



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»

ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΟΡΓΑΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Σύνθεση αλκυλιωμένων παραγώγων του 3-αμινοφθαλυδραζιδίου ως
ενώσεων με πιθανές βιολογικές εφαρμογές**

Ζησιμοπούλου Ανδρονίκη Δανάη

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2018



Σημ.: 1^ο Εσώφυλλο

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ» ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

«ΟΡΓΑΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Σύνθεση αλκυλιωμένων παραγώγων του 3-αμινοφθαλυδραζιδίου ως
ενώσεων με πιθανές βιολογικές εφαρμογές**

Ζησιμοπούλου Ανδρονίκη Δανάη

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2018

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Σύνθεση αλκυλιωμένων παραγώγων του 3-αμινοφθαλυδραζιδίου ως
ενώσεων με πιθανές βιολογικές εφαρμογές**

Ζησιμοπούλου Ανδρονίκη Δανάη

ΑΜ.: 31502

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Γεώργιος Χ. Βουγιουκαλάκης, Επίκουρος Καθηγητής

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γεώργιος Χ. Βουγιουκαλάκης, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

Αθανάσιος Γκιμήσης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

Δημήτριος Γεωργιάδης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη παρούσα ερευνητική εργασία μελετήθηκαν οι συνθήκες αλκυλίωσης αμινοφθαλυδραζιδίων. Διερευνήθηκε ο ρόλος παραγόντων όπως η χρήση βάσης, το αλκυλιωτικό μέσο, ο διαλύτης και η θερμοκρασία στην έκβαση της αντίδρασης. Οι βέλτιστες συνθήκες που βρέθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή των αμινοφθαλυδραζιδίων με αλυσίδες (ποικίλου μήκους) που φέρουν στο άκρο τους φωσφονιακά κατιόντα (τριφαινυλο, τρικυκλοξέυλο και τριτόλυλο). Τα ενδιάμεσα και τελικά προϊόντα ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (^1H , ^{13}C και ^{31}P NMR) και φασματομετρία μάζας (ESI-MS). Τα παράγωγα αυτά αναμένεται να είναι χημειοφωταυγείς ενώσεις και η ιδιότητά τους αυτή, σε συνδυασμό με τα δομικά χαρακτηριστικά τους, αναμένεται να τους επιτρέπει να είναι χρήσιμα σε βιολογικές εφαρμογές.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Οργανική Σύνθεση

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: φθαλυδραζίδια, φωσφονιακά κατιόντα, χημειοφωταύγεια.

ABSTRACT

The alkylation conditions of aminophthalhydrazides are investigated. The impact of the use of base, alkylating agent, solvent and temperature on the reaction outcome are being evaluated. The optimal alkylation conditions found are used in the derivatization of aminophthalhydrazides with chains (of various lengths) bearing phosphonium cations (triphenyl, tricyclohexyl and tritoly). All intermediate and final products are being characterized using NMR (^1H , ^{13}C and ^{31}P NMR) and MS spectroscopies. These derivatives are expected to be chemiluminescent compounds. This property, in combination with their structural characteristics, is expected to provoke their utilization in biological applications.

SUBJECT AREA: Organic Synthesis

KEYWORDS: phthalhydrazides, phosphonium cations, chemiluminescence.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά τη περίοδο Νοέμβριος 2015-Ιούνιος 2018 υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Γεώργιου Χ. Βουγιουκαλάκη.

Στην οικογένεια μου και στον θείο Γιώργο..

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή Γεώργιο Χ. Βουγιουκαλάκη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, για τη συνεχή βοήθεια και καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο, και κυρίως για την άψογη συνεργασία που είχαμε. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα δύο μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Αθανάσιο Γκιμήση και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Δημήτριο Γεωργιάδη για τις υποδείξεις και παρατηρήσεις τους με σκοπό την ολοκλήρωση και βελτιστοποίηση της παρούσας εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της Ερευνητικής Ομάδας του Επικ. Καθ. Γ. Βουγιουκαλάκη. Ειδικά, ένα μεγάλο ευχαριστώ αξίζει στον μεταδιδάκτορα ερευνητή Δρ. Γιώργο Ρώτα, τον υποψήφιο διδάκτορα Θοδωρή Μικρούλη και τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες Έρα Δασκαλάκη και Έλενα Κοτρώνη για τη βοήθεια και την στήριξή τους. Τέλος, ένα επίσης μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα Άννα Παντελιά, για τις συμβουλές της και τη βοήθειά της εντός και εκτός εργαστηρίου, αλλά κι ένα τεράστιο ευχαριστώ στους φίλους μου και στην οικογένεια μου, Βαγγέλη, Άννη, Θάνο, για τη βοήθεια, την υπομονή, τη συμπαράσταση και τη στήριξή τους, όχι μόνο αυτά τα δύο χρόνια, αλλά και γενικότερα.

Η παρούσα εργασία έλαβε χρηματοδότηση από το πρόγραμμα έρευνας και καινοτομίας Horizon 2020 της Ευρωπαϊκής Ένωσης με αριθμό συμβολαίου 712921.

This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 712921.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	i
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	iv
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	vi
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	viii
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	1
ΠΟΛΥΜΟΡΦΟ ΓΛΟΙΟΒΛΑΣΤΩΜΑ	1
1.1 Εισαγωγή	1
1.2 Συμπτώματα.....	2
1.3 Θεραπεία.....	2
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	5
ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	5
2.1 Γενικά	5
2.2 Ιστορικά.....	6
2.3 Βασικές Αρχές της Φωτοδυναμικής Θεραπείας.....	7
2.3 Φωτοευαισθητοποιητές	9
2.4 Η Φυσική Πίσω Από Το Φως	11
2.5 Το Οξυγόνο	12
2.6 5-Αμινολεβουλινικό Οξύ (5-ALA)	13
2.6.1 Γενικά	13
2.6.2 5-ALA και Πρωτοπορφυρίνη IX.....	15
2.6.3 5-ALA και Γλοίωμα	17
2.6.4 Επιλογή του ALA.....	18
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	21
ΣΤΟΧΕΥΣΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ...	21
3.1 Μιτοχόνδρια.....	21

3.2 Μιτοχονδριοτροπικοί Φορείς	22
3.3 Μιτοχονδριακή Μembrάνη	24
3.4 Τριφαινυλοφωσφονιακά Κατιόντα (TPP)	26
3.4.1. Συσσώρευση των TPP στα κύτταρα και τοξικότητα	27
3.4.2 TPP <i>in vivo</i>	27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	29
ΛΟΥΜΙΝΟΛΗ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ.....	29
4.1. Χημειοφωταύγεια.....	29
4.2 Ιστορική Αναδρομή στη Χημεία της Λουμινόλης.....	32
4.3 Φυσικοχημικές Ιδιότητες Λουμινόλης.....	32
4.4 Λουμινόλη και Χημειοφωταύγεια	34
4.4.1 Γενικά	34
4.4.2 Μηχανισμός Χημειοφωταύγειας Λουμινόλης.....	35
4.5 Χημεία της λουμινόλης	37
4.5.1 Σύνθεση της λουμινόλης	38
4.5.2 Παράγωγα της λουμινόλης.....	39
4.6 Αμινο-αλκυλιωμένα παράγωγα της λουμινόλης.....	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	43
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	43
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6	47
Διερεύνηση συνθηκών αλκυλίωσης της λουμινόλης	47
6.1 Αλκυλίωση λουμινόλης.....	47
6.2 Αλκυλίωση Λουμινόλης: Επιλογή Διαλύτη.....	52
6.2.1 N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο	52
6.2.2 Διμεθυλοσουλφοξείδιο	55
6.2.3 N-μεθυλοπυρρολιδόνη.....	58

6.3 Αλκυλίωση Λουμινόλης: Επιλογή αλκυλιωτικού μέσου.....	67
6.3.1 Διβρωμοαλκάνια	67
6.3.2 Τόσυλο-Βρωμοαλκάνια	67
6.3.3 Διωδοαλκάνια	70
6.4 Συμπεράσματα	72
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7	73
Σύνθεση Μιτοτροπικών 5- <i>N</i> -Αλκυλιωμένων Παραγώγων της Λουμινόλης	73
7.1 Σύνθεση φωσφίνο-αλκυλο-ιωδιδίων	75
7.2 Σύνθεση φωσφίνο-TEG-αλογονιδίων	76
7.3 Σύνθεση των μιτοτροπικών παραγώγων της λουμινόλης.....	78
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8	83
Απόπειρες σύνθεσης 6- <i>N</i> -αλκυλιωμένων μιτοτροπικών παραγώγων της ισολουμινόλης.....	83
8.1 Σύνθεση Ισολουμινόλης.....	83
8.2 Προσπάθειες 6- <i>N</i> -αλκυλίωσης της ισολουμινόλης	85
8.3 Προσπάθειες σύνθεσης 6- <i>N</i> -αλκυλιωμένων παραγώγων της ισολουμινόλης μέσω φθαλιμιδίων	86
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9	89
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΠΟΡΕΙΕΣ ΚΑΙ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ	89
9.1 Γενικό Πειραματικό Μέρος.....	89
9.1.1 Αντιδραστήρια και Διαλύτες.....	89
9.1.2 Όργανα και Διατάξεις	89
9.1.3 Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC)	90
9.1.4 Χρωματογραφία Στήλης	90
9.2 Πειραματικές πορείες και Χαρακτηρισμός Προϊόντων	91
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ- ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ- ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	121

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1 Ένας φωτοευαίσθητοποιητής (PS) χορηγείται συστηματικά ή τοπικά. Διεγείρεται με ακτινοβολία, και παρουσία μοριακού οξυγόνου ενεργοποιείται μια φωτοχημική αντίδραση που κορυφώνεται με τη παραγωγή οξυγόνου απλής κατάστασης ($^1\text{O}_2$). Η ανεπανόρθωτη βλάβη των κυτταρικών μακρομορίων οδηγεί στον θάνατο των κυττάρων του όγκου. [9].....	6
Εικόνα 2 Σχηματική απεικόνιση των διεργασιών φωτοευαίσθητοποίησης τύπου II.....	9
Εικόνα 3: Αναπαράσταση του ορατού φάσματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Στο «κόκκινο άκρο» είναι τα μεγαλύτερα μήκη κύματος και οι χαμηλότερες ενέργειες φωτονίων, ενώ στο «μπλε άκρο» είναι τα μικρότερα μήκη κύματος και υψηλότερες ενέργειες φωτονίων.....	12
Εικόνα 4: Βιοσυνθετική οδός της αίμης [13].....	14
Εικόνα 5: Φάσματα φθορισμού διάφορων μορίων του ιστού. [17].....	16
Εικόνα 6 Ένα μόριο φωτοευαίσθητοποιητή απορροφά φως κατάλληλου μήκους κύματος και διεγείρει πολλαπλά μόρια οξυγόνου.	17
Εικόνα 7 Δομή Μιτοχονδρίου	23
Εικόνα 8: Το ενεργειακό διάγραμμα Jablonski δείχνει τις ενεργειακές στάθμες και μεταπτώσεις ενός μορίου, όπου S_0 η βασική ενεργειακή κατάσταση του μορίου, S_1 η πρώτη και S_2 η δεύτερη απλή διεγερμένη, και T_1 , T_2 η πρώτη και δεύτερη τριπλή διεγερμένη αντίστοιχα.	30
Εικόνα 9 Φάσματα $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) των ενώσεων 12 (πάνω), 10 (μέση) και 11 (κάτω).	49
Εικόνα 10 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) του μίγματος της αντίδρασης της λουμινόλης με 3-βρωμοπεντάνιο παρουσία K_2CO_3	50
Εικόνα 11 Φάσματα $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO-d_6) της λουμινόλης (πάνω) και της 9 (μέση). Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, DMSO-d_6) της 9 κάτω.....	52

Εικόνα 12 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO-d_6) του βρωμοπαραγώγου 13	53
Εικόνα 13 Φάσματα μίγματος αντίδρασης λουμινόλης με 1,6-διβρωμοεξάνιο σε DMF/100°C/72h. Πάνω: φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO-d_6 , αρωματική περιοχή). Κάτω: Φάσματα ES-MS θετικού (αριστερά) και αρνητικού (δεξιά) ιονισμού.	54
Εικόνα 14 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO-d_6) μίγματος της αντίδρασης της λουμινόλης με 1,6-διβρωμοεξάνιο σε $\text{DMSO}/90^\circ\text{C}/3\text{h}$. Ένθετο: Φάσμα ES-MS αρνητικού ιονισμού.	57
Εικόνα 15. Φάσματα MS των μιγμάτων των αντιδράσεων αλκυλίωσης της λουμινόλης με 1,6-διβρωμοεξάνιο σε NMP.	61
Εικόνα 16 Δομές που αντιστοιχούν σε σήματα των φασμάτων MS των μιγμάτων των αντιδράσεων αλκυλίωσης της λουμινόλης με 1,6-διβρωμοεξάνιο σε NMP.	62
Εικόνα 17 Φάσμα MS του μίγματος της αντίδρασης αλκυλίωσης της λουμινόλης με 1,10-διβρωμοδεκάνιο σε NMP.	63
Εικόνα 18 Δομές που αντιστοιχούν σε σήματα του φάσματος MS του μίγματος της αντίδρασης αλκυλίωσης της λουμινόλης με 1,10-διβρωμοδεκάνιο σε NMP.	63
Εικόνα 19 Δομές που αντιστοιχούν σε σήματα του φάσματος MS του μίγματος της αντίδρασης βρωμιωμένων παραγώγων με τριφαινυλοφωσφίνη	65
Εικόνα 20 Φάσμα MS του μίγματος της αντίδρασης βρωμιωμένων παραγώγων με τριφαινυλοφωσφίνη.	66
Εικόνα 21 Φάσματα $^1\text{H-NMR}$ (πάνω, 200 MHz, CD_3OD) και $^{13}\text{C-NMR}$ (κάτω, 50 MHz, CD_3OD) της ένωσης 30	69
Εικόνα 22 Τα φωσφονιακά κατιόντα και οι αλυσίδες (spacers) που συνδυάστηκαν με τη λουμινόλη στα μιτοτροπικά παράγωγα.	74
Εικόνα 23 Φάσματα $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3 , πάνω) και $^{31}\text{P NMR}$ (81 MHz, CDCl_3 , κάτω) της ένωσης 37b	76

Εικόνα 24 Φάσματα ^1H NMR των 42 (200 MHz, CDCl_3 , πάνω) και 41 (200 MHz, DMSO-d_6 , μέση). Κάτω: Φάσμα ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO-d_6) της ένωσης 42	78
Εικόνα 25 Φάσματα ^1H NMR (200 MHz, DMSO-d_6) των 44 , 36a,b και 36d (200 MHz, DMSO-d_6).....	81
Εικόνα 26 Φάσματα ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO-d_6) των 44 , 36a και 36b	81
Εικόνα 27 Φάσματα ^1H NMR (200 MHz, DMSO-d_6) του 36c μετά τον καθαρισμό από δύο (πάνω) και μια στήλες χρωματογραφίας (μέση, διακρίνονται οι κορυφές της λουμινόλης). Κάτω: φάσμα ^1H NMR (200 MHz, DMSO-d_6) της λουμινόλης.	81
Εικόνα 28 Φάσματα ^1H NMR (200 MHz, DMSO-d_6 , πάνω) και ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO-d_6 , κάτω) της ισολουμινόλης.	85
Εικόνα 29 Φάσματα ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , πάνω) και ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3 , κάτω) της 51	88

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: 8 Μόρια αμινολεβουλινικού απαιτούνται για τη δημιουργία ενός μορίου πρωτοπορφυρίνης IX μέσω της βιοσύνθεσης της αίμης.	15
Σχήμα 2: Εξάρτηση του δυναμικού διάχυσης που παράγεται στη λιπιδική μεμβράνη σε σύγκριση με τη συγκέντρωση του TPP.....	26
Σχήμα 3: Πρόσληψη ενός TPP κατιόντος προσαρτημένο σε μία ομάδα X στο κυτταρόπλασμα από το εξωτερικό περιβάλλον οδηγούμενο από το δυναμικό μεμβράνης. Από το κυτταρόπλασμα, η ένωση συσσωρεύεται περαιτέρω στα μιτοχόνδρια, οδηγούμενο από το δυναμικό μεμβράνης. Όπου X οποιαδήποτε ένωση με φαρμακευτικές ιδιότητες ή ανιχνευτής.	26
Σχήμα 4 Τα ταυτομερή της λουμινόλης σε όξινο (LH_2) και βασικό διάλυμα (LH^- , L^{2-}).....	33
Σχήμα 5 Η προτεινόμενη αντίδραση χημειοφωταύγειας της λουμινόλης σε DMSO	35

Σχήμα 6: Προτεινόμενος μηχανισμός χημειοφωταύγειας της λουμινόλης σε υδατικά διαλύματα.....	37
Σχήμα 7. Οι πιθανές πορείες της αντίδρασης της λουμινόλης με ένα ηλεκτρονιόφιλο E παρουσία βάσης B.	38
Σχήμα 8. Συνθετικές πορείες της λουμινόλης. Συνθήκες: (i) ουρία, AcOH, Δ, (ii) Fe/ NH ₄ Cl/ H ₂ O, Δ ή H ₂ , Pd/C, EtOH, (iii) N ₂ H ₄ H ₂ O, EtOH, Δ.....	39
Σχήμα 9. Γενική επισκόπηση της αναμενόμενης δράσης της ειδικά τροποποιημένης λουμινόλης.....	44
Σχήμα 10. Γενική δομή των μιτοτροπικών παραγώγων της λουμινόλης και της ισολουμινόλης (ενώσεις στόχοι).....	45
Σχήμα 11. Ρετροσυνθετικό σχήμα των μιτοτροπικών παραγώγων 6 της λουμινόλης.....	47
Σχήμα 12. Αλκυλίωση της λουμινόλης παρουσία βάσης. Συνθήκες: (i) Βρωμοεξάνιο, K ₂ CO ₃ , DMF, 90°C, 24h.....	48
Σχήμα 13. 5- <i>N</i> αλκυλίωση της λουμινόλης. Συνθήκες: (i) DMF, 110°C, 48h..	51
Σχήμα 14. Αλκυλίωση λουμινόλης με διβρωμοεξάνιο. Συνθήκες: (i) DMF, 110°C, 72h.....	52
Σχήμα 15. Αντίδραση λουμινόλης με διβρωμοεξάνιο. Συνθήκες: (i) DMSO, 90°C, 3h.....	56
Σχήμα 16 Προτεινόμενος μηχανισμός βρωμίωση δακτυλίου A και πιθανή αντίδραση B	58
Σχήμα 17 Αντίδραση υποκατάστασης βρωμιδίου από τη φωσφίνη.	64
Σχήμα 18. Απόπειρα αλκυλίωσης της λουμινόλης με τοσυλοενδεκυλοβρωμίδιο. Συνθήκες: (i) TsCl, Et ₃ N, DMAP, THF, 0-20°C, 18h, (ii) LH ₂ , DMF, 90°C.....	68
Σχήμα 19. Απόπειρα αλκυλίωσης της λουμινόλης με τοσυλοενδεκυλοφωσφινικό άλας. Συνθήκες: (i) PPh ₃ , MeCN, Δ, (ii) TsCl, Et ₃ N, DMAP, THF, 0-20°C, 18h, (iii) LH ₂ , DMF, 90°C.....	70

