



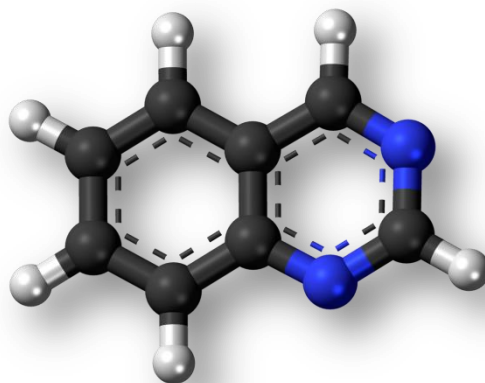
ΤΜΗΜΑ

Βιοχημείας &  
Βιοτεχνολογίας

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

“ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ  
ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΝΕΩΝ ΤΡΙΑΖΟΛΥΛΟ ΚΙΝΑΖΟΛΙΝΩΝ ΩΣ ΠΙΘΑΝΩΝ  
ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ”



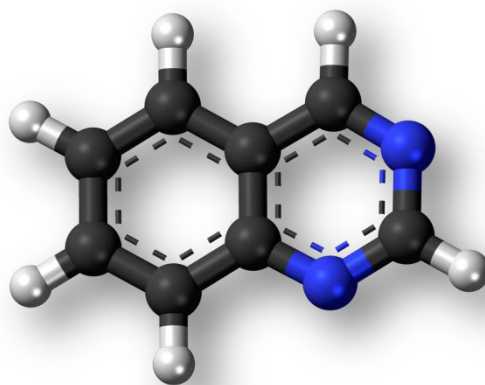
Γκρίνια Στυλιανή του Παναγιώτη

Λάρισα, Φεβρουάριος 2021



DEPARTMENT OF  
**Biochemistry &  
Biotechnology**  
UNIVERSITY OF THESSALY

DIPLOMA THESIS  
“SYNTHESIS AND SPECTROSCOPIC IDENTIFICATION OF NOVEL  
TRIAZOLYL QUINAZOLINES AS POTENTIAL CYTOTOXIC  
AGENTS”



Gkrinia Styliani

Larisa, February 2021

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

- Δρ. Κομιώτης Δημήτριος (επιβλέπων): Καθηγητής Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Δρ. Μήτσος Χρήστος: Μέλος ΕΔΙΠ του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Δρ. Κολλάτος Νικόλαος: Πανεπιστημιακός Υπότροφος του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Η παρούσα διπλωματική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοργανικής Χημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Οργανικής Χημείας, κ. Κομιώτη Δημήτριο.

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όσους στάθηκαν στο πλευρό μου κατά την υλοποίηση αυτής της προσπάθειας.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Δημήτριο Κομιώτη, τον επιβλέποντα της πτυχιακής μου εργασίας, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε προκειμένου να αναλάβω την εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας στο εργαστήριο του καθώς και την αρωγή του καθόλη την πορεία.

Ιδιαίτερα, ευχαριστώ θερμά τον κύριο Μήτσο Χρήστο για την πολύτιμη βοήθεια, την υπομονή και την ενθάρρυνση του κατά τη διάρκεια υλοποίησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Επιπροσθέτως, ευχαριστώ τον κύριο Κολλάτο για την καθοδήγησή και τις πολύτιμες υποδείξεις του.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς και τα αδέρφια μου για την υποστήριξη και την συμπαράσταση τους κατά τη διάρκεια περάτωσης των σπουδών μου.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	(7)
<b>ABSTRACT</b> .....	(8)
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	
1.1. Το σύστημα της κιναζολίνης.....	(9)
1.2. Ιδιότητες του συστήματος της κιναζολίνης.....	(10)
1.3. Παράγωγα κιναζολίνης με βιολογική δράση.....	(12)
1.4. Γνωστά παράγωγα 4-μορφολινοκιναζολίνης.....	(16)
1.5. PI3K και αναστολείς της.....	(17)
1.6. Η σημασία της μορφολίνο-ομάδας.....	(19)
1.7. Εφαρμογές των αναστολέων PI3K στην αντικαρκινική θεραπεία... (22)	
1.8. Παράγωγα 1,2,3-τριαζολίου.....	(23)
1.9. Καταλυόμενη από Cu κυκλοπροσθήκη αζιδίου-αλκινίου (CuAAC).. (26)	
1.10. Ισομέρεια αζιδίου-τετραζολίου.....	(28)
<b>2. ΣΚΟΠΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</b> .....	(30)
<b>3. ΤΕΧΝΙΚΕΣ – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	(31)
3.1. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC).....	(31)
3.2. Χρωματογραφία στήλης.....	(32)
3.3. Θέρμανση με τη χρήση μικροκυμάτων.....	(33)
3.4. Προσδιορισμός σημείου τήξεως.....	(34)
3.5. Φασματοσκοπία NMR.....	(35)
3.6. Γενικές Παρατηρήσεις.....	(35)
<b>4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	(36)
4.1. Γενική πορεία σύνθεσης.....	(36)
4.2. Μεθοδολογία σύνθεσης.....	(37)
4.2.1. Σύνθεση της 2,4-διχλωροκιναζολίνης.....	(38)
4.2.2. Σύνθεση της 4-(2-χλωροκιναζολιν-4-υλο)μορφολίνης.....	(39)
4.2.3. Σύνθεση της 4-(τετραζολο[1,5-α]κιναζολιν-5-υλο)μορφολίνης [(4-(2-αζιδοκιναζολιν-4-υλο)μορφολίνης)].....	(40)
4.2.4. Σύνθεση της (4-(2-φαινυλο-1H-1,2,3-τριαζολ-1-υλο)κιναζολιν-4-υλο)μορφολίνης.....	(41)
4.2.5. Σύνθεση της (1-(4-μορφολινοκιναζολιν-2-υλο)-1H-1,2,3-τριαζολ-4-υλο)μεθανόλης.....	(42)
<b>5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΩΣΕΩΝ – ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ</b> .....	(43)
5.1. Φάσμα <sup>1</sup> H-NMR της 4-(2-χλωροκιναζολιν-4-υλο)μορφολίνης.....	(43)
5.2. Φάσμα <sup>13</sup> C-NMR της 4-(2-χλωροκιναζολιν-4-υλο)μορφολίνης.....	(44)
5.3. Φάσμα <sup>1</sup> H-NMR της 4-(τετραζολο[1,5-α]κιναζολιν-5-υλο)μορφολίνης [(4-(2-αζιδοκιναζολιν-4-υλο)μορφολίνης)].....	(45)
5.4. Φάσμα <sup>13</sup> C-NMR της 4-(τετραζολο[1,5-α]κιναζολιν-5-υλο)μορφολίνης [(4-(2-αζιδοκιναζολιν-4-υλο)μορφολίνης)].....	(46)
5.5. Φάσμα <sup>1</sup> H-NMR της (4-(2-φαινυλο-1H-1,2,3-τριαζολ-1-υλο)κιναζολιν-4-υλο)μορφολίνης.....	(47)

5.6. Φάσμα $^{13}\text{C}$ -NMR της (4-(2-φαινυλο-1H-1,2,3-τριαζολ-1-υλο)κιναζολιν-4-υλο)μορφολίνης.....	(48)
5.7. Φάσμα $^1\text{H}$ -NMR της (1-(4-μορφολινοκιναζολιν-2-υλο)-1H-1,2,3-τριαζολ-4-υλο)μεθανόλης.....	(49)
5.8. Φάσμα $^{13}\text{C}$ -NMR της (1-(4-μορφολινοκιναζολιν-2-υλο)-1H-1,2,3-τριαζολ-4-υλο)μεθανόλης.....	(50)
<b>6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>(51)</b>
<b>7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>(53)</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κιναζολίνη είναι μία αρωματική ετεροκυκλική ένωση που αποτελείται από δύο συμπυκνωμένους εξαμελείς αρωματικούς δακτύλιους, έναν δακτύλιο βενζολίου και έναν δακτύλιο πυριμιδίνης. Τα παράγωγα κιναζολίνης έχουν προσελκύσει ιδιαίτερη προσοχή λόγω των ποικίλων φαρμακολογικών δράσεων τους ως αντιμικροβιακοί, αντιφλεγμονώδεις, αντιυπερτασικοί και αντικαρκινικοί παράγοντες. Έχει συντεθεί ένας μεγάλος αριθμός παραγώγων κιναζολίνης ως πιθανών φαρμακευτικών παραγόντων, ενώ στόχο της σύγχρονης έρευνας αποτελεί ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη αποτελεσματικότερων φαρμάκων με πρώτη ύλη αυτά τα παράγωγα.

Η εργασία αυτή εστιάζει σε παράγωγα κιναζολίνης υποκατεστημένα με μορφολίνη, η οποία έχει βρεθεί πως οδηγεί σε ενώσεις με ισχυρή αντιπολλαπλασιαστική δράση κατά καρκινικών κυτταρικών σειρών και αναστέλλει την κινάση PI3K. Οι αναστολείς της κινάσης αυτής εμφάνισαν ισχυρές αντικαρκινικές δράσεις, όπως φαίνεται από τον μεταβολίτη Wortmannin και την ένωση LY294002 αλλά και τα φάρμακα Idelalisib και Copanlisib. Επιπροσθέτως, γίνεται αναφορά στη χρήση παραγώγων 1,2,3-τριαζολίου, τα οποία έχουν ερευνηθεί εκτενώς λόγω των ισχυρών αντικαρκινικών, αντιμικροβιακών και πολλών ακόμα δράσεων τους.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση δύο νέων παραγώγων με πρώτη ύλη την εμπορικά διαθέσιμη κιναζολιν-2,4(1H,3H)-διόνη. Στην ένωση αυτή με μια σειρά αντιδράσεων εισήχθη μορφολίνη στη θέση 4 και 1,2,3-τριαζόλιο στη θέση 2. Ο σχεδιασμός των νέων παραγώγων βασίστηκε στα δομικά παρόμοια παράγωγα (PI-103), (GDC-0941) και (GDC-0980), τα οποία έχει βρεθεί πως δρουν ως αναστολείς της κινάσης PI3K.

## **ABSTRACT**

Quinazoline is an aromatic heterocyclic compound consisting of 2 fused six-membered aromatic rings, a benzene ring and a pyrimidine ring. Quinazoline derivatives have attracted special interest due to their various pharmacological actions as antimicrobial, anti-inflammatory, antihypertensive and anticancer agents. A large number of quinazoline derivatives have been synthesized as possible pharmaceutical agents, while the aim of modern research is to design and develop more effective drugs based on these derivatives.

This study focuses on quinazoline derivatives with a morpholine substituent, which has been found to lead to compounds with potent antiproliferative activity against cancer cell lines and inhibit PI3K kinase. Inhibitors of this kinase have potent anticancer activity, as shown by the metabolite Wortmannin and compound LY294002, as well as the drugs Idelalisib and Copanlisib. In addition, reference is made to the use of 1,2,3-triazole derivatives, which have been extensively investigated due to their potent anticancer, antimicrobial and many other effects.

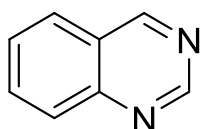
In the present diploma thesis, two new derivatives were synthesized from the commercially available quinazolin-2,4 (1H, 3H) -dione. From this compound, through a series of reactions, morpholine was introduced in position 4 and 1,2,3-triazole in position 2. The design of these novel derivatives was based on the structurally similar derivatives (PI-103), (GDC-0941) and (GDC-0980), which have been identified as PI3K kinase inhibitors.



## 1. Εισαγωγή

### 1.1. Το ετεροκυκλικό σύστημα της κιναζολίνης

Η κιναζολίνη, μια οργανική ένωση με τύπο  $C_8H_6N_2$ , είναι ένα ανοιχτό κίτρινο κρυσταλλικό στερεό το οποίο διαλύεται στο νερό. Είναι μία αρωματική ετεροκυκλική ένωση με δικυκλική δομή που αποτελείται από 2 συμπυκνωμένους εξαμελείς αρωματικούς δακτυλίους, έναν δακτύλιο βενζολίου και έναν δακτύλιο πυριμιδίνης. Η ονομασία της υποδηλώνει ότι είναι παράγωγο της κινολίνης και μπορεί εναλλακτικά να ονομασθεί 1,3-διαζαναφθαλίνιο. Έχει επίπεδη δομή και αποτελεί ισομερές της φθαλαζίνης και της κινόξαλίνης. Έχουν αναγνωριστεί περισσότερα από 200 βιολογικά ενεργά αλκαλοειδή κιναζολίνης ή κινολίνης. Το μόριο της κιναζολίνης σπάνια αναφέρεται μόνο του στην βιβλιογραφία, αλλά πλήθος υποκατεστημένων παραγώγων του έχουν συντεθεί για ιατρικούς σκοπούς, όπως ως αντικαρκινικοί παράγοντες.

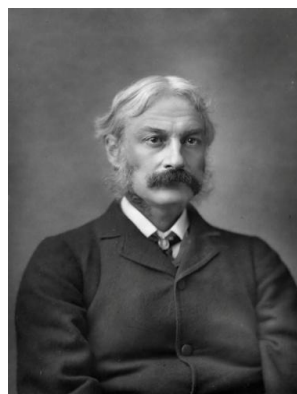


### Κιναζολίνη

Ο Griess το 1869 συνέθεσε το πρώτο παράγωγο κιναζολίνης, το 4-οξο-3,4-διυδροκιναζολιν-2-καρβονιτρίλιο, με την αντίδραση ανθρανιλικού οξέος με κυανογόνο (δικυάνιο). Το 1895, οι Bischler και Lang παρασκεύασαν τη μητρική κιναζολίνη με αποκαρβοξυλίωση του κιναζολιν-2-καρβοξυλικού οξέος [1].



Peter Griess



Andrew Lang [15]

Ο πυρήνας κιναζολίνης εμφανίζεται φυσικά στα αλκαλοειδή κιναζολίνης, τα οποία βρίσκονται σε διάφορες οικογένειες βοτάνων. Επίσης, η τετροδοτοξίνη, μία από τις πιο ισχυρές μη πρωτεϊνικές τοξίνες, που απομονώθηκε από το ήπαρ και τις ωοθήκες του ιαπωνικού ruffer fish, είναι ένα σύνθετο παράγωγο κιναζολίνης, το οποίο δίνει απλά παράγωγα κιναζολίνης με χημική αποικοδόμηση [1].

## 1.2. Ιδιότητες του ετεροκυκλικού συστήματος της κιναζολίνης

Όσον αφορά τη σταθερότητα και τις φυσικές της ιδιότητες, η κιναζολίνη κρυσταλλώνεται σε μορφή φύλλων από πετρελαϊκό αιθέρα και είναι σταθερή όταν αποστάζεται. Είναι ελεύθερα διαλυτή στο νερό, δίνοντας αλκαλική αντίδραση, ενώ είναι επίσης διαλυτή σε διάφορους οργανικούς διαλύτες. Η μονοένυδρη υδροχλωρική κιναζολίνη έχει σημείο τήξης 127–128 °C. Είναι σταθερή σε διαλύματα ψυχρού αραιού οξέος και αλκαλίων, αλλά αποσυντίθεται και δίνει 2-αμινοβενζαλδεΐδη, αμμωνία και μυρμηκικό οξύ όταν αυτά τα διαλύματα θερμαίνονται. [1]

Όσον αφορά τις χημικές ιδιότητές της, η συμπύκνωση του δακτυλίου βενζολίου με τον δακτύλιο πυριμιδίνης μεταβάλλει τη δραστηριότητα και των δύο δακτυλίων. Ο δακτύλιος βενζολίου έχει μια βαθιά επίδραση στις ιδιότητες του δακτυλίου πυριμιδίνης. Λόγω της συμπύκνωσης των δύο δακτυλίων ο δεσμός N3-C4 στις κιναζολίνες αναπτύσσει έναν ιδιαίτερα εντοπισμένο χαρακτήρα διπλού δεσμού, με αποτέλεσμα την εύκολη προσθήκη πυρηνόφιλων. Αντιθέτως, οι κιναζολίνες με ταυτομεριζόμενες (π.χ. υδροξυ) ομάδες στον δακτύλιο πυριμιδίνης υφίστανται χαρακτηριστικές αντιδράσεις των αντίστοιχων πυριμιδινών. Ο δακτύλιος βενζολίου απενεργοποιείται προς ηλεκτροφιλική προσβολή από το φαινόμενο απόσυρσης ηλεκτρονίων του δακτυλίου πυριμιδίνης. [1]

Σε υδατικό διάλυμα, η κιναζολίνη είναι πολύ ισχυρότερη βάση ( $pK_a = 3,51$ ) από την πυριμιδίνη ( $pK_a = 1,31$ ) λόγω της σταθεροποίησης της πρωτονιομένης μορφής της. [1]

Οι κιναζολίνες υφίστανται κυρίως τρεις τύπους αντιδράσεων μετάθεσης. Σε μια αναδιάταξη Charman λαμβάνει χώρα η θερμική μετατροπή των κιναζολιν-2-υλ και κιναζολιν-4-υλ αιθέρων προς τις αντίστοιχες N-αλκυλοκιναζολινόνες. Η μετατροπή των 3-αλκυλο- ή 3-αρυλο-2-αμινοκιναζολιν-4(3H)-ονών σε 2-(αλκυλαμινο) ή 2-(αρυλαμινο)κιναζολιν-4(3H)-όνες, υπό βασικές συνθήκες, είναι γνωστή ως μετάθεση Dimroth. Η τρίτη συνθετικά σημαντική αντίδραση μετάθεσης είναι η διεύρυνση του δακτυλίου των 3-οξειδίων 2-(αμινομεθυλ) 4-φαινυλκιναζολίνης σε 2-(μεθυλαμινο)-5-φαινυλ-3H-1,4-βενζοδιαζεπίνη-4-οξείδια. [1]

Τρεις χαρακτηριστικές εντατικές και αιχμηρές ζώνες απορρόφησης IR που βρίσκονται στις περιοχές 1478-1517, 1566–1581 και 1612–1628  $\text{cm}^{-1}$  σχετίζονται με τον δακτύλιο κιναζολίνης, σύμφωνα με μια συστηματική μελέτη πολλών παραγώγων κιναζολίνης. [1]

Ως προς την πυρηνόφιλη υποκατάσταση, οι κιναζολίνες που φέρουν αποχωρούσες ομάδες στις θέσεις 2 και 4 έχουν προδιάθεση για πυρηνόφιλη προσβολή. Συνθετικά πολύ χρήσιμες είναι οι πυρηνόφιλες αντιδράσεις υποκατάστασης 2- και 4-αλογονοκιναζολινών με διάφορα πυρηνόφιλα. Η συμπύκνωση ενός δακτυλίου βενζολίου με μια αλογονο-υποκατεστημένη πυριμιδίνη αυξάνει την δραστηριότητα του ατόμου αλογόνου ως προς την πυρηνόφιλη υποκατάσταση, πιθανώς λόγω της αυξημένης σταθεροποίησης μέσω

