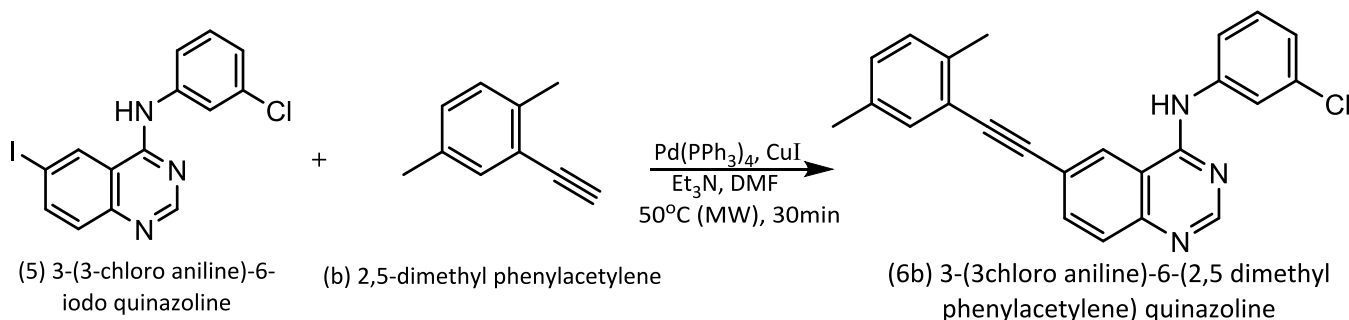
Πειραματική πορεία για την (6a)'

Σε ξηρές συνθήκες προστέθηκαν αρχικά 1 ισοδύναμο από την ένωση (5)' ($n=0,10\text{mmol}$, $m=37\text{mg}$, $M_r=365,15\text{g/mol}$), 0,1 ισοδύναμο καταλύτης παλλαδίου $\text{Pd(PPh}_3)_4$ ($n=0,01\text{mmol}$, $m=12\text{mg}$, $M_r=1155,58\text{g/mol}$) και 0,1 ισοδύναμο CuI ($n=0,01\text{mmol}$, $m=2\text{mg}$, $M_r=190,45\text{g/mol}$). Στη συνέχεια προστέθηκαν 3 ισοδύναμα του ακετυλένιου (a) ($n=0,30\text{mmol}$, $d=0,877\text{mg/}\mu\text{l}$, $m=47,47\text{mg}$, $V=54\mu\text{l}$, $M_r=158,24\text{g/mol}$) και άνυδρος διαλύτης DMF ($V=0,5\text{ml}$). Τέλος πρόστέθηκαν 3 ισοδύναμα τριαιθυλαμίνης Et_3N ($n=0,3\text{mmol}$, $d=0,727\text{mg/}\mu\text{l}$, $V=42\mu\text{l}$, $M_r=101,19\text{g/mol}$). Η αντίδραση έλαβε χώρα στη συσκευή μικροκυμάτων όπου θερμάνθηκε στους 60°C για 30 λεπτά. Η παραλαβή του προϊόντος (6a)' έγινε με την ίδια διαδικασία όπως και στην ένωση (6a).

Πίνακας 7: Χαρακτηριστικά του (6a)'

Μοριακό Βάρος (M_r)	395,48 g/mol
Σημείο Τήξεως (T_m)	αποσύνθεση στους 225°C
Σταθερά Επιβράδυνσης (R_f) TLC: 99% CH_2Cl_2 /1% MeOH	0,13
Απόδοση	90%

Αντίδραση (b): σύνθεση της 3-(3-χλωρο-ανιλίνο)-6-(2,5 διμεθυλο-φαινυλακετυλένο) κιναζολίνης (6b)



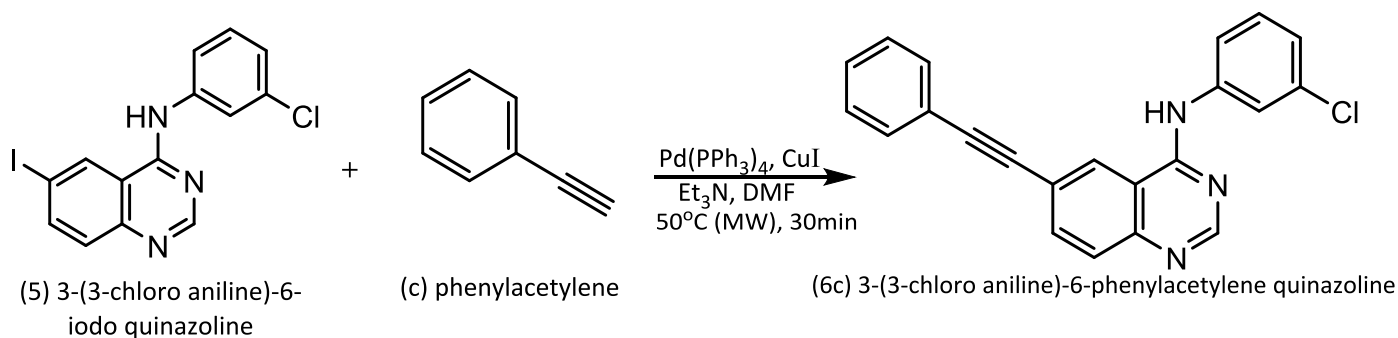
Πειραματική πορεία για την (6b)

Σε ξηρές συνθήκες προστέθηκαν αρχικά 1 ισοδύναμο από την ένωση (5) ($n=0,10\text{mmol}$, $m=38\text{mg}$, $M_r=381,60\text{g/mol}$), 0,1 ισοδύναμο καταλύτη παλλαδίου $\text{Pd(PPh}_3)_4$ ($n=0,01\text{mmol}$, $m=12\text{mg}$, $M_r=1155,58\text{g/mol}$) και 0,1 ισοδύναμο CuI ($n=0,01\text{mmol}$, $m=2\text{mg}$, $M_r=190,45\text{g/mol}$). Στη συνέχεια προστέθηκαν 3 ισοδύναμα του ακετυλένιου (b) ($n=0,30\text{mmol}$, $d=0,914\text{mg/}\mu\text{l}$, $m=39,06\text{mg}$, $V=43\mu\text{l}$, $M_r=130,19\text{g/mol}$) και άνυδρος διαλύτης DMF ($V=0,5\text{ml}$). Τέλος πρόστέθηκαν 3 ισοδύναμα τριαιθυλαμίνης Et_3N ($n=0,3\text{mmol}$, $d=0,727\text{mg/}\mu\text{l}$, $V=42\mu\text{l}$, $M_r=101,19\text{g/mol}$). Η αντίδραση έλαβε χώρα στη συσκευή μικροκυμάτων όπου θερμάνθηκε στους 60°C για 30 λεπτά. Η παραλαβή του προϊόντος (6b) έγινε με την ίδια διαδικασία όπως και στην ένωση (6a).