Σχήμα 20 Σχηματικές αντιδράσεις αλκυλίωσης της λουμινόλης με διιωδοαλκάνια.	71
Σχήμα 21 Ρετροσυνθετικό σχήμα για τη δημιουργία των μιτοτροπικών παραγώγων της λουμινόλης.	73
Σχήμα 22. Σύνθεση των φωσφίνο-αλκυλο-ιωδιδίων. Συνθήκες: (i) 100°C, 1.5 h.....	75
Σχήμα 23 Σύνθεση των φωσφίνο-TEG-αλογονιδίων 39 και 42. Συνθήκες: (i) CBr ₄ , PPh ₃ , CH ₂ Cl ₂ , (ii) 100°C, 2 h, (iii) TsCl, KOH, CH ₂ Cl ₂ , (iv) KI, ακετόνη, (v) 100°C, 1.5 h.....	77
Σχήμα 24 Σύνθεση των μιτοτροπικών παραγώγων της λουμινόλης. Συνθήκες: (i) NMP, 110°C, 18 h.....	79
Σχήμα 25. Πορεία σύνθεσης της ισολουμινόλης. Συνθήκες: (i) Ac ₂ O, Δ, (ii) NH ₂ NH ₂ , AcOH, Δ, (iii) H ₂ , 10% Pd/C, MeOH, 40°C.	84
Σχήμα 26. Απόπειρες αλκυλίωσης της λουμινόλης. Συνθήκες: (i) NMP, 110°C, (ii) DMF, 110°C.	86
Σχήμα 27. Συνθετική προσέγγιση του διαλκυλιωμένου παραγώγου 52 . Συνθήκες: (i) sec-BuNH ₂ , AcOH, Δ, (ii) H ₂ , 10% Pd/C, MeOH, (iii) 37b , NMP, 120°C, (iv) Et ₂ SO ₄ , 140°C, (v) NH ₂ NH ₂ , EtOH, Δ.....	87

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: οξειδωτικά που αντιδρούν με λουμινόλη και παράγουν φως.	34
Πίνακας 2 Αντιδράσεις της λουμινόλης με διβρωμοεξάνιο σε διαλύτη DMSO.	57
Πίνακας 3: Εύρεση του Ιδανικού όγκου NMP για σχηματισμό ιζήματος κατά την υδατική επεξεργασία της αντίδραση αλκυλίωσης 0.3 mmol λουμινόλης με 1,6-διβρωμοεξάνιο.	60

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΠΟΛΥΜΟΡΦΟ ΓΛΟΙΟΒΛΑΣΤΩΜΑ

1.1 Εισαγωγή

Το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα είναι η συχνότερη μορφή πρωτογενούς καρκίνου του εγκεφάλου. Είναι από τους πλέον επιθετικούς και επικίνδυνους εγκεφαλικούς όγκους. Εάν αφεθεί χωρίς θεραπεία οδηγεί τον ασθενή σε θάνατο εντός μερικών εβδομάδων, ενώ είναι υπεύθυνο για το 3% των θανάτων από καρκίνο σε ηλικίες κάτω των 65 χρόνων και η τρίτη αιτία θνησιμότητας σε νέους ηλικίας από 15 έως 34 χρόνων. Κάθε χρόνο πραγματοποιείται διάγνωση σε 17.000 καινούριες περιπτώσεις [1]. Οι επιπτώσεις του γλοιοβλαστώματος αυξάνονται όσο αυξάνεται η ηλικία και είναι πιο έντονες στις ηλικίες 75 με 84, ενώ εμφανίζεται κυρίως σε λευκούς άντρες. Ένα ποσοστό μικρότερο του 5% επιβιώνει από την ασθένεια αυτή για πάνω από 5 χρόνια, καθώς οι ασθενείς ζουν συνήθως για μόλις 12 με 15 μήνες μετά τη διάγνωση. [2][3]

Τα νευρογλοιακά κύτταρα είναι 5-10 φορές περισσότερα από τους νευρώνες και μικρότερα από αυτούς. Αποτελούν συνολικά τον μισό του ολικού όγκου του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού. Οι νευρογλοιακοί όγκοι αντιπροσωπεύουν το 40-50% των ενδοκρανιακών όγκων και ονομάζονται γλοιώματα. Πιο συχνοί είναι οι όγκοι των αστροκυττάρων (είδος νευρογλοιακών κυττάρων, με μικρά κυτταρικά σώματα και διακλαδώσεις προς όλες τις κατευθύνσεις) [4] που περιλαμβάνουν τα αστροκυττώματα και τα γλοιοβλαστώματα. Οι όγκοι της νευρογλοίας εμφανίζουν μεγάλη διηθητικότητα και για αυτό τον λόγο είναι πολύ δύσκολο να επιτευχθεί πλήρης χειρουργική αφαίρεση του όγκου, με τις μετεγχειρητικές υποτροπές να είναι συχνές. Ένα άλλο χαρακτηριστικό είναι ότι η επέκταση όγκων δεν επηρεάζει τη λειτουργία των παρακείμενων νευρώνων, έτσι ώστε συχνά ο όγκος είναι κατά πολύ μεγαλύτερος από όσο εκτιμάται από τη συμπτωματολογία του ασθενούς.

Η πλέον συνηθισμένη τοποθεσία του γλοιοβλαστώματος είναι η εμπρόσθια περιοχή του εγκεφάλου, όμως συχνά επηρεάζονται και οι βρεγματικοί λοβοί. Κακοήθες γλοιώμα εγκεφάλου συχνά εμφανίζεται και σε παιδιά. Στη παρεγκεφαλίδα και στο νωτιαίο μυελό αυτό το είδους όγκου είναι πολύ σπάνιο. Σύγχρονες μορφές απεικόνισης, όπως η μαγνητική τομογραφία, υποδηλώνουν ότι τα κακοήθη γλοιώματα είναι καλά περιφραγμένοι όγκοι με περιφερειακές νεκρώσεις, που περιβάλλουν το βιώσιμο ιστό. Ωστόσο, οι τρόποι απεικόνισης αποτυγχάνουν να ανιχνεύσουν το πόσο διεισδυτικό είναι ένα γλοιώμα. Επιπλέον, οι όγκοι που συνοδεύουν αυτές τις βλάβες, αρκετές φορές βρίσκονται σε απόσταση εκατοστών από λειτουργικές περιοχές του εγκεφάλου. Ως εκ τούτου, τα κακοήθη γλοιώματα είναι ασθένεια που επηρεάζει ολόκληρο τον εγκέφαλο κι όχι μια συγκεκριμένη περιοχή. [5]

1.2 Συμπτώματα

Η κλινική ιστορία είναι συνήθως μικρή (λιγότερο των 3 μηνών) εκτός κι αν το νεόπλασμα αναπτυχθεί σε αναπλαστικό αστροκύτταρο. Οι ασθενείς συνήθως εμφανίζονται χωρίς συγκεκριμένα νευρολογικά συμπτώματα. Συνήθως παρουσιάζουν αλλαγή στη προσωπικότητα, επιδείνωση μνήμης και άλλα συμπτώματα όπως κεφαλαλγία, ναυτία, και υπνηλία, εξαιτίας της αυξημένης ενδοκρανιακής πίεσης. Αρκετά συχνά, το πρώτο σύμπτωμα είναι η επιληπτική κρίση. [6]

1.3 Θεραπεία

Η θεραπεία που προτείνεται για το γλοιοβλάστωμα είναι τριών σταδίων. Όπου είναι δυνατό, αρχικά εφαρμόζεται μια χειρουργική εκτομή για να μειωθεί όσο δυνατό μεγαλύτερο μέρος του όγκου. Στη συνέχεια ακολουθεί ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία. Μετά τη συμπλήρωση της χειρουργικής εκτομής και της ακτινοθεραπείας ο μέσος όρος ζωής είναι 6 με 9 μήνες.

Όμως, όπως προαναφέρθηκε, μία τέτοια χειρουργική αντιμετώπιση περιορίζεται εξαιτίας της επιθετικότητας του καρκίνου. Στις περισσότερες περιπτώσεις το γλοιοβλάστωμα επιστρέφει, ακόμα κι αν έχει αφαιρεθεί πλήρως με προεγχειρητικό σχεδιασμό και παρά τις μετεγχειρητικές τεχνικές. Επιπρόσθετα, στον εγκέφαλο, οι εκτομές είναι σπάνια επιλογή ιδιαίτερα στην

περιοχή των λειτουργικά σημαντικών περιοχών του εγκεφάλου. Σε ποσοστό άνω του 80% των περιπτώσεων η υποτροπή βρίσκεται σε απόσταση 2 cm από τον αρχικό όγκο λόγω υπολειμμάτων μάζας όγκου ή κυττάρων όγκου που διεισδύουν στον ιστό του. [5]

Με βάση τα δεδομένα αυτά, η χημειοθεραπεία θεωρείται προς το παρόν η καλύτερη λύση για την αντιμετώπισή του. Μέχρι τώρα πολλά χημειοθεραπευτικά φάρμακα έχουν εγκριθεί από το FDA για τη θεραπεία του γλοιοβλαστώματος, αν και δεν έχει υπάρξει κάποια βελτίωση στο μέσο όρο επιβίωσης. Το αρνητικό αποτέλεσμα αποδίδεται κυρίως σε αρκετά «εμπόδια» που συναντούν τα φάρμακα, όπως τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, ο οποίος αποτρέπει την επαρκή παράδοση των φαρμάκων στον ιστό του γλοιώματος.

Τα τελευταία χρόνια πολλά συστήματα μεταφοράς νανοφαρμάκων τροποποιήθηκαν με υποκαταστάτες που στοχεύουν τον όγκο για τη θεραπεία του γλοιοβλαστώματος, όπως λιποσώματα και νανοσωματίδια (πολυμερή και δενδριμερή). Αυτά στηρίζονται στην ικανότητα των νανομεταφορέων να αυξήσουν τη συσσώρευση και να διατηρήσουν μια υψηλή συγκέντρωση των χημειοθεραπευτικών μέσων στους όγκους. Όμως, το γλοιοβλάστωμα χαρακτηρίζεται από μικροαγγειακούς πόρους που διακυβεύουν την προσβολή και προσκόλληση του νανομεταφορέα στον όγκο, περιορίζοντας με τον τρόπο αυτόν το θεραπευτικό αποτέλεσμα. [7]

Μεταξύ των πρόσφατων μελετών για τη θεραπεία του γλοιοβλαστώματος, η φωτοδυναμική θεραπεία εμφανίζεται ως μια πολλά υποσχόμενη λύση. Το κυτταροτοξικό της αποτέλεσμα βασίζεται στη συνεργεία τριών συστατικών: ενός φωτοευαισθητοποιητή, του φωτός και του οξυγόνου. Η ενέργεια που δίδεται από το λέιζερ, οδηγεί σε διέγερση του φωτοευαισθητοποιητή μέσα στα καρκινικά κύτταρα και έτσι επιτυγχάνεται μια φωτοαντίδραση μεταξύ αυτού και του οξυγόνου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή οξυγόνου απλής κατάστασης και ελευθέρων ριζών, τα οποία είναι κυτταροτοξικά και οδηγούν σε θανάτωση του καρκινικού κυττάρου. [8]

Πιο επιθετικές τοπικές θεραπείες θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν για να παρατείνουν την επιβίωση, αλλά πρέπει να θυμόμαστε ότι οποιαδήποτε θεραπεία είναι ουσιαστικά παρηγορητική, εξαιτίας της αναπόφευκτης

υποτροπής του όγκου. Κατά συνέπεια, η θεραπεία πρέπει να είναι ασφαλής, έτσι ώστε να μην βλάπτει την ποιότητα ζωής για τη σύντομη περίοδο επιβίωσης που διαθέτουν οι ασθενείς. Λαμβανομένων υπόψη όλων αυτών, υπάρχουν τρεις προϋποθέσεις για τοπικές θεραπείες στα κακοήγη γλοιώματα:

1. οι θεραπείες δεν θα πρέπει να προκαλούν κλινική αλλοίωση.
2. οι θεραπείες θα πρέπει να επιτρέπουν την αποτελεσματική αφαίρεση των καρκινικών κυττάρων.
3. οι θεραπείες θα πρέπει να είναι ιδιαίτερα στοχευμένες.

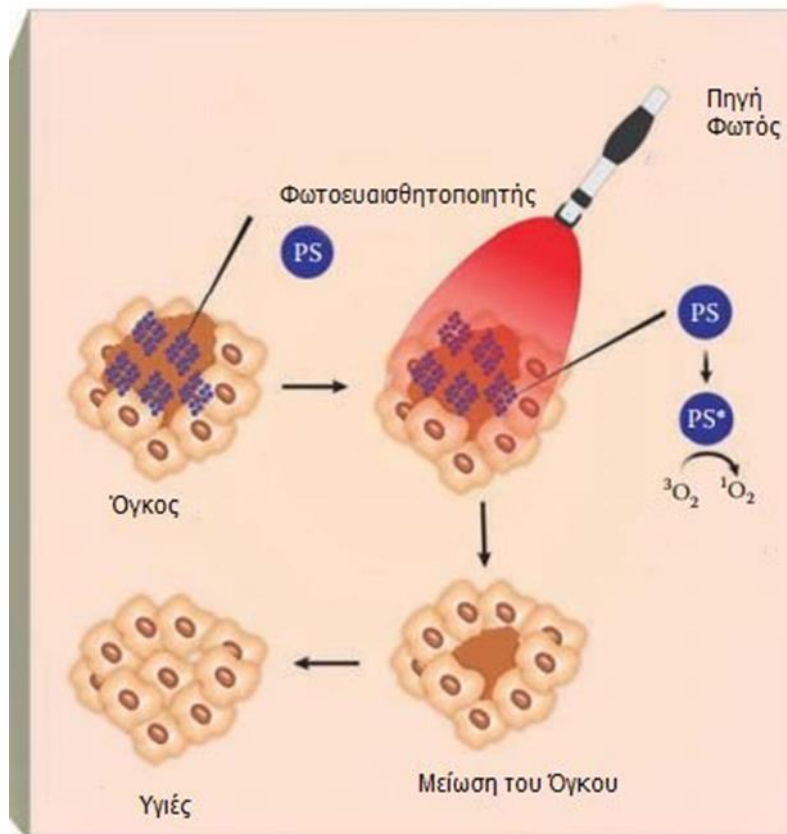
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

2.1 Γενικά

Η φωτοδυναμική θεραπεία είναι μία κλινικά εγκεκριμένη, ελάχιστα επεμβατική θεραπευτική αγωγή, η οποία έχει χρησιμοποιηθεί αρκετά στο τομέα της ογκολογίας και έχει αποδειχθεί ότι δρα αποτελεσματικά και εκλεκτικά κατά κακοηθών και άλλων όγκων. Είναι μία τεχνική δύο φάσεων, κατά την οποία αφού έχουμε καταστήσει την επιθυμητή περιοχή ευαίσθητη στο φως, την ακτινοβολούμε με ασφαλείς δόσεις. Για να πετύχουμε ευαισθητοποίηση, χορηγούμε συστηματικά φωτοευαισθητοποιητικές ουσίες, οι οποίες προσλαμβάνονται τόσο από τους φυσιολογικούς όσο και από τους ιστούς που έχουν προσβληθεί από κάποια μορφή καρκίνου, αλλά συσσωρεύονται και παραμένουν περισσότερο στα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα όπως τα κακοήθη.

Η διαδικασία περιλαμβάνει συστηματική ή τοπική χορήγηση του φωτοευαισθητοποιητή, ο οποίος είναι μη τοξικός απουσία ακτινοβολίας, και στη συνέχεια την ακτινοβολήσή του. Η ακτινοβολία έχει μήκος κύματος το οποίο αντιστοιχεί σε μία από τις ζώνες απορρόφησής του φωτοευαισθητοποιητή και παρουσία οξυγόνου αρχίζει μια σειρά φυσικών, χημικών και βιολογικών διεργασιών, που τελικά οδηγούν στη νέκρωση του όγκου (Εικόνα 1). Αυτή η διαδικασία έχει πολυπαραγοντική φύση, καθώς γενικά περιλαμβάνει άμεση θανάτωση των νεοπλασματικών κυττάρων, βλάβη του αγγειακού συστήματος του όγκου, ενεργοποίηση ενός αντιγονικού ανοσοαποκριτή κι επαγωγή τοπικών αντιφλεγμονωδών αντιδράσεων.