συντονισμού της μεταβατικής κατάστασης. Η πιο σημαντική αντίδραση των κιναζολιν-2-ονών και των κιναζολιν-4-ονών, ταυτομερών μορφών της 2-υδροξυ και της 4-υδροξυ-κιναζολίνης αντίστοιχα, είναι η αντικατάσταση της οξομάδας από αλογόνο. [1]

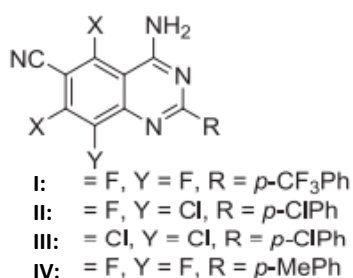
### 1.3. Παράγωγα κιναζολίνης με βιολογική δράση

Τα παράγωγα κιναζολίνης έχουν προσελκύσει ιδιαίτερη προσοχή λόγω των ποικίλων φαρμακολογικών δράσεων τους όπως είναι αντιμικροβιακή, αντιφλεγμονώδης, αντιυπερτασική, αντισπασμωδική, αντιδιαβητική, ανασταλτική έναντι της χολινεστεράσης και αντικαρκινική. Μερικά παράγωγα κιναζολίνης αλληλοεπιδρούν με την τουμπουλίνη παρεμβαίνοντας στον πολυμερισμό της, ενώ άλλα ενεργούν ρυθμίζοντας την δραστηριότητα της κινάσης Αυτογα ή επηρεάζουν κρίσιμες φάσεις στον κύτταρικό κύκλο ή ακόμα ενεργούν ως επαγωγείς απόπτωσης. [2]

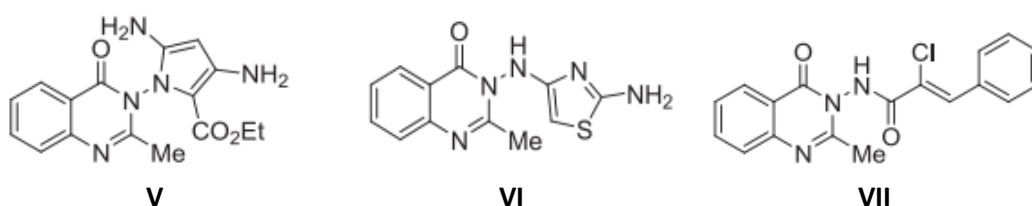
Έχει συντεθεί ένας μεγάλος αριθμός παραγώγων κιναζολίνης ως πιθανών φαρμακευτικών παραγόντων, ενώ ο στόχος της σύγχρονης έρευνας είναι ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη πιο αποτελεσματικών φαρμάκων βάσει αυτών των παραγώγων. Ακολουθώς παρουσιάζονται αναλυτικότερα ορισμένες από τις βιολογικές δράσεις που έχουν επιδείξει τα παράγωγα κιναζολίνης.

#### ▪ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

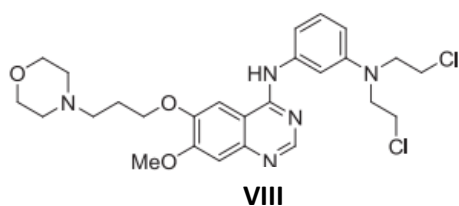
Οι Yan et al. [2] ανέπτυξαν μια απλή και αποτελεσματική διαδικασία για τη σύνθεση βιβλιοθήκης πολυαλογονωμένων 2-αρυλο-4-αμινοκιναζολινών. Η πρόσφατα συντεθείσα βιβλιοθήκη ενώσεων αξιολογήθηκε ως προς την *in vitro* ανασταλτική δράση κατά μιας σειράς ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων. Το Cisplatin (CDDP, σισπλατίνη) χρησιμοποιήθηκε ως το φάρμακο αναφοράς. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν ότι μερικές από τις ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων των **I** έως **IV**, είχαν καλή δραστηριότητα έναντι των κυττάρων του όγκου. Μεταξύ αυτών, η ένωση **I** ήταν η πιο δραστική, πιο ισχυρή από τη σισπλατίνη έναντι των κυτταρικών σειρών SKOV-3, U2-OS, A549 και MCF7. Επιπλέον, η **I** είναι έως και 40 φορές πιο ενεργή από τη σισπλατίνη εναντίον MCF-7 κυττάρων. Αυτό την καθιστά μία από τις πιο ελπιδοφόρες για μελλοντικές κλινικές δοκιμές βάσει των πολύτιμων πληροφοριών που αποκτήθηκαν.



Ο Mohareb και οι συνεργάτες του [2] ανέφεραν αρκετά νέα παράγωγα κιναζολίνης που φέρουν ομάδες πυρρολίου, θειαζολίου, ή βενζυλιδενίου. Οι συνθετικές ενώσεις υποβλήθηκαν στην πρωταρχική *in vitro* αντικαρκινική δοκιμασία μιας δόσης του NCI (National Cancer Institute), χρησιμοποιώντας ένα πάνελ 3 κυτταρικών σειρών αποτελούμενο από MCF-7 (στήθος), NCI-H460 (πνεύμονας) και SF-268 (CNS) καρκινικά κύτταρα. Όσον αφορά την ευαισθησία έναντι μεμονωμένων κυτταρικών γραμμών, η ένωση **V** έδειξε σημαντική δράση έναντι των MCF-7, NCIH460 και SF-268. Η ένωση **VI** έδειξε την υψηλότερη ισχύ έναντι MCF-7 σε συγκέντρωση 0,01 mM, και επομένως είναι σχεδόν δύο φορές πιο δραστική από τη δοξορουμπικίνη που χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας. Η ένωση **VII** έδειξε επίσης μια αξιοσημείωτη δραστικότητα έναντι και των τριών κυτταρικών σειρών. [2]



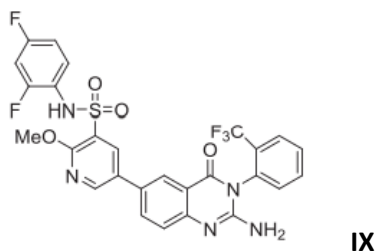
Ο Qi και οι συνεργάτες του [2] σχεδίασαν και συνέθεσαν μια σειρά από δεκατρία νέα παράγωγα κιναζολίνης, τα οποία αξιολογήθηκαν για την αντικαρκινική τους δράση *in vitro* και *in vivo*. Έλεγχοι κυτταροτοξικότητας πραγματοποιήθηκαν σε πέντε καρκινικές κυτταρικές σειρές (HepG2, SH-SY5Y, DU145, MCF-7 και A549) και σε μία φυσιολογική ανθρώπινη κυτταρική γραμμή (GES-1). Τα κλινικά χρησιμοποιούμενα φάρμακα Sorafenib και Gefitinib χρησιμοποιήθηκαν ως θετικός έλεγχος. Μεταξύ των ελεγχόμενων ενώσεων, η **VIII** έδειξε πολύ χαμηλό IC<sub>50</sub> σε κύτταρα HepG2, η οποία ήταν χαμηλότερη από το Sorafenib. Στο μοντέλο ξενομοσχεύματος HepG2, η **VIII** παρουσίασε σημαντική αναστολή ανάπτυξης καρκίνου με χαμηλή τοξικότητα ξενιστή *in vivo*. [2]



#### ▪ ΔΡΑΣΗ ΚΑΤΑ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ

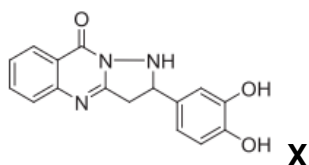
Ο Botyanszki και οι συνεργάτες του ανακάλυψαν έναν αναστολέα τύπου III της Phosphatidylinositol 4-Kinase Alpha (PI4KIIIa) ως παράγοντα κατά της ηπατίτιδας C (HCV). Έχουν επίσης περιγράψει τις σχέσεις δομής-δραστικότητας που σχετίζονται με την αναστολή PI4KIIIa και την αντιγραφή του HCV. Αυτές οι προσπάθειες οδήγησαν στην αναγνώριση της κιναζολινόνης **IX** που εμφανίζει

υψηλή εκλεκτικότητα για την PI4KIIIa και αναστέλλει ισχυρά την αντιγραφή του HCV *in vitro*. [4]

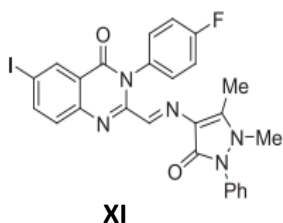


#### ■ ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΔΡΑΣΗ

Ο Hussein ανέφερε τη σύνθεση της 2,3-διυδρο-2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)-πυραζολο[5,1-b]κιναζολιν-9(1H)-όνης και τη δοκίμασε για την αντιφλεγμονώδη δράση της χρησιμοποιώντας τη μέθοδο των Winter et al. και το νατριούχο δικλοφενάκη ως πρότυπο αναφοράς. Η ελεγχόμενη ένωση **X** έδειξε πολλά υποσχόμενη αντιφλεγμονώδη δράση σε σύγκριση με το φάρμακο αναφοράς. [4]

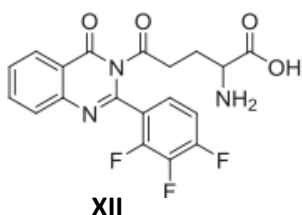


Ο Abbas και οι συνεργάτες του ανέφεραν μερικά νέα 3-(4-χλωροφαινυλ)- ή 3-(4-φθοροφαινυλ)- παράγωγα της 6-ιωδο-4-οξο-3,4-διυδροκιναζολίνης που φέρουν βάσεις Schiff και διάφορα ετεροκυκλικά μοτίβα όπως οξαζολόνη, ιμιδαζολιδίνη, πυραζολιδίνη, πυριδίνη και πυριμιδίνη. Οι συντεθείσες ενώσεις εξετάστηκαν για την αντιφλεγμονώδη δράση τους. Ο έλεγχος της αντιφλεγμονώδους δραστηριότητας των νέων ενώσεων 4(3H)-κιναζλινόνης αποκάλυψε ότι, η 3-(4-φθοροφαινυλ)-2-[(1,5-διμεθυλ-3-οξο-2-φαινυλ-2,3-διυδρο-1H-πυραζολ-4-υλιμινο)-μεθυλ]-6-ιωδο-3H-κιναζολιν-4-όνη **XI**, η οποία έχει πλευρική αλυσίδα αζωμεθίνης με ένα τμήμα πυραζολίου στη θέση C-2 και χλωροφαινύλιο στη θέση 3, έδειξε ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση. [3]



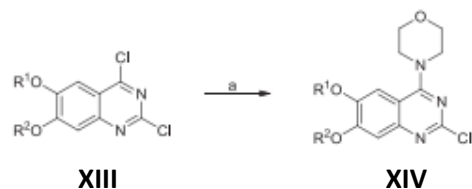
## ▪ ANTIMΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ

Οι Prashanth και Revanasiddappa συνέθεσαν μια νέα σειρά συζευγμένων με γλουταμίνη 2,3-διυποκατεστημένων κιναζολινών ξεκινώντας από ανθρανιλικό μεθυλεστέρα και διάφορα υποκατεστημένα οξέα ή χλωρίδια οξέων. Οι πρόσφατα παρασκευασμένες ενώσεις ελήφθησαν με καλές αποδόσεις. Όλες οι ενώσεις εξετάστηκαν για την αντιβακτηριακή τους δράση κατά Gram<sup>+</sup> (*Bacillus subtilis* και *Staphylococcus aureus*) και Gram<sup>-</sup> βακτήρια (*Pseudomonas aeruginosa* και *Escherichia coli*) και για αντιμυκητιακή δράση κατά *Candida albicans* και *Aspergillus flavus*, χρησιμοποιώντας τεχνική διάχυσης χαρτιού. Η ένωση **XII** βρέθηκε να παρουσιάζει την πιο ισχυρή αντι-μικροβιακή δράση *in vitro* μεταξύ των ελεγχόμενων σειρών ενώσεων. Μια εκτενής ανάλυση των αποτελεσμάτων διαλογής και των δομών των δραστικών ενώσεων αποκάλυψε ότι η υποκατάσταση αλογόνου του φαινυλο-δακτυλίου αυξάνει την αντιμικροβιακή δράση. Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι η ιδιότητα του δακτυλίου φαινυλίου να αποσύρει ηλεκτρόνια είναι σημαντική και επιβεβαιώνεται από την αυξημένη δραστηριότητα ενώσεων με ομάδα αλογόνου και τη μειωμένη δραστηριότητα ενώσεων με μεθύλιο ή μεθόξυ ομάδα στον δακτύλιο φαινυλίου. Ως εκ τούτου, η αντικατάσταση των αλογόνων με μεθύλιο ή μεθόξυ ομάδα οδηγεί στη μείωση της αντιβακτηριακής δράσης. [4]



#### 1.4. Γνωστά παράγωγα 4-μορφολινοκινιναζολίνης

Η συνθετική οδός για τις ενώσεις **XIII** και **XIV** που έχουν μορφολίνη στη θέση 4, περιγράφεται στο Σχήμα 1. Η 2,4-διχλωρο-6,7-διαλκυλοξυκινιναζολίνη χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη. Η αντίδραση της **XIII** με μορφολίνη παρήγαγε το βασικό ενδιάμεσο 2-χλωρο-4-(4-μορφολινυλ)-6,7-διαλκυλοξυκινιναζολίνη (**XIV**).



R<sup>1</sup> = CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>;  
R<sup>2</sup> = CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, Bn

Σχήμα 1

Όπου α: morpholine, Et<sub>3</sub>N, THF, 0 °C, 0.5 h, rt, 2 h, 55.8-70.5%;

Οι παραπάνω ενώσεις αξιολογήθηκαν, με εφαρμογή της χρωματομετρικής δοκιμασίας βρωμιούχου 3-(4,5-διμεθυλθειαζολ-2-υλ)-2,5-διφαινυλτετραζολίου (MTT), ως προς την αντιπροπλασιαστική τους δράση κατά της κυτταρικής γραμμής του καρκινώματος του παχέος εντέρου (HCT-116) και την κυτταρική σειρά αδενοκαρκινώματος μαστού (MCF-7). Ο αναστολέας της PI3K GDC-0941 χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν με τιμές IC<sub>50</sub>. Όπως ήταν αναμενόμενο, οι ενώσεις εμφάνισαν ισχυρή αντιπροπλασιαστική δράση κατά των δύο καρκινικών κυτταρικών σειρών. Γενικά, ήταν πιο δραστικές έναντι της HCT-116 από ότι εναντίον της MCF-7. Η ένωση **XIII** έδειξε υψηλή δραστικότητα έναντι των HCT-116 (IC<sub>50</sub> 0,90 mM) και MCF-7 (IC<sub>50</sub> 2,14 mM). Το γεγονός ότι η ένωση **XIV** είναι πιο δραστική από την ένωση **XIII** έναντι HCT-116 και HCF-7 υποδεικνύει ότι η παρουσία μεθοξυ ομάδας στο R2 ή το R3 μπορεί να ενισχύσει την αντιπροπλασιαστική δράση. Περαιτέρω δράση παρόμοιων παραγώγων 4-μορφολινοκινιναζολίνης αποτελεί η αναστολή της κινάσης PI3K. Σχετικά παραδείγματα αναστολέων της PI3K αναφέρονται παρακάτω [5], [6].

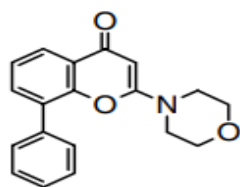


### 1.5. Η κινάση PI3K και οι αναστολείς της

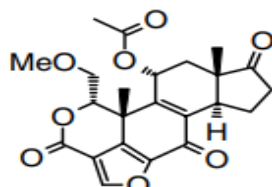
Οι κινάσες 3-φωσφατιδυλινοσιτόλης (PI3Ks) είναι μια οικογένεια ενζύμων που έχουν ρυθμιστικό ρόλο σε κρίσιμες κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής ανάπτυξης, του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης. Οι κινάσες αυτές φωσφορυλιώνουν το 3-OH' του δακτυλίου ινοσιτόλης των φωσφοινοσιτιδίων και παράγεται η 3-φωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη (PIP), ενώ απορρύθμιση αυτού του μονοπατιού σχετίζεται με πολλές ασθένειες. Μετά την παραγωγή τους τα PIP παραμένουν στην μεμβράνη οπού και στρατολογούνται διάφορες πρωτεΐνες μέσω της PH περιοχής τους, όπως η PKB. Η φωσφορυλιωμένη PKB αναστέλλει πρωτεΐνες που προκαλούν απόπτωση και θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου. Από την άλλη η φωσφατάση PTEN, αποφωσφορυλιώνει όλα τα 3' φωσφορυλιωμένα φωσφοινοσιτιδία εμποδίζοντας τη στρατολόγηση-ενεργοποίηση της PKB που στοχεύει στην επιβίωση του κυττάρου, διαδραματίζοντας έτσι σημαντικό ρολο στην ισορροπία μεταξύ κυτταρικής επιβίωσης και κυτταρικού πολλαπλασιασμού [7].

Παρόλα αυτά είναι απογοητευτικό το γεγονός ότι πολλοί αναστολείς PI3K δεν έχουν ανταποκριθεί στο πραγματικό κλινικό δυναμικό τους λόγω της απουσίας αξιόπιστων και αποτελεσματικών βιοδεικτών και την έλλειψη ανάπτυξης ορθολογικών θεραπευτικών συνδυασμών. Ως εκ τούτου, υπάρχει η ελπίδα ότι για τις κλινικές δοκιμές των αναστολέων της PI3K, η ταυτοποίηση κατάλληλων βιοδεικτών και η ανάπτυξη βέλτιστων συνδυασμών θα οδηγήσουν σε μελλοντικά επιτυχημένα φάρμακα εγκεκριμένα από τον FDA.

Μεταξύ των πρώτων αναστολέων της PI3K που ανακαλύφθηκαν περιλαμβάνονται ο μεταβολίτης Wortmannin και η ένωση LY294002. Αν και ο Wortmannin είναι ένας ισχυρός αναστολέας της PI3K, έχει χαμηλή in vivo αντικαρκινική δράση. Επιπλέον, είναι ασταθής σε διάλυμα, πιθανώς λόγω της παρουσίας ενός δραστικού δακτυλίου φουρανίου. Η ένωση LY294002 είναι περισσότερο σταθερή, αλλά σχετικά ασθενής αναστολέας PI3K. Επιπλέον, ούτε το Wortmannin ούτε το LY294002 εμφανίζουν επιλεκτικότητα μεταξύ των ισομορφών PI3K και η έλλειψη - ειδικών για τις ισομορφές - PI3K αναστολέων έχει καταστήσει δύσκολη την κατανόηση των βιολογικών ρόλων μεμονωμένων ισομορφών PI3K [7].