Πίνακας 8: Χαρακτηριστικά του (6b)

Μοριακό Βάρος (M_r)	383,88 g/mol
Σημείο Τήξεως (T_m)	αποσύνθεση στους 225°C
Σταθερά Επιβράδυνσης (R_f) TLC: 99% CH_2Cl_2 /1% MeOH	0,15
Απόδοση	80%

Αντίδραση (c): σύνθεση της 3-(3-χλωρο-ανιλίνο)-6-φαινυλακετυλενο κιναζολίνης (6c)



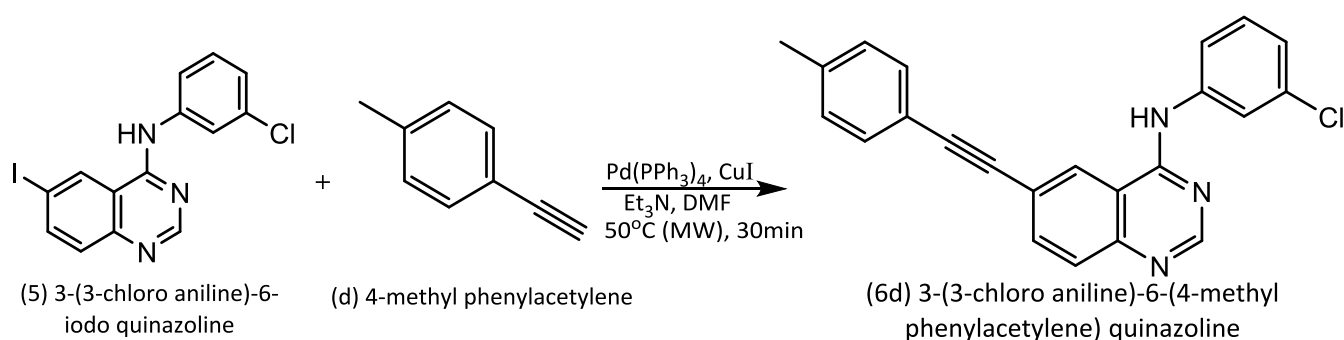
Πειραματική πορεία για την (6c)

Σε ξηρές συνθήκες προστέθηκαν αρχικά 1 ισοδύναμο από την ένωση (5) ($n=0,10\text{mmol}$, $m=38\text{mg}$, $M_r=381,60\text{g/mol}$), 0,1 ισοδύναμο καταλύτη παλλαδίου $\text{Pd(PPh}_3)_4$ ($n=0,01\text{mmol}$, $m=12\text{mg}$, $M_r=1155,58\text{g/mol}$) και 0,1 ισοδύναμο CuI ($n=0,01\text{mmol}$, $m=2\text{mg}$, $M_r=190,45\text{g/mol}$). Στη συνέχεια προστέθηκαν 3 ισοδύναμα του ακετυλένιου (c) ($n=0,30\text{mmol}$, $d=0,930\text{mg/}\mu\text{l}$, $m=30,64\text{mg}$, $V=33\mu\text{l}$, $M_r=102,14\text{g/mol}$) και άνυδρος διαλύτης DMF ($V=0,5\text{ml}$). Τέλος πρόστέθηκαν 3 ισοδύναμα τριαιθυλαμίνης Et_3N ($n=0,3\text{mmol}$, $d=0,727\text{mg/}\mu\text{l}$, $V=42\mu\text{l}$, $M_r=101,19\text{g/mol}$). Η αντίδραση έλαβε χώρα στη συσκευή μικροκυμάτων όπου θερμάνθηκε στους 60°C για 35 λεπτά. Η παραλαβή του προϊόντος (6c) έγινε με την ίδια διαδικασία όπως και στην ένωση (6a).

Πίνακας 9: Χαρακτηριστικά του (6c)

Μοριακό Βάρος (M_r)	355,83 g/mol
Σημείο Τήξεως (T_m)	205-207°C
Σταθερά Επιβράδυνσης (R_f) TLC: 99,5% CH_2Cl_2 / 0,5% MeOH	0,2
Απόδοση	80%

Αντίδραση (d): σύνθεση της 3-(3-χλωρο-ανιλίνο)-6-(4-μεθυλακετυλενο) κιναζολίνης (6d)



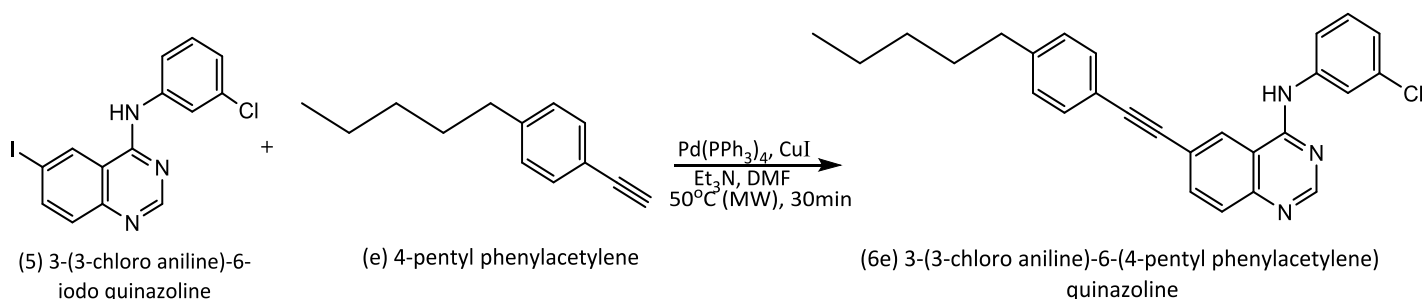
Πειραματική πορεία για την (6d)

Σε ξηρές συνθήκες προστέθηκαν αρχικά 1 ισοδύναμο από την ένωση **(5)** ($n=0,10\text{mmol}$, $m=38\text{mg}$, $M_r=381,60\text{g/mol}$), 0,1 ισοδύναμο καταλύτη παλλαδίου $\text{Pd(PPh}_3)_4$ ($n=0,01\text{mmol}$, $m=12\text{mg}$, $M_r=1155,58\text{g/mol}$), 0,1 ισοδύναμο CuI ($n=0,01\text{mmol}$, $m=2\text{mg}$, $M_r=190,45\text{g/mol}$) καθώς και 2 ισοδύναμα του ακετυλένιου **(d)** ($n=0,20\text{mmol}$, $m=23\text{mg}$, $V=33\mu\text{l}$, $M_r=102,14\text{g/mol}$). Στη συνέχεια προστέθηκε άνυδρος διαλύτης DMF ($V=0,5\text{ml}$). Τέλος πρόστέθηκαν 3 ισοδύναμα τριαιθυλαμίνης Et_3N ($n=0,3\text{mmol}$, $d=0,727\text{mg}/\mu\text{l}$, $V=42\mu\text{l}$, $M_r=101,19\text{g/mol}$). Η αντίδραση έλαβε χώρα στη συσκευή μικροκυμάτων όπου θερμάνθηκε στους 60°C για 35 λεπτά. Η παραλαβή του προϊόντος **(6d)** έγινε με την ίδια διαδικασία όπως και στην ένωση **(6a)**.