Εικόνα 1 Ένας φωτοευαισθητοποιητής (PS) χορηγείται συστηματικά ή τοπικά. Διεγείρεται με ακτινοβολία, και παρουσία μοριακού οξυγόνου ενεργοποιείται μια φωτοχημική αντίδραση που κορυφώνεται με τη παραγωγή οξυγόνου απλής κατάστασης ($^1\text{O}_2$). Η ανεπανόρθωτη βλάβη των κυτταρικών μακρομορίων οδηγεί στον θάνατο των κυττάρων του όγκου. [9]

2.2 Ιστορικά

Η χρήση φωτός για τη θεραπεία διάφορων νόσων αναφέρεται 4.000 χρόνια πριν. Οι αρχαίοι Αιγύπτιοι, οι Ινδοί αλλά και οι Κινέζοι χρησιμοποίησαν φως για να θεραπεύσουν διάφορες ασθένειες όπως η ψωρίαση, η ραχίτιδα, η λεύκη και ο καρκίνος του δέρματος. Αναφορές της σύγχρονης φωτοδυναμικής θεραπείας εμφανίστηκαν για πρώτη φορά κατά τη διάρκεια των ερευνών του Finsen στα τέλη του 19ου αιώνα, ο οποίος διαπίστωσε ότι η έκθεση σε κόκκινο φως μπορεί να αποτρέψει το σχηματισμό και να προκαλέσει την εκκένωση των φλύκταινων της ευλογιάς. Το 1900, ο Prime, ένας γάλλος νευρολόγος, χρησιμοποίησε την ηωσίνη (ένα βρωμιούχο παράγωγο της φλουορεσκεΐνης) μέσω του στόματος για τη θεραπεία της επιληψίας, αλλά ανακάλυψε ότι η επιχειρούμενη θεραπεία προκάλεσε δερματίτιδα. Αυτή η ανακάλυψη οδήγησε στην πρώτη θεραπευτική ιατρική εφαρμογή του συνδυασμού φωτοευαισθητοποιητή και φωτός στη θεραπεία του καρκίνου του

δέρματος . Η θεραπευτική εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας σε ασθενείς με καρκίνο έγινε πρώτη φορά πολλά χρόνια αργότερα. Μόλις το 1975, όταν ο Dougherty και η ομάδα του ανέφεραν ότι η χορήγηση μιας αιματοπορφυρίνης και του ερυθρού φωτός θα μπορούσε να εξαλείψει πλήρως την ανάπτυξη όγκου του μαστού σε ποντικούς. [10]

2.3 Βασικές Αρχές της Φωτοδυναμικής Θεραπείας

Η φωτοδυναμική δράση απαιτεί την παρουσία και την αλληλεπίδραση τριών στοιχείων:

1. *Της ευαισθητοποιού ουσίας*
2. *Του φωτός και*
3. *Του οξυγόνου*

Τα κυτταροτοξικά είδη είναι οι ενεργές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen species - ROS) που παράγονται μέσω μεταφοράς ηλεκτρονίων ή ενέργειας από τον διεγερμένο φωτοευαισθητοποιητή. Η κύρια κυτταροτοξική δραστηριότητα σχετίζεται με την παραγωγή οξυγόνου απλής κατάστασης ($^1\text{O}_2$), το οποίο μπορεί να επιτεθεί αποτελεσματικά σε μία ποικιλία υποκυτταρικών συστατικών, όπως είναι αρωματικά τμήματα ενώσεων, οι πλευρικές ομάδες αμινοξέων που περιέχουν θείο, ακόρεστα λιπίδια και στεροειδή. Ως εκ τούτου, ένας κρίσιμος παράγοντας που ελέγχει το επιτυχημένο αποτέλεσμα της φωτοδυναμικής θεραπείας των όγκων είναι η απαίτηση μιας αρκετά μεγάλης συγκέντρωσης του οξυγόνου στον ιστό του όγκου.

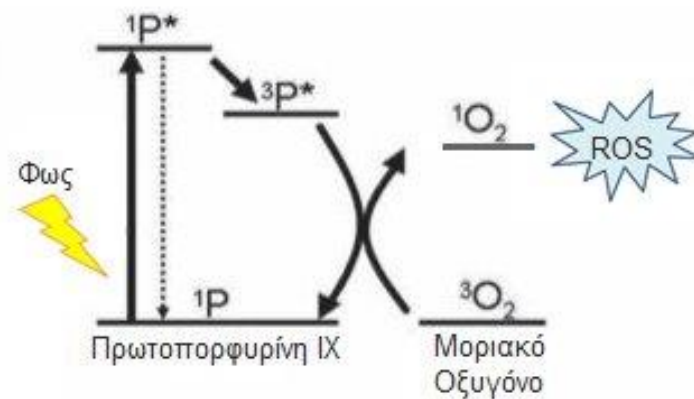
Προκειμένου να ενεργοποιηθεί ο φωτοευαισθητοποιητής, πρέπει να απορροφήσει φως, συνεπώς, το φως πρέπει να είναι μήκους κύματος που θα βρίσκεται μέσα στο φάσμα απορρόφησης του φωτοευαισθητοποιητή. Ωστόσο, επειδή ο ιστός έχει χρωστικές και σωματιδιακό υλικό που μπορεί να απορροφήσει ή να διασκορπίσει το φως, τα συγκεκριμένα μήκη κύματος που επιλέγονται θα πρέπει να είναι αυτά που δεν απορροφώνται ή διασκορπίζονται από τον ιστό που περνά. Η επιλογή του ιδανικού μήκους κύματος για τη φωτοδυναμική θεραπεία προκύπτει από την απαίτηση ισχυρής

απορρόφησης από το φωτοευαισθητοποιητή και ταυτόχρονη καλή διαπερατότητα από τον ιστό. [5]

Ο μηχανισμός δράσης της φωτοδυναμικής θεραπείας ταξινομείται σε δύο τύπους, τον τύπο I και II, οι οποίοι προέρχονται από ένα συνδυασμό φυσικών (αλληλεπίδρασης φωτός με το μόριο), χημικών (παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου) και βιολογικών φαινομένων (καταστροφή όγκου). Ο τύπος I περιλαμβάνει απόσπαση ατόμων υδρογόνου ή αντίδραση μεταξύ διεγερμένων καταστάσεων του φωτοευαισθητοποιητή κι ενός βιολογικού υποστρώματος με αποτέλεσμα τη παραγωγή ελευθέρων ριζικών ιόντων. Αυτές οι ρίζες είναι πολύ δραστικές και αντιδρούν με το μοριακό οξυγόνο, δημιουργώντας ιόντα υπεροξειδίου ή ρίζες υδροξυλίου, προκαλώντας ανεπανόρθωτη βλάβη στους ιστούς των όγκων.

Στην αντίδραση τύπου II, πραγματοποιείται μεταφορά ενέργειας στη βασική κατάσταση του μοριακού οξυγόνου, διεγείροντάς το σε οξυγόνο απλής κατάστασης $^1\text{O}_2$, το οποίο είναι εξαιρετικά δραστικό και αλληλοεπιδρά με διάφορα βιομόρια και κατέχει κεντρικό ρόλο στη φωτοδυναμική κυτταροτοξικότητα. Ταυτόχρονα, ο φωτοευαισθητοποιητής επιστρέφει στη βασική του ενεργειακή κατάσταση. Στην Εικόνα 2, φαίνεται ένα απλοποιημένο σχέδιο της φωτοφυσικής οδού, που οδηγεί στη μετατροπή του μοριακού οξυγόνου σε $^1\text{O}_2$, από το φωτοευαισθητοποιητή πρωτοπορφυρίνη IX (φωτοευαισθητοποίηση τύπου II).

Οι διεγερμένες καταστάσεις, τόσο του φωτοευαισθητοποιητή όσο και του οξυγόνου, έχουν πολύ μικρούς χρόνους ημιζωής. Κατά συνέπεια, προκειμένου η φωτοευαισθητοποίηση να είναι αποτελεσματική, τα μόρια και των δύο πρέπει να είναι πολύ κοντά μεταξύ τους και σε γειτνίαση με τις βιολογικές κυτταρικές δομές. [5]



Εικόνα 2 Σχηματική απεικόνιση των διεργασιών φωτοευαισθητοποίησης τύπου II.

Η πλειονότητα των χρησιμοποιούμενων φωτοευαισθητοποιητών συγκεντρώνονται στις μεμβράνες, τόσο του κυτταροπλάσματος όσο και του μιτοχονδρίου. Ευαίσθητα στη δράση της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι τα μικροσωληνάρια και η άτρακτος, δομές απαραίτητες για τη διενέργεια μιτωτικής διαδικασίας. Τελικό αποτέλεσμα είναι ο κυτταρικός θάνατος με νέκρωση ή απόπτωση. Η καταστροφική δράση της φωτοδυναμικής θεραπείας δεν περιορίζεται μόνο στον όγκο, αλλά και στο δίκτυο νεοαγγείωσής του.

Όσο αφορά την επιλογή του φωτοευαισθητοποιητή, μια βασική ιδιότητα για τη βέλτιστη αντίδραση του όγκου συνιστάται στη κβαντική απόδοση του σχηματισμού του ¹O₂. Ένα πλήθος από in vitro μελέτες έδειξαν ότι η κβαντική απόδοση για να εξασφαλισθεί ικανοποιητική ανταπόκριση του κακοήθους ιστού πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 0.5. [11][12]

2.3 Φωτοευαισθητοποιητές

Η ποιότητα των φωτοευαισθητοποιών ουσιών είναι σημαντική για την αποτελεσματικότητα της θεραπείας.

Επιθυμητές ιδιότητες του ευαισθητοποιητή είναι:

1. Να είναι μη τοξικός απουσία φωτός.
2. Να είναι εξαιρετικά αποδοτικός στην απορρόφηση της φωτεινής ενέργειας και στη μεταφορά του φωτός στο υπόστρωμα.

3. Να είναι ικανός να απορροφά φως μεγάλου μήκους κύματος (πάνω από 600 nm) για βαθιά διείσδυση στον ιστό.
4. Να συσσωρεύεται κατά προτίμηση εντός του ιστού-στόχου.
5. Να μπορεί να καθαριστεί γρήγορα από τους φυσιολογικούς ιστούς.
6. Να έχει καλό βαθμό καθαρότητας και συγκεκριμένη, γνωστή δομή, προκειμένου να διευκολύνει τη φαρμακοκινητική συμπεριφορά αλλά και την ανάλυση ποιοτικού ελέγχου.
7. Να έχει υψηλή σταθερότητα σε ακτινοβολία με ορατό φως, ελαχιστοποιώντας τη διαδικασία φωτοδιάσπασης, το οποίο συνεπάγεται μείωση της ποσότητας της φωτοχημικώς δραστικής ουσίας.

Το σημαντικότερο χαρακτηριστικό, είναι ο φωτοευαισθητοποιητής να διαθέτει καλές φαρμακοκινητικές ιδιότητες που να επιτυγχάνουν μεγάλο βαθμό επιλεκτικότητας στη συσσώρευση του στον όγκο σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς ιστούς. Ο λόγος μεταξύ της συγκέντρωσης του φωτοευαισθητοποιητή στον όγκο και στον γύρω ιστό, εξαρτάται από διάφορους παράγοντες και μερικές φορές είναι δύσκολο να προβλέψουμε τη χρονική πορεία κατανομής του φωτοευαισθητοποιητή in vivo.

Σε σχέση με αυτό, η κινητική για την πρόληψη και απελευθέρωση του φωτοευαισθητοποιητή από διαφορετικούς ιστούς και τον ορό είναι αρκετά περίπλοκη και μπορεί να επηρεαστεί από:

1. Τη χημική δομή του φωτοευαισθητοποιητή.
2. Τη κατανομή του φωτοευαισθητοποιητή μεταξύ των πρωτεϊνών του ορού αμέσως μετά την ενδοφλέβια ένεση.
3. Τα βιοχημικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά του όγκου.
4. Τη πιθανή συσχέτιση του φωτοευαισθητοποιητή με το φορέα ή ένα παράγοντα στόχευσης.
5. Τον τρόπο που ο φωτοευαισθητοποιητής θα «καθαριστεί» από το σώμα.

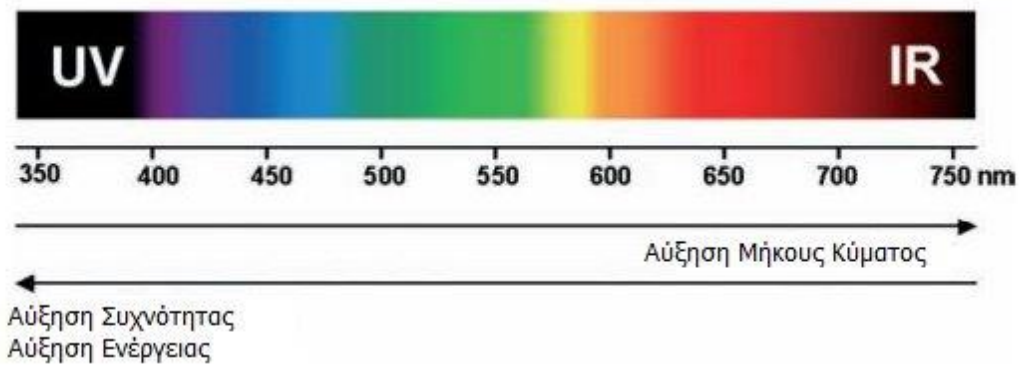
Παραδοσιακά, το διάστημα μεταξύ χορήγησης του φωτοευαισθητοποιητή και της ακτινοβολίας είναι λίγο μεγαλύτερο από 24 ώρες, για να προλάβει ο φωτοευαισθητοποιητής να διαχυθεί μακριά από τους φυσιολογικούς ιστούς.

Κυριότερες κατηγορίες φωτοευαισθητοποιητών είναι:

1. Παράγωγα πορφυρίνων.
2. Φθαλοκυανίνες συμπλοκοποιημένες συνήθως με ένα διαμαγνητικό ιόν μετάλλου, παρουσιάζοντας υψηλή φωτοδυναμική δραστικότητα και ελάχιστες φωτοτοξικές παρενέργειες.
3. Χλωρίνες, υδρόφιλα πορφυρινοειδή συστήματα με μέγιστη απορρόφηση τα 600-700nm.
4. Άλλοι όπως υπερικίνη, θειονίνη κ.α.. [13]

2.4 Η Φυσική Πίσω Από Το Φως

Η φυσική προέλευση του φθορισμού έγκειται στην αλληλεπίδραση των φωτονίων με τα εξωτερικά ηλεκτρόνια των μορίων. Μόλις το μόριο διεγερθεί ηλεκτρονικά, με απορρόφηση φωτονίου κατάλληλου μήκους κύματος, έχει πολλές δυνατότητες επιστροφής στη θεμελιώδη κατάσταση. Μία από αυτές τις πιθανότητες είναι η εκπομπή δευτερεύοντος φωτονίου που φέρει τη διαφορά ενέργειας από την υψηλότερη στη χαμηλότερη ηλεκτρονικά κατάσταση. Όσο μεγαλύτερη είναι αυτή η διαφορά, τόσο μεγαλύτερη είναι η συχνότητα ή τόσο μικρότερο το μήκος κύματος των εκπεμπόμενων φωτονίων. Λόγω της αρχής διατήρησης της ενέργειας, το εκπεμπόμενο φωτόνιο διαθέτει ενέργεια η οποία είναι χαμηλότερη ή ίση με την ενέργεια του φωτονίου διέγερσης, συνεπώς το φως φθορισμού είναι συνήθως μετατοπισμένο σε μεγαλύτερα μήκη κύματος σε σχέση με το φως που χρησιμοποιείται για διέγερση (Εικόνα 3). Αυτή η απώλεια ενέργειας οφείλεται στις ταλαντώσεις του διεγερμένου μορίου και εμφανίζεται ως απώλεια θερμικής ενέργειας.



Εικόνα 3: Αναπαράσταση του ορατού φάσματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Στο «κόκκινο άκρο» είναι τα μεγαλύτερα μήκη κύματος και οι χαμηλότερες ενέργειες φωτονίων, ενώ στο «μπλε άκρο» είναι τα μικρότερα μήκη κύματος και υψηλότερες ενέργειες φωτονίων.

2.5 Το Οξυγόνο

Το 1902 ο Ledoux-Lebards παρατήρησε ότι η φωτοβόληση κυττάρων που είχαν τροφοδοτηθεί με εωσίνη παρουσίαζε καλύτερα (πιο θανατηφόρα) αποτελέσματα όταν η φωτοβόληση γινόταν σε ανοιχτό δοχείο από ότι σε κλειστό. Ως εκ τούτου, υπέθεσε ότι η παρουσία οξυγόνου αποτελεί προϋπόθεση για τη εκτέλεση της φωτοδυναμικής θεραπείας. Λίγα χρόνια αργότερα, υποστηρίχθηκε ότι το οξυγόνο είναι ένα κρίσιμο υπόστρωμα για τις τοξικές επιδράσεις που προκαλούνται από τη φωτοδυναμική θεραπεία. [14]

Το οξυγόνο απλής κατάστασης ($^1\text{O}_2$) είναι μια εξαιρετικά δραστική μορφή οξυγόνου και θεωρείται ότι είναι μία από τις κύριες ενεργές μορφές οξυγόνου που συνεισφέρουν στην αποτελεσματικότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας.

Το οξυγόνο, στην βασική του κατάσταση, έχει δύο μη συζευγμένα ηλεκτρόνια κι επομένως είναι στη τριπλή κατάσταση ($^3\text{O}_2$), αντίθετα με τη πλειονότητα των οργανικών ενώσεων, στις οποίες η θεμελιώδης κατάσταση είναι η απλή.

Η χαμηλότερη διεγερμένη κατάσταση του οξυγόνου είναι το $^1\text{O}_2$, η διαμόρφωση του οποίου απαιτεί αναστροφή της περιστροφής ενός ηλεκτρονίου. Ο σχηματισμός $^1\text{O}_2$ απαιτεί φυσική σύγκρουση του $^3\text{O}_2$ της θεμελιώδους κατάστασης με μία διεγερμένη κατάσταση του φωτοευαισθητοποιητή. Ενέργεια από τον φωτοευαισθητοποιητή μεταφέρεται στο οξυγόνο, σε συνδυασμό με μία αντιστροφή των spin των ηλεκτρονίων τόσο στο οξυγόνο όσο και στο φωτοευαισθητοποιητή.

Το οξυγόνο απλής κατάστασης είναι ισχυρό οξειδωτικό και ιδιαίτερα δραστικό, με διάρκεια ζωής μικρότερη από 4 μs σε βιολογικό περιβάλλον. Έχει ακτίνα δράσης μικρότερη από 0.02 μm και οι αντιδράσεις του με κυτταρικούς στόχους οδηγούν σε θάνατο.

Όπως προαναφέρθηκε, η φωτοδυναμική θεραπεία περιλαμβάνει οξειδωτική βλάβη σε κυτταρικά συστατικά με τη παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου, και ειδικότερα $^1\text{O}_2$. Μετά από ενδοφλέβια ένεση, ή τοπική εφαρμογή του φωτοευαισθητοποιητή, ο φωτοευαισθητοποιητής συσσωρεύεται στον ιστό του όγκου. Σε αυτό το στάδιο ο φωτοευαισθητοποιητής είναι στη βασική του κατάσταση. Μόλις ο ιστός ακτινοβοληθεί σε συγκεκριμένο μήκος κύματος (συνήθως κόκκινη ή υπέρυθη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, 600-800 nm), ο φωτοευαισθητοποιητής που συσσωρεύεται στα κύτταρα του όγκου απορροφά την ενέργεια που παρέχεται από τη φωτεινή πηγή με τη μορφή φωτονίων, φθάνοντας σε μία διεγερμένη κατάσταση με μεγαλύτερη ενέργεια.