**LY294002**

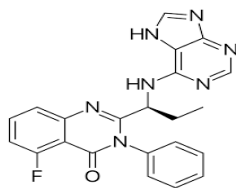


**Wortmannin**

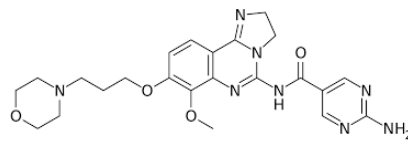
Η επιλεκτική αναστολή μεμονωμένων ισομορφών της PI3K με τη χρήση μικρών μορίων αναστολέων ανταγωνιστών-ATP θεωρείται μια πολλά υποσχόμενη

θεραπευτική στρατηγική για την αντιμετώπιση αυτών των καταστάσεων. Αυτή η αυξανόμενη επικύρωση του ρόλου της PI3K σε διάφορες ασθένειες έχει οδηγήσει στην επέκταση της έρευνας από φαρμακευτικές εταιρείες και ακαδημαϊκές ομάδες παγκοσμίως.

Η κινάση PI3K έχει προσελκύσει τεράστιο βιομηχανικό και ακαδημαϊκό ενδιαφέρον ως θεραπευτικός στόχος για κλινικές παθήσεις, όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης και το άσθμα. Το Idelalisib ήταν ο πρώτος αναστολέας PI3K εγκεκριμένος από την Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) και χρησιμοποιείται για τη θεραπεία υποτροπιάζουσας χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας.



**Idelalisib**



**Copanlisib**

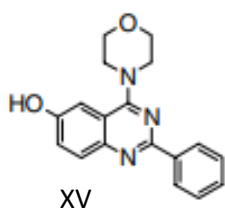
Στη συνέχεια, το Copanlisib εγκρίθηκε για ασθενείς που έχουν λάβει τουλάχιστον δύο προηγούμενες συστηματικές θεραπείες. Επιπλέον, υπάρχει ένας πλούτος παραγόντων PI3K που βρίσκονται σήμερα σε κλινικές δοκιμές (38 αυτήν τη στιγμή), που στοχεύουν σε διάφορους συνδυασμούς των ισομορφών PI3K. Ενώ το Idelalisib έχει αποδειχθεί αποτελεσματικό σε ασθενείς, απροσδόκητες μολυσματικές και αυτοάνοσες τοξικότητες έχουν δείξει την ανάγκη για προσεκτική ανάπτυξη νέων παραγόντων. Γενικά, οι αρχικοί αναστολείς PI3K υποφέρουν από κακές φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως μικρή διαλυτότητα και διαπερατότητα, από συνδυασμό πολλαπλών αρωματικών δακτυλίων και έλλειψη ανθράκων sp<sup>3</sup> που οδηγούν σε ενώσεις με κακές φαρμακοκινητικές ιδιότητες. Αυτά τα πρώιμα ζητήματα γρήγορα επιλύθηκαν από φαρμακευτικούς χημικούς, μέσω μείωσης της λιποφιλικότητας και προσθήκη ιονισμένων ομάδων για την παροχή ενώσεων με εξαιρετική διαπερατότητα και καλές φαρμακοκινητικές ιδιότητες [7].

## 1.6. Η σημασία της μορφολινο-ομάδας

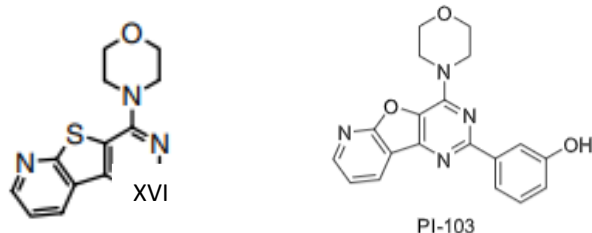
Οι κινάσες φωσφατιδυλινοσιτόλης είναι μια οικογένεια κινασών λιπιδίων που καταλύουν τη φωσφορυλίωση της φωσφατιδυλινοσιτόλης και τους μεταβολίτες της. Η φωσφατιδυλινοσιτόλη είναι ένας δεύτερος αγγελιοφόρος που εμπλέκεται λειτουργικά σε διαδικασίες που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων, τη μεταφορά μεμβρανών και την κυτταροσκελετική αναδιαμόρφωση. Το επίκεντρο των μελετών, που αφορούσαν διάφορες ασθένειες, ήταν η οικογένεια των κινασών 3-φωσφατιδυλινοσιτόλης (PI3Ks) και μια ομάδα σχετικών ενζύμων που αναφέρονται ως πρωτεΐνες που σχετίζονται με PI3K κινάσες (PIKK). Αυτή είναι μια οικογένεια κινασών σερίνης/θρεονίνης, διαφορετικών από άλλες κινάσες πρωτεϊνών, και λειτουργικά διακριτές από την PI3K, καθώς καμία από αυτές δεν σχετίζεται με τα φωσφορυλιωμένα λιπίδια. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω οι αναστολείς PI3K που είχαν ανακαλυφθεί χαρακτηρίζονταν από κακή διαλυτότητα, βιοδιαθεσιμότητα και πολύ γρήγορη μεταβολική αποδόμηση.

Οι PI3Ks που είναι γνωστές μέχρι σήμερα χωρίζονται στις τάξεις I-III, και η κλάση I υποδιαιρείται περαιτέρω στις τάξεις Ia και Ib. Μεταξύ αυτών των ισομορφών, τα ένζυμα κατηγορίας Ia θεωρείται ότι διαδραματίζουν τον πιο σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων ως απόκριση στην ενεργοποίηση της οδού αυξητικού παράγοντα κινάσης τυροσίνης. Το γονίδιο PIK3CA, το οποίο κωδικοποιεί την καταλυτική υπομονάδα p110α της PI3K, ενισχύεται και υπερεκφράζεται στον καρκίνο των ωθηκών αλλά και σε άλλους καρκίνους. Έτσι, η τάξη Ia των PI3Ks, και ιδιαίτερα η υπομονάδα p110α, είναι πιθανοί στόχοι στη θεραπεία του καρκίνου και οι αναστολείς τους αποτελούν πιθανούς αντικαρκινικούς παράγοντες.

Έχει πραγματοποιηθεί διαλογή υψηλής απόδοσης (high throughput screening) προκειμένου να αποκτήσουμε νέους αναστολείς της p110α του PI3K και έτσι ανακαλύφθηκε η 4-μορφολινο-2-φαινυλοκιναζολιν-6-όλη (XV). Με βάση αυτή την ένωση προέκυψαν πολλές ακόμα καινοτόμες και επιλεκτικές ενώσεις-αναστολείς PI3K. Η ένωση XV είχε τιμή  $IC_{50}$  1,3  $\mu$ M για αναστολή του p110α σε μια δοκιμασία SPA, με το LY294002 να αναστείλει το p110α με τιμή  $IC_{50}$  μόλις 0,63  $\mu$ M. Στη συνέχεια η εισαγωγή μιας 3-υδρόξυ ομάδας στην φαινυλο-ομάδα της παραπάνω ένωσης οδήγησε στην παραγωγή ενώσεων με μεγαλύτερη ανασταλτική δραστηριότητα απέναντι στην p110α [8].



Στη συνέχεια οι επιστήμονες οδηγήθηκαν στην ανακάλυψη της 4-morpholin-4-ylpyrido[3,2:4,5]thieno[3,2-d]pyrimidine (XVI) ως νέου αναστολέα του p110α, με IC<sub>50</sub> 1,4 μM. Έπειτα, με δομική τροποποίηση του, προέκυψε το παράγωγο 2-aryl-4-morpholinopyrido[3,2:4,5]furo[3,2-d]pyrimidine (PI-103) που είχε περίπου 400 φορές μεγαλύτερη ισχύ από την (XVI). Η αξιολόγηση της επιλεκτικότητας της ισομορφής αυτής έδειξε μεγάλη αντιπολλαπλασιαστική δραστηριότητα σε διάφορες κυτταρικές σειρές, ενώ ήταν αποτελεσματική έναντι ξενομοσχευμάτων ανθρώπινου τραχηλικού όγκου HeLa σε γυμνούς ποντικούς.[17]



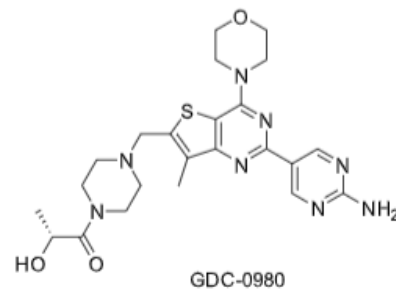
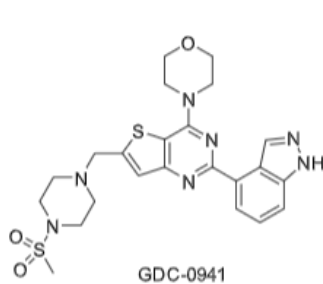
Τόσο το PI3K όσο και το mTOR έχουν αναγνωρισθεί ως πολλά υποσχόμενοι στόχοι για τη θεραπεία του καρκίνου. Αυτά τα ένζυμα συμμετέχουν σε συναφή δίκτυα σηματοδότησης μεταδίδοντας κυτταρικά σήματα ανάπτυξης και επιβίωσης, τα οποία είναι χαρακτηριστικά της ανάπτυξης όγκου. Η PI3Kα, ένα μέλος των της τάξης I των κινασών PI3K, έχει συνδεθεί με τον καρκίνο μέσω της ταυτοποίησης ενεργών μεταλλάξεων στην περιοχή της κινάσης, μεταλλάξεων απώλειας λειτουργίας στον αρνητικό ρυθμιστή PTEN, του βασικού ρόλου της στην μετάδοση σημάτων προς και από γνωστά ογκογονίδια και ως γνωστό μηχανισμό αντίστασης σε υπάρχουσες θεραπείες. Αρκετοί αναστολείς της τάξης I των PI3K, όπως η GDC-0941 έχουν εισαχθεί σε κλινικές δοκιμές.

Ο αναστολέας GDC-0941 χρησίμευσε ως πρότυπο για τη διερεύνηση της πιθανής προσθήκης αναστολής του mTOR, καθώς αυτή η ένωση είχε καλή ισχύ, ήταν επιλεκτική έναντι ενός μεγάλου αριθμού κινασών και ήταν αποτελεσματική σε μελέτες ξενομοσχεύματος ποντικών όταν δόθηκε από το στόμα. Έτσι η ανακάλυψη της ένωσης PI-103, που επίσης είχε πυρήνα μορφολινοπυριμιδίνης και ανέστειλε τόσο τον mTOR όσο και τις PI3Ks, υπέδειξε ότι η ικανότητα αναστολής του mTOR θα μπορούσε να αποκτηθεί μέσω τροποποίησης της ένωσης GDC-0941.

Έχει αναφερθεί προηγουμένως ότι η ομάδα μορφολίνης στο σχετικό πρότυπο κιναζολίνης ήταν κρίσιμη για την αναστολή του p110α, με όλες τις τροποποιήσεις σε αυτήν τη θέση να έχουν ως αποτέλεσμα μεγάλες μειώσεις στην ισχύ. Μελέτες αναλόγων του LY294002 έδειξαν επίσης ότι η ομάδα μορφολίνης είναι κρίσιμη για την ανασταλτική δράση, υποδηλώνοντας ότι οι ομάδες μορφολίνης στις σειρές κιναζολίνης και το LY294002 αλληλεπιδρούν με την PI3K με παρόμοιο τρόπο. Συνεπώς, ένα επόμενο βήμα ήταν η ανακάλυψη της GDC-0941. Η ένωση αυτή που έχει ελεγχθεί εκτενώς, φαίνεται να έχει εξαιρετική επιλεκτικότητα αναστολέα

έναντι των PI3K. Παράλληλα, δείχνει ισχυρό ανασταλτικό χαρακτήρα *in vitro* έναντι εύρους κυτταρικών σειρών ανθρώπινων όγκων αλλά και απέναντι στην ανάπτυξη ανθρώπινων ξενομοσχευμάτων γλοιοβλαστώματος U87MG σε αθυμικά ποντίκια [16].

Η αναστολή του mTOR προστέθηκε ως ιδιότητα στους αναστολείς των PI3K μέσω αντικατάστασης της ινδαζόλης στην ένωση GDC-0941 με 2-αμινοπυριμιδίνη. Έτσι, με σκοπό την αύξηση της διαλυτότητας ανακαλύφθηκε η ένωση GDC-0980. Η ένωση αυτή είναι δραστική έναντι ισομορφών PI3K αλλά αναστέλλει και το mTOR, με ισχυρή επιλεκτικότητα [17].



## 1.7 Εφαρμογές των αναστολέων PI3K στην αντικαρκινική θεραπεία

Η οδός κινάσης 3-φωσφατιδυλινοσιτόλης (PI3K) είναι μία της πιο συχνά ενεργοποιημένες οδούς παθογόνου σηματοδότησης καρκίνου στον άνθρωπο, επηρεάζοντας το 30-50% των κακοηθειών, καθιστώντας την ορθολογικό και σημαντικό στόχο για την ανάπτυξη καινοτόμων φαρμάκων για στοχευμένη αντικαρκινική θεραπεία. Το γονίδιο PIK3CA, το οποίο κωδικοποιεί την καταλυτική υπομονάδα p110α του PI3K, είναι η πιο συχνά μεταλλαγμένη κινάση στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ενίσχυσης και υπερέκφρασης PIK3CA σε διαφορετικούς καρκίνους, καθώς και πολλές άλλες ογκογονικές ανωμαλίες, συμπεριλαμβανομένης της συχνής μετάλλαξης, της διαγραφής και της απώλειας έκφρασης του γονιδίου καταστολής όγκου PTEN [7].

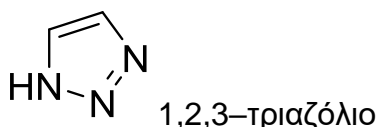
Ένα σημαντικό βήμα προς τα εμπρός τα τελευταία χρόνια ήταν η είσοδος πάνω από 30 αναστολέων PI3K μικρών μορίων σε κλινικές δοκιμές και η πρώτη κανονιστική έγκριση ενός τέτοιου μορίου, του idelalisib (το οποίο αναφέρθηκε παραπάνω). Μελλοντικό στόχο αποτελούν η μελλοντική ανάπτυξη και χρήση αναστολέων PI3K για τη θεραπεία ασθενών με μια σειρά διαφορετικών κακοηθειών.

Οι τρεις κύριες κατηγορίες αναστολέων PI3K που βρίσκονται σήμερα σε κλινικές δοκιμές περιλαμβάνουν διπλούς αναστολείς PI3K / mTOR, αναστολείς της PI3K που δεν έχουν σημαντική δραστικότητα στο mTOR, και εκλεκτικούς σε ισομορφή της PI3K αναστολείς. Η συντριπτική πλειονότητα των φαρμάκων είναι αναστολείς κινάσης ανταγωνιστικοί με το ATP [9].

Στο μέλλον, θα είναι σημαντικό να καθιερώσουμε σαφή κριτήρια επιλογής ασθενών χρησιμοποιώντας προγνωστικά βιοδείκτες απόκρισης και αντίστασης για τις διάφορες κατηγορίες PI3K αναστολέων. Ωστόσο, μια τέτοια επιλογή ασθενούς είναι πολύπλοκη και πολυπαραγοντική, και ενδέχεται να επηρεαστεί από ζητήματα ενδοογκικής ετερογένειας. Μελέτες συσχέτισης ευαισθησίας με βάση το γονότυπο που περιλάμβαναν αναστολείς PI3K έχουν αναφερθεί για την αξιολόγηση ευρέων πάνελ καρκινικών κυτταρικών σειρών σε υψηλού προφίλ επιστημονικές δημοσιεύσεις και σε σχετικά σύνολα δεδομένων όπως το πρόγραμμα Genome Cancer (CGP, Sanger Center) και η εγκυκλοπαίδεια του Cancer Cell Line (CCLE, Broad Ινστιτούτο). Συνολικά, εντοπίστηκαν μεγάλες διαφορές μεταξύ των συσχετισμών ευαισθησίας-γονότυπου από αυτές τις δύο πηγές δεδομένων, αν και τα δεδομένα αλληλουχίας και έκφρασης DNA και RNA βρέθηκαν να είναι σύμφωνα. Είναι σημαντικό να λάβουμε υπόψη την ακριβή επιλεκτικότητα ισομορφής PI3K και να συμπεριλάβουμε πολλαπλούς διαφορετικούς χημειοτύπους αναστολέα, έτσι ώστε να ελαχιστοποιούνται οι επιπτώσεις εκτός στόχου και να μεγιστοποιηθεί η αξιοπιστία των ευρημάτων [9].

## 1.8. Παράγωγα 1,2,3-τριαζολίου

Μεταξύ των ετεροκυκλικών συστημάτων που έχουν ερευνηθεί εκτενώς στο πεδίο της φαρμακευτικής χημείας είναι και οι τριαζόλες, οργανικές ενώσεις που με πενταμελή δακτύλιο που περιλαμβάνει τρία άτομα αζώτου και δύο άνθρακα. Υπάρχουν δύο ισομερείς μορφές τριαζολών, συγκεκριμένα η 1,2,3-τριαζόλη και η 1,2,4-τριαζόλη. Γενικά, τα 1,2,3-τριαζόλια υποδιαιρούνται περαιτέρω σε τρεις κύριες κατηγορίες, συγκεκριμένα, μονοκυκλικά 1,2,3-τριαζόλια, βενζοτριαζόλια και άλατα 1,2,3-τριαζολίου.