Πίνακας 10: Χαρακτηριστικά του (6d)

Μοριακό Βάρος (M_r)	369,85 g/mol
Σημείο Τήξεως (T_m)	200-202°C
Σταθερά Επιβράδυνσης (R_f) TLC: 99,5% CH_2Cl_2 /0,5% MeOH	0,17
Απόδοση	90%

Αντίδραση (ε): σύνθεση της 3-(3-χλωρο-ανίλινο)-6-(4-πεντυλο-φαινυλακετυλενο) κιναζολίνης (6ε)



Πειραματική πορεία για την (6ε)

Σε ξηρές συνθήκες προστέθηκαν αρχικά 1 ισοδύναμο από την ένωση (5) ($n=0,1\text{mmol}$, $m=38\text{mg}$, $M_r=381,60\text{g/mol}$), 0,1 ισοδύναμο καταλύτη παλλαδίου $\text{Pd(PPh}_3)_4$ ($n=0,01\text{mmol}$, $m=12\text{mg}$, $M_r=1155,58\text{g/mol}$) και 0,1 ισοδύναμο CuI ($n=0,01\text{mmol}$, $m=2\text{mg}$, $M_r=190,45\text{g/mol}$). Στη συνέχεια προστέθηκαν 3 ισοδύναμα του ακετυλένιου (ε) ($n=0,30\text{mmol}$, $d=0,885\text{mg/}\mu\text{l}$, $m=51,68\text{mg}$, $V=58\mu\text{l}$, $M_r=172,27\text{g/mol}$) και άνυδρος διαλύτης DMF ($V=0,5\text{ml}$). Τέλος προστέθηκαν 3 ισοδύναμα τριαιθυλαμίνης Et_3N ($n=0,3\text{mmol}$, $d=0,727\text{mg/}\mu\text{l}$, $V=42\mu\text{l}$, $M_r=101,19\text{g/mol}$). Η αντίδραση έλαβε χώρα στη συσκευή μικροκυμάτων όπου θερμάνθηκε στους 60°C για 35 λεπτά. Η παραλαβή του προϊόντος (6ε) έγινε με την ίδια διαδικασία όπως και στην ένωση (6α).

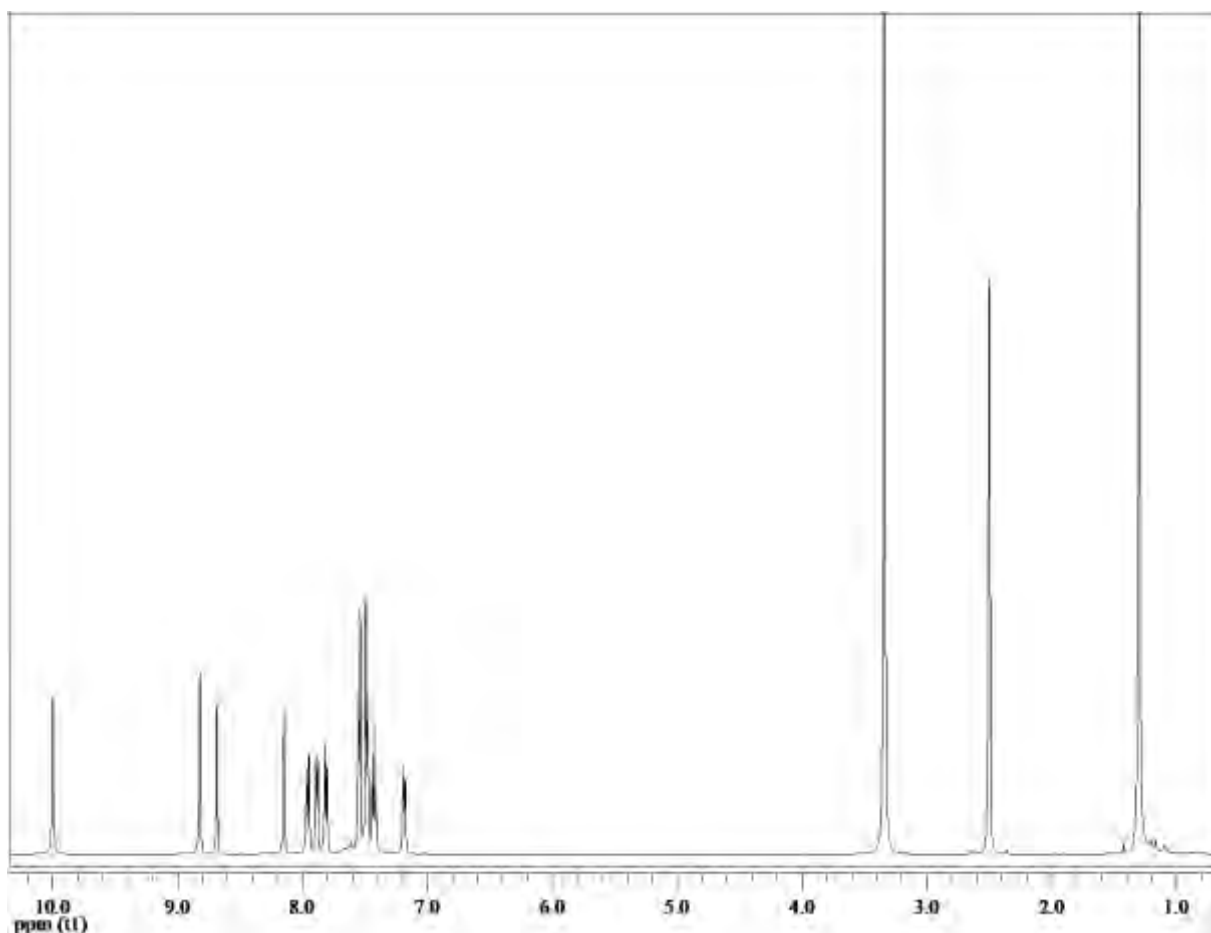
Πίνακας II: Χαρακτηριστικά του (6ε)

Μοριακό Βάρος (M_r)	425,96 g/mol
Σημείο Τήξεως (T_m)	αποσύνθεση στους 192°C
Σταθερά Επιβράδυνσης (R_f) TLC: 99,5% CH_2Cl_2 /0,5% MeOH	0,12
Απόδοση	60%