Το παραγόμενο $^1\text{O}_2$ από τη φωτοευαισθητοποίηση τύπου II προκαλεί βλάβη στις κυτταρικές δομές συμπεριλαμβανομένου του γονιδιωματικού DNA και της καταστροφής της πλασματικής μεμβράνης των λιποσωμάτων και των μιτοχονδρίων. [15]

2.6 5-Αμινολεβουλινικό Οξύ (5-ALA)

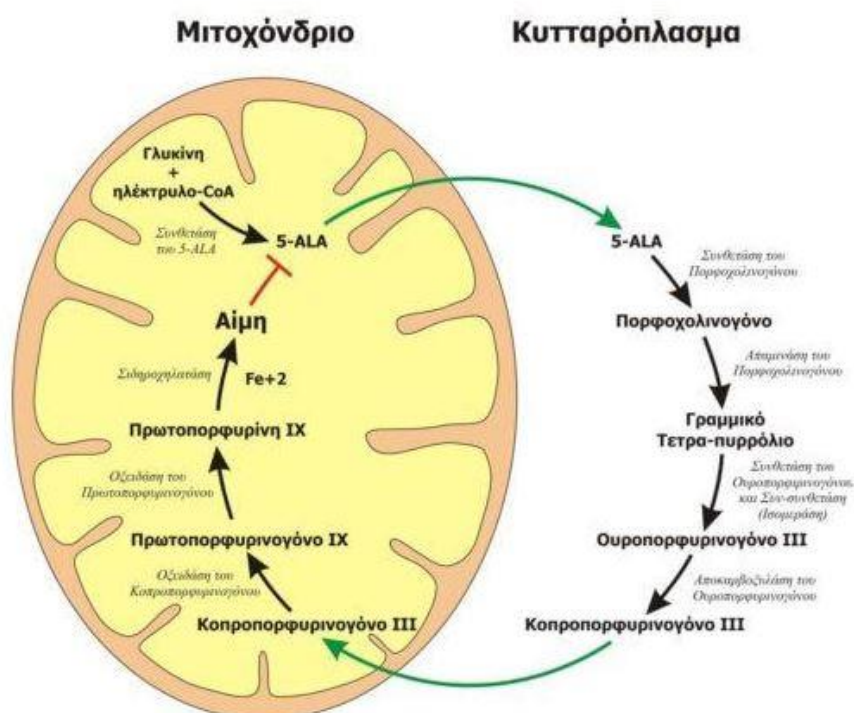
2.6.1 Γενικά

Μια ειδική περίπτωση φωτοευαισθητοποιητών είναι τα λεγόμενα προφάρμακα, όπως το 5-αμινολεβουλινικό οξύ, ή αλλιώς ALA και οι εστέρες του. Το ALA είναι ένα πολικό μόριο για το οποίο ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός είναι αδιαπέραστος. Έτσι μια διακοπή του αιματοεγκεφαλικού φραγμού είναι απαραίτητη προϋπόθεση για να συσσωρευτεί το ALA στους εγκεφαλικούς όγκους.

Το 5-ALA δεν είναι το ίδιο φωτοευαισθητοποιητής. Τέτοια δράση παρουσιάζει η πρωτοπορφυρίνη IX (PpIX) στην οποία το 5-ALA μεταβολίζεται κατά τη βιοσύνθεση της αίμης. [5][12]

Η βιοσύνθεση της αίμης αποτελείται από 8 στάδια, από τα οποία το πρώτο και τα τρία τελευταία λαμβάνουν χώρα στο μιτοχόνδριο (Εικόνα 5). Στο πρώτο στάδιο σχηματίζεται το 5-αμινολεβουλινικό οξύ από γλυκίνη και συνένζυμο A. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το μιτοχονδριακό ένζυμο συνθετάση του ALA. Στη συνέχεια το ALA εξέρχεται του μιτοχονδρίου, και μετατρέπεται σε 3 στάδια στο κοπροπορφυρινογόνο III, το οποίο και εισέρχεται ξανά στο μιτοχόνδριο. Εκεί, μετατρέπεται σε 2 στάδια στην πρωτοπορφυρίνη IX. Στο τελευταίο στάδιο, η συνθετάση της αίμης καταλύει τη προσθήκη δισθενούς σιδήρου εντός της πρωτοπορφυρίνης (PrlX) προς σχηματισμό αίμης. Η τελευταία μετακινείται από το μιτοχόνδριο στο κυτταρόπλασμα. [16]

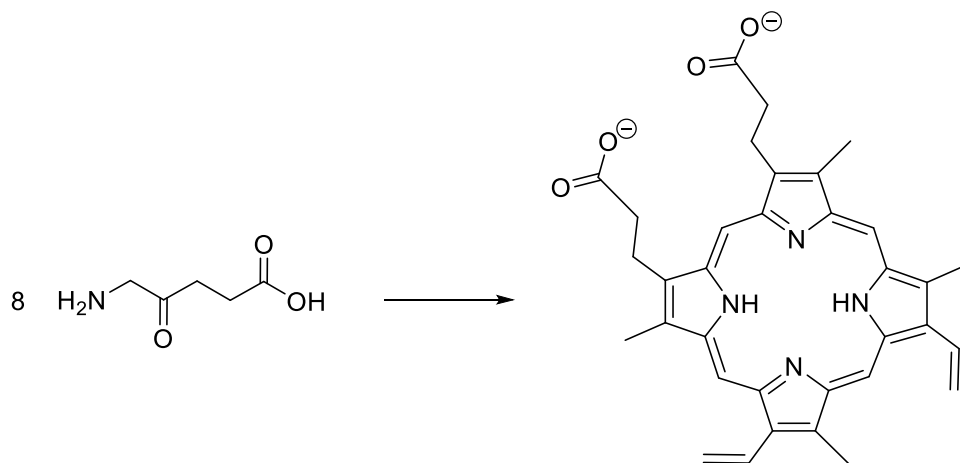
Η σύνθεση του ALA κανονικά ελέγχει τη σύνθεση της αίμης. Το ALA είναι ο πρώτος δεσμευμένος πρόδρομος στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της αίμης.



Εικόνα 4: Βιοσυνθετική οδός της αίμης [13]

Η σύνθεση του ALA ελέγχεται από ένα μηχανισμό που αντανακλά την ενδοκυτταρική συγκέντρωση ελεύθερης (αχρησιμοποίητης) αίμης. Η αύξηση της συγκέντρωσης της αίμης προκαλεί μείωση του ρυθμού σύνθεσης της ALA από γλυκίνη και ηλεκτρυλοσυνένζυμο A. Ωστόσο, με την παρουσία μιας μεγάλης ποσότητας εξωγενώς χορηγούμενου ALA, αυτός ο αμφίδρομος

μηχανισμός παρακάμπτεται. Συνεπώς, το εξωγενώς χορηγούμενο ALA παρακάμπτει την κανονική ανατροφοδότηση στο σημείο ελέγχου και ωθεί τη βιοσυνθετική οδό της αίμης να λειτουργεί με τη μέγιστη δυνατή απόδοση.



Σχήμα 1: 8 Μόρια αμινολεβουλινικού απαιτούνται για τη δημιουργία ενός μορίου πρωτοπορφυρίνης IX μέσω της βιοσύνθεσης της αίμης.

Ο ρυθμός με τον οποίο η ALA μετατρέπεται σε PpIX και τελικά σε αίμη σχετίζεται με τις κυτταρικές απαιτήσεις για αίμη. Όταν προστίθεται μια κατάλληλη ποσότητα εξωγενούς ALA, όλοι οι όγκοι εμφανίζουν φθορισμό της PpIX κατά την ακτινοβολήση, ενώ διαφορετικοί τύποι όγκων ποικίλλουν ως προς την ένταση του φθορισμού. Δεδομένου ότι οι όγκοι έχουν μειωμένη ικανότητα μετατροπής της PpIX σε αίμη, η PpIX συσσωρεύεται σε αυτά τα κύτταρα.

Αυτό είναι και το φαινόμενο που εκμεταλλεύεται η φωτοδυναμική θεραπεία με τη χρήση ALA. Υπό την παρουσία του εξωγενούς ALA, ορισμένοι τύποι κυττάρων συσσωρεύουν σχετικά μεγάλες ποσότητες PpIX, ενώ άλλα κύτταρα συσσωρεύουν πολύ λιγότερο.

2.6.2 5-ALA και Πρωτοπορφυρίνη IX

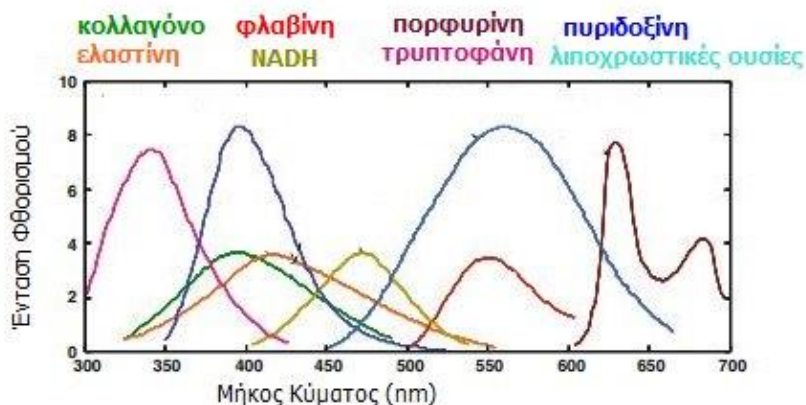
Η πρωτοπορφυρίνη IX είναι μια φθορίζουσα ένωση με μία ισχυρή διαφορά μεταξύ του κύριου μήκους κύματος της διέγερσής της και του μήκους κύματος εκπομπής φθορισμού. Συγκεκριμένα, παρουσιάζει μια ισχυρή απορρόφηση

στο βαθύ μπλε του ορατού φάσματος στα 400nm (ταινία Soret) που επάγει ένα χαρακτηριστικό φάσμα φθορισμού με δύο προεξέχουσες κορυφές στα 630 και 700nm σε διάλυμα.

Στον ιστό, η απορρόφηση του αίματος προκαλεί αλλαγές στις κορυφές, ενώ σε διαφορετικά μικροπεριβάλλοντα προκαλείται μικρή μετατόπιση των κορυφών.

Υπάρχουν σαφείς ενδείξεις για συσσώρευση πρωτοπορφυρίνης στον επιθηλιακό ιστό σε σύγκριση με τον συνδετικό ή τον μυϊκό με μία περαιτέρω μετατόπιση στο κακοήθη ιστό.

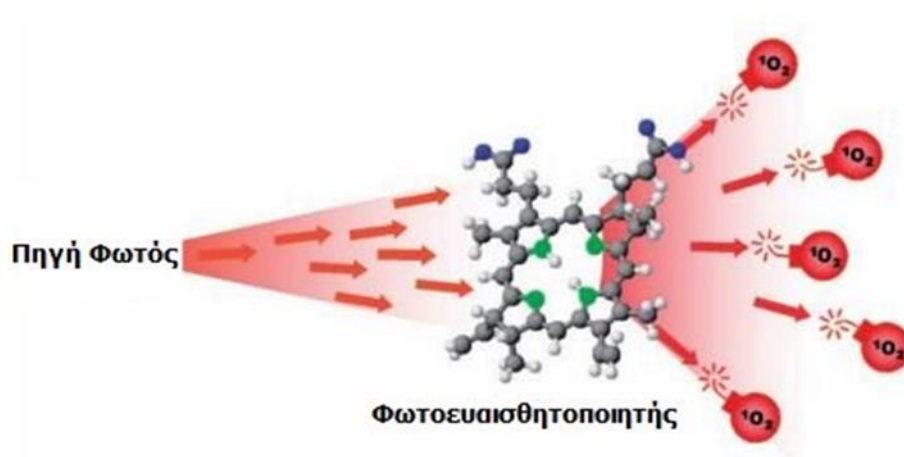
Όπως με τις περισσότερες διαγνωστικές διαδικασίες στην ιατρική, ο φθορισμός της πρωτοπορφυρίνης που προκαλείται από χορήγηση ALA δεν είναι ευαίσθητη μέθοδος. Το κύριο μειονέκτημα του φθορισμού της πρωτοπορφυρίνης είναι ότι εξαφανίζεται κατά τη διάρκεια παρατεταμένης και έντονης διέγερσης.



Εικόνα 5: Φάσματα φθορισμού διάφορων μορίων του ιστού. [17]

Η μεταφορά ενέργειας από ένα μόριο PpIX σε ένα μόριο οξυγόνου επαναφέρει το μόριο της PpIX στην αρχική του κατάσταση, οπότε και πάλι είναι έτοιμο να απορροφήσει ένα άλλο φωτόνιο. Επομένως, η PpIX λειτουργεί ως καταλύτης, που παίρνει την ενέργεια ενός φωτονίου φωτός, το μεταφέρει σε ένα μόριο οξυγόνου και τότε επιστρέφει στην αρχική, μη διεγερμένη κατάσταση. Ενεργοποίηση και απενεργοποίηση μπορεί να επαναληφθεί

πολλές φορές, προκαλώντας υψηλή συγκέντρωση οξυγόνου απλής κατάστασης (Εικόνα 4).



Εικόνα 6 Ένα μόριο φωτοευαισθητοποιητή απορροφά φως κατάλληλου μήκους κύματος και διεγείρει πολλαπλά μόρια οξυγόνου.

Ωστόσο, κάποια από τα μόρια της PpIX καταστρέφονται αντιδρώντας με το ιδιαίτερα δραστικό οξυγόνο απλής κατάστασης.

2.6.3 5-ALA και Γλοιώμα

Η ανάγκη για νέες αποτελεσματικές κι ασφαλείς θεραπείες για το κακοήθες γλοιώμα είναι φανερές. Όπως είδαμε σε παραπάνω κεφάλαιο, παρά τη χειρουργική επέμβαση, την ακτινοθεραπεία και τη χημειοθεραπεία, η μέση επιβίωση των ασθενών που πάσχουν από το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα δεν υπερβαίνει κατά πολύ το ένα έτος.

Το 5 αμινολεβουλινικό οξύ φαίνεται να είναι ένα πολλά υποσχόμενο όπλο στην καταπολέμηση των κακοηθών γλοιωμάτων, μέσω της συσσώρευσης PpIX σε κακοήθη κύτταρα του γλοιώματος. Ο φθορισμός του όγκου που προκύπτει είναι χρήσιμος για τις φθορίζουσες εκτομές. Επίσης, η φωτοτοξικότητα της πορφυρίνης έδειξε σημαντικές δυνατότητες για στοχευμένη θανάτωση νεοπλασματικών κυττάρων που δεν υπόκεινται σε εγχείριση. Και οι δύο τρόποι είναι πολύτιμες προσθήκες στη καταπολέμηση του γλοιοβλαστώματος, είτε χρησιμοποιηθούν για διάγνωση είτε για θεραπεία. Ωστόσο, τα καλύτερα αποτελέσματα θα επιτευχθούν συνδυάζοντας και τους

δύο τρόπους: ασφαλής και πλήρης απομάκρυνση του όγκου με καθοδήγηση της εκτομής από το φθορισμό, ακολουθούμενη από ακτινοβολία της χειρουργικής κοιλότητας με ορατό φως για καταστροφή των κυτταρικών όγκων που διεισδύουν.

Μέχρι τώρα, η φωτοδυναμική θεραπεία των κακοηθών γλοιωμάτων που χρησιμοποιούν ALA έχει περάσει το πειραματικό στάδιο και εξετάζεται σε κλινικά πρωτόκολλα. Πειραματικά, τα γλοιώματα σε αρουραίους έχουν υποβληθεί σε επιτυχή και συγκεκριμένη θεραπεία, χρησιμοποιώντας ALA και λέιζερ στα 635 nm. [5]

2.6.4 Επιλογή του ALA

Μια βασική διαφορά του ALA με άλλους φωτοευαισθητοποιητές είναι ότι ενώ οι προσχηματισμένοι φωτοευαισθητοποιητές χρειάζονται έναν μηχανισμό επιλεκτικής συσσώρευσης / παράδοσης στον όγκο και τους φυσιολογικούς ιστούς, η PpIX συντίθεται και συσσωρεύεται επιλεκτικά στους ιστούς των καρκινικών όγκων. Ως εκ τούτου, ο χώρος δράσης είναι συχνά διαφορετικός για τη PpIX από ότι για άλλους φωτοευαισθητοποιητές.

Ενώ οι περισσότεροι προδιαμορφωμένοι φωτοευαισθητοποιητές τείνουν να διεγείρουν αρχικά τις οξειδωτικές αντιδράσεις στις κυτταρικές μεμβράνες των μικροαγγείων, η φωτοδυναμική με χρήση του ALA ξεκινάει να προκαλεί βλάβη μέσα στα μιτοχόνδρια. Αποτέλεσμα αυτού είναι η επαγωγή υψηλού βαθμού απόπτωσης ως μηχανισμού κυτταρικού θανάτου, σε σύγκριση με τη νέκρωση που συχνά συναντάται με τους προσχηματισμένους, εξωτερικά χορηγούμενους φωτοευαισθητοποιητές. Μόλις συντίθεται το μόριο της PpIX, υποβάλλεται σε μια διαδικασία διανομής μέσα στο σώμα, παρόμοια με αυτή οποιουδήποτε άλλου προσχηματισμένου φωτοευαισθητοποιητή με πορφυρινική δομή. Υπάρχει, ωστόσο, μια σημαντική διαφορά. Η βιομετατροπή της ALA σε PpIX τοποθετεί το μόριο του φωτοευαισθητοποιητή σε μια θέση η οποία δεν μπορεί εύκολα να προσεγγισθεί με την εισαγωγή προ-σχηματισμένου PpIX. Έτσι, ο εν λόγω φωτοευαισθητοποιητής δεν κατανέμεται με τον ίδιο τρόπο αν εισαχθεί ως προ-σχηματισμένος φωτοευαισθητοποιητής ή ως πρόδρομο φάρμακο. Η πρωτοπορφυρίνη, στη

πλειονότητα των περιπτώσεων, θα αφήσει το μιτοχόνδριο και θα κινηθεί σε διαφορετικά μέρη του σώματος με τον ίδιο τρόπο που θα δρούσαν κι τα υπόλοιπα φάρμακα, με την κύρια διαφορά ότι έχει ξεκινήσει από διαφορετική αφετηρία. Έτσι, η φωτοδυναμική θεραπεία με χρήση ALA έχει δύο φάσεις στις οποίες κάποιος μπορεί να εκτελέσει την ακτινοβόληση. Η πρώτη φάση είναι περίπου 3 ώρες μετά τη χορήγηση του ALA, όταν θα βρεθεί ένα μεγάλο κλάσμα της PpIX στην περιοχή των μιτοχονδρίων (δημιουργώντας έτσι υψηλό βαθμό απόπτωσης). Η δεύτερη φάση είναι περίπου 16-20 ώρες μετά τη χορήγηση ALA, όταν η PpIX θα έχει ανακαταταχθεί στο κύτταρο / ιστό, και η απόπτωση θα είναι μικρότερη (περισσότερη νέκρωση).