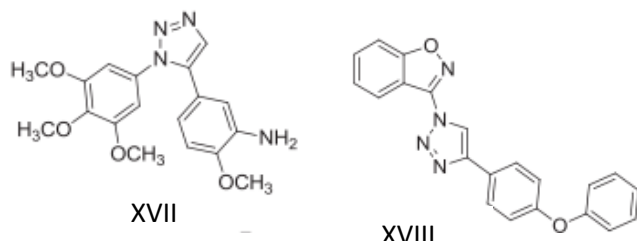
Οι μονοκυκλικές 1,2,3-τριαζόλες χαρακτηρίζονται από εξαιρετική χημική σταθερότητα σε υδρολυτικές, οξειδωτικές ή αναγωγικές συνθήκες, αλλά και ανθεκτικότητα στην ενζυμική αποδόμηση. Μόνο σε δραστικές συνθήκες υφίστανται αναγωγική διάσπαση που οδηγεί στο σχηματισμό αλάτων τριαζολίου. Η σταθερότητα τους, σε συνδυασμό με την ικανότητα συμμετοχής σε ποικίλες διαμοριακές αλληλεπιδράσεις, όπως είναι οι διπόλου-διπόλου, οι π-αλληλεπιδράσεις και οι δεσμοί υδρογόνου, αλλά και η καλή διαλυτότητά τους, έχουν αυξήσει τη σημασία τους στον τομέα της φαρμακευτικής χημείας, καθώς συνδέονται με βιολογικούς στόχους με υψηλή συγγένεια και εμφανίζουν βελτιωμένες φαρμακοκινητικές ιδιότητες.

Τα ετεροκυκλικά μόρια με βάση την 1,2,3-τριαζόλη έχουν αξιοποιηθεί για τη δημιουργία πολλών φαρμακευτικών ενώσεων που εμφανίζουν αντί-HIV, αντικαρκινικές, αντιβακτηριακές και άλλες δράσεις. Πολλές ενώσεις που φέρουν αυτό το τμήμα είναι εγκεκριμένα φάρμακα. Μεταξύ των ποικίλων δράσεων αυτών των παραγώγων, εμείς θα αναφερθούμε στις αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιμικροβιακές ιδιότητές τους [10].

### 1) Αντικαρκινική δράση

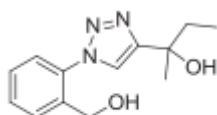
Τα 1,2,3-τριαζόλια διερευνώνται εδώ και πολύ καιρό για τις δυνατότητές τους στην αντικαρκινική χημειοθεραπεία. Πολλές ομάδες έχουν πραγματοποιήσει εστιασμένη έρευνα σε αυτό το συγκεκριμένο θέμα. Οι Odlo et al. ανακάλυψαν μια σειρά cis 1,5-δισυποκατεστημένων ανάλογων 1,2,3-τριαζολίου της κομπρεταστατίνης A-4 (CA-4). Ένα από αυτά, η 2-μεθοξυ-5-(1-(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλο)-1H-1,2,3-τριαζολ-5-υλ)ανιλίνη (**XVII**), ανέστειλε τον πολυμερισμό της τουμπουλίνης. Πειράματα μοριακής μοντελοποίησης που περιλαμβάνουν το (**XVII**) και τη θέση δέσμευσης κολχικίνης της  $\alpha$ ,  $\beta$ -τουμπουλίνης έδειξαν ότι το τμήμα τριαζολίου αλληλεπιδρά με την  $\beta$ -τουμπουλίνη μέσω σύνδεσης με αρκετά αμινο οξέα. [11]

Πρόσφατα, η 3-(4-(4-φαινοξυφαινυλ)-1H-1,2,3-τριαζολ-1-υλ)βενζο[d]ισοξαζόλη (PTB) (**XVIII**) βρέθηκε να είναι ένας από τους πιο ισχυρούς αντιπολλαπλασιαστικούς παράγοντες έναντι κυττάρων MV4-11 χρησιμοποιώντας δοκιμασία MTT. Συγκεκριμένα, η κυτταροτοξικότητα που προκαλείται από την PTB στα κύτταρα MOLM13, MOLM14 και MV4-11 έχει επιλεκτικότητα σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα μυελού των οστών (C57BL/6). [11]



## 2) Αντιφλεγμονώδης δράση

Η φλεγμονή είναι μια εξαιρετικά περίπλοκη βιολογική διαδικασία, που περιλαμβάνει απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος (AA) από φωσφολιπίδια μεμβράνης, που υποβάλλονται σε περαιτέρω διεργασίες βιομετασχηματισμού μέσω οδών κυκλοξυγενάσης (COX) και 5-λιποξυγενάσης (5-LOX). Πολλά μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα όπως η ιβουπροφαίνη, η ινδομεθακίνη και η ναπροξένη εμποδίζουν τον μεταβολισμό του AA αναστέλλοντας την COX. Ωστόσο, η παρατεταμένη χρήση παραδοσιακών φαρμάκων προκαλεί σοβαρές παρενέργειες όπως νεφρική ανεπάρκεια, έλκος και παρατεταμένο χρόνο αιμορραγίας μετά από τραυματισμό. Επομένως, είναι υπαρκτή η ανάγκη για νέα αντιφλεγμονώδη φάρμακα. Σε αυτό το πλαίσιο, οι Kim et al. συνέθεσαν ανάλογα φωσφονικού και καρβοξυλικού οξέος της φαινυλο-1H-1,2,3-τριαζόλης ως πιθανά αντιφλεγμονώδη και αξιολόγησαν τις δυνατότητές τους χρησιμοποιώντας το μοντέλο οιδήματος αυτιού που προκαλείται από ξυλόλιο σε ποντίκια. Οι μελέτες έδειξαν ότι η προσθήκη του (**XIX**) ενίσχυσε την επαγόμενη από TNFα έκφραση του COX-2 και αποδείχθηκε καλύτερη σε μοριακό επίπεδο σε σύγκριση με το φάρμακο αναφοράς, το diclofenac. [11]

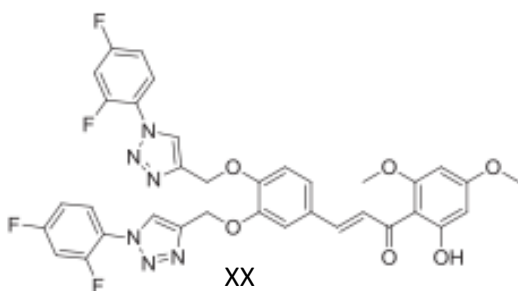


XIX



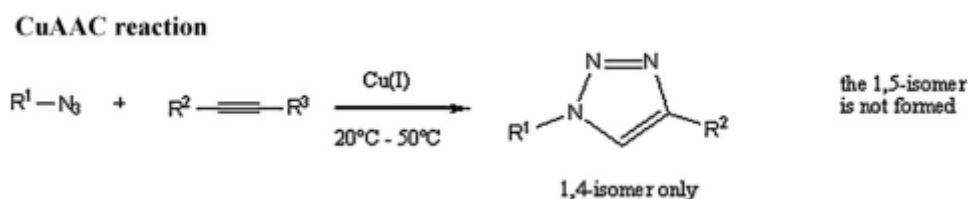
### 3) Αντιμικροβιακή δράση

Οι λοιμώξεις που προκαλούνται από πολλά μικρόβια αποτελούν σοβαρή απειλή για την ανθρώπινη επιβίωση. Επιπλέον η εμφάνιση ανθεκτικότητας στα φάρμακα δημιουργεί σοβαρά εμπόδια στη θεραπεία. Μεταξύ των μυκητιασικών λοιμώξεων, η καντιντίαση είναι υπεύθυνη για επικίνδυνες ασθένειες τόσο στον άνθρωπο όσο και στα φυτά. Σε μια προσπάθεια ανακάλυψης μιας νέας κατηγορίας αντιμικροβιακών και αντι-πλασμοδικών παραγόντων συντέθηκαν παράγωγα 1,4-διυποκατεστημένων 1,2,3-τριαζολίων, από χαλκόνες και φλαβόνες, μέσω της χημείας click. Οι ενώσεις αξιολογήθηκαν για την αντιβακτηριακή τους δράση έναντι Gram+ βακτηρίων (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*) και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella boydii*, *Klebsiella pneumoniae*). Αυτή η σειρά ενώσεων εξετάστηκε ως προς την αντιμικροβιακή και κυτταροτοξική δράση *in vitro*, και τα περισσότερα παράγωγα έδειξαν αξιόλογη αντιβακτηριακή δράση, με ασθενή κυτταροτοξική και αντιμυκητιακή δράση. Από τις είκοσι πέντε ενώσεις, η ένωση **XX** έδειξε πολλά υποσχόμενη αντιβακτηριακή δράση, όντας πιο δραστική από την αμπικιλίνη έναντι των *Escherichia coli* και *Staphylococcus aureus*, ενώ επέδειξε και αξιόλογες αντιμυκητιακές και κυτταροτοξικές δράσεις. [11]



### 1.9. Καταλυόμενη από Cu κυκλοπροσθήκη αζιδίου-αλκινίου (CuAAC)

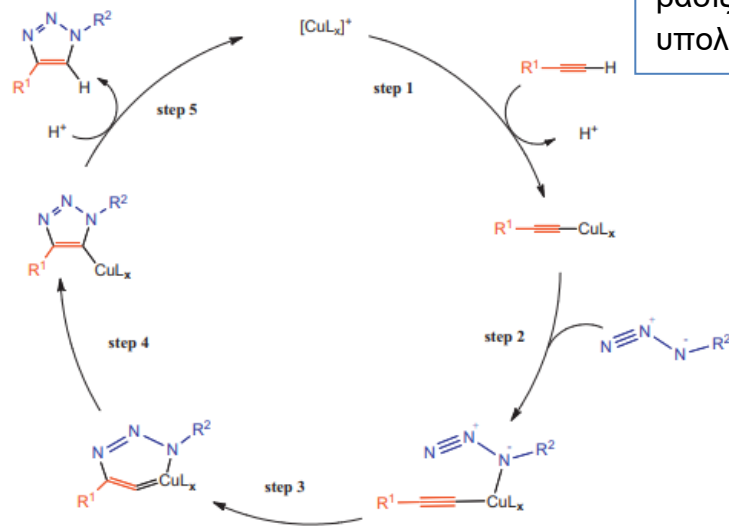
Το 2001, οι Kolb, Finn και Sharpless εισήγαγαν την πολύ χρήσιμη έννοια της αντίδρασης «κλικ» (“click” reaction), η οποία υποδηλώνει τη σύνδεση δύο μοριακών δομικών μονάδων μέσω μίας ευέλικτης, επιλεκτικής, και υψηλής απόδοσης αντίδρασης, η οποία πραγματοποιείται σε ήπιες συνθήκες, ακόμη και παρουσία νερού, δίνοντας ελάχιστα ή καθόλου παραπροϊόντα. Η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη αντίδραση «κλικ» που μπορεί να εκπληρώσει τις παραπάνω προϋποθέσεις είναι η καταλυόμενη από χαλκό (Cu) κυκλοπροσθήκη αζιδίου-αλκινίου (CuAAC). Το πλεονέκτημα της αντίδρασης CuAAC των τελικών αλκινίων είναι ο απόλυτα επιλεκτικός σχηματισμός των 1,4-υποκατεστημένων τριαζολών, σε σχέση με τις ισομερείς 1,5-υποκατεστημένες, με χρήση ποικιλίας καταλυτών Cu ή προδρόμων καταλυτών Cu. Έτσι, η αντίδραση CuAAC έγινε πολύ δημοφιλής ως «κλικ» αντίδραση και περισσότερα από 1000 σχετικά ερευνητικά άρθρα έχουν δημοσιευτεί. Οι λόγοι για την επιτυχία της είναι ότι είναι πολύ εύκολη στην εκτέλεση και έχει ευρεία εφαρμογή σε ποικιλία αντιδρώντων. Πράγματι, δεν επηρεάζεται από μια ποικιλία λειτουργικών ομάδων, μπορεί να επιτευχθεί με πολλές πηγές Cu ως καταλυτών και σε διάφορους διαλύτες, συμπεριλαμβανομένων υδατικών. [12]



Μία ερευνητική ομάδα στο ινστιτούτο Scripps διερεύνησε τον μηχανισμό της αντίδρασης CuAAC χρησιμοποιώντας κινητικές μελέτες και υπολογισμούς DFT. Ο συντονισμός του αλκινίου εκτιμάται ότι μειώνει την  $pK_a$  κατά 9,8 μονάδες pH σε υδατικό μέσο, εξηγώντας την αποπρωτονίωση του πρόδρομου π-συμπλόκου αλκινίου-Cu(I) από το ίδιο το νερό, ακόμη και απουσία επιπρόσθετης βάσης, για να σχηματιστεί το σ-αλκύνυλο-Cu(I) ενδιάμεσο. Κινητικές μελέτες έδειξαν ότι η ταχύτητα της αντίδρασης ήταν δεύτερης τάξης σε Cu(I), σε χαμηλές συγκεντρώσεις Cu(I), με σχηματισμό λιγότερο δραστικών συσσωματωμάτων χαλκού σε υψηλότερες συγκεντρώσεις. Αρχικά προτάθηκε ένας διμεταλλικός μηχανισμός όπου το αλκίνιο συμπλέχθηκε σε ένα κέντρο Cu, ενώ το αζίδιο σε ένα δεύτερο. Ένας άλλος σχετικός μηχανισμός προτάθηκε, στον οποίο το αζίδιο πρόσβαλλε το ίδιο το κέντρο Cu με το αλκίνιο. Μια διμεταλλική δομή συμμετέχει επίσης σε αυτόν τον μηχανισμό, καθώς η π-σύμπλεξη του σ-αλκύνυλο-Cu(I) ενδιάμεσου πιθανό να αυξάνει τη δραστηριότητα του τριπλού δεσμού, λόγω μείωσης της πυκνότητας ηλεκτρονίων στα άτομα άνθρακα sp. Ο υπολογισμός DFT επιβεβαίωσε ότι το δεύτερο άτομο Cu(I) αλληλεπιδράσε με το Cu(I)-ακετυλίδιο.

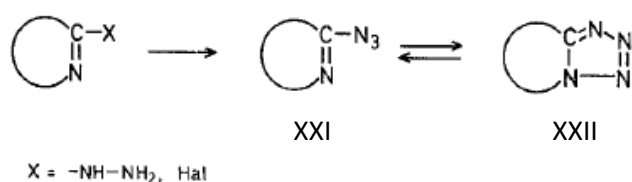
Την προσβολή από το αζίδιο ακολούθησε ο σχηματισμός Cu(III)-μεταλλοκυκλικού βινυλιδενίου. [13]

Ο προτεινόμενος καταλυτικός κύκλος των Fokin και Finn για την αντίδραση CuAAC βασιζόμενος σε υπολογισμούς DFT.

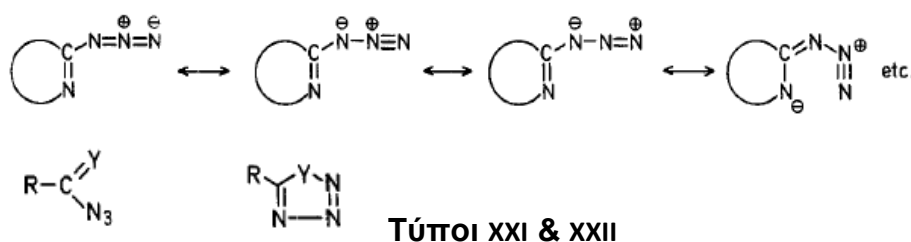


### 1.10. Ισομέρεια αζιδίου-τετραζολίου

Η ισομέρεια μεταξύ αζιδίου και τετραζολίου αναλύεται πολύ σπάνια στα υπάρχοντα άρθρα ανασκόπησης αζιδίων ή τετραζολίων. Οι πιο συνηθισμένες μέθοδοι σχηματισμού μιας αζιδομάδας συνδεδεμένης σε έναν ετεροκυκλικό δακτύλιο είναι η διαζώτωση μιας υδραζινομάδας, και η πυρηνόφιλη υποκατάσταση ενός ατόμου αλογόνου (συνήθως χλωρίου) από αζίδιο νατρίου. Εάν η παραγόμενη αζιδομάδα συνδέεται με άτομο άνθρακα γειτονικό σε άζωτο του δακτυλίου, μπορεί αυθόρμητα να κυκλοποιηθεί για να δώσει ένα συμπυκνωμένο τετραζολικό δακτύλιο, ή τουλάχιστον ένα μείγμα ισορροπίας και των δύο μορφών.



Ο μετασχηματισμός ενός ετεροκυκλικού αζιδίου στο τετραζολικό ισομερές έχει χαρακτηριστεί ως περίπτωση ταυτομέρειας, ως ισορροπία αζιδοαζομεθινο-τετραζολίου, ως 1,5-διπολική κυκλοποίηση και ως ισομερισμός σθένους. Στην βασική τους κατάσταση, τα αζίδια διαθέτουν μια γραμμική διάταξη τριών ατόμων αζώτου, αλλά βάσει θεωρητικών υπολογισμών η διαφορά ενέργειας μεταξύ της γραμμικής και της κεκαμμένης διάταξης των ατόμων αζώτου δεν είναι μεγάλη. Για την πρώτη κατάσταση διέγερσης, οι υπολογισμοί MO προβλέπουν ότι η κεκαμμένη μορφή είναι η πιο σταθερή. Οι μετατροπές είναι δυνατές με συστήματα των γενικών τύπων 21 και 22, όπου το Y είναι ένα ετεροάτομο, υποκατεστημένο ή μη, που μπορεί ενδμια μονάδα ή ένα υποκατεστημένο ετεροάτομο που μπορεί και να αποτελεί, μαζί με το R, μέρος ενός κυκλικού συστήματος. [14]



Από τη χημεία των αναλόγων ανοικτής αλυσίδας του XXI είναι προφανές ότι σε γενικές γραμμές η φύση του ατόμου ή της ομάδας Y είναι υπεύθυνη για την ύπαρξη μιας συγκεκριμένης μορφής. Έτσι, ο χαρακτήρας του Y (Y = O, S, N-R', C(R')<sub>2</sub> κλπ), πιθανώς σε συνδυασμό με την φύση της λειτουργικής ομάδας R, ασκεί σταθεροποιητική ή αποσταθεροποιητική επίδραση στις μορφές αζιδίου ή τετραζόλης. Για παράδειγμα, τα ακυλο αζίδια (Y = O) είναι γνωστό ότι βρίσκονται

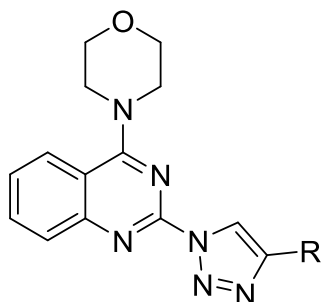
αποκλειστικά σε μορφή αζιδίου, σε αντίθεση με τα ανάλογα του θείου που υπάρχουν ως 1,2,3,4-θειατριαζόλες. [14]

Μια ακραία περίπτωση είναι αυτή των αζιδο-1,3,5-τριαζινών που βρίσκονται αποκλειστικά στη μορφή του αζιδίου. Η μετατροπή της μορφής τετραζολίου σε μορφή αζιδίου είναι ενδόθερμη διαδικασία, όπως έχει αναφερθεί για κάποια μονοκυκλικά τετραζόλια που είναι 10-12 kcal/mol πιο σταθερά από τα ισομερή τους αζιδο-παράγωγα. [14]

## 2. Σκοπός της εργασίας

Σκοπό αυτής της διπλωματικής εργασίας αποτελεί η σύνθεση και ταυτοποίηση με φασματοσκοπικές μεθόδους, νέων ενώσεων, και η διερεύνηση των κυτταροτοξικών ιδιοτήτων τους με απώτερο στόχο την ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών παραγόντων.