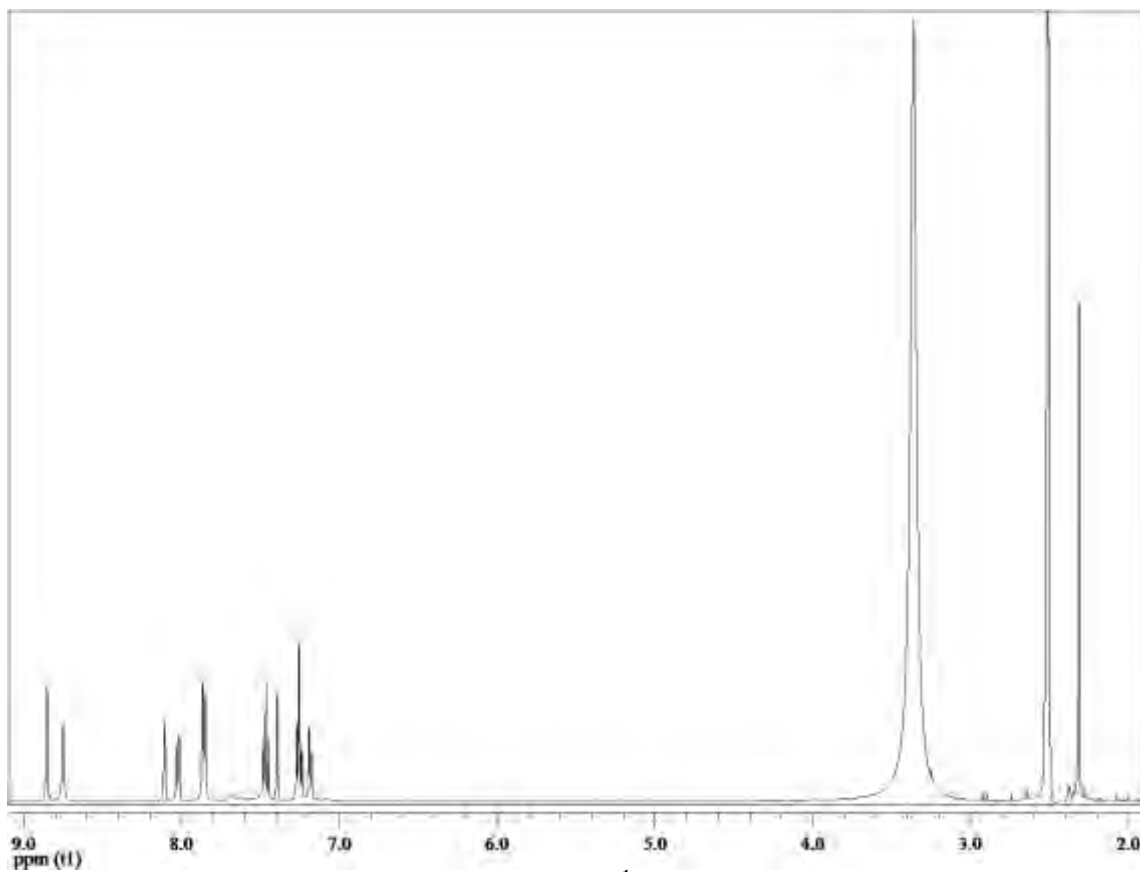
5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΕΛΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Για την ταυτοποίηση των τελικών προϊόντων του πειραματικού μέρους πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) πρωτονίου και άνθρακα-13, τα οποία επιβεβαίωσαν την δομή και την καθαρότητα των προϊόντων και συνεπώς την επιτυχία των πειραμάτων. Ως διαλύτης για τις φασματοσκοπίες χρησιμοποιήθηκε δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO-d₆). Παρακάτω απεικονίζονται τα φάσματα NMR των ενώσεων (6a-e) και (6a)'.

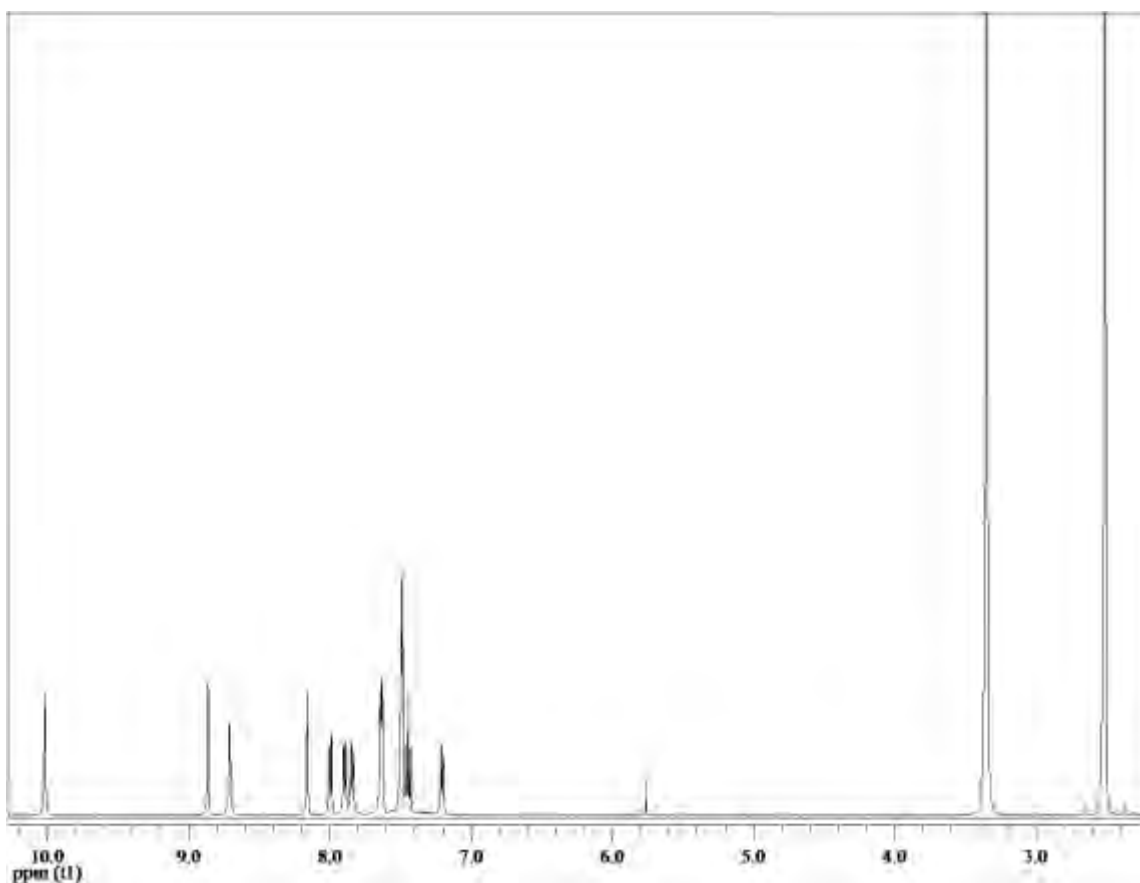
5.1 NMR πρωτονίου



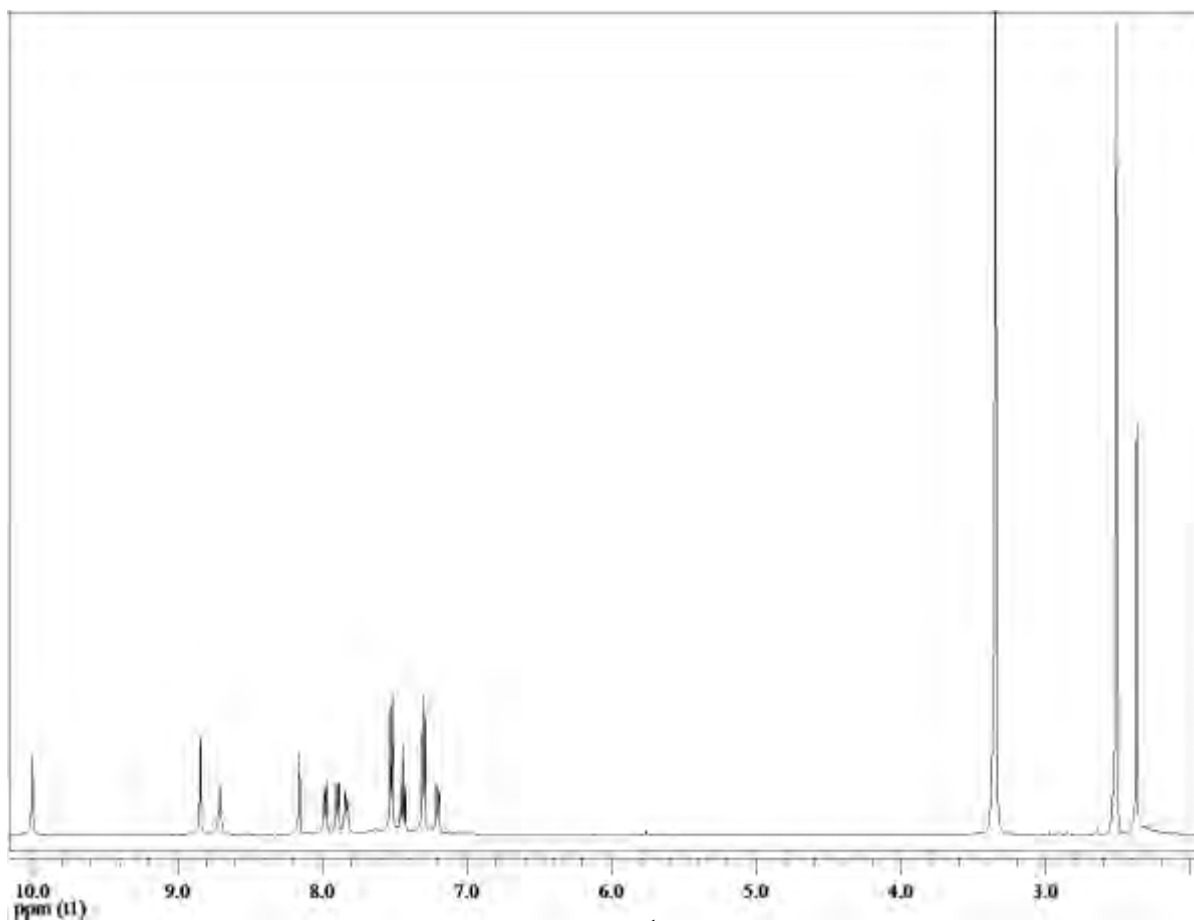
Εικόνα 19: Φάσμα NMR ¹H της ένωσης (6a)