Ως απόπτωση, ονομάζεται ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, που πραγματοποιείται όταν τα κύτταρα δεν είναι πλέον απαραίτητα για τον οργανισμό. Τα κύτταρα που μετά από μία οξεία βλάβη πεθαίνουν, τυπικά διογκώνονται κι στη συνέχεια διασπείρουν το εσωτερικό τους πάνω σε γειτονικά κύτταρα. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται κυτταρική νέκρωση και σε αντίθεση με την απόπτωση βλάπτει και τα γειτονικά κύτταρα. [18]

Από την άποψη της αποτελεσματικότητας της παραγωγής οξυγόνου απλής κατάστασης, η PpIX δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική συγκρινόμενη με άλλους εγκεκριμένους φωτοευαισθητοποιητές. Το κύριο πλεονέκτημα από τη χρήση της βρίσκεται στον τρόπο με τον οποίο η PpIX παράγεται, δηλαδή μέσω μιας διαδρομής που είναι φυσική για το σώμα. Παραμένει έτσι ο πλέον «φυσικός» φωτοευαισθητοποιητής, μέχρι σήμερα, και για αυτό φαίνεται να είναι ο ευκολότερος στη χρήση και ο ασφαλέστερος. [5]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΣΤΟΧΕΥΣΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

3.1 Μιτοχόνδρια

Τα μιτοχόνδρια χαρακτηρίζονται ως οι «ενεργειακές μονάδες» του κυττάρου. Χωρίς αυτά, θα ήταν αδύνατο στα κύτταρα να παράξουν τα απαραίτητα ποσά ενέργειας από τις θρεπτικές ουσίες, οπότε όλες οι κυτταρικές λειτουργίες θα σταματούσαν. Τα μιτοχόνδρια τα συναντάμε σε κάθε τμήμα του κυτταροπλάσματος, ο αριθμός τους όμως ποικίλλει ανάλογα με τις ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου. Επιπλέον, τα μιτοχόνδρια συγκεντρώνονται στα μέρη του κυττάρου που είναι υπεύθυνα για το μεγαλύτερο μέρος του ενεργειακού μεταβολισμού, ενώ το μέγεθος και το σχήμα τους ποικίλλουν ανάλογα με το είδος του κυττάρου.

Το μιτοχόνδριο αποτελείται από δύο μεμβράνες, με διπλή λιπιδική στιβάδα, μια εξωτερική και μία εσωτερική. [19] Η εσωτερική μεμβράνη είναι μοναδική, εξαιτίας του ότι είναι αρκετά πυκνή λόγω της αφθονίας σε κορεσμένα φωσφολιπίδια και της υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες, με μοριακή αναλογία πρωτεϊνών:λιπίδια 3:1, συγκριτικά με τη μεμβράνη του πλάσματος που η ίδια αναλογία είναι 1:1. Επιπλέον, το μιτοχόνδριο έχει υψηλό δυναμικό μεμβράνης ($\Delta\psi = -180\text{mV}$) σε σύγκριση με το δυναμικό μεμβράνης του πλάσματος ($\Delta\psi = -60\text{m}$). Αυτά τα χαρακτηριστικά επιτρέπουν στο μιτοχόνδριο να αποκλείει ένα ευρύ φάσμα από ιόντα και μόρια και ειδικούς μηχανισμούς μεταφοράς για διείσδυση στην εσωτερική μεμβράνη. Είναι για παράδειγμα σημαντικό το ότι το μιτοχόνδριο πρέπει να μπορεί να αποκλείει ακόμα και πολύ μικρά ιόντα, όπως πρωτόνια, από το να επιστρέψουν μέσω της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης στον διαμεμβρανικό χώρο. [20]

Τα μιτοχόνδρια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε αρκετές μορφές μη αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου, καθώς είναι βασικοί ρυθμιστές του κυτταρικού θανάτου. Έτσι, οι ενώσεις που στοχεύουν τα μιτοχόνδρια

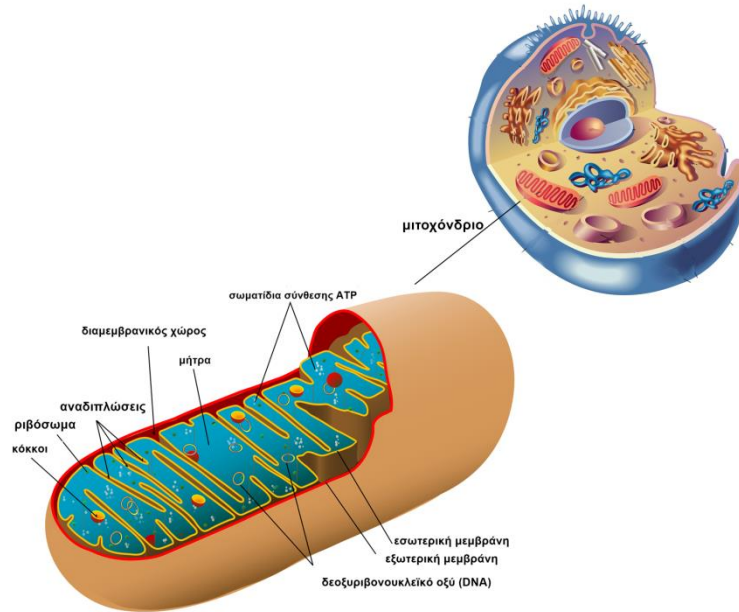
αντιπροσωπεύουν μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για την εκρίζωση ανθεκτικών καρκινικών κυττάρων.

Λόγω του ρόλου τους στη ρύθμιση θεμελιωδών κυτταρικών λειτουργιών, δεν προκαλεί έκπληξη ότι τα μιτοχόνδρια εμπλέκονται σε πολλές πτυχές της ογκογένεσης, όπως για παράδειγμα μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού ή του πυρηνικού DNA [21]. Είναι επίσης γνωστό ότι τα μιτοχόνδρια είναι γεννήτριες ROS στα κύτταρα και ότι αρκετές παθολογικές ασθένειες, αλλά και η γήρανση, οφείλονται στην οξειδωτική βλάβη των μιτοχονδρίων, καθώς εκείνα είναι κυρίως υπεύθυνα για τη παραγωγή ROS που προκαλούν βλάβη του DNA και γενετική αστάθεια. [22]

Τα μιτοχόνδρια των καρκινικών κυττάρων διαφέρουν από αυτά των φυσιολογικών, τόσο δομικά όσο και λειτουργικά. επιπλέον, η διόρθωση των δυσλειτουργιών των μιτοχονδρίων των καρκινικών κυττάρων και η επανενεργοποίηση προγραμμάτων κυτταρικού θανάτου από φαρμακολογικούς παράγοντες, αντιπροσωπεύει μια ελκυστική στρατηγική για τη θεραπεία του καρκίνου. [21]

3.2 Μιτοχονδριοτροπικοί Φορείς

Όπως αναλύεται παραπάνω, το μιτοχόνδριο, η βασική δομή του οποίου παρουσιάζεται στην Εικόνα 7, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση των κυττάρων, όσο και στο θάνατό τους. Αναγνωρίζοντας τον ρόλο του μιτοχονδρίου στην έναρξη και την εξέλιξη του καρκίνου, έχουν εμφανιστεί αρκετοί χημειοθεραπευτικοί παράγοντες που στοχεύουν στο μιτοχόνδριο, οι οποίοι είναι αρκετά ελπιδοφόροι για την καταπολέμηση του καρκίνου, καθώς ενεργούν άμεσα πάνω στους μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου.



Εικόνα 7 Δομή Μιτοχονδρίου

Έτσι, είναι φανερό ότι για να κατευθύνεται ο φαρμακευτικός παράγοντας στο μιτοχόνδριο, χρειαζόμαστε κατάλληλους μιτοτροπικούς ή μιτοχονδριοτροπικούς (μετα)φορείς. Έχει βρεθεί, ότι οι μιτοτροπικοί μεταφορείς θα πρέπει να έχουν απεντοπισμένο θετικό φορτίο και λιποφιλικότητα. Ο κατιοντικός χαρακτήρας χρειάζεται προκειμένου να οδηγηθεί ο φορέας μέσω της κυψελίδας και της μιτοχονδριακής μεμβράνης εντός του μιτοχονδρίου, καθώς και οι δύο έχουν αρνητικό δυναμικό μεμβράνης. Ο απεντοπισμός του θετικού φορτίου μειώνει την ενέργεια ενεργοποίησης που σχετίζεται με τη διαλυτοποίηση του ιόντος πριν από την πρόσληψή του μέσω της υδρόφοβης εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Έτσι, το θετικό φορτίο διαχέεται σε μεγάλη επιφάνεια, ώστε να αυξηθεί η ιοντική ακτίνα του, μειώνοντας αποτελεσματικά την αλληλεπίδραση με τα περιβάλλοντα μόρια του νερού. Αυτά τα χαρακτηριστικά επιτρέπουν σε τέτοιου είδους μόρια να διαμοιραστούν σε όλη την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, οδηγούμενα από τα μεγάλο αρνητικό δυναμικό που υπαγορεύεται από την εξίσωση του Nernst. Αυτό οδηγεί σε 100-500 φορές αύξηση της συγκέντρωσης των μιτοτροπικών παραγόντων στη μήτρα. Επιπλέον, τα μικρά

μιτοτροπικά μόρια, τείνουν να συσσωρεύονται εντός μεταβολικά δραστήριων κυττάρων, όπως αυτά της καρδιάς και του εγκεφάλου. [20]

Τα μιτοχόνδρια είναι κοντά στις σηματοδοτούμενες διαδρομές που ανταποκρίνονται στις ROS. Έτσι, μιτοτροπικοί αντιοξειδωτικοί παράγοντες προκαλούν αποτελεσματική μείωση τόσο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού *in vitro*, όσο και ογκογένεσης *in vivo*. Τα καρκινικά κύτταρα, αυξάνουν την αντιοξειδωτική τους ικανότητα προκειμένου να αντισταθμίσουν την αύξηση της παραγωγής ROS. Αυτό επιτρέπει στα καρκινικά κύτταρα να παράγουν υψηλά επίπεδα H₂O₂ και να ενεργοποιήσουν οδούς σηματοδότησης που προωθούν τη διάδοση, χωρίς να επιτρέπουν στις ROS να συσσωρεύονται σε επίπεδα που θα προκαλούσαν θάνατο του καρκινικού κυττάρου. Για τα φάρμακα που στοχεύουν σε μιτοχόνδρια πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα εξής:

1. Η τοξικότητά τους στα φυσιολογικά κύτταρα.
2. Κάθε τέτοιο φάρμακο δεν πρέπει να διασχίσει μόνο την κυτταρική μεμβράνη αλλά και δύο μιτοχονδριακές μεμβράνες. Η σύνδεση ενός λιπόφιλου κατιόντος σε μικρά μόρια, αυξάνει τη συσσώρευση στο μιτοχονδριακό πλέγμα σε συγκέντρωση κατά 1000 φορές μεγαλύτερη από ότι έξω από το κύτταρο. Η πρόσληψη λιπόφιλων κατιόντων στα μιτοχόνδρια συμβαίνει λόγω του μεγάλου δυναμικού της μεμβράνης που δημιουργείται από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων κατά μήκος της εσωτερικής μεμβράνης. [21]

3.3 Μιτοχονδριακή Μεμβράνη

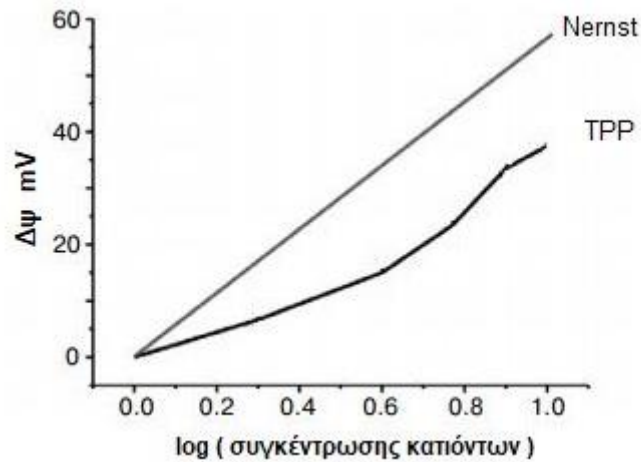
Όπως είδαμε και παραπάνω, το μιτοχόνδριο αποτελείται από μία εξωτερική και μία εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, οι οποίες ανάμεσα τους σχηματίζουν έναν διαμεμβρανικό χώρο. Η εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη είναι διαπερατή από υδρόφιλα υδατοδιαλυτά μόρια με μικρή μοριακή μάζα (<5 kDa). Η εσωτερική μεμβράνη περιβάλλει τη μήτρα του μιτοχονδρίου, η οποία υποδιαιρείται σε μικρότερους χώρους που σχηματίζονται από πτυχώσεις της εσωτερικής μεμβράνης, γνωστές και ως ακρολοφίες. Επιπλέον, η εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη είναι το σημείο μεταφοράς ηλεκτρονίων, άντλησης

πρωτονίων (H^+) και εντοπισμού της συνθετάσης του ATP. Μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών που είναι ενσωματωμένες σε αυτή τη μεμβράνη, αποτελούν συστατικά της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων που παίρνουν μέρος στην οξειδωτική φωσφορυλίωση. [23]

Όπως αναλύθηκε παραπάνω, η μεγάλη διαφορά δυναμικού ($\Delta\psi = 150-180\text{mV}$, αρνητικό στο εσωτερικό) της μιτοχονδριακής μεμβράνης χρησιμοποιείται για τη στόχευση μορίων μέσα στα μιτοχόνδρια. Τα λιπόφιλα κατιόντα περνούν εύκολα μέσω της διπλής στοιβάδας, επειδή το φορτίο τους είναι διασκορπισμένο σε μία μεγάλη επιφάνεια και η διαφορά δυναμικού οδηγεί τη συσσώρευση τους στη μιτοχονδριακή μήτρα. Η πρόσληψη λιπόφιλων κατιόντων στα μιτοχόνδρια αυξάνεται κατά 10 φορές για κάθε 61.5mV δυναμικού μεμβράνης στους 37°C , οδηγώντας σε 100-1000 φορές μεγαλύτερη συσσώρευση. [24]

Επιπλέον, είναι αξιοσημείωτο ότι το $\Delta\psi$ είναι περισσότερο αρνητικό στα καρκινικά κύτταρα από ότι στα φυσιολογικά, γεγονός που ενισχύει την εκλεκτικότητα της στόχευσης. [25]

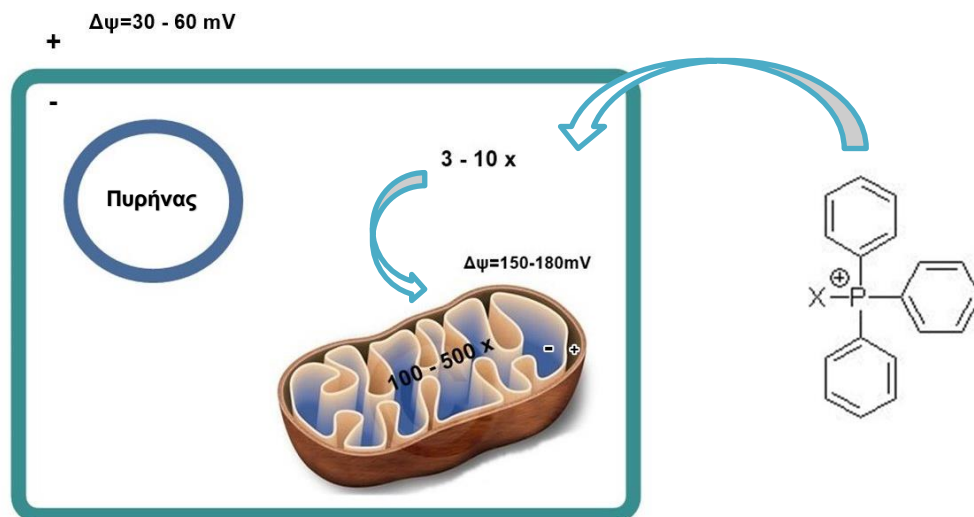
Η τιμή για το $\Delta\psi$ μπορεί να μετρηθεί με τον προσδιορισμό της κατανομής των φορτισμένων ιόντων εντός και εκτός της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων, συνήθως κατιόντα ροδαμίνης 123 ή τριφαινυλοφωσφίνης (TPP^+) [26]. Στην περίπτωση που ένα τέτοιο κατιόν διαπεράσει τη μεμβράνη, αλλά δεν τη διαταράξει όπως προβλέπεται από την εξίσωση του Nernst, μια δεκαπλάσια συγκέντρωση θα παρήγαγε διαφορά δυναμικού $\Delta\psi = 60\text{mV}$, όπως φαίνεται από τη θεωρητική ευθεία του Σχήματος 2. Η απόκλιση από την ευθεία, στα πειραματικά δεδομένα, οφείλεται είτε σε παράγοντες που επιδρούν επιζήμια στη λιπιδική μεμβράνη, είτε σε διαρροή πρωτονίων σε όλη τη περιοχή της μεμβράνης. [22]



Σχήμα 2: Εξάρτηση του δυναμικού διάχυσης που παράγεται στη λιπιδική μεμβράνη σε σύγκριση με τη συγκέντρωση του TPP.

3.4 Τριφαινυλοφωσφονιακά Κατιόντα (TPP)

Το πιο αξιοσημείωτο παράδειγμα λιπόφιλου κατιόντος που χρησιμοποιείται ως μιτοχονδριακός στοχευτής, είναι το τριφαινυλοφωσφονιακό κατιόν. Αυτός ο φορέας στόχευσης περιέχει ένα μόνο θετικό φορτίο που σταθεροποιείται με συντονισμό σε τρία φαινύλια. Εκτός από το θετικό φορτίο, η μεγάλη υδρόφοβη επιφάνεια του TPP κατιόντος επιτρέπει την ευνοϊκή του αλληλεπίδραση με τη διπλοστιβάδα της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Αυτό οδηγεί σε πρόσληψή του από το μιτοχονδριακό πλέγμα.



Σχήμα 3: Πρόσληψη ενός TPP κατιόντος προσαρτημένο σε μία ομάδα X στο κυτταρόπλασμα από το εξωτερικό περιβάλλον οδηγούμενο από το δυναμικό μεμβράνης. Από το κυτταρόπλασμα, η ένωση συσσωρεύεται περαιτέρω στα μιτοχόνδρια, οδηγούμενο από το δυναμικό μεμβράνης. Όπου X οποιαδήποτε ένωση με φαρμακευτικές ιδιότητες ή ανιχνευτής.