Οι ενώσεις-στόχοι της συγκεκριμένης εργασίας έχουν την παρακάτω γενική δομή:

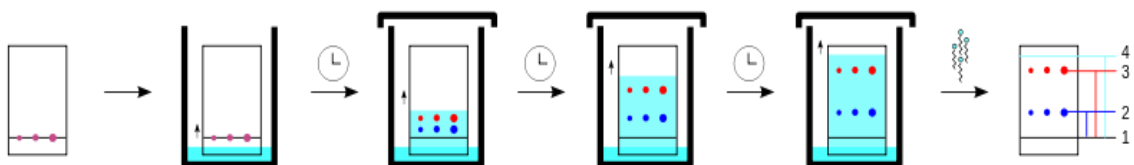


Ο γενικός τύπος περιλαμβάνει το δικυκλικό σύστημα της κιναζολίνης, υποκατεστημένο με μορφολίνη στη θέση 4 και 1,2,3-τριαζόλιο στη θέση 2. Ο σχεδιασμός των νέων ενώσεων βασίστηκε στην προαναφερθείσα 4-μορφολινοκιναζολίνη (**I**) και στα δομικά παρόμοια παράγωγα (**PI-103**), (**GDC-0941**) και (**GDC-0980**), τα οποία δρουν ως αναστολείς της κινάσης PI3K. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας διατηρήσαμε τον υποκαταστάτη μορφολίνης, ο οποίος όπως αναφέρθηκε έχει κρίσιμο ρόλο στην αναστολή της PI3K, και εισαγάγαμε ένα δακτύλιο 1,2,3-τριαζολίου στη θέση 2 προκειμένου να προβούμε σε μια προκαταρκτική διερεύνηση της επίδρασής του στη συγκεκριμένη βιολογική δράση. Δεδομένης της εμπλοκής της κινάσης PI3K σε πολλά είδη καρκίνου, οι νέες ενώσεις θα αποτιμηθούν μελλοντικά ως προς την πιθανή κυτταροτοξική δράση απέναντι σε κατάλληλες καρκινικές κυτταρικές σειρές.

### 3. Τεχνικές – Πειραματικές μέθοδοι

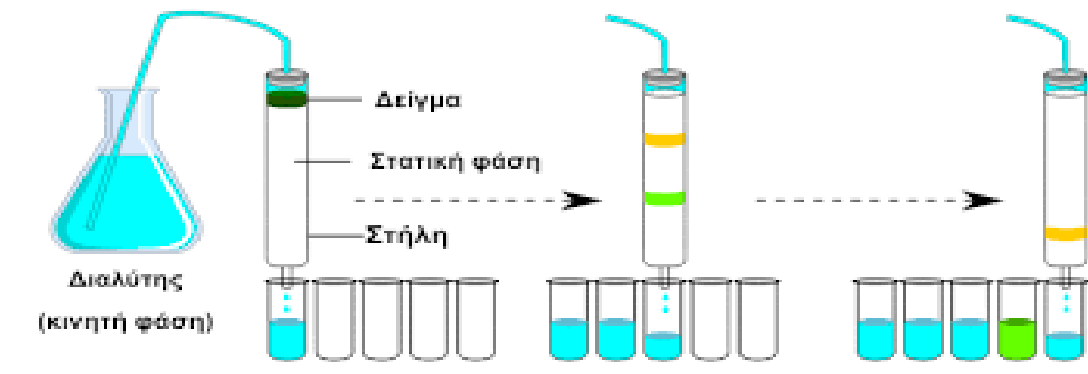
#### 3.1. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας TLC (Thin Layer Chromatography)

Ο έλεγχος των αντιδράσεων έγινε με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC). Αυτή η χρωματογραφική τεχνική διαχωρισμού βασίζεται στη διαφορετική συγγένεια των συστατικών του μείγματος με την στερεή στατική φάση, η οποία είναι συνήθως silica gel ή alumina ακινητοποιημένη σε πλακίδια αλουμινίου πάχους 0,2 mm, σε σχέση με τη συγγένειά τους για την υγρή κινητή φάση. Σταγόνες διαλύματος του δείγματος τοποθετούνται σε σημείο του πλακιδίου κοντά στο κάτω άκρο του. Αφού εξατμιστεί ο διαλύτης το πλακίδιο τοποθετείται όρθιο σε αεροστεγή θάλαμο που περιέχει κατάλληλο σύστημα διαλυτών (διαλύτης ανάπτυξης της TLC) φροντίζοντας το ύψος του υγρού να είναι κάτω από αυτό της κηλίδας του δείγματος. Στη συνέχεια, οι διαλύτες αφήνονται να ανέλθουν με τη βοήθεια τριχοειδών φαινομένων, μέχρι το μέτωπο του διαλύτη ανάπτυξης να φτάσει λίγα χιλιοστά πριν την κορυφή του πλακιδίου. Έπειτα, η πλάκα αποσύρεται και στεγνώνεται με ρεύμα αέρα. Οι διάφορες ουσίες που περιέχονται στο υπό εξέταση δείγμα μετακινούνται με διαφορετική ταχύτητα, ανάλογα με την πολικότητα τους και τη χημική συγγένεια που έχουν με την silica gel, και εμφανίζονται με τη μορφή διακριτών κηλίδων. Με βάση την απόσταση που έχει διανύσει το κάθε μόριο στη στατική φάση πραγματοποιείται και ο προσδιορισμός του συντελεστή κατακράτησης  $R_f$ . Ο συντελεστής  $R_f$  ορίζεται ως το πηλίκο της απόστασης που διανύθηκε από την ένωση προς την απόσταση που διανύθηκε από το σύστημα των διαλυτών. Η τιμή  $R_f$  ενός συγκεκριμένου μορίου έχει ορισμένη τιμή σε για συγκεκριμένο διαλύτη ανάπτυξης και είναι πολύ χρήσιμη για την ταυτοποίηση μιας ουσίας. Η παρατήρηση των κηλίδων γίνεται με εξέταση στο υπεριώδες φως (254 ή 356 nm), ή έπειτα από ψεκασμό με διάλυμα  $H_2SO_4$  30% ή άλλο κατάλληλο αντιδραστήριο για τις ενώσεις που δεν απορροφούν στο υπεριώδες.



### 3.2. Χρωματογραφία στήλης (Column chromatography)

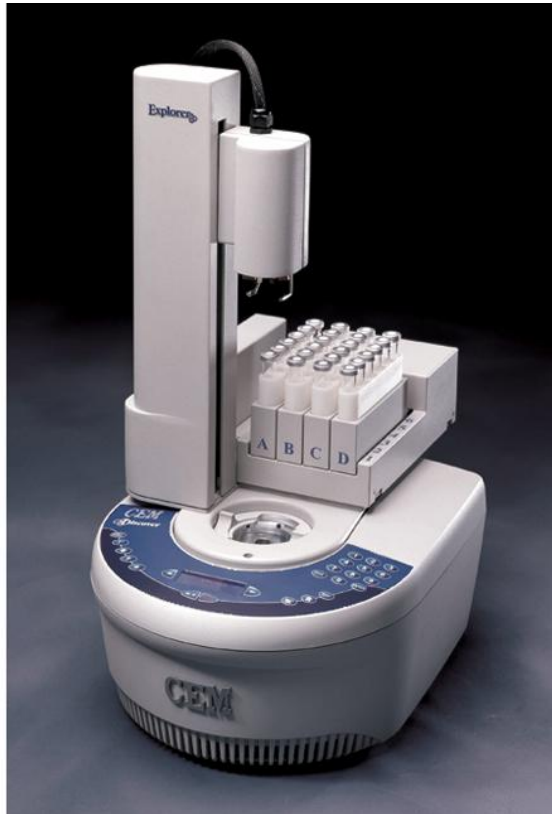
Η χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των συστατικών μεγάλης ποσότητας ενός δείγματος και εφαρμόζεται ευρέως για τον καθαρισμό οργανικών ενώσεων. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην αλληλεπίδραση των χημικών ομάδων των ενώσεων με το προσροφητικό υλικό, όπως και στην περίπτωση της TLC. Η διαδικασία ξεκινάει όταν σε μία κάθετα στηριγμένη γυάλινη στήλη τοποθετείται το κατάλληλο προσροφητικό υλικό αναμειγμένο με ποσότητα της κινητής φάσης (διαλύτης έκλουσης). Η στατική φάση συμπιέζεται με εφαρμογή πίεσης έτσι ώστε να μην υπάρχουν φυσαλίδες αέρα στο εσωτερικό της. Στη συνέχεια, εισάγουμε στο πάνω μέρος της στήλης διάλυμα του προς διαχωρισμό μείγματος, και συνεχίζουμε με έκλουση. Δηλαδή, βάζουμε το κατάλληλα επιλεγμένο σύστημα διαλυτών (κινητή φάση) στο πάνω μέρος της στήλης και όπως ρέει προς τα κάτω εκλούει το δείγμα. Τα συστατικά του μείγματος κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες, ανάλογα με την ισχύ της αλληλεπίδρασής τους με το προσροφητικό υλικό. Ο διαλύτης έκλουσης εξέρχεται από το κάτω μέρος της στήλης και χωρίζεται σε κλάσματα που τα συλλέγουμε σε σωληνάρια. Τα κλάσματα αναλύονται με TLC και όσα περιέχουν την επιθυμητή ουσία συλλέγονται σε φιάλη και απομακρύνεται ο διαλύτης για την ποσοτική παραλαβή της. Για την γρηγορότερη παραλαβή των δειγμάτων η χρωματογραφίες έγιναν με τη συνεχή παροχή αέρα υπό πίεση. Συνεπώς, μέσα στη στήλη επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός του επιθυμητού προϊόντος από διάφορα παραπροϊόντα και προσμίξεις.





### 3.3. Θέρμανση με τη χρήση μικροκυμάτων

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ευρύτατα καθώς δίνει υψηλότερες αποδόσεις σε μικρότερο χρόνο και με μικρότερη κατανάλωση διαλυτών και ενέργειας. Αρχικά εισάγουμε το σωληνάριο με το μείγμα της αντίδρασης στην υποδοχή της συσκευής θέρμανσης με μικροκύματα, και στη συνέχεια επιλέγουμε τη θερμοκρασία, την ισχύ ακτινοβολίας και το χρόνο θέρμανσης. Το φάσμα των μικροκυμάτων στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα αντιστοιχεί σε μήκη κύματος μεταξύ 1cm και 1m και συχνότητες από 30GHz έως 300MHz. Το πλεονέκτημα της χρήσης μικροκυμάτων, σε σχέση με τη συμβατική θέρμανση, είναι η ολοκλήρωση πολλών αντιδράσεων σε πολύ μικρότερο χρονικό διάστημα με περιορισμό, σε πολλές περιπτώσεις, των παραγόμενων παραπροϊόντων.



### 3.4. Προσδιορισμός σημείου τήξεως

Ως σημείο τήξεως (σ.τ.) ορίζουμε την θερμοκρασία στην οποία μια ουσία μετατρέπεται από στερεή σε υγρή. Οι καθαρές κρυσταλλικές ουσίες έχουν σημείο τήξεως επαρκώς καθορισμένο, ενώ η ύπαρξη προσμίξεων οδηγεί σε μεταβολή του σ.τ. Για το λόγο αυτό αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται κατά κόρον για τον έλεγχο της καθαρότητας πολλών οργανικών και φαρμακευτικών ουσιών. Αρχικά εισάγουμε σε ένα τριχοειδές μικρή ποσότητα στερεού δείγματος και το τοποθετούμε σε θερμαινόμενη πλάκα εντός της συσκευής. Στη συνέχεια παρατηρούμε το δείγμα, ενώ αυξάνουμε τη θερμοκρασία, και καταγράφουμε τη περιοχή θερμοκρασιών όπου πραγματοποιήθηκε η τήξη.



Συσκευή προσδιορισμού  
σημείου τήξεως

### 3.5. Φασματοσκοπία NMR

Η ταυτοποίηση της δομής των νεοσυντιθέμενων οργανικών ενώσεων έγινε μέσω φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Αυτή είναι η πλέον σημαντική τεχνική για τον χαρακτηρισμό της δομής μιας ένωσης, καθώς αποκαλύπτει την ειδική τοποθέτηση και τον τρόπο σύνδεσης των ατόμων. Η φασματοσκοπία NMR βασίζεται στο φαινόμενο του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, σύμφωνα με το οποίο οι πυρήνες εντός ενός μαγνητικού πεδίου απορροφούν και επανεκπέμπουν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Το σήμα NMR λαμβάνεται από τη διέγερση των πυρήνων μέσω ραδιοκυμάτων. Η απορρόφηση και η επανεκπομπή ενέργειας εξαρτάται από τον παρατηρούμενο πυρήνα, με αποτέλεσμα οι συχνότητες της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας να είναι χαρακτηριστικές του πυρήνα. Το σήμα NMR που λαμβάνεται βρίσκεται, αρχικά, στο πεδίο του χρόνου αλλά προκειμένου να μελετηθεί μετατρέπεται, με τη χρήση του μετασχηματισμού Fourier, στο πεδίο της συχνότητας. Το τελικό φάσμα NMR αποτελείται από μία πληθώρα κορυφών, οι οποίες συντονίζονται σε διάφορες συχνότητες. Μπορεί, επομένως, να αξιοποιηθεί για τον προσδιορισμό της ακριβής θέσης των λειτουργικών ομάδων και να δώσει πολύτιμες πληροφορίες για τον ανθρακικό σκελετό και για το μόριο ως σύνολο. Βρίσκει εφαρμογή σε κάθε πυρήνα, ο οποίος έχει περιττό μαζικό αριθμό και/ή περιττό ατομικό αριθμό, όπως είναι οι πυρήνες πρωτονίου ( $^1\text{H}$  NMR) και άνθρακα ( $^{13}\text{C}$  NMR).

Τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR ελήφθησαν με χρήση δευτεριωμένων διαλυτών όπως χλωροφόρμιο ( $\text{CDCl}_3$ ), διμεθυσουλφοξείδιο [ $(\text{CD}_3)_2\text{SO}_4$ ] και μεθανόλη ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ). Η πολλαπλότητα των σημάτων σημειώνεται ως s (single), d (doublet), t (triplet), dd (doublet doublet), dt (doublet triplet) και m (multiplet). Οι σταθερές σύζευξης J μετρήθηκαν σε Hz.

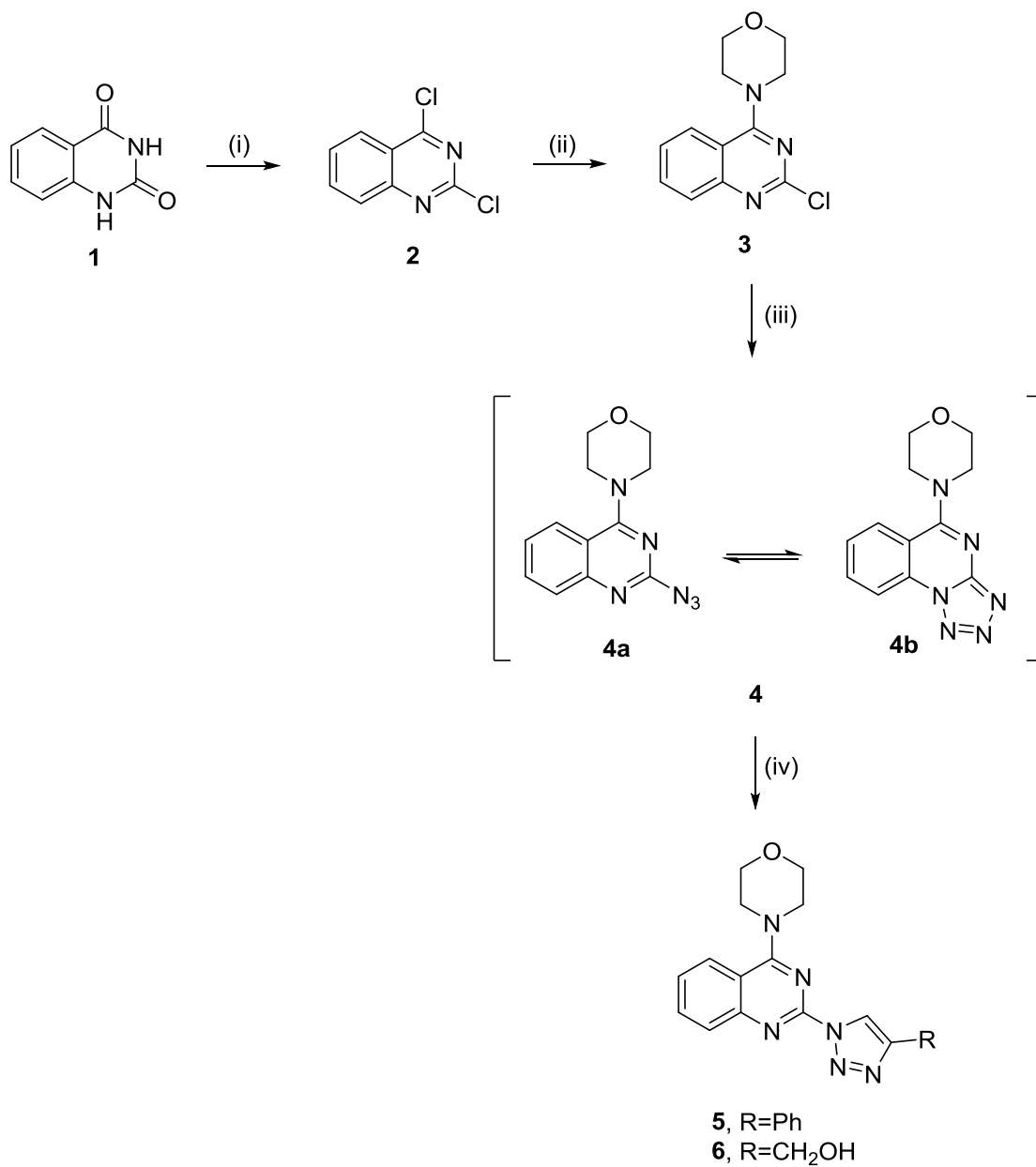
Τα φάσματα  $^{13}\text{C}$  NMR καταγράφηκαν στο ίδιο φασματόμετρο, χρησιμοποιώντας και πάλι ως δευτεριωμένους διαλύτες χλωροφόρμιο ( $\text{CDCl}_3$ ), διμεθυσουλφοξείδιο [ $(\text{CD}_3)_2\text{SO}_4$ ] και μεθανόλη ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

### 3.6. Γενικές παρατηρήσεις

Όλα τα αντιδραστήρια ήταν εμπορικά διαθέσιμα, με υψηλή καθαρότητα, και χρησιμοποιήθηκαν ως είχαν. Οι αντιδράσεις που ήταν ευαίσθητες σε οξυγόνο, έγιναν υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου. Για τις αντιδράσεις που απαιτούσαν άνυδρες συνθήκες, τα γυαλικά ξηραίνονταν σε κλίβανο στους  $200^\circ\text{C}$  για κάποιες ώρες. Τέλος, ως μέσο συμβατικής θέρμανσης χρησιμοποιήθηκε το ελαιόλουτρο.