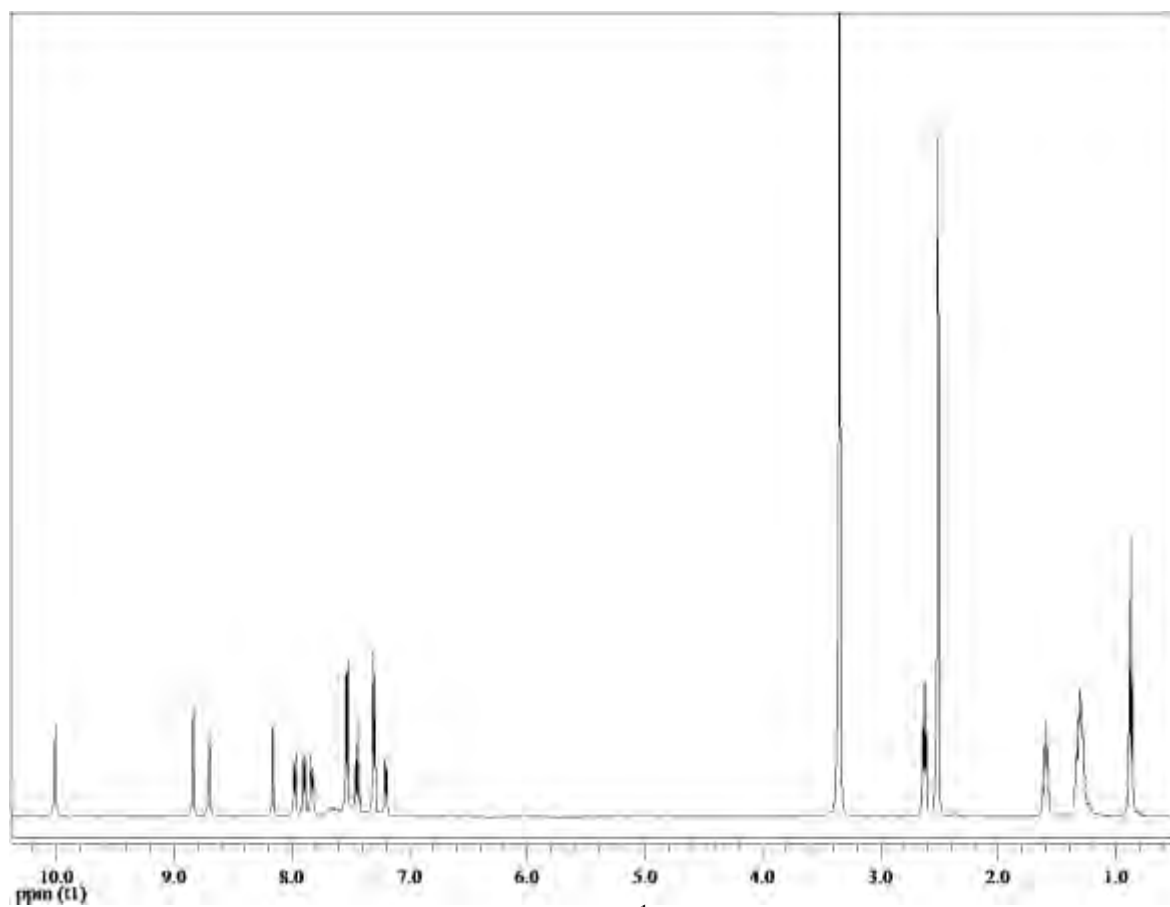
Εικόνα 20: Φάσμα NMR ^1H της ένωσης (**6b**)



Εικόνα 21: Φάσμα NMR ^1H της ένωσης (**6c**)