3.4.1. Συσσώρευση των TPP στα κύτταρα και τοξικότητα

Κατά τη μετάβαση από τα απομονωμένα μιτοχόνδρια σε κύτταρα, η τοξικότητα είναι το πρώτο που πρέπει να εξεταστεί. Η εκτεταμένη συσσώρευση λιπόφιλων κατιόντων στα μιτοχόνδρια μπορεί να διαταράξει τόσο την ακεραιότητα της μεμβράνης, όσο και τη σύνθεση ATP. Ως εκ τούτου, τα λιπόφιλα κατιόντα TPP μπορούν να διαταράξουν τη μιτοχονδριακή λειτουργία ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους. Για τα κύτταρα των θηλαστικών γνωρίζουμε ότι συγκεντρώσεις γύρω στο 0.1μM δεν προκαλούν βραχυπρόθεσμη τοξικότητα, ωστόσο είναι κάτι που διαφέρει σημαντικά ανάλογα με την κυτταρική πυκνότητα, τον τύπο του κυττάρου και τις συνθήκες επώασης. [24]

3.4.2 TPP *in vivo*

Καθώς τα κατιόντα TPP περνούν εύκολα μέσω των φωσφολιπιδικών διπλοστιβάδων, θα είναι ικανά να περάσουν από το έντερο στην κυκλοφορία του αίματος κι από εκεί στα περισσότερα κύτταρα. Έχει αποδειχθεί ότι όταν χορηγούνται απλές αλκυλο-τριφαινυλοφωσφονιακές ενώσεις σε ποντίκια ενδοφλέβια, αυτές φεύγουν γρήγορα από το πλάσμα και συσσωρεύονται στην καρδιά, τον εγκέφαλο, τους σκελετικούς μύες και το ήπαρ. Αυτά τα πειραματικά δείχνουν σαφώς ότι οι αλκυλο-TPP ενώσεις μεταδίδονται ταχέως στα όργανα, μέσω της κυκλοφορίας του αίματος.

Η μη καθορισμένη τοξικότητα των αλκυλο-TPP κατιόντων που παρουσιάζεται στα μιτοχόνδρια και τα κύτταρα θα εμφανιστεί και *in vivo* και αυτός είναι ο σημαντικότερος παράγοντας που περιορίζει τις ποσότητες των εν λόγω ενώσεων που μπορούν να χορηγηθούν με ασφάλεια. [24]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΛΟΥΜΙΝΟΛΗ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ

4.1. Χημειοφωταύγεια

Χημειοφωταύγεια είναι το φαινόμενο που παρατηρείται όταν το ηλεκτρονικά διεγερμένο προϊόν μιας χημικής αντίδρασης αποδιεγείρεται – μεταπίπτει στη θεμελιώδη κατάσταση εκπέμποντας φωτόνιο, και με απλούς όρους, μπορεί να οριστεί ως μια χημική αντίδραση που εκπέμπει φως.

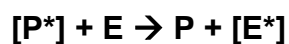
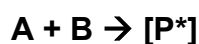
Μια τέτοια χημική αντίδραση παράγει ενέργεια σε επαρκή ποσότητα (περίπου 300kJ/mol για εκπομπή κόκκινου φωτός) για να προκαλέσει τη μετάβαση ενός ηλεκτρονίου του εν λόγω μορίου από τη θεμελιώδη κατάσταση στη διεγερμένη. Αυτή η ηλεκτρονική μετάβαση συχνά συνοδεύεται από δονητικές και περιστροφικές μεταπτώσεις του μορίου. Σε οργανικά μόρια έχουμε πιο συχνά μεταβάσεις από ένα π δεσμικό σε ένα π* αντιδεσμικό τροχιακό (π → π*) ή από ένα μη δεσμικό σε ένα αντιδεσμικό τροχιακό (n → π*). Η επιστροφή των ηλεκτρονίων στην βασική κατάσταση, με ταυτόχρονη εκπομπή ενός φωτονίου, είναι αυτό που καλούμε φθορισμό, ενώ, συνολικά, το φαινόμενο κατά το οποίο ο φθορισμός παράγεται μετά από μία χημική αντίδραση και όχι ακτινοβόληση, ονομάζεται χημειοφωταύγεια. Το διεγερμένο μόριο μπορεί επίσης να χάσει ενέργεια υποβαλλόμενο σε χημικές αντιδράσεις, με απενεργοποίηση μέσω συγκρούσεων ή μη φθοριζουσών εσωτερικών μετατροπών. Αυτές οι διαδικασίες είναι ανεπιθύμητες, καθώς ανταγωνίζονται τη χημειοφωταύγεια. [27]

Η χημειοφωταύγεια αναφέρεται στην εκπομπή φωτός από μία χημική αντίδραση, η οποία μπορεί να εμφανιστεί σε στερεά υγρά ή αέρια συστήματα. Υπάρχουν δύο τύποι χημειοφωταύγειας, η άμεση και η έμμεση. Η άμεση έχει τη μορφή:

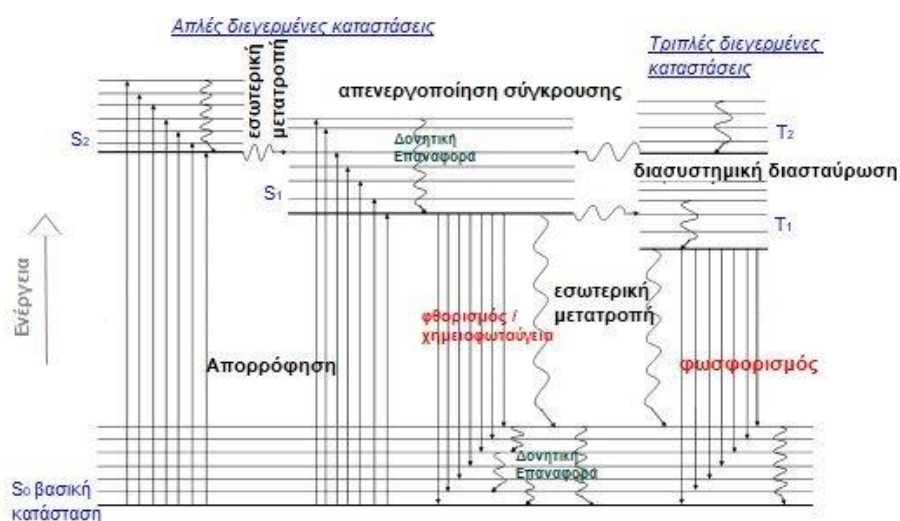


Όπου A και B είναι τα αντιδρώντα και P* είναι η ενδιάμεση διεγερμένη μεταβατική κατάσταση του προϊόντος (P). Η αντίδραση οξειδωσης της λουμινόλης είναι ένα παράδειγμα χημειοφωταύγειας αυτής της μορφής.

Έμμεση χημειοφωταύγεια έχουμε όταν η ενδιάμεση διεγερμένη κατάσταση είναι ένας προπομπός, η ενέργεια του οποίου μπορεί να μεταφερθεί σε ένα άλλο μόριο, π.χ. σε έναν φωτοευαίσθητοποιητή E, διεγείροντάς τον, ο οποίος με τη σειρά του εκπέμπει φως αποδιεγειρόμενος.



Μόλις ένα μόριο μετατραπεί σε ένα λιγότερο σταθερό ενδιάμεσο, σε μία διεγερμένη κατάσταση, υπάρχουν αρκετές διαδρομές από τις οποίες μπορεί να επιστρέψει στη θεμελιώδη κατάσταση. Η εκπομπή φωτός μπορεί να είναι είτε φθορισμός (αν προέρχεται από την αποδιέγερση απλής κατάστασης), είτε φωσφορισμός (αν προέρχεται από την αποδιέγερση τριπλής). Το φως που εκπέμπεται από τις αντιδράσεις χημειοφωταύγειας διαφέρει σε βαθμό έντασης, διάρκεια ζωής και μήκους κύματος. Αυτές οι διαδρομές παρουσιάζονται σχηματικά από το ενεργειακό διάγραμμα Jablonski (Εικόνα 8)



Εικόνα 8: Το ενεργειακό διάγραμμα Jablonski δείχνει τις ενεργειακές στάθμες και μεταπτώσεις ενός μορίου, όπου S_0 η βασική ενεργειακή κατάσταση του μορίου, S_1 η πρώτη και S_2 η δεύτερη απλή διεγερμένη, και T_1 , T_2 η πρώτη και δεύτερη τριπλή διεγερμένη αντίστοιχα.

Για την εκπομπή ακτινοβολίας μέσω μιας χημικής αντίδρασης θα πρέπει να τηρούνται τρεις προϋποθέσεις:

1. Θα πρέπει να υπάρχει ένα ενεργειακά ευνοϊκό μονοπάτι για την παραγωγή ενώσεων στη διεγερμένη κατάσταση. Δηλαδή, από τον

συνολικό αριθμό των μορίων που συμμετέχουν στην αντίδραση, ένας σημαντικός αριθμός θα πρέπει να περιέλθει στην διεγερμένη κατάσταση.

2. Η αντίδραση πρέπει να είναι εξώθερμη, ώστε να ευνοείται, με την ελεύθερη ενέργεια να κυμαίνεται στην περιοχή των 170-300 kJ mol⁻¹.
3. Θα πρέπει να υπάρχει ένα ευνοϊκό μονοπάτι αποδιέγερσης μέσω φθορισμού, με τις άλλες διεργασίες που δεν εκπέμπουν φως, όπως τα φαινόμενα της ένδο- ή δια-μοριακής μεταφοράς ενέργειας, μοριακής διάστασης, ισομερισμού ή εσωτερικής μετατροπής, να περιορίζονται στο ελάχιστο.

Η απόδοση εκπομπής της χημειοφωταύγειας μιας αντίδρασης περιγράφεται από την κβαντική απόδοση της χημειοφωταύγειας (Φ_{CL}):

$$\Phi_{CL} = \frac{\text{συνολικός αριθμός φωτονίων που εκπέμπονται}}{\text{αριθμός μορίων που αντιδρούν}}$$

Η Φ_{CL} είναι προϊόν τριών παραγόντων: το κλάσμα των αρχικών μορίων που αντιδρούν ακολουθώντας την αλληλουχία αντιδράσεων προς την παραγωγή διεγερμένων μορίων (Φ_R), το κλάσμα των διεγερμένων μορίων που παράγονται από τα μόρια που ακολούθησαν την παραπάνω αλληλουχία αντιδράσεων (Φ_{EX}), και τη κβαντική απόδοση φθορισμού των παραπάνω διεγερμένων μορίων (Φ_F):

$$\Phi_{CL} = \Phi_R \Phi_{EX} \Phi_F$$

Η κβαντική απόδοση της χημειοφωταύγειας και το χρώμα εκπομπής επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από το περιβάλλον στο οποίο η αντίδραση λαμβάνει μέρος. Για παράδειγμα, η κβαντική απόδοση και το χρώμα εκπομπής για τη λουμινόλη σε διμεθυλοσουλφοξείδιο είναι 0.05, και κυανοπράσινο ($\lambda_{max} = 480-502\text{nm}$) αντίστοιχα, ενώ σε νερό 0.01 και κυανό-ιώδες ($\lambda_{max} 425\text{nm}$) αντίστοιχα [28].

Η χημειοφωταύγεια της λουμινόλης έχει μελετηθεί αρκετά. Ο τρόπος παραγωγής φωτός από την οξειδωσή της είναι μία σύνθετη διαδικασία πολλαπλών σταδίων κι εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως τα οξειδωτικά αντιδραστήρια, η θερμοκρασία και το pH. [28]

4.2 Ιστορική Αναδρομή στη Χημεία της Λουμινόλης

Παρόλο που η λουμινόλη ανακαλύφθηκε – συντέθηκε το 1908 από τον Schmitz, [28] η έντονη χημειοφωταύγειά της αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1928 από τον Albrecht. Το 1936 της δόθηκε το όνομα «λουμινόλη» όταν επιβεβαιώθηκαν και οι ιδιότητες της φωταύγειας. [29] Ο Sprech, το 1937, εγκληματολόγος στο Πανεπιστήμιο Ιατρικής και Επιστημονικής εγκληματολογίας της Γιένα, στη Γερμανία, αρχικά μελέτησε σε βάθος το ρόλο της αιμίνης, μίας πορφυρίνης συμπλοκοποιημένης με σίδηρο και χλώριο, και στη συνέχεια τη χημική αντίδρασή της με λουμινόλη και διερεύνησε την ενδεχόμενη εφαρμογή της τελευταίας στην ανίχνευση αίματος, που αντιπροσωπεύει τη πρώτη χρήση της χημειοφωταύγειας σε υγρή φάση για αναλυτικούς σκοπούς. Οι Proesher και Moody το 1939 διερεύνησαν τόσο τη χημική δομή, όσο και τις ιδιότητες της αντίδρασης της λουμινόλης, προβλέποντας σωστά την κετο-ενολική ταυτομέρειά της σε αλκαλικά διαλύματα και την ύπαρξη της πλήρως πρωτονιωμένης μορφής της σε όξινα διαλύματα. Συμπέραναν ότι η ένταση και η διάρκεια της χημειοφωταύγειας αυξάνεται με στεγνό και αποσυντεθημένο αίμα, χρονικής διάρκειας αποσύνθεσης ακόμα και 3 ετών, σε σχέση με το νωπό αίμα. Επιπλέον, παρατήρησαν ότι όσο ψέκαζαν με διάλυμα λουμινόλης πάνω στο αίμα, η λουμινόλη χημειοφωταυγούσε εκ νέου. Ο Mc Grath το 1942 αξιολόγησε την εξειδίκευση του test της λουμινόλης σε βιολογικά υγρά και απέδειξε ότι εμφανίζει εξειδίκευση για το αίμα, ενώ δεν φαινόταν ευαίσθητη στα υπόλοιπα βιολογικά υγρά. Ο Grodsky το 1951 πρότεινε ένα μίγμα από λουμινόλη, ανθρακικό νάτριο (Na_2CO_3) και υπερβορικό νάτριο $\text{NaBO}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ σε νερό. Αυτό είναι το κύριο μίγμα το οποίο χρησιμοποιούν μέχρι και σήμερα οι ερευνητές σε σκηνές εγκλήματος. Άλλο μίγμα που προτάθηκε από το Weber το 1966 αποτελείται από υδατικό διάλυμα λουμινόλης και NaOH ή KOH .

4.3 Φυσικοχημικές Ιδιότητες Λουμινόλης

Η λουμινόλη είναι ένα κυκλικό ακυλο-υδραζίδιο. Τα διαλύματά της είναι ευαίσθητα στο φως και στην παρουσία μεταλλικών κατιόντων, ενώ τυπικά είναι σταθερά για 8 με 12 ώρες. Επιπλέον, η λουμινόλη είναι θερμικά

ασταθής, με αποτέλεσμα να πρέπει να προστατεύεται, τόσο αυτή όσο και τα διαλύματά της, από υψηλές θερμοκρασίες.

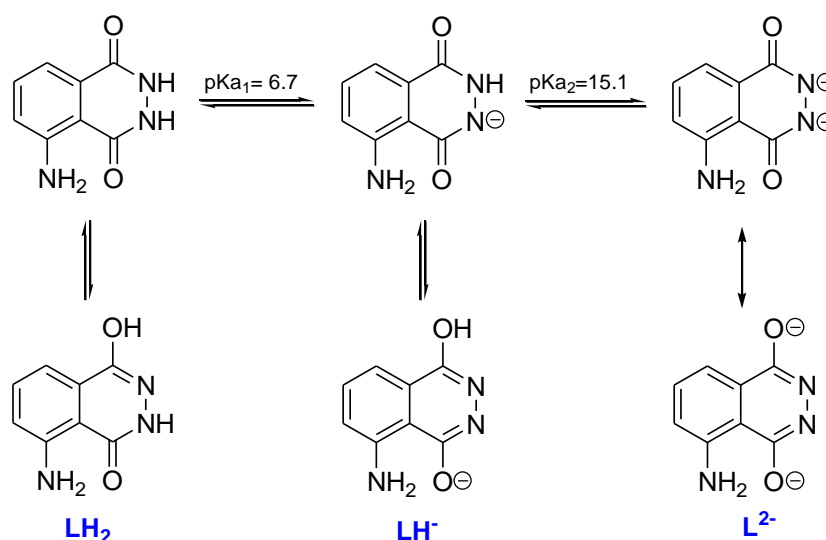
Η λουμινόλη μπορεί να απαντηθεί και με άλλες ονομασίες, όπως 5-αμινο-2,3-διυδροφθαλαζιν-1,4-διόνη (κατά IUPAC), ή 3-αμινοφθαλυδραζίδιο.

Ο μοριακός τύπος είναι $C_8H_7N_3O_2$ και η μοριακή της μάζα 177,16 amu.

Η διαλυτότητά της στο νερό είναι μικρότερη από 0.1g / 100ml σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ οπτικά είναι υποκίτρινο στερεό.

Οι τοξικολογικές της ιδιότητες δεν έχουν ερευνηθεί πλήρως πάνω στον άνθρωπο. Έχει παρατηρηθεί ερεθισμός στα μάτια, στο δέρμα, προβλήματα στην αναπνοή και στο γαστρεντερικό (από ναυτία, μέχρι διάρροια), αλλά δεν έχει αναφερθεί κάποιο χρόνιο πρόβλημα.

Η λουμινόλη θεωρείται ασθενές οξύ, έχει δύο διαφορετικές τιμές pK_a που αντιστοιχούν σε απώλεια των δύο πρωτονίων του ακυλυδραζιδίου, $pK_{a1} = 6.7$ και $pK_{a2} = 15.1$ (Σχήμα 4). Έτσι, σε υδατικό διάλυμα η λουμινόλη μπορεί να βρεθεί στη πλήρως πρωτονιωμένη μορφή σε όξινα διαλύματα (LH_2), ενώ σε βασικό διάλυμα θα βρίσκεται στη μορφή του μονοανιόντος (LH^-) και του διανιόντος (L^{2-}). Όλες οι μορφές υφίστανται κετο-ενολική ταυτομέρεια, τόσο σε διάλυμα, όσο και σε στερεά κατάσταση.



Σχήμα 4 Τα ταυτομερή της λουμινόλης σε όξινο (LH_2) και βασικό διάλυμα (LH^- , L^{2-}).

4.4 Λουμινόλη και Χημειοφωταύγεια

4.4.1 Γενικά

Όπως προαναφέρθηκε, ο Albrecht ήταν ο πρώτος που ανέφερε την χημειοφωταύγεια της λουμινόλης το 1928. Η αντίδραση χημειοφωταύγειας περιλαμβάνει την οξειδωση της λουμινόλης από κάποιο οξειδωτικό (O_2 , H_2O_2 , $HClO$, $KMnO_4$, KIO_4 , $NaBrO$), συνήθως παρουσία καταλύτη, όπως σιδηροκυανιούχα άλατα, $Fe(CN)_6^{-3}$, χαλκός (II), κοβάλτιο (II) ή ένζυμα (υπεροξειδάσες). Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται κάποια οξειδωτικά που προκαλούν την αντίδραση χημειοφωταύγειας. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα συνήθως σε αλκαλικό διάλυμα. Το φάσμα εκπομπής της χημειοφωταύγειας είναι ταυτόσημο με αυτό του φθορισμού του προϊόντος οξειδωσης, του 3-αμινοφθαλικού ανιόντος. Σε υδατικά διαλύματα, το φως που παρατηρείται κυμαίνεται μεταξύ μπλε-μωβ και μπλε-πράσινου, αν και η φασματική περιοχή της εκπομπής είναι συχνά ευρεία και το παρατηρούμενο μέγιστο εξαρτάται από πολλές παραμέτρους της αντίδρασης όπως η παρουσία αίματος που απορροφά ισχυρά στα 420nm και λειτουργεί σαν εσωτερικό φίλτρο, μετατοπίζοντας έτσι την παρατηρούμενη χημειοφωταύγεια της λουμινόλης στα 450nm [28].