## 4. Πειραματικό μέρος

### 4.1. Γενική πορεία σύνθεσης



(i) POCl<sub>3</sub>, i-Pr<sub>2</sub>NEt, 105-110 °C, (ii) morpholine, i-Pr<sub>2</sub>NEt, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C or rt, (iii) NaN<sub>3</sub>, DMF, 90 °C, (iv) αλκίνιο, CuSO<sub>4</sub>, NaAsc, THF-AcOH, 60 °C.

#### 4.2. Μεθοδολογία της σύνθεσης

Ως πρώτη ύλη της πορείας σύνθεσης των επιθυμητών παραγώγων χρησιμοποιήθηκε η κιναζολιν-2,4(1H,3H)-διόνη (**1**), η οποία μετατράπηκε στην 2,4-διχλωροκιναζολίνη (**2**) με την επίδραση μεγάλης περισσειας οξυχλωριδίου φωσφόρου ( $\text{POCl}_3$ ) παρουσία N,N-διισοπροπυλαιθυλαμίνης ( $i\text{-Pr}_2\text{NEt}$ ). Το οξυχλωρίδιο φωσφόρου έχει ρόλο χλωριωτικού μέσου αλλά και διαλύτη, ενώ η N,N-διισοπροπυλαιθυλαμίνη δεσμεύει το παραγόμενο υδροχλώριο.

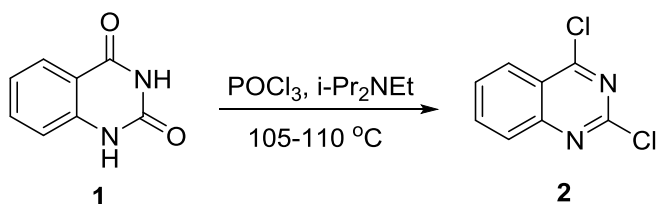
Η επόμενη αντίδραση είναι η προσθήκη της μορφολίνης στη θέση 4 της 2,4-διχλωροκιναζολίνης (**2**), χρησιμοποιώντας άνυδρο διχλωρομεθάνιο ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) παρουσία τριαιθυλαμίνης ( $\text{Et}_3\text{N}$ ), από την οποία προκύπτει η 4-(2-χλωροκιναζολιν-4-υλο)μορφολίνη (**3**).

Στη συνέχεια λαμβάνει χώρα, η αντικατάσταση του χλωρίου στο προϊόν (**3**) με προσθήκη νατραζιδίου ( $\text{NaN}_3$ ) και διαλύτη άνυδρο N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) και από την αντίδραση αυτή προκύπτει το προϊόν (**4**).

Το τελικό στάδιο της συνθετικής πορείας περιλαμβάνει την προσθήκη οξικού οξέος, φαινυλακετυλενίου, ασκορβικού νατρίου και θεικού χαλκού στην ένωση (**4**). Με διαλύτη το τετραϋδροφουράνιο (THF), προκύπτει το προϊόν (**5**) (4-(2-φαινυλο-1H-1,2,3-τριαζολ-1-υλο)κιναζολιν-4-υλο)μορφολίνη. Με την παραγωγή αυτού του προϊόντος κλείνει η πρώτη συνθετική πορεία.

Για το δεύτερο συνθετικό στάδιο, παραμένουν ίδια τα βήματα μέχρι την παραγωγή της ένωσης (**4**). Στην ένωση αυτή προστίθενται διαδοχικά οξικό οξύ ( $\text{AcOH}$ ), προπαργυλική αλκοόλη, ασκορβικό νάτριο και θειικός χαλκός. Με τη χρήση και πάλι THF ως διαλύτη παράγεται η ένωση (1-(4-μορφολινοκιναζολιν-2-υλο)-1H-1,2,3-τριαζολ-4-υλο)μεθανόλης (**6**).

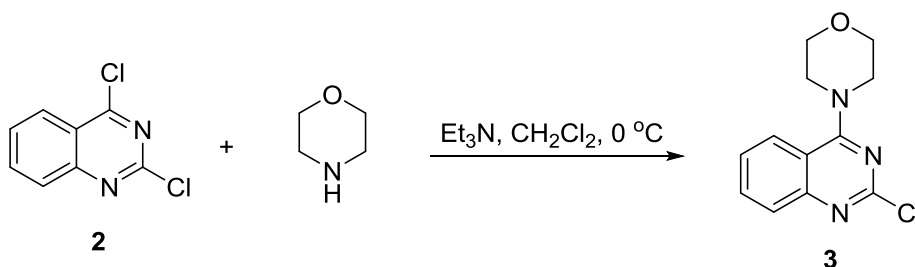
#### 4.2.1 Σύνθεση της 2,4-διχλωροκινναζολίνης (2)



Σε στεγνή σφαιρική φιάλη προστίθενται 325 mg (2.00 mmol) κινναζολιν-2,4(1H,3H)-διόνης (1) και 2.0 mL (21 mmol, 10 eq) οξυχλωριδίου φωσφόρου (POCl<sub>3</sub>). Ακολουθεί στάγδην προσθήκη N,N-δισοπροπυλαιθυλαμίνης (i-Pr<sub>2</sub>NEt, 0.35 mL, 2.0 mmol, 1 eq) υπό συνεχή ανάδευση του ετερογενούς μείγματος. Προσαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας, διαβιβάζεται αέριο άζωτο και το μείγμα θερμαίνεται στους 105-110 °C. Μετά από 2 h παραμένει ακόμη αδιάλυτη ποσότητα πρώτης ύλης. Προστίθεται επιπλέον ποσότητα N,N-δισοπροπυλαιθυλαμίνης (0.18 mL, 1.0 mmol, 0.5 eq), συνεχίζεται η θέρμανση κάτω από ατμόσφαιρα αζώτου και εντός 1 h προκύπτει καστανοκόκκινο διάλυμα. Έλεγχος της πορείας της αντίδρασης με TLC (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 95:5) δείχνει πλήρη αντίδραση της (1). Το διάλυμα θερμαίνεται για 0.5 h ακόμη, στη συνέχεια αφήνεται να ψυχθεί κάτω από τους περίπου 50 °C και απομακρύνεται η περίσσεια POCl<sub>3</sub> υπό κενό στον περιστροφικό εξατμιστήρα (rotary evaporator). Το υπόλειμμα διαλύεται σε AcOEt (25 mL) και το διάλυμα ξεπλένεται διαδοχικά με νερό (2×15 mL), κορεσμένο διάλυμα NaHCO<sub>3</sub> (2×15 mL) και κορεσμένο διάλυμα NaCl (15 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με θειικό νάτριο (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) και ακολούθως απομακρύνεται ο διαλύτης υπό κενό για να δώσει μπεζ στερεό (370 mg). Έλεγχος της καθαρότητας του προϊόντος με TLC (hexane-AcOEt 4:1) δείχνει μία μόνο κηλίδα οπότε χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Απόδοση 93.0%.

R <sub>f</sub> (hexane-AcOEt 4:1)	0.73
Σημείο τήξης	120-121 °C
Απόδοση	93.0%

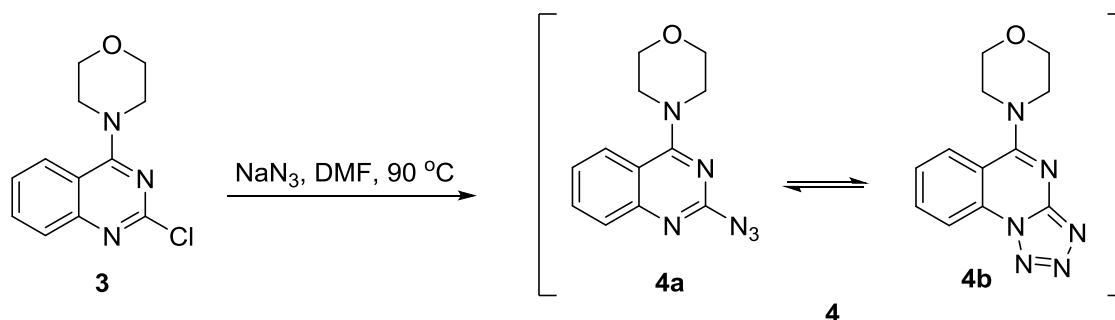
#### 4.2.2 Σύνθεση της 4-(2-χλωροκιναζολιν-4-υλο)μορφολίνης (**3**)



Σε στεγνή σφαιρική φιάλη προστίθενται 199 mg (1.00 mmol) 2,4-διχλωροκιναζολίνης (**2**) και 10.0 mL άνυδρο διχλωρομεθάνιο ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). Το διάλυμα που προκύπτει ψύχεται στους  $0\text{ }^\circ\text{C}$  σε παγόλουτρο και στη συνέχεια προστίθενται αργά 278  $\mu\text{L}$  (2.0 mmol, 2 eq) τριαιθυλαμίνης ( $\text{Et}_3\text{N}$ ). Ακολούθως προστίθενται σταγόδην 91  $\mu\text{L}$  (1.05 mmol, 1.05 eq) μορφολίνης και διαβιβάζεται αέριο άζωτο,. Το ανοικτό κίτρινο διάλυμα αναδεύεται στους  $0\text{ }^\circ\text{C}$  για 30 min, οπότε έλεγχος με TLC (hexane-AcOEt 4:1) δείχνει πλήρη αντίδραση της (**2**). Το διάλυμα αραιώνεται με  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 mL), ξεπλένεται με νερό (3×20 mL) και κορεσμένο διάλυμα NaCl (20 mL), ξηραίνεται με  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  και συμπυκνώνεται υπό κενό για να δώσει σκουροκίτρινο στερεό. Καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (flash chromatography), με διαλύτη έκλουσης hexane-AcOEt 7:3, απέφερε το καθαρό προϊόν (**3**) ως λευκό στερεό (217 mg, 86.9%).

$R_f$ (hexane-AcOEt 7:3)	0.20
Σημείο τήξης	113-114 $^\circ\text{C}$
Απόδοση	86.9%

4.2.3 Σύνθεση της 4-(τετραζολο[1,5-α]κινναζολιν-5-υλο)μορφολίνης [(4-(2-αζιδοκινναζολιν-4-υλο)μορφολίνης)] (4)

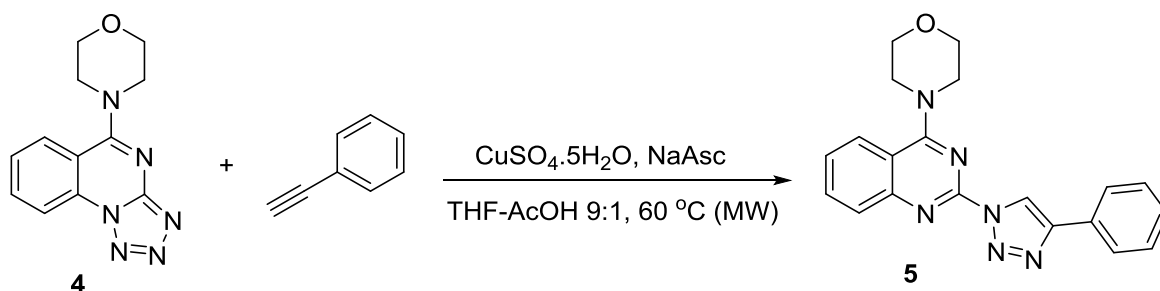


Σε στεγνή σφαιρική φιάλη προστίθενται 225 mg (0.90 mmol) 4-(2-χλωροκινναζολιν-4-υλο)μορφολίνης (**3**), 176 mg (2.7 mmol, 3 eq) νατραζίδιο ( $\text{NaN}_3$ ) και 1.5 mL άνυδρο N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF). Διαβιβάζεται αέριο άζωτο, η φιάλη πωματίζεται στεγανά και το μείγμα θερμαίνεται στους 90 °C σε ελαιόλουτρο. Έλεγχος της πορείας της αντίδρασης με TLC (hexane-EtOAc 1:1) δείχνει πλήρη αντίδραση της (**3**) μετά από 22 h και παρατηρείται σχηματισμός λευκού στερεού. Το μείγμα αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθενται 6 mL νερό, θερμοκρασίας 0 °C, και στη συνέχεια αφήνεται σε θερμοκρασία 0-4 °C για 3 h. Το μείγμα διηθείται υπό κενό και το λευκό στερεό ξεπλένεται με νερό θερμοκρασίας 0 °C (2 φορές) και ξηραίνεται σε ρεύμα αέρα υπό προστασία από το φως. Λαμβάνονται 220 mg λευκού στερεού (απόδοση 95%). Το προϊόν δείχνει μόνο μία κηλίδα στο TLC (hexane-EtOAc 1:3) και χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

R <sub>f</sub> (hexane-AcOEt 1:3)	0.28
Σημείο τήξης	123-125 °C
Απόδοση	95%



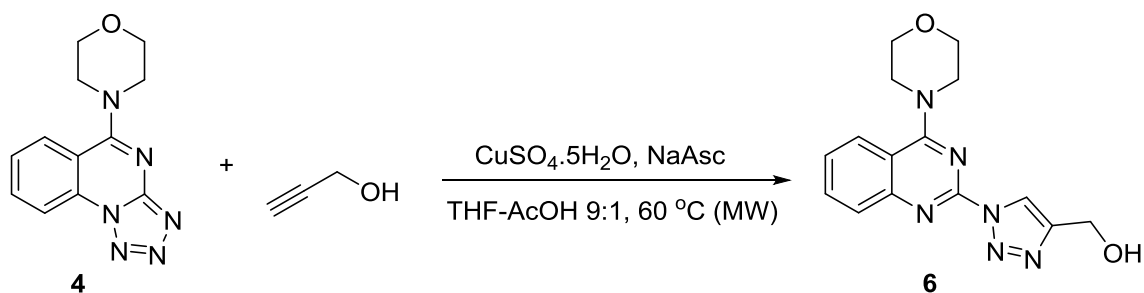
#### 4.2.4 Σύνθεση της (4-(2-φαινυλο-1H-1,2,3-τριαζολ-1-υλο)κιναζολιν-4-υλο)μορφολίνης (**5**)



Σε σωλήνα συσκευής μικροκυμάτων (MW) προστίθενται διαδοχικά η (**4**) (26 mg, 0.10 mmol), ο διαλύτης τετραϋδροφουράνιο (THF, 0.9 mL), το οξικό οξύ (AcOH, 0.1 mL), το φαινυλακετυλένιο (22  $\mu$ L, 0.20 mmol, 2 eq), το ασκορβικό νάτριο (NaAsc, 8 mg, 0.04 mmol, 0.4 eq), και ο ένυδρος θειικός χαλκός ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 5 mg, 0.02 mmol, 0.2 eq). Διαβιβάζεται αέριο άζωτο, ο σωλήνας πωματίζεται στεγανά και το μείγμα αναδεύεται σε rt για 5 min και στη συνέχεια θερμαίνεται στους 60 °C στη συσκευή MW. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχεται με TLC (hexane-AcOEt 1:3) ανά 30 ή 60 min. Στη 1.5 h προστίθεται επιπλέον ασκορβικό νάτριο (4 mg, 0.04 mmol, 0.2 eq), και στις 3 h επιπλέον φαινυλακετυλένιο (11  $\mu$ L, 0.10 mmol, 1 eq) και η θέρμανση συνεχίζεται σε ελαιόλουτρο, στους 60 °C, για 16 h. Προστίθεται επιπλέον ποσότητα  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (3 mg, 0.01 mmol, 0.1 eq) και συνεχίζεται η θέρμανση στους 60 °C στη συσκευή MW, για 30 min. Έλεγχος με TLC δείχνει ότι παραμένει πολύ μικρή ποσότητα της (**4**). Το μείγμα αραιώνεται με AcOEt (15 mL), ξεπλένεται με κορεσμένο διάλυμα NaCl (3 $\times$ 5 mL), και στη συνέχεια ξηραίνεται με  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα υποβάλλεται σε χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (hexane-AcOEt 60:40) αποφέροντας το προϊόν (**5**) σε μορφή λευκού στερεού (26 mg, 72%).