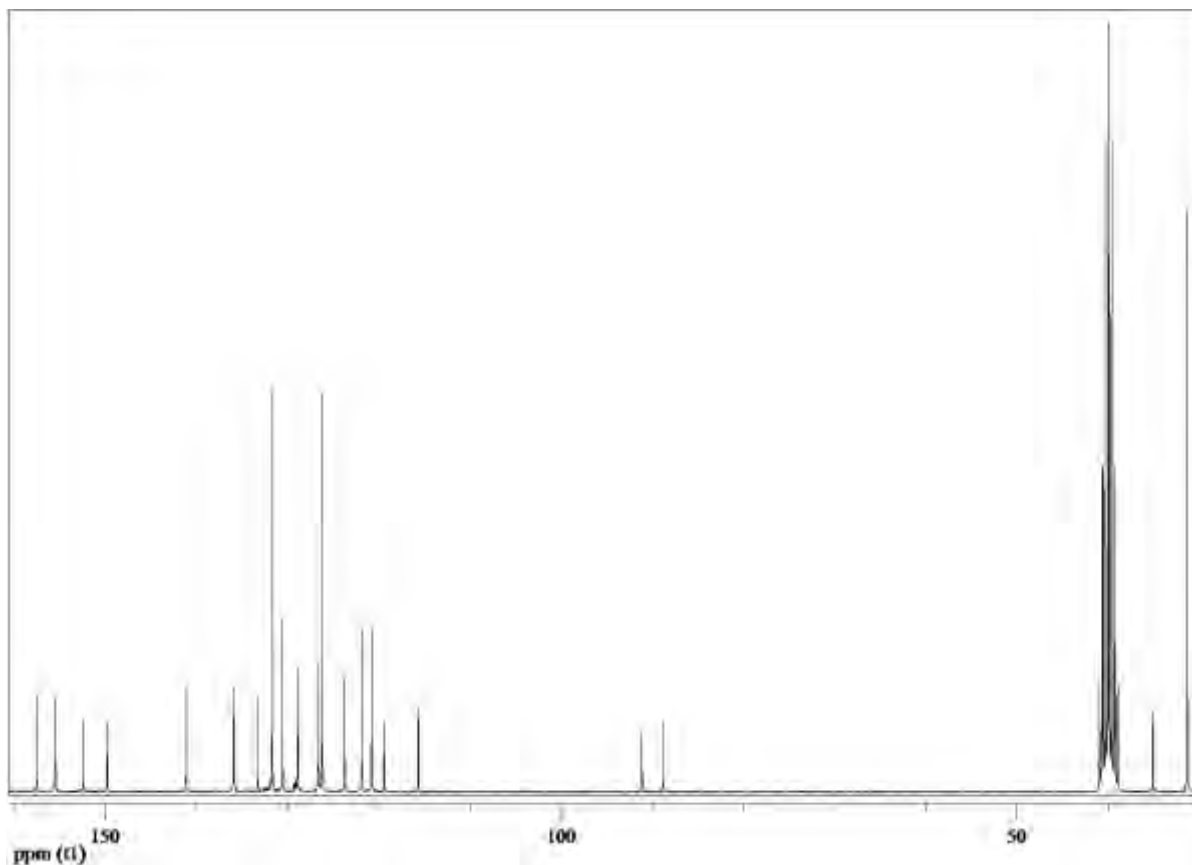


Εικόνα 22: Φάσμα NMR ^1H της ένωσης (**6d**)

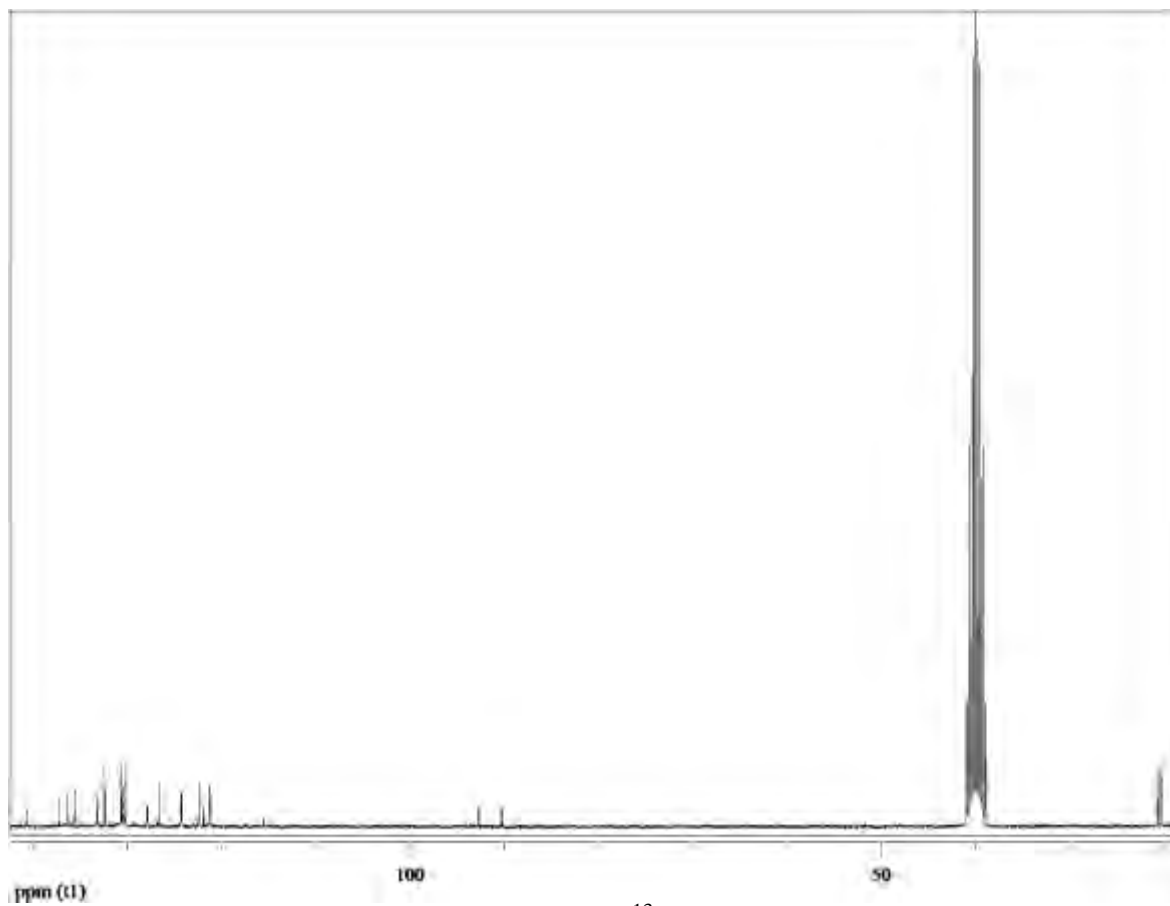


Εικόνα 23: Φάσμα NMR ^1H της ένωσης (**6e**)