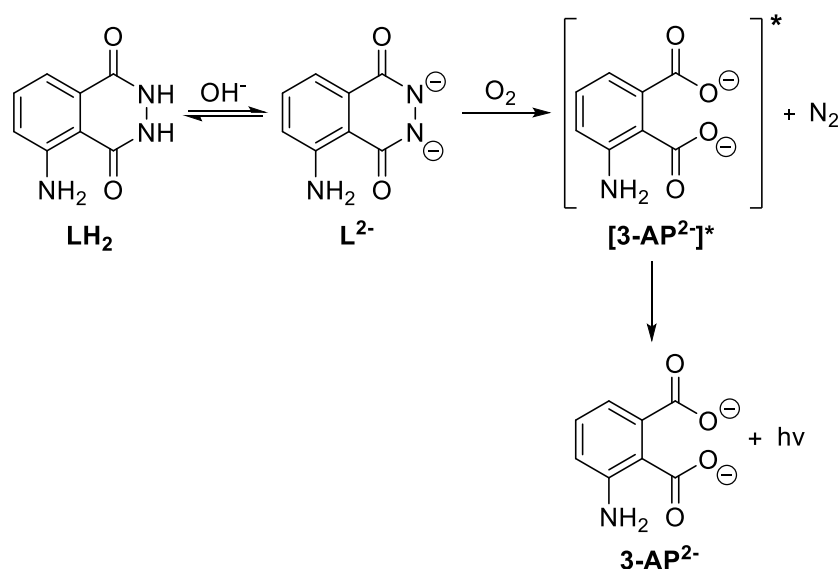
Στον Πίνακα 1, παρουσιάζονται κάποια από τα οξειδωτικά που έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση φωτονιακών αποδόσεων της αντίδρασης της λουμινόλης [30].

Οξειδωτικό	Καταλύτης
H_2O_2 /αιμοσφαιρίνη	μεταβατικά μεταλλικά κατιόντα
$NaOCl$, $NaOBr$	Cr^{2+} Hg^{2+} Mn^{2+}
$H_2S_2O_8$	Ni^{2+}
$K_3Fe(CN)_6$	Cu^{2+} Co^{2+} Fe^{3+}
NO_2	Fe^{2+}

Πίνακας 1: οξειδωτικά που αντιδρούν με λουμινόλη και παράγουν φως.

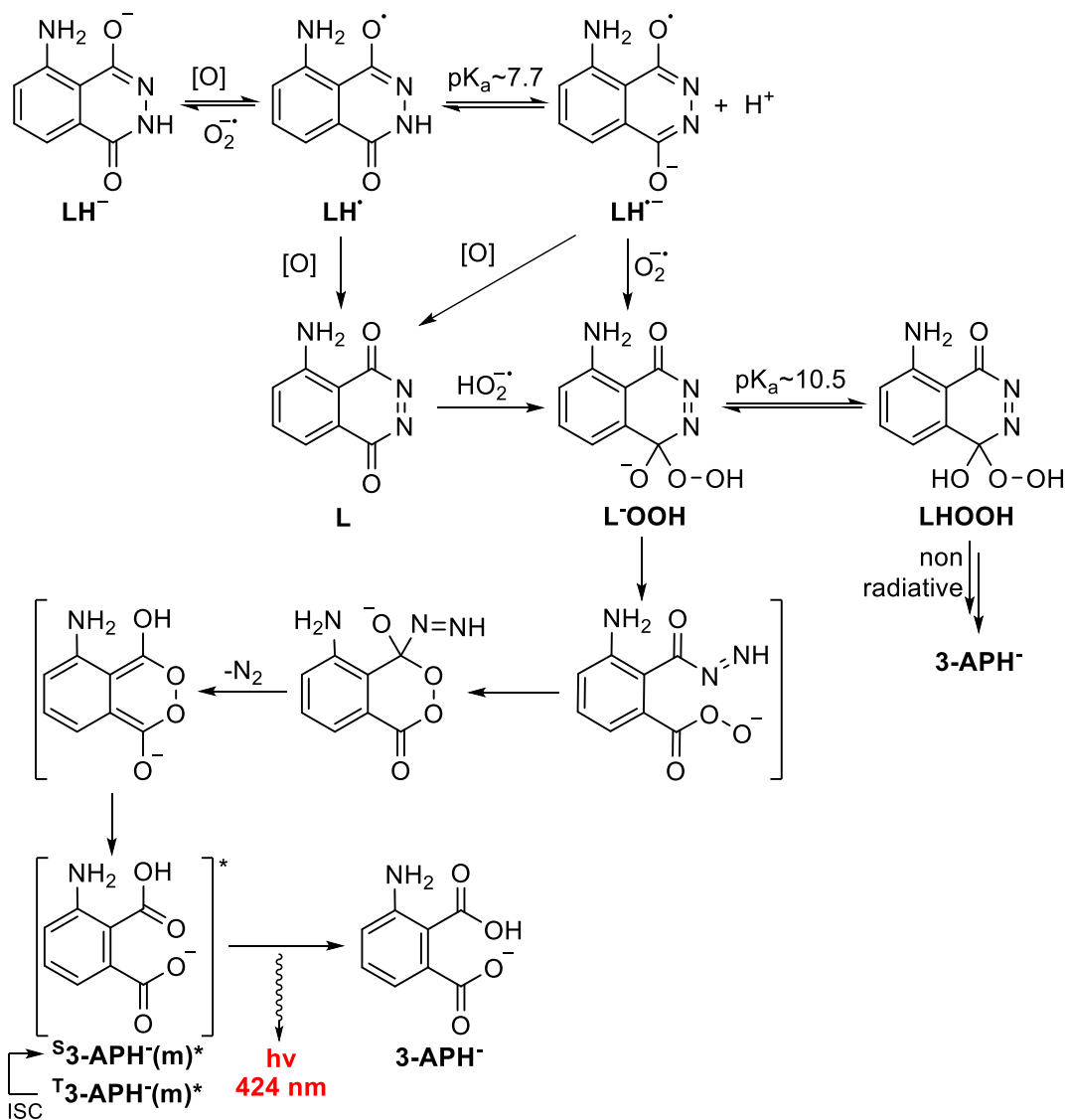
4.4.2 Μηχανισμός Χημειοφωταύγειας Λουμινόλης

Ο ακριβής μηχανισμός χημειοφωταύγειας της λουμινόλης δεν είναι πλήρως γνωστός, παρόλο που έχει διερευνηθεί εκτενώς τόσο σε υδατικά διαλύματα (παρουσία NaOH και οξειδωτικών, όπως $K_3[Fe(CN)_6]/H_2O_2$), όσο και σε μη πρωτικούς πολικούς διαλύτες (DMF, DMSO, παρουσία NaOH). Έχει αποδειχθεί ότι η ένταση χημειοφωταύγειας εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το pH του διαλύματος (συνήθως >10) και από τους καταλύτες / οξειδωτικά μέσα που χρησιμοποιούνται κάθε φορά. Σε πολικούς μη πρωτικούς διαλύτες (π.χ. DMSO), η χημειοφωταύγεια προκαλείται μόνο παρουσία βάσης. Επίσης, η παρουσία του οξυγόνου είναι απαραίτητη, καθώς έχει βρεθεί ότι σε απαερωμένα διαλύματα δεν προκαλείται χημειοφωταύγεια. Ο πιθανός μηχανισμός χημειοφωταύγειας σε DMSO περιλαμβάνει το σχηματισμό του διανιόντος L^{2-} παρουσία βάσης, το οποίο οξειδώνεται από το στοιχειακό οξυγόνο προς την απλή διεγερμένη κατάσταση του 3-αμινοφθαλικού ανιόντος $3-AP^{2-}$ (πιθανότατα μέσω της τριπλής διεγερμένης κατάστασης), το οποίο με τη σειρά του αποδιεγείρεται στη βασική κατάσταση, δίνοντας το χαρακτηριστικό φθορισμό (Σχήμα 5).



Σχήμα 5 Η προτεινόμενη αντίδραση χημειοφωταύγειας της λουμινόλης σε DMSO.

Ο μηχανισμός χημειοφωταύγειας της λουμινόλης σε υδατικά διαλύματα έχει διερευνηθεί εκτενέστερα, χωρίς όμως να έχει αποδειχθεί πέρα από κάθε αμφιβολία. Ο πιο κοινά αποδεκτός είναι αυτός που προτάθηκε από τον Merenyi και την ερευνητική ομάδα (Σχήμα 6). [31] Η λουμινόλη, όπως φαίνεται στο Σχήμα 6, σε αλκαλικά διαλύματα βρίσκεται με την μορφή του μονοανιόντος LH^- . Πραγματοποιείται οξειδωση του LH^- προς σχηματισμό της ρίζας LH^{\bullet} . Στη συνέχεια, η ρίζα LH^{\bullet} αποπρωτονιώνεται προς την ανιοντική ρίζα $LH^{\bullet-}$, η οποία είτε μπορεί να αντιδράσει με την ρίζα $O_2^{\bullet-}$, προς σχηματισμό του υπεροξειδίου $L^{\bullet}OOH$, είτε να οξειδωθεί προς σχηματισμό της μη χημειοφωταυγούς αμινοφθαλαζίνης L. Η τελευταία μπορεί να προκύψει και από την οξειδωση της LH^{\bullet} . Η L (προερχόμενη από το LH^{\bullet} ή από το $LH^{\bullet-}$) οξειδώνεται προς το $L^{\bullet}OOH$ από το H_2O_2 , γεγονός που εξηγεί την αυξημένη κβαντική απόδοση της χημειοφωταύγειας που έχει παρατηρηθεί κατά την προσθήκη H_2O_2 . Η ισορροπία $L^{\bullet}OOH \leftrightarrow LHOOH$ φαίνεται να είναι μεγάλης σημασίας για την αντίδραση χημειοφωταύγειας, καθώς όταν τείνει προς το $L^{\bullet}OOH$, αυτό υπόκειται σε απόσπαση αζώτου (μέσω των ενδιάμεσων) προς την τριπλή διεγερμένη κατάσταση του 3-αμινοφθαλικού ανιόντος ${}^3[3-APH^-]^*$, και στη συνέχεια στην απλή ${}^1[3-APH^-]^*$. [32] Η τελευταία χημειοφωταυγεί αποδιεγειρόμενη προς τη θεμελιώδη κατάσταση του 3-APH $^-$. [33] Όταν όμως επικρατεί η πρωτονιωμένη μορφή LHOOH, αυτή οδηγεί πάλι στο 3-αμινοφθαλικό ανιόν, αυτή τη φορά όμως μέσω μιας «σκοτεινής» αλληλουχίας αντιδράσεων, χωρίς δηλαδή την παραγωγή χημειοφωταύγειας. Βασικός λοιπόν παράγοντας που καθορίζει τη διάσπαση του ενδιάμεσου $L^{\bullet}OOH$, και κατ' επέκταση την ένταση χημειοφωταύγειας της λουμινόλης, είναι η τιμή του pH στο διάλυμα. Ειδικότερα, σε τιμές $pH < 10.5$ ευνοείται η μορφή LHOOH (σκοτεινή αντίδραση), ενώ σε τιμές $pH > 10.5$ ευνοείται η μορφή $L^{\bullet}OOH$ (χημειοφωταυγής αντίδραση).

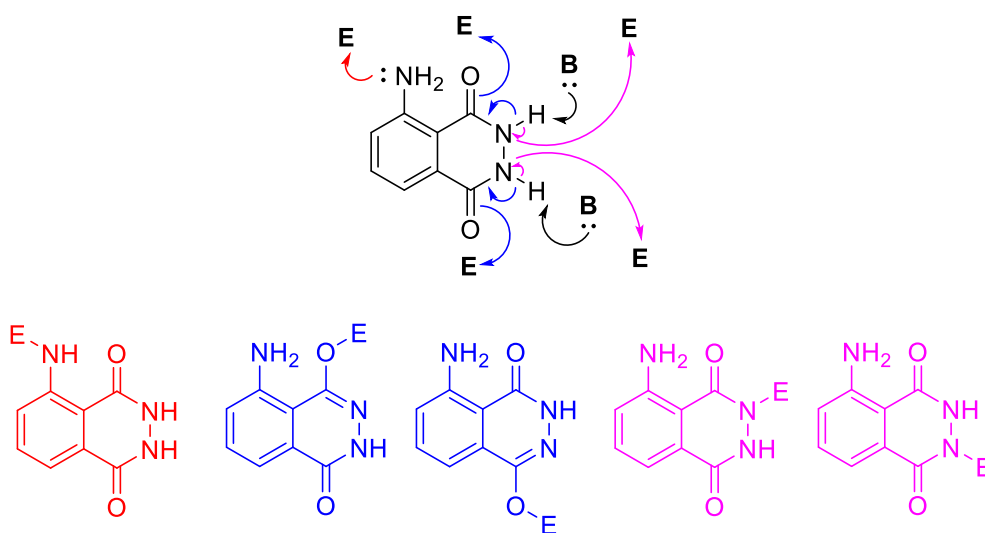


Σχήμα 6: Προτεινόμενος μηχανισμός χημειοφωταύγειας της λουμινόλης σε υδατικά διαλύματα.

4.5 Χημεία της λουμινόλης

Λόγω των πολλαπλών εφαρμογών της λουμινόλης στην αναλυτική χημεία, τη βιοανάλυση, την εγκληματολογία, κλπ., έχουν γίνει προσπάθειες σύνθεσης παραγώγων της προκειμένου να μεγιστοποιηθεί η απόδοση χημειοφωταύγειας και να διευρυνθεί η περιοχή του φάσματος εκπομπής της. Ωστόσο, η χημεία της λουμινόλης είναι αρκετά περιορισμένη, όπως διαπιστώνεται από τα μέχρι τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα, ενώ οι περισσότερες συνθετικές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί πριν τη δεκαετία του 1950, όπου δεν υπήρχε ο σημερινός προηγμένος εργαστηριακός

εξοπλισμός και οι προηγμένες μέθοδοι ανάλυσης. [34] [35] Γενικά, από προηγούμενες μελέτες και αποτελέσματα, η λουμινόλη φαίνεται να έχει 5 πυρηνόφιλα κέντρα (Σχήμα 7). Το πιο προφανές κέντρο είναι η 5-άμινο ομάδα. Επιπλέον, τα πρωτόνια της υδραζίνης είναι αρκετά όξινα, οπότε, παρουσία βάσης (έστω και ασθενούς), η λουμινόλη αποπρωτονιώνεται οδηγώντας στο μονοανιόν, στο οποίο το αρνητικό φορτίο εντοπίζεται στην 2-N ή 3-N θέση. Έτσι, το μονοανιόν στις δυο αυτές θέσεις μπορεί είτε να αντιδράσει με ένα ηλεκτρονιόφιλο κέντρο, είτε να δώσει την ενολική του μορφή, όπου το αρνητικό φορτίο εντοπίζεται στην 1-O ή 4-O θέση. Συνοψίζοντας, η αντίδραση της λουμινόλης με ένα ηλεκτρονιόφιλο παρουσία βάσης μπορεί να αποδώσει 5 ισομερή προϊόντα (Σχήμα 7).

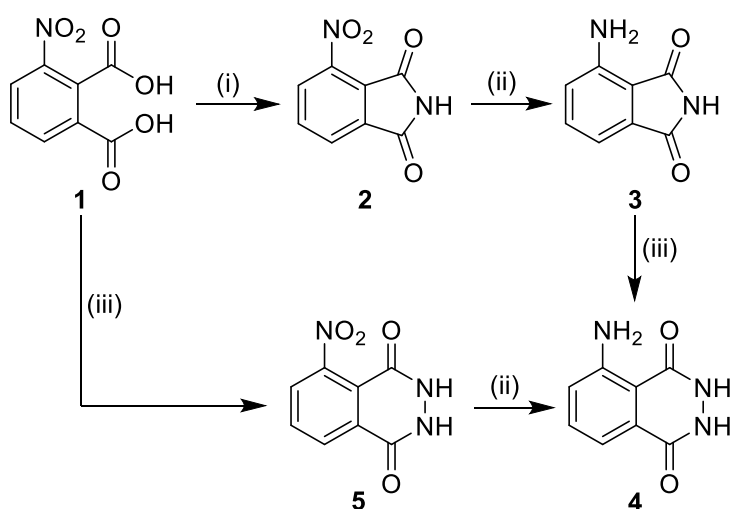


Σχήμα 7. Οι πιθανές πορείες της αντίδρασης της λουμινόλης με ένα ηλεκτρονιόφιλο E παρουσία βάσης B.

4.5.1 Σύνθεση της λουμινόλης

Ανάμεσα σε μια μεγάλη ποικιλία από ετεροκυκλικές ενώσεις που έχουν συντεθεί και περιέχουν τη χαρακτηριστική ομάδα της φθαλαζίνης, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η λουμινόλη [36]. Αρχικά, η σύνθεση της λουμινόλης επιτεύχθηκε σε απόδοση μόλις 35%, μέσω αντίδρασης υδραζιόλυσης του 3-νιτροφθαλικού οξέος σε διαλύτη γλυκόλη υπό επαναρροή και στη συνέχεια αντίδραση αναγωγής από διθειώδες νάτριο. [37] [38] Σήμερα,

χρησιμοποιούνται δύο εναλλακτικές συνθετικές πορείες, ξεκινώντας από το 3-νιτροφθαλικό οξύ, όπως συνοψίζονται στο Σχήμα 8. [39] Στην πρώτη, το 3-νιτροφθαλικό οξύ υποβάλλεται σε αντίδραση με ουρία σε διαλύτη οξικό οξύ υπό επαναρροή, προς σχηματισμό του 3-νιτροφθαλιμιδίου, το οποίο στη συνέχεια ανάγεται με σκόνη σιδήρου σε υδατικό διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου με θέρμανση, ή με καταλυτική υδρογόνωση, χρησιμοποιώντας Pd/C σε αιθανόλη. Τελικά, σχηματίζεται το 3-αμινοφθαλιμίδιο, το οποίο με την σειρά του αντιδρά με ένυδρη υδραζίνη σε αιθανόλη υπό αναρροή, παράγοντας λουμινόλη. Η δεύτερη συνθετική πορεία περιλαμβάνει την αντίδραση του 3-νιτροφθαλικού οξέος με υδραζίνη προς σχηματισμό της 5-νιτρο-2,3-διυδροφθαλαζιν-1,4-διόνης, η οποία δίνει τη λουμινόλη μέσω αναγωγής της νιτρο ομάδας υπό τις ίδιες συνθήκες.