$R_f$ (hexane-AcOEt 3:2)	0.20
Σημείο τήξης	132-133 °C
Απόδοση	72%

4.2.5 Σύνθεση της (1-(4-μορφολινοκιναζολιν-2-υλο)-1H-1,2,3-τριαζολ-4-υλο)μεθανόλης (**6**)



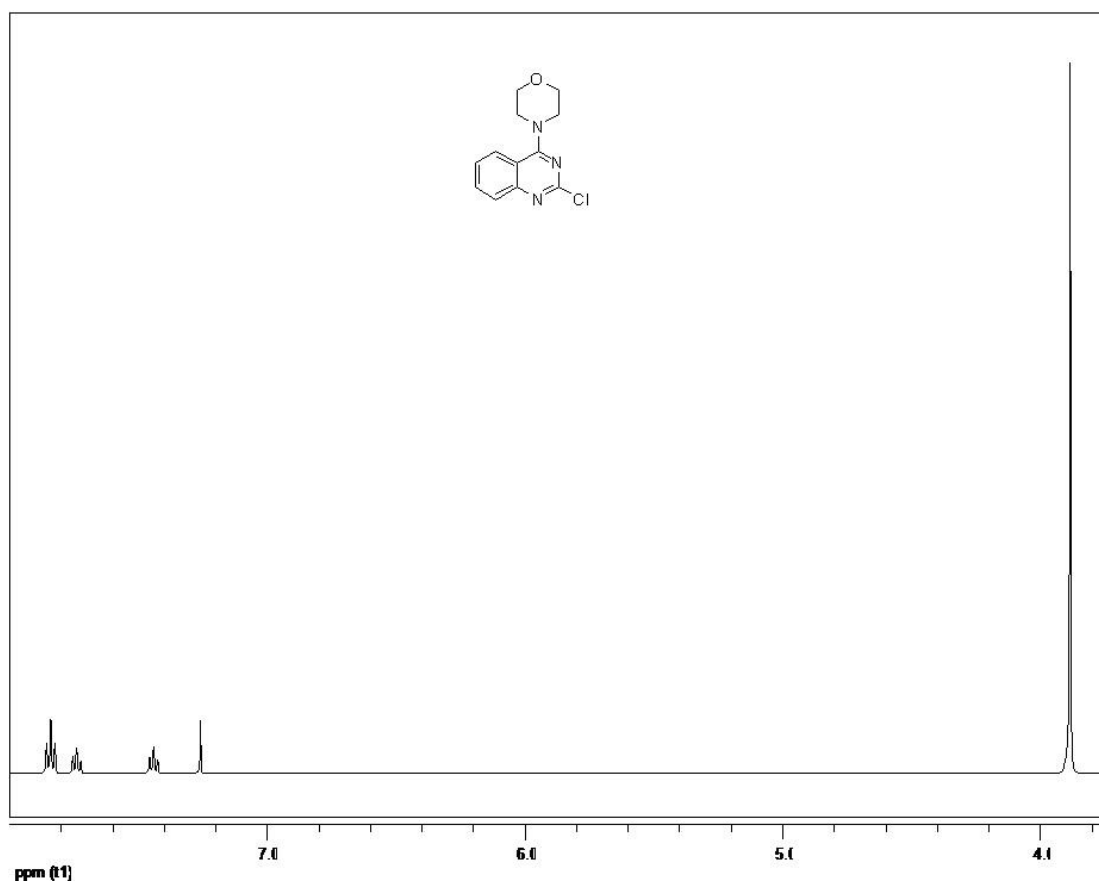
Σε σωλήνα συσκευής μικροκυμάτων (MW) προστίθενται διαδοχικά η (**4**) (13 mg, 51 μmol), ο διαλύτης τετραϋδροφουράνιο (THF, 0.45 mL), το οξικό οξύ (AcOH, 0.05 mL), η προπαργυλική αλκοόλη (6 μL, 0.10 mmol, 2 eq), το ασκορβικό νάτριο (NaAsc, 5 mg, 25 μmol, 0.5 eq), και ο ένυδρος θειικός χαλκός (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 3 mg, 12 μmol, 0.25 eq). Διαβιβάζεται αέριο άζωτο, ο σωλήνας πωματίζεται στεγανά και το μείγμα αναδεύεται σε rt για 5 min και στη συνέχεια θερμαίνεται στους 60 °C στη συσκευή MW. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχεται με TLC (hexane-AcOEt 1:3) ανά 30 min. Μετά από 1 h προστίθεται επιπλέον ποσότητα προπαργυλικής αλκοόλης (9 μL, 0.15 mmol, 3 eq). Μετά από θέρμανση στους 60 °C, στη συσκευή MW, για 4 h επιπλέον, ο έλεγχος με TLC δείχνει ότι παραμένει πολύ μικρή ποσότητα της (**4**). Το μείγμα αραιώνεται με AcOEt (10 mL) και ξεπλένεται με κορεσμένο διάλυμα NaCl (5 mL). Η υδατική φάση εκχυλίζεται με CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2×10 mL) και το μείγμα το οργανικών φάσεων AcOEt-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ξηραίνεται με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το κίτρινο στερεό υπόλειμμα υποβάλλεται σε χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (4 έως 6% MeOH σε CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) αποφέροντας το προϊόν (**6**) σε μορφή λευκού στερεού (10 mg, 63%).

R <sub>f</sub> (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH 95:5)	0.20
Σημείο τήξης	127-129 °C
Απόδοση	63%

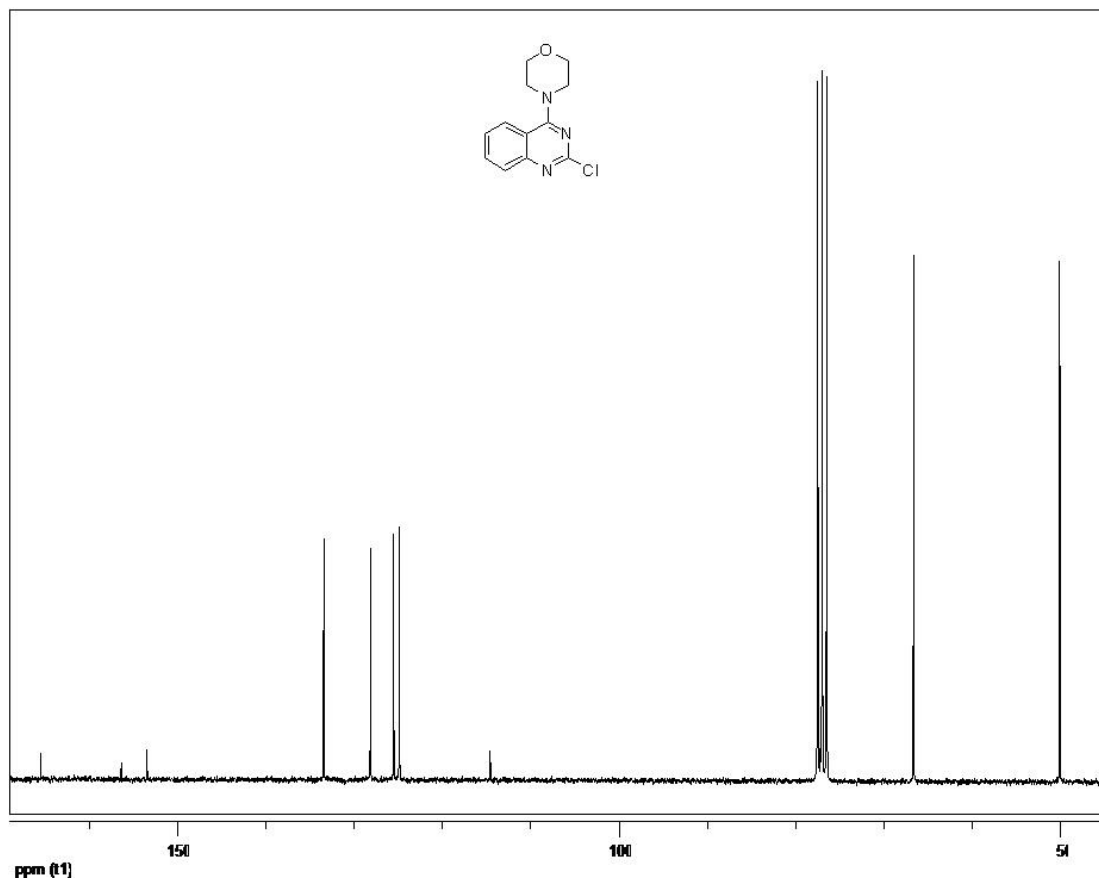
## 5. Ταυτοποίηση ενώσεων – Φασματοσκοπική μελέτη

Οι δομές όλων των ενώσεων ταυτοποιήθηκαν μέσω φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) πρωτονίου ( $^1\text{H}$ ) και άνθρακα-13 ( $^{13}\text{C}$ ). Παρακάτω παραθέτονται τα φάσματα.

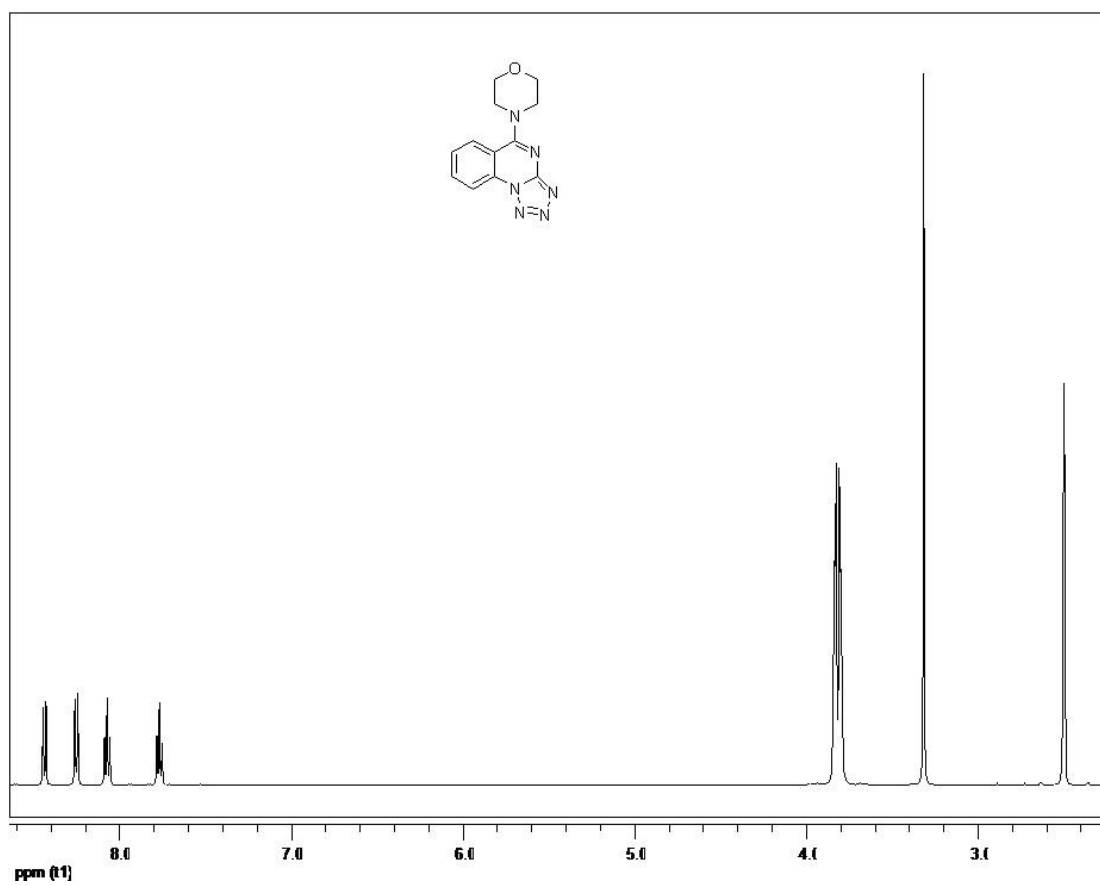
### 5.1 Φάσμα $^1\text{H}$ -NMR της 4-(2-χλωροκινναζολιν-4-υλο)μορφολίνης (**3**)



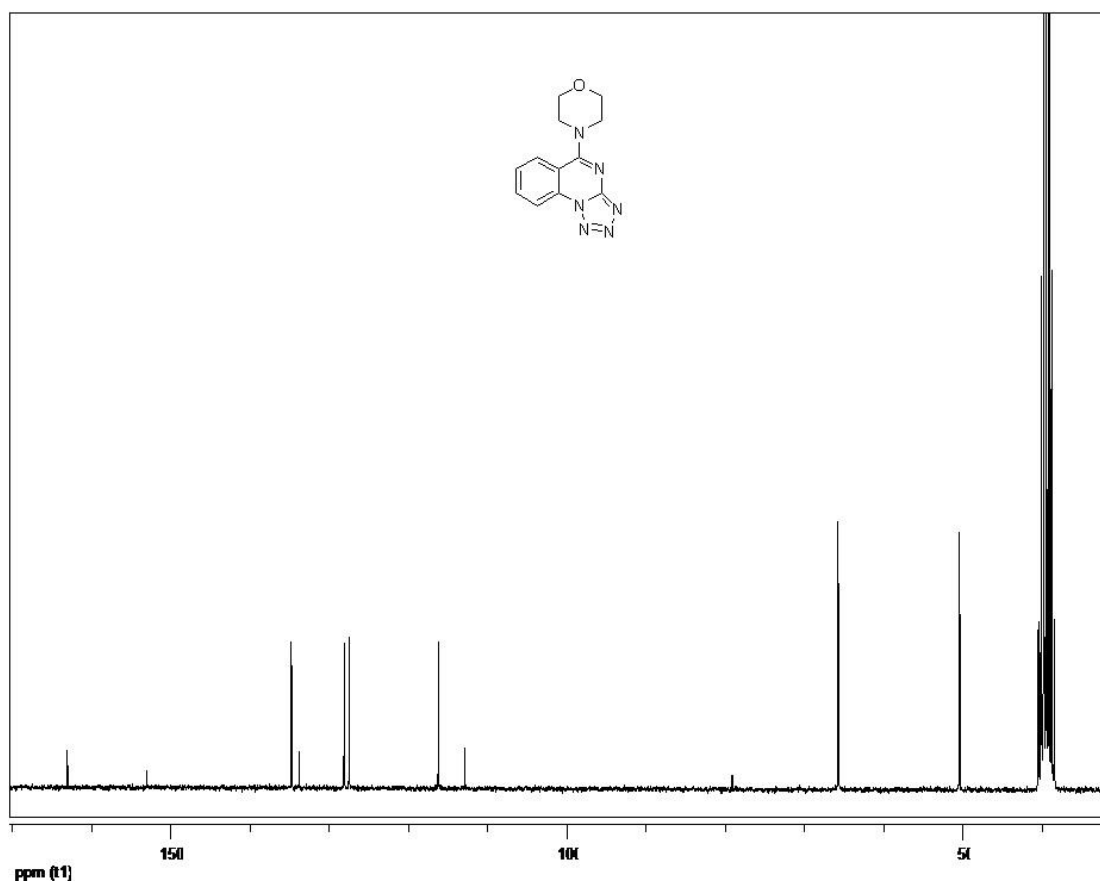
5.2 Φάσμα  $^{13}\text{C}$ -NMR της 4-(2-χλωροκινναζολιν-4-υλο)μορφολίνης (**3**)



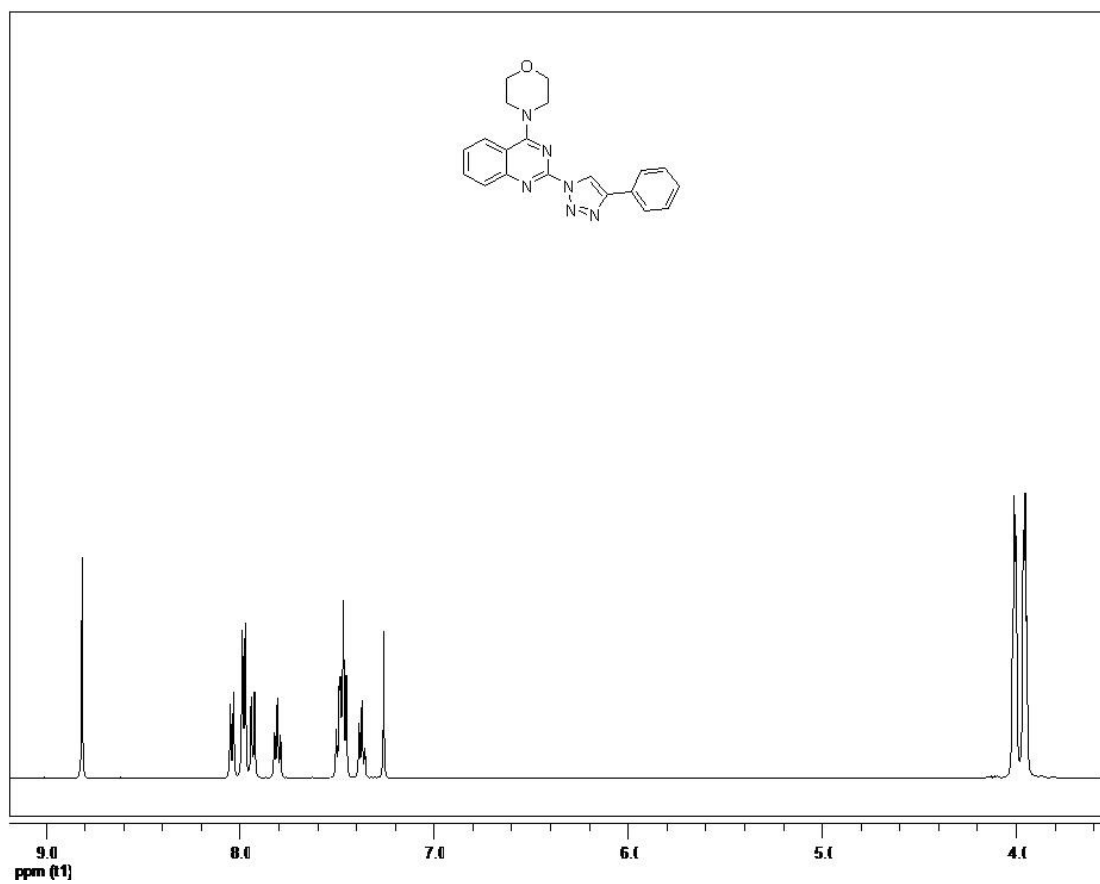
5.3 Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της 4-(τετραζολο[1,5-a]κινναζολιν-5-υλο)μορφολίνης [(4-(2-αζιδοκινναζολιν-4-υλο)μορφολίνης)] (4)