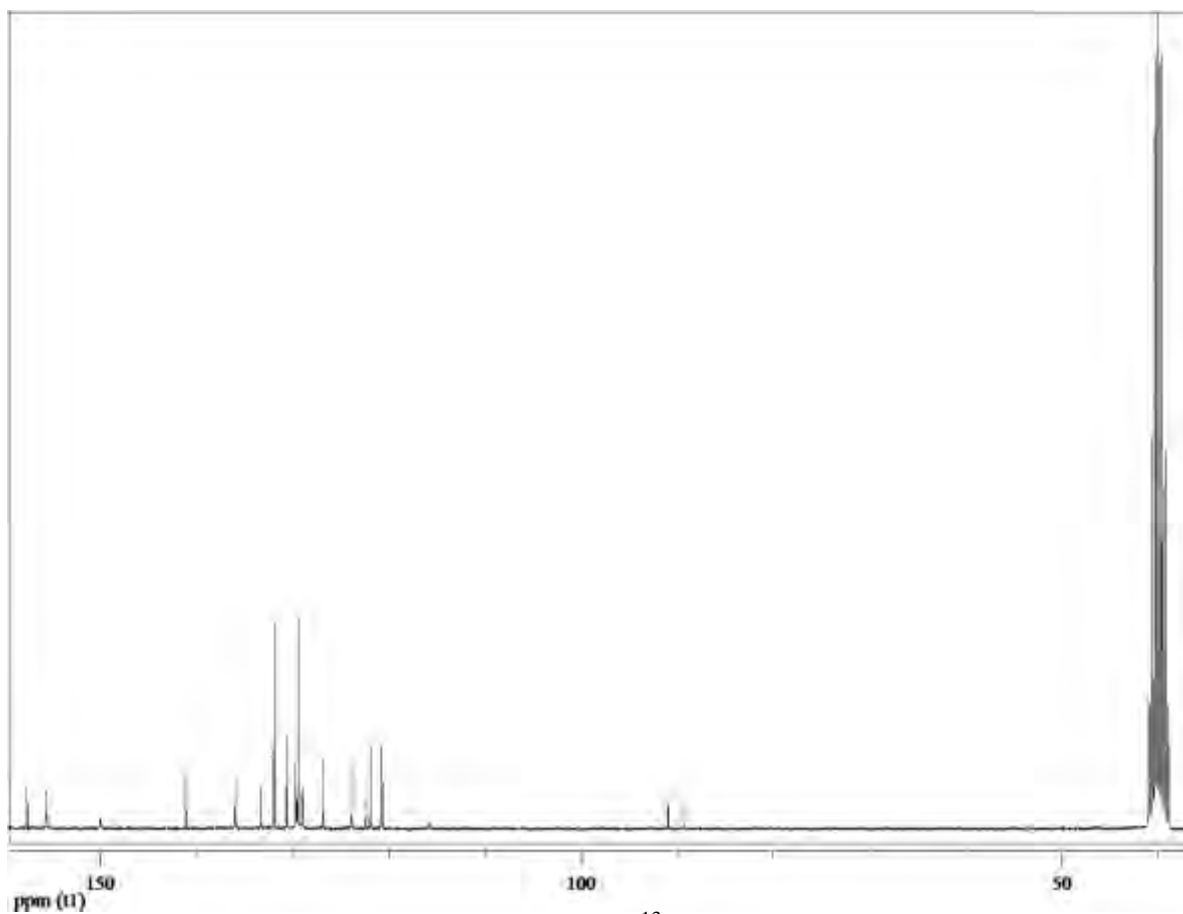
5.2 NMR άνθρακα-13



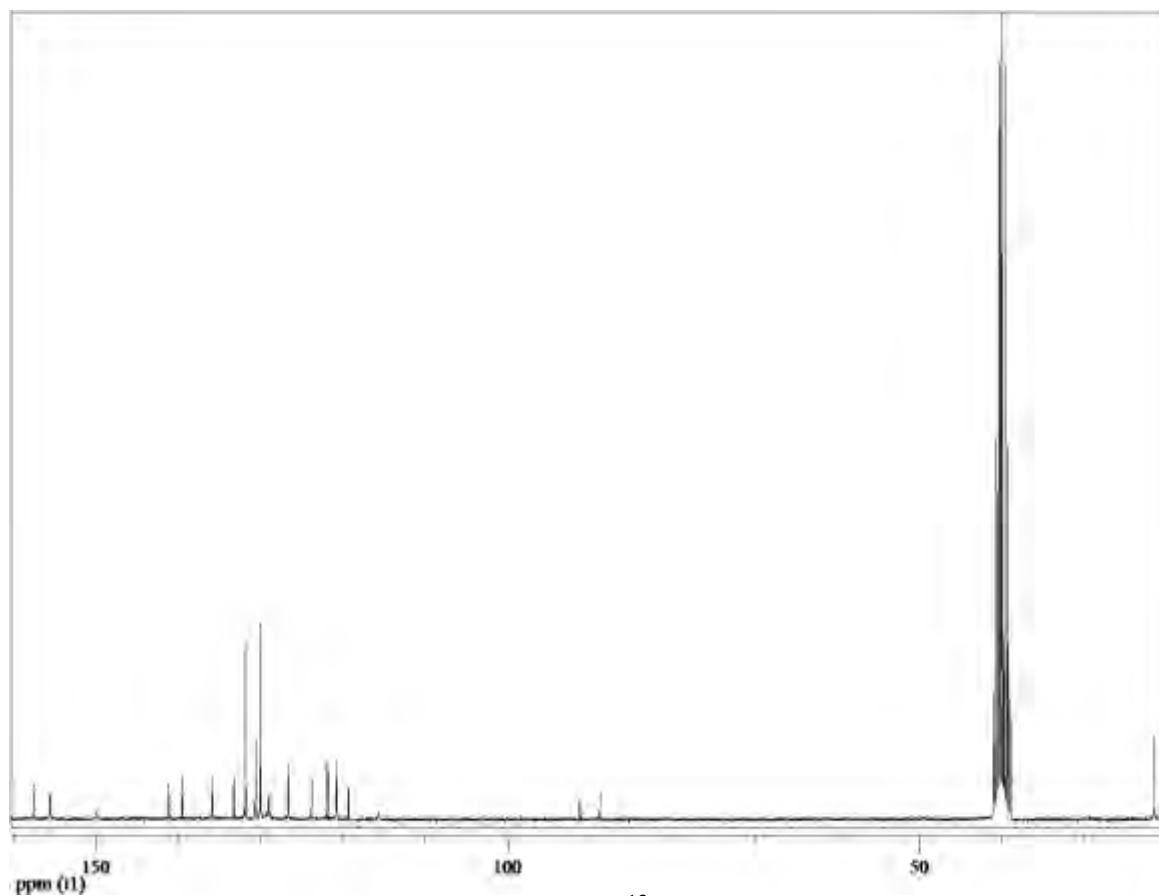
Εικόνα 24: Φάσμα NMR ¹³C της ένωσης (**6a**)



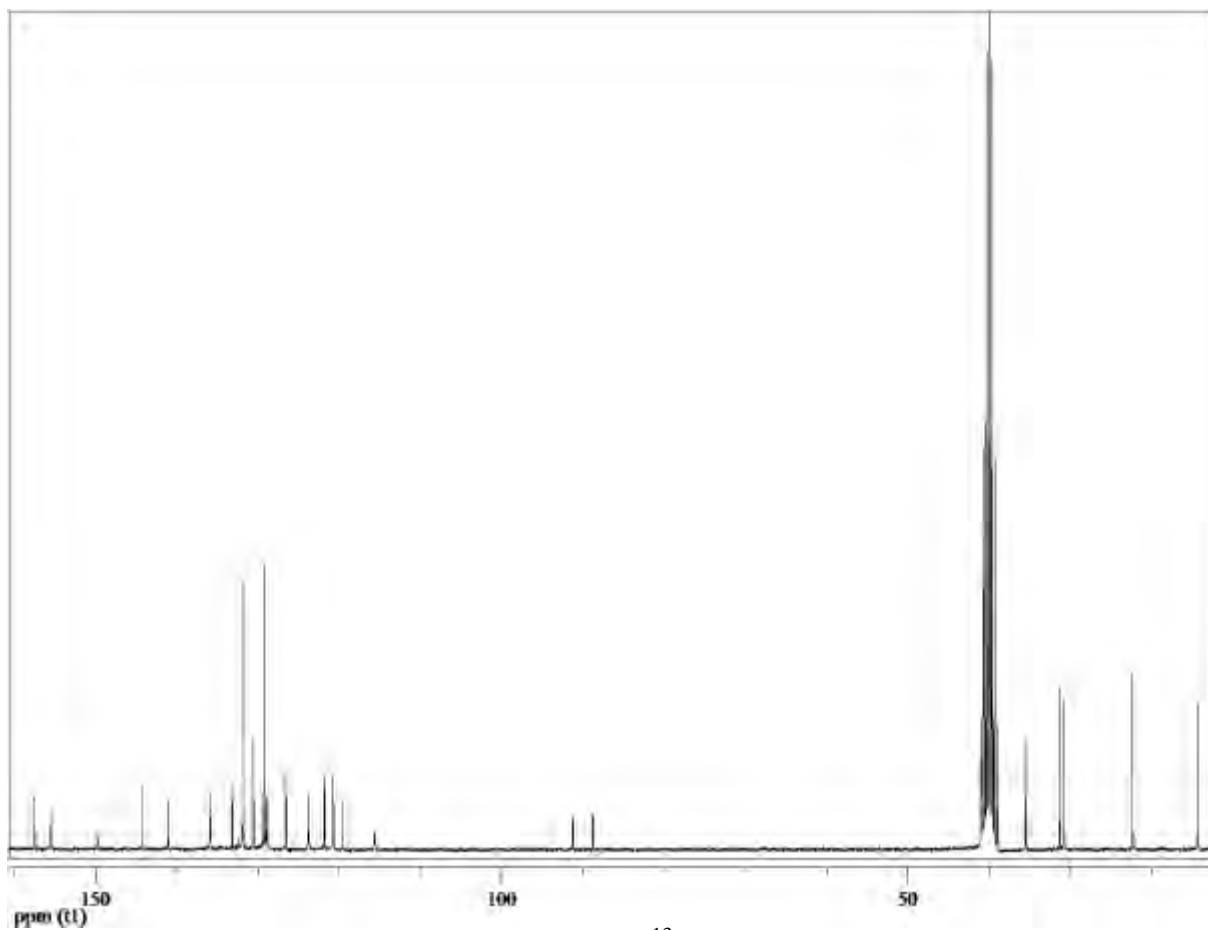
Εικόνα 25: Φάσμα NMR ¹³C της ένωσης (**6b**)



Εικόνα 26: Φάσμα NMR ¹³C της ένωσης (**6c**)



Εικόνα 27: Φάσμα NMR ¹³C της ένωσης (**6d**)



Εικόνα 28: Φάσμα NMR ^{13}C της ένωσης (6e)

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για την σύνθεση των έξι νέων παραγώγων κιναζολίνης παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα. Αρχικά είναι μια σχετικά σύντομη πορεία καθώς περιλαμβάνει μόλις 5 στάδια. Ιδιαίτερα σημαντικό πλεονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι σχεδόν όλες οι αντιδράσεις απέφεραν υψηλές έως εξαιρετικά υψηλές αποδόσεις. Επιπρόσθετα, ανάγκη χρωματογραφικού καθαρισμού υπήρχε μόλις στα δύο από τα 5 στάδια της αντίδρασης (στάδια iii και v). Τέλος, η χρήση της συσκευής μικροκυμάτων για τη σύνθεση στις αντιδράσεις Sonogashira, μείωσε τον χρόνο που απαιτείται για την ολοκλήρωση της αντίδρασης από 3-6 ώρες σε μόλις 30 λεπτά.

Εφόσον διαπιστώθηκε η δομή και η καθαρότητα των προϊόντων και συνεπώς επιβεβαιώθηκε η επιτυχία της πειραματικής πορείας, δείγματα από όλα τα τελικά προϊόντα στάλθηκαν στο Πανεπιστήμιο της Leuven στο Βέλγιο ώστε να πραγματοποιηθεί η βιολογική τους αποτίμηση. Η αποτίμηση αυτή θα εξετάσει αρχικά τις πιθανές κυτταροτοξικές ιδιότητες των παραγώγων και στη συνέχεια την επιλεκτικότητα τους σε καρκινικά κύτταρα, ώστε να αξιολογηθεί η πιθανότητα χρήσης τους ως αντικαρκινικών παραγόντων.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. T. Gupta, A. Rohilla, A. Pathak, Md J. Akhtar, Md R. Haider, M. S. Yar, *Current perspectives on quinazolines with potent biological activities: A Review*, Synthetic Communications, 2018, 48:10, 1099-1127
2. M. Asif, *Chemical Characteristics, Synthetic methods and Biological potential of Quinazoline and Quinazolinone Derivatives*, International Journal of Medicinal Chemistry, 2014 ID 395637, 27 pages
3. B. Vijayakumar, P. Prasanthi, K. Muni Teja, K. Makesh Kumar Reddy, P. Nishanthi, M. Nagendramma, M. Nishanthi, *Quinazoline Derivatives & Pharmacological Activities: A Review*, Medicinal Chemistry & Analysis, 2013, 3:1, 10-21
4. I. Khan, A. Ibrar, N. Abbas, A. Saeed, *Recent advances in the structural library of functionalized quinazoline and quinazolinone scaffolds: Synthetic approaches and multifarious applications*, European Journal of Medicinal Chemistry, 2014, 76. 193-244
5. W. F. Stanaszek, D. Kellerman, R. N. Brodgen, J. A. Romankiewicz, *Prazosin Update: A Review of its Pharmacological Properties and Therapeutic Use in Hypertension and Congestive Heart Failure*, Drugs, 1983, 25. 339-384
6. S. Kung, Z. Espirel, M. I. Lapid, *Treatment of nightmares with prazosin: a systematic review*, Mayo Clinical Proceedings, 2012, 87, 890-900
7. R. M. Graham et al, *α 1-Adrenergic Receptor Subtypes: Molecular Structures, Function and Signaling*, Circulation Research, 1996, 78, 737-749
8. R. C. Jackson, D. W. Fry, T. J. Boritzki, J. A. Besserer, W. R. Leopold, B. J. Sloan, E. F. Elslager, *Biochemical Pharmacology of the lipophilic antifolate, trimetrexate*, Advances in enzyme regulation, 1984, 22, 187-206
9. *Nolatrexed Dihydrochloride*, pubchem.com, PubChem, Ανακτήθηκε Σεπτέμβριο 2019
10. *Tradjenta (linagliptin) Tablets: Full Prescribing Information*, Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals Inc., Ridgefield, Ανακτήθηκε Σεπτέμβριο 2019
11. J. J. Neumiller, S. M. Setter, *Review of Linagliptin for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus*, Clinical Therapeutics, 2012, 34, 993-1005
12. C. Carmi, M. Mor, P. G. Petronini, R. R. Alfieri, *Clinical perspectives for irreversible tyrosine kinase inhibitors in cancer*, Biochemical Pharmacology, 2012, 84, 1388-1399
13. R. S. M. Ismail, N. S. M. Ismail, S. Abuserii, D. A. Abou El Ella, *Recent advances in 4-amino quinazoline based scaffold derivatives targeting EGFR kinases as anticancer agents*, Future Journal of Pharmaceutical Sciences, 2016, 2, 9-19
14. Y. Yarden, M. X. Sliwkowski, *Untangling the Erb-B signaling network*, Nature reviews Molecular Cell Biology, 2001, 2, 127-137

15. D. S. Salomon, R. Brandt, F. Ciardiello, N. Normanno, *Epidermal Growth Factor-related peptides and their receptors in human malignancies*, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 19, 183-232
16. J. R. Woodburn, *The Epidermal Growth Factor Receptor and Its Inhibition in Cancer Therapy*, *Pharmacology & Therapeutics*, 1990, 82, 241-250
17. Y. J. Liu, C. M. Zhang, Z. P. Liu, *recent Developments of Small Molecule EGFR Inhibitors Based on the Quinazoline Core Scaffolds*, *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2012, 12, 391-406
18. N. Sharma, J. Graziano, *Overview of the LUX-Lung clinical trial program of afatinib for non-small cell lung cancer*, *Cancer Treatment Reviews*, 2018, 69, 143-151
19. A. de la Hoz, A. Diaz-Ortiz, A. Moreno, *Microwaves in Organic Synthesis: Thermal and non-thermal microwave effects*, *Chemical Society Reviews*, 2005, 164-178
20. W. Miltzer, E. Smith, E. Evans, *Nuclear Iodination of Aromatic Amines*, *Journal of the American Chemical Society*, 1941, 63, 436
21. T. Sardon, T. Cottin, J. Xu, A. Giannis, J. Vernos, *Development and Biological Evaluation of Novel Aurora A Kinase Inhibitor*, *ChemBioChem*, 2009, 10, 464-478