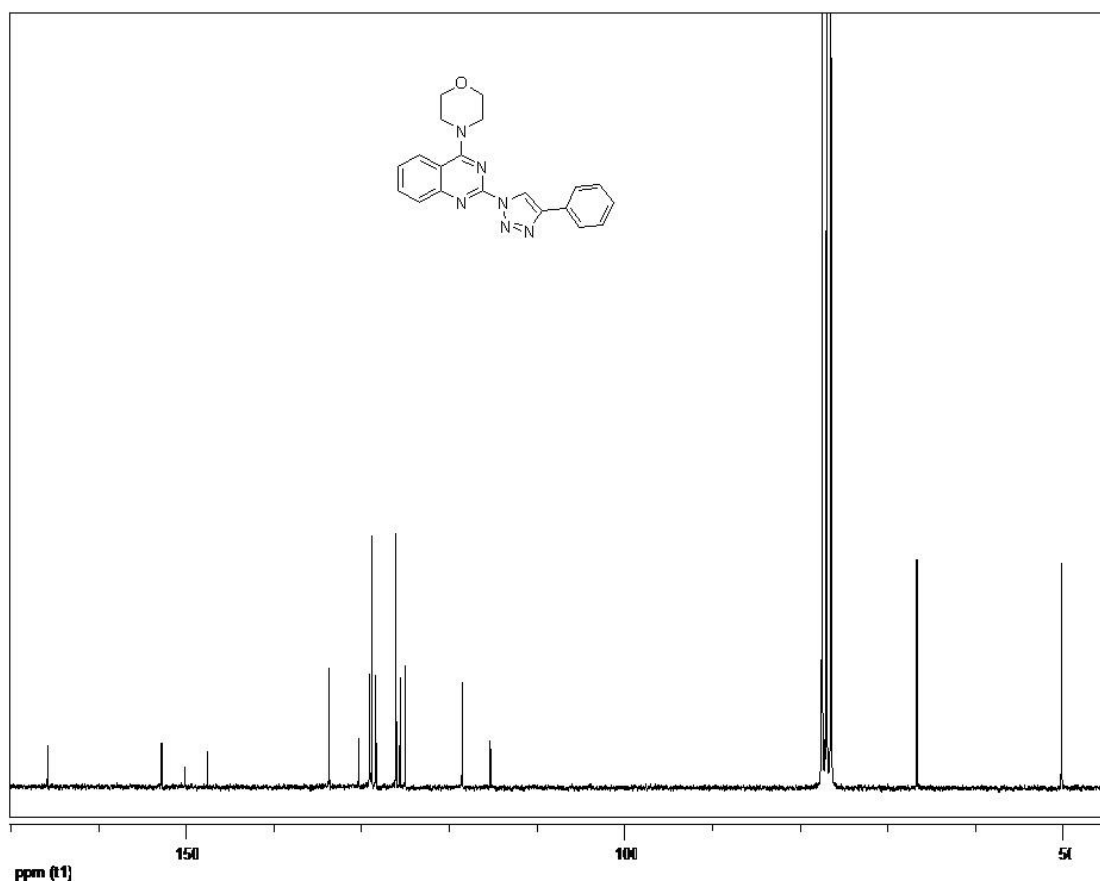
5.4 Φάσμα  $^{13}\text{C}$ -NMR της 4-(τετραζολο[1,5-a]κιναζολιν-5-υλο)μορφολίνης [(4-(2-αζιδοκιναζολιν-4-υλο)μορφολίνης)] (4)



5.5 Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της (4-(2-φαιnyλο-1H-1,2,3-τριαζολ-1-υλο)κιναζολιν-4-υλο)μορφολίνης (**5**)

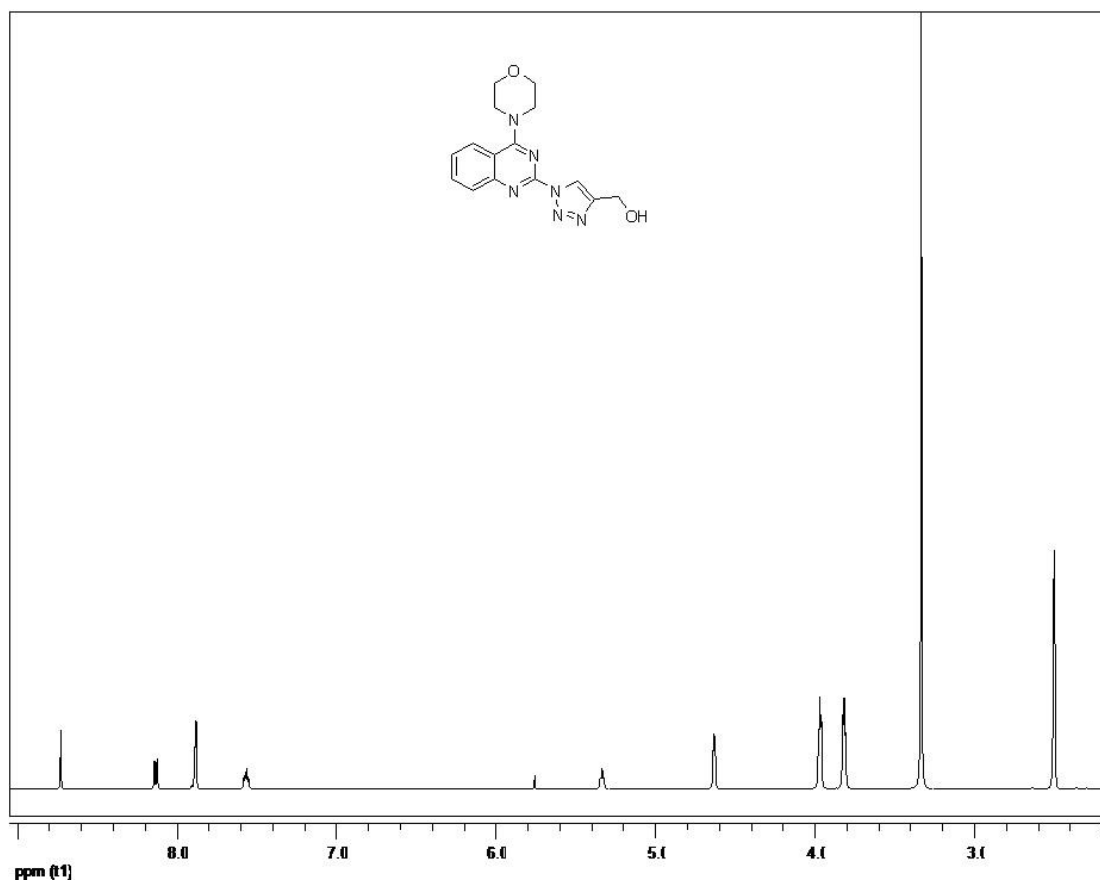


5.6 Φάσμα  $^{13}\text{C}$ -NMR της (4-(2-φαινυλο-1H-1,2,3-τριαζολ-1-υλο)κιναζολιν-4-υλο)μορφολίνης (**5**)

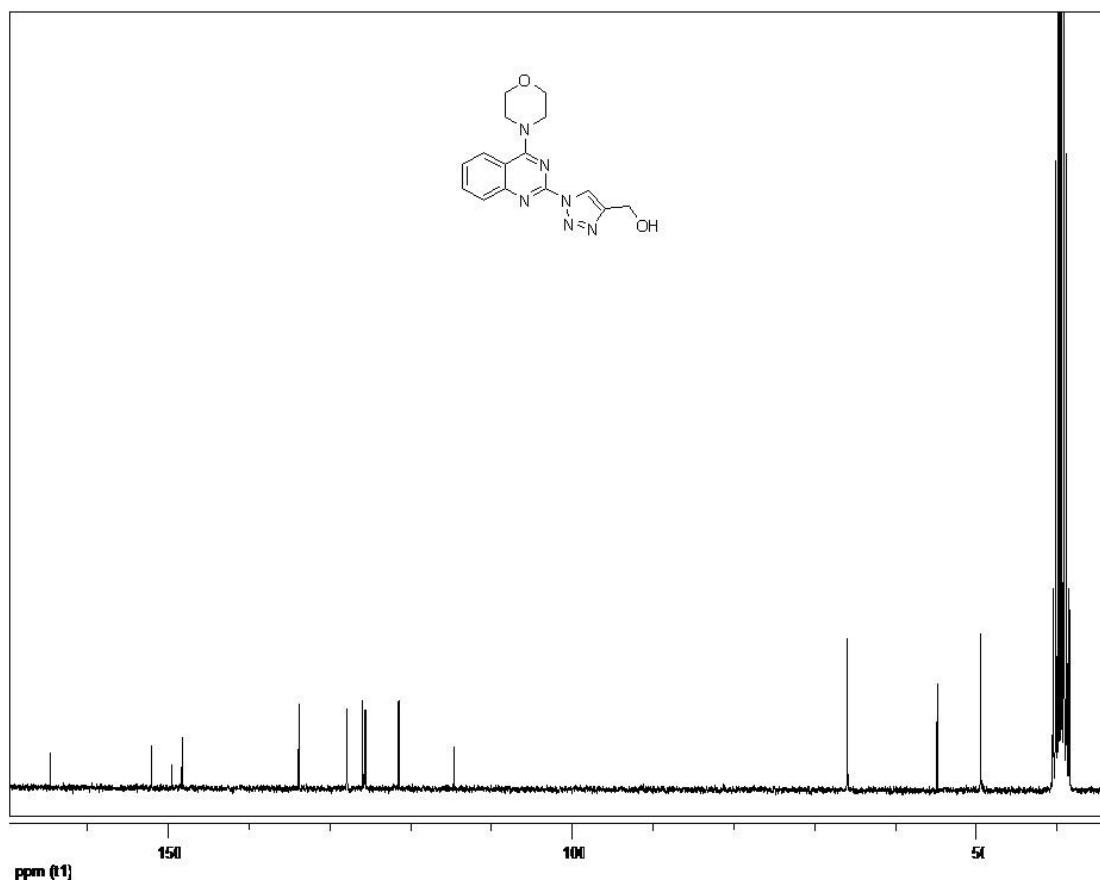




5.7 Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της (1-(4-μορφολινοκιναζολιν-2-υλο)-1H-1,2,3-τριαζολ-4-υλο)μεθανόλης (6)



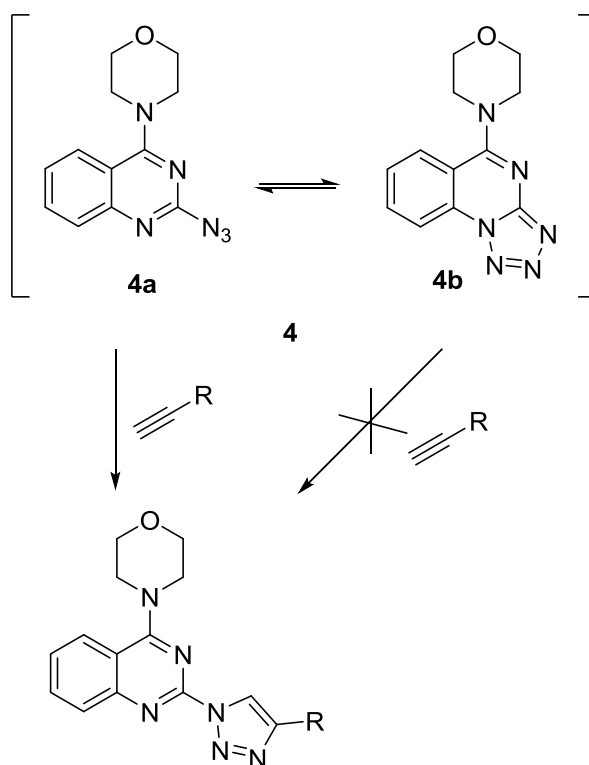
5.8 Φάσμα  $^{13}\text{C}$ -NMR της (1-(4-μορφολινοκιναζολιν-2-υλο)-1H-1,2,3-τριαζολ-4-υλο)μεθανόλης (6)



## 6. Συζήτηση αποτελεσμάτων

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας συντέθηκαν δύο νέα παράγωγα κιναζολίνης υποκατεστημένα με μορφόλινο ομάδα στη θέση 4 και τριαζολικό δακτύλιο στη θέση 2. Ο σχεδιασμός των νέων ενώσεων βασίστηκε σε γνωστά από τη βιβλιογραφία παράγωγα, τα οποία εμφανίζουν ανασταλτική δράση έναντι της κινάσης PI3K και αποτελούν τη βάση για την ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών παραγόντων.

Η σύνθεση αυτών των παραγώγων **5** και **6** επιτεύχθηκε μέσω μιας πορείας 5 αντιδράσεων με πρώτη ύλη την εμπορικά διαθέσιμη κιναζολιν-2,4(1H,3H)-διόνη. Το τελικό βήμα της συνθετικής πορείας ήταν μια καταλυόμενη από Cu(I) αντίδραση κυκλοπροσθήκης αζιδίου-αλκινίου, η οποία πραγματοποιήθηκε σε μείγμα διαλυτών τετραϋδροφουρανίου – οξικού οξέος με θέρμανση σε συσκευή μικροκυμάτων. Ο καταλύτης Cu(I) σχηματίστηκε *in situ* μέσω της αναγωγής άλατος δισθενούς χαλκού από το ασκορβικό οξύ. Αν και γενικά η συγκεκριμένη αντίδραση κυκλοπροσθήκης είναι από τις πλέον ευέλικτες και αξιόπιστες, στη συγκεκριμένη περίπτωση δυσχεραίνεται λόγω της ισομέρειας αζιδοαζωμεθίνης-τετραζολίου (**4a** και **4b**, αντίστοιχα, στο σχήμα) που εμφανίζει η πρώτη ύλη (**4**). Καθώς μόνο η μορφή της 2-αζιδοκιναζολίνης μπορεί να αντιδράσει απαιτείται η εύρεση κατάλληλων συνθηκών στις οποίες η ισοροπία μεταξύ των δύο ισομερών να μετατοπίζεται προς τη συγκεκριμένη μορφή. Η χρήση του οξικού οξέος ως συνδιαλύτη ενδεχόμενα να συντέλεσε σε αυτό το σκοπό επιτρέποντας την παραλαβή των τελικών προϊόντων **5** και **6**.



Η ταυτοποίηση της δομής των δύο τελικών παραγώγων και η επιβεβαίωση της καθαρότητάς τους έγιναν μέσω φασματοσκοπικής ανάλυσης πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

Επόμενο βήμα μελλοντικά είναι η βιολογική αποτίμηση των παραγώγων αυτών που θα περιλαμβάνει διερεύνηση της πιθανής κυτταροτοξικής δράσης τους έναντι κατάλληλων καρκινικών κυτταρικών σειρών. Σε περίπτωση που διαπιστωθεί αξιοσημείωτη κυτταροτοξική δράση, θα προχωρήσουμε στη σύνθεση επιπλέον παραγώγων, με άλλους υποκαταστάτες στο 1,2,3-τριαζόλιο ή στον δακτύλιο της κιναζολίνης, με σκοπό την αύξηση της δραστηριότητας.

## 7. Βιβλιογραφία

- 1) D. Kikelj. 'Quinazolines : science of synthesis' Category 2, Heterocycles and Related Ring Systems. 16.13 (2013) 573.
- 2) 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. 76 (2014) 193-244. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.02.005>.
- 3) I. Khan, A. Ibrar, N. Abbas, A. Saeed. 'Synthetic approaches, functionalization and therapeutic potential of quinazoline and quinazolinone skeletons: The advances continue'. European Journal of Medicinal Chemistry. 90 (2015) 124-169. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.10.084>.
- 4) I. Khan, S. Zaib, S. Batool, N. Abbas, Z. Ashraf, J. Iqbal, A. Saeed. 'Quinazolines and quinazolinones as ubiquitous structural fragments in medicinal chemistry: An update on the development of synthetic methods and pharmacological diversification'. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 24 (2016) 2361-2381. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2016.03.031>
- 5) M. Hayakawa, H. Kaizawa, H. Moritomo, T. Koizumi, T. Ohishi, M. Okada, M. Ohta, S. Tsukamoto, P. Parker, P. Workman, M. Waterfield. Synthesis and Biological Evaluation of 4- Morpholino-2-phenylquinazolines and Related Derivatives as Novel PI3 Kinase p110alpha Inhibitors. Bioorg. Med. Chem. 14 (2006) 6847-6858.
- 6) X. Wang, M. Xin, J. Xu, B. Kang, Y. Li, S. Lu, S. Zhang. 'Synthesis and antitumor activities evaluation of m-(4- morpholinoquinazolin-2-yl)benzamides in vitro and in vivo'. European Journal of Medicinal Chemistry. 96 (2015) 382-395.
- 7) A. Garces, M. Stocks. 'Class 1 PI3K Clinical Candidates and Recent Inhibitor Design Strategies: A Medicinal Chemistry Perspective'. Journal of medicinal chemistry. 68 (2019) 4815-4850.
- 8) M. Andrs, J. Korabecny, D. Jun, Z. Hodny, J. Bartek, K. Kuca. 'Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) and Phosphatidylinositol 3-Kinase-Related Kinase (PIKK) Inhibitors: Importance of the Morpholine Ring'. Journal of medicinal chemistry. 58 (2014) 41-71.
- 9) T. Yap, L. Bjerke, P. Clarke, P. Workman. 'Drugging PI3K in cancer: refining targets and therapeutic strategies'. Science Direct. 23 (2015) 98-107. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2015.05.016>
- 10) D. Dheer, V. Singh, R. Shankar. 'Medicinal attributes of 1,2,3-triazoles: Current developments'. Bioorganic Chemistry. 71 (2017) 30-54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.01.010>

- 11) E. Bonandi, M. Christodoulou, G. Fumagalli, D. Perdicchia, G. Rastelli, D. Passarella. 'The 1,2,3-triazole ring as a bioisostere in medicinal chemistry'. *Drug discovery today*. 22 (2017) 1572-1581. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.05.014>.
- 12) M. Meldal, C. Tomøe. 'Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition'. *Chemical Reviews*. 108 (2008) 2952–3015.
- 13) L. Liang, D. Astruc. 'The copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) "click" reaction and its applications. An overview' *Coordination Chemistry Reviews*. 255 (2011) 2933-2945. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2011.06.028>.
- 14) V. Lopyrev, L. Larina, T. Vakul. 'The Azidoazomethine–Tetrazole Tautomerism'. *Russian Chemical Review*. 44 (1975) 481.
- 15) A. Gauld. 'Andrew Lang as Psychical Researcher'. *Journal of the Society for Psychical Research*. 52 (1983) 161-177.
- 16) A. Folkes, K. Ahmadi, W. Alderton, S. Alix, S. Baker, G. Box, I. Chuckowree, P. Clarke, P. Depledge, S. Eccles, L. Friedman, A. Hayes, T. Hancox, A. Kugendradas, L. Lensun, P. Moore, A. Olivero, J. Pang, S. Patel, G. Pergl-Wilson, F. Raynaud, A. Robson, N. Saghir, L. Salphati, S. Sohal, M. Ultsch, M. Valenti, H. Wallweber, C. Nan, C. Wiesmann, P. Workman, A. Zhyvoloup, M. Zvelebil, S. Shuttleworth. The identification of 2-(1H-indazol-4-yl)-6-(4-methanesulfonyl-piperazin-1-ylmethyl)-4-morpholin-4-yl-thieno[3,2-d]pyrimidine (GDC-0941) as a potent, selective, orally bioavailable inhibitor of class I PI3 kinase for the treatment of cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*. 51 (2008) 5522-5532.
- 17) M. Hayakawa, H. Kaizawa, H. Moritomo, T. Koizumi, T. Ohishi, M. Yamano, M. Okada, M. Ohta, S. Tsukamoto, F. Raynaud, P. Workman, M. Waterfield, P. Parker. Synthesis and Biological Evaluation of pyrido[3',2':4,5]furo[3,2-d]pyrimidine Derivatives as Novel PI3 Kinase p110alpha Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 17 (2007) 2438–2442.