Σχήμα 8. Συνθετικές πορείες της λουμινόλης. Συνθήκες: (i) ουρία, AcOH, Δ, (ii) Fe/ NH₄Cl/ H₂O, Δ ή H₂, Pd/C, EtOH, (iii) N₂H₄ H₂O, EtOH, Δ.

4.5.2 Παράγωγα της λουμινόλης

Κάποια παράγωγα της λουμινόλης και γενικότερα της φθαλαζινοδιόνης έχουν συντεθεί και μελετηθεί ως προς την εκπομπή χημειοφωταύγειας. Η σύνθεση των παραγώγων της λουμινόλης ξεκινάει ως επί τον πλείστον από πρόδρομα

μόρια της, ενώ οι σχετικές αναφορές σε είναι ελάχιστες και χρονολογούνται πριν το 1950.

Ο Drew και η ερευνητική του ομάδα καινοτόμησαν στη σύνθεση και την αξιολόγηση χημειοφωταύγειας των παραγώγων λουμινόλης [40] [41]. Συγκεκριμένα, έχουν αναφέρει ότι η υποκατάσταση του αρωματικού δακτυλίου των παραγώγων της λουμινόλης μπορεί είτε να ενισχύσει την κβαντική απόδοση χημειοφωταύγειας (Φ_{CL}), είτε να αδρανοποιήσει τον μηχανισμό χημειοφωταύγειας.

Μερικές γενικές παρατηρήσεις που μπορούν να εξαχθούν από τη σχετική δημοσιευμένη εργασία είναι:

- 1) Οι ομάδες δότες ηλεκτρονίων στον αρωματικό δακτύλιο αυξάνουν τη χημειοφωταύγεια, ενώ το αντίθετο ισχύει για τις ομάδες δέκτες ηλεκτρονίων.
- 2) Η υποκατάσταση στις θέσεις 5- και 8- έχει ισχυρότερη επίδραση σε σύγκριση με αυτή στις θέσεις 6- και 7-.
- 3) Η 5,8-διυποκατάσταση πιθανότατα έχει ισχυρότερη επίδραση από τη μονοϋποκατάσταση.
- 4) Η ένταση της χημειοφωταύγειας κάθε ένωσης εξαρτάται από τις συνθήκες οξειδωσης (οξειδωτικό, θερμοκρασία κλπ).
- 5) Το μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής αλλάζει ανάλογα με το παράγωγο.
- 6) Η αντικατάσταση της 5-αμινο ομάδας από H, Me, NO₂ ή Cl, μειώνει στο ελάχιστο την ένταση της χημειοφωταύγειας.
- 7) Η ισολουμινόλη (6-άμινο ισομερές της λουμινόλης) εμφανίζει Φ_{CL} μειωμένη κατά 90% σε σύγκριση με τη λουμινόλη. [42]
- 8) Τα 6-*N*-διαλκυλιωμένα παράγωγα της ισολουμινόλης εμφανίζουν έως και διπλάσια Φ_{CL} σε σχέση με τη λουμινόλη.

4.6 Αμινο-αλκυλιωμένα παράγωγα της λουμινόλης

Έχει βρεθεί ότι μεθυλίωση της αμινομάδας της λουμινόλης οδηγεί σε μείωση της έντασης χημειοφωταύγειας σε σύστημα NaOH/αιμίνη/H₂O₂, ενώ διμεθυλίωση σε ακόμα σημαντικότερη μείωση. [46] [27] Αυτή η παρατήρηση έχει αποδοθεί σε ηλεκτρονικές και στερεοχημικές αλληλεπιδράσεις, καθώς η αλκυλίωση της άμινο ομάδας καθιστά ηλεκτρονιακά πλούσιο τον αρωματικό δακτύλιο. Στην περίπτωση της λουμινόλης, όσο πιο ογκώδης είναι η *N*-άλκυλο ομάδα, τόσο το ασύζευκτο ζεύγος ηλεκτρονίων του αζώτου αποκλίνει από το επίπεδο που είναι κάθετο στον αρωματικό δακτύλιο, με αποτέλεσμα το φαινόμενο συντονισμού να είναι ασθενέστερο, όπως και η ένταση της χημειοφωταύγειας.

Η μόνη δημοσιευμένη μέθοδος παρασκευής 5-*N*-αλκυλιωμένων παραγώγων της λουμινόλης είναι μέσω αντίδρασης με αλκυλοβρωμίδιο σε *N,N'*-διμεθυλοφορμαμίδιο παρουσία βάσης. Όπως όμως θα δειχθεί παρακάτω, η αλκυλίωση με αυτή τη μέθοδο δεν είναι πραγματοποιήσιμη (με τον δημοσιευμένο χαρακτηρισμό των προϊόντων αλκυλίωσης να είναι λανθασμένος), με αποτέλεσμα να μην υπάρχει κάποια αξιόπιστη βιβλιογραφική πορεία να ακολουθηθεί για την αλκυλίωση της λουμινόλης. [47]

Αντίθετα με τη λουμινόλη, όσων αφορά στην ισολουμινόλη, έχουν αναφερθεί ορισμένες συνθέσεις 6-*N*-αλκυλιωμένων και 6-*N,N*-διαλκυλιωμένων παραγώγων, τα οποία όπως προαναφέρθηκε εμφανίζουν ισχυρή χημειοφωταύγεια. Η σύνθεση των παραγώγων αυτών δεν γίνεται μέσω αλκυλίωσης της λουμινόλης, αλλά μέσω αλκυλίωσης του προδρόμου φθαλιμιδίου, το οποίο στη συνέχεια με μια αντίδραση υδραζινόλυσης δίνει τα αλκυλιωμένα παράγωγα της ισολουμινόλης. [44] Θα πρέπει να τονιστεί ότι ενώ οι αμίνες γενικά είναι καλά πυρηνόφιλα, η άμινο ομάδα της λουμινόλης, της ισολουμινόλης και των αντίστοιχων φθαλιμιδίων είναι αρκετά ασθενές πυρηνόφιλο. Για παράδειγμα, η αντίδραση της αμμωνίας με αλκυλαλογονίδια σπάνια δίνει καθαρά προϊόντα, καθώς το προϊόν της υποκατάστασης είναι περισσότερο πυρηνόφιλο από την αρχική αμίνη, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολη η απομόνωση του μονο-αλκυλιωμένου παραγώγου. [43] Στην περίπτωση όμως αλκυλίωσης των φθαλιμιδίων, αναφέρεται το προϊόν

μονοαλκυλίωσης ως το κύριο προϊόν, και μάλιστα σε αρκετά δραστικές συνθήκες, υποδεικνύοντας τον ασθενή πυρηνόφιλο χαρακτήρα της εν λόγω άμινο ομάδας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

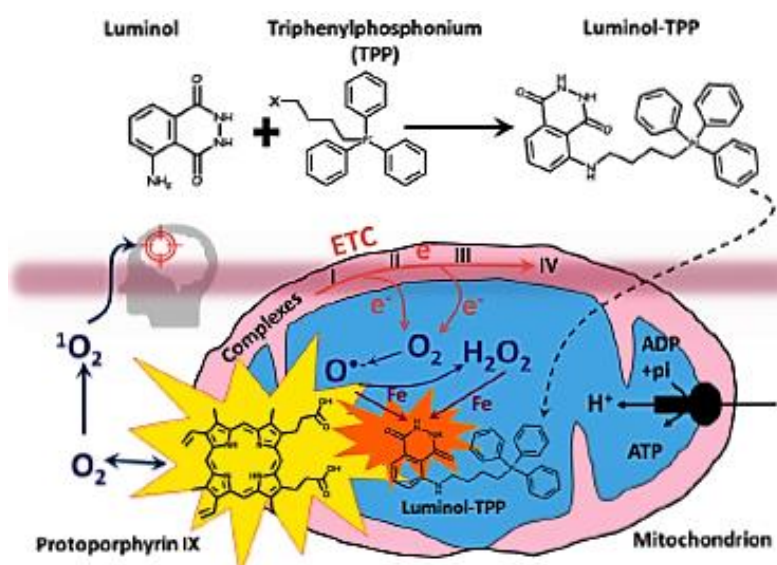
Το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα είναι ένα από τα πιο επιθετικά είδη καρκίνου. Το ποσοστό επιβίωσης από αυτή την ασθένεια είναι μόλις 4%. Αυτό καθιστά την ανάγκη καταπολέμησης του επιτακτική. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η σύνθεση, ο χαρακτηρισμός και η μελέτη μιας νέας οικογένειας ειδικά σχεδιασμένων φωτοενεργών οργανικών ενώσεων, οι οποίες θα χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη μιας πρωτοποριακής, μη επεμβατικής θεραπείας για το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα με βάση τη λουμινόλη .

Αυτές οι ενώσεις θα εμφανίζουν τα εξής χαρακτηριστικά:

1. Το ένα τους τμήμα θα αποτελείται από τη λουμινόλη ή παράγωγά της. Όπως είδαμε, η λουμινόλη έχει την ιδιότητα να χημειοφωταυγεί όταν βρεθεί στις κατάλληλες οξειδωτικές συνθήκες. Μέσα στο κύτταρο, υπάρχουν οι προϋποθέσεις ώστε η λουμινόλη να οξειδωθεί παράγοντας ακτινοβολία με $\lambda_{\max} = 425 \text{ nm}$, ένα μήκος κύματος το οποίο είναι στη περιοχή απορρόφησης της πρωτοπορφυρίνης IX.
2. Το άλλο τους τμήμα θα αποτελείται από τριφαινυλοφωσφονιακά κατιόντα, συνδεδεμένα με το τμήμα της λουμινόλης μέσω μίας αλειφατικής αλυσίδας. Με αυτό τον τρόπο, οι ενώσεις που θα συνθέσουμε θα μπορέσουν να κατευθυνθούν επιλεκτικά στα μιτοχόνδρια, και να διαπεράσουν τις μιτοχονδριακές μεμβράνες.
3. Τα δύο αυτά τμήματα θα συνδέονται με διαφορετικές γέφυρες, οι οποίες θα διαθέτουν διαφορετικό μήκος (αλκυλο-υποκατάστατες) ή μόρια αιθυλενογλυκόλης.

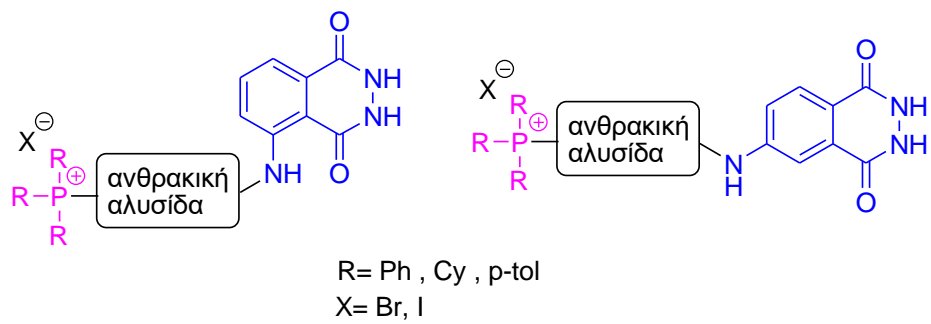
Η ιδεατή πορεία δράσης των ενώσεων-στόχων είναι η ακόλουθη: Η ένωση-στόχος εισέρχεται μέσα στο μιτοχόνδριο του κυττάρου, καρκινικό ή υγιές. Η συγκέντρωση της πρωτοπορφυρίνης IX, είναι αυξημένη στα καρκινικά κύτταρα, λόγω μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας στη πορεία ελέγχου της βιοσυνθετικής πορείας. Έτσι, από τη στιγμή που εισέρχεται η ειδικά τροποποιημένη (μιτοτροπική) λουμινόλη στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου του καρκινικού κυττάρου, και λόγω της ικανής συγκέντρωσης των ιόντων του

σιδήρου (καταλύτης της αντίδρασης χημειοφωταύγειας) και των δραστικών μορφών οξυγόνου $O_2^{\cdot-}$ και OH^{\cdot} , και H_2O_2 , ξεκινάει η οξειδωση της λουμινόλης. Τότε, εκπέμπεται η χαρακτηριστική ακτινοβολία με $\lambda_{max} \approx 425$ nm, στο μήκος κύματος δηλαδή που απορροφάει η πρωτοπορφυρίνη IX. Έτσι, τα μόρια πρωτοπορφυρίνης IX απορροφούν την εκπεμπόμενη ακτινοβολία, που προέρχεται από την οξειδωση της λουμινόλης, διεγείρονται και παράγουν οξυγόνο απλής κατάστασης. Αυτό αποτελεί ισχυρό κυτταροτοξικό παράγοντα, ο οποίος σκοτώνει επιλεκτικά τα καρκινικά κύτταρα, καθώς αυτά εμφανίζουν μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτοπορφυρίνης IX σε σχέση με τα υγιή.



Σχήμα 9. Γενική επισκόπηση της αναμενόμενης δράσης της ειδικά τροποποιημένης λουμινόλης.

Με βάση το παραπάνω σκεπτικό, στόχος της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι η σύνθεση μιτοτροπικών παραγώγων της λουμινόλης και ισολουμινόλης που εμφανίζουν τη γενική δομή του Σχήματος 10: Η σύνθεσή τους στηρίζεται στην αλκυλίωση της ελεύθερης αμινομάδας της λουμινόλης με τα κατάλληλα παράγωγα ανθρακικής αλυσίδας, που φέρουν φωσφονιακά κατιόντα. Τα προϊόντα αυτά συνδυάζουν τα επιθυμητά χαρακτηριστικά, έτσι ώστε να αποτελέσουν ενώσεις με πιθανή δράση κατά του πολύμορφου γλοιοβλαστώματος.

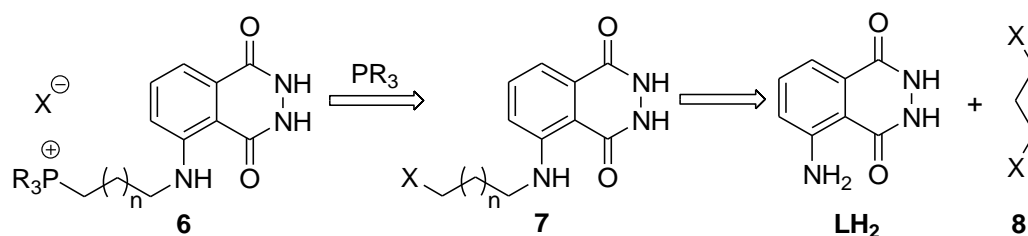


Σχήμα 10. Γενική δομή των μιτοτροπικών παραγώγων της λουμινόλης και της ισολουμινόλης (ενώσεις στόχοι).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Διερεύνηση συνθηκών αλκυλίωσης της λουμινόλης

Σκοπός του πρώτου μέρους της παρούσας εργασίας είναι η σύνθεση μιτοτροπικών 5-άμινο αλκυλιωμένων παραγώγων της λουμινόλης. Σε αυτό το κεφάλαιο παρουσιάζονται οι μεθοδολογίες που εφαρμόστηκαν για τη σύνθεση κατάλληλων ενδιάμεσων 5-*N*-αλκυλιωμένων παραγώγων της λουμινόλης. Ο σκοπός της σύνθεσης των παραγώγων αυτών είναι να χρησιμοποιηθούν ως πρόδρομες ενώσεις στη σύνθεση των επιθυμητών μιτοτροπικών ενώσεων στόχων. Μία τέτοια προσέγγιση φαίνεται στο ρετροσυνθετικό Σχήμα 11. Τα μιτοτροπικά παράγωγα **6** θα προέλθουν από την αντίδραση πυρηνόφιλης αλειφατικής υποκατάστασης μεταξύ μιας τριάρυλο ή τριάλυλο φωσφίνης και του αλκυλιωμένου παραγώγου της λουμινόλης **7**. Το τελευταίο θα προέλθει από την αλκυλίωση της άμινο ομάδας λουμινόλης από ένα κατάλληλα (στα άκρα) διυποκατεστημένο παράγωγο αλειφατικής αλυσίδας **8** με καλές αποχωρούσες ομάδες X.

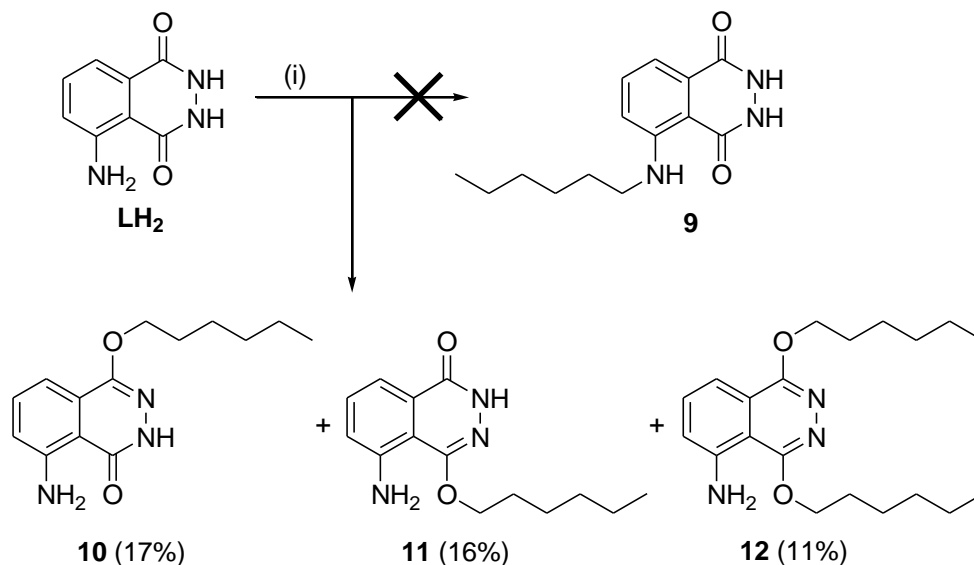


Σχήμα 11. Ρετροσυνθετικό σχήμα των μιτοτροπικών παραγώγων **6** της λουμινόλης.

6.1 Αλκυλίωση λουμινόλης

Από τη στιγμή που η 5-*N*-αλκυλίωση της λουμινόλης κρίνεται ως απαραίτητο βήμα στη σύνθεση των τελικών παραγώγων, θεωρήθηκε αναγκαίο να διερευνηθεί αυτή η αντίδραση, καθώς η υπάρχουσα βιβλιογραφία, όπως προαναφέρθηκε (Κεφάλαιο 4.6), είναι αρκετά περιορισμένη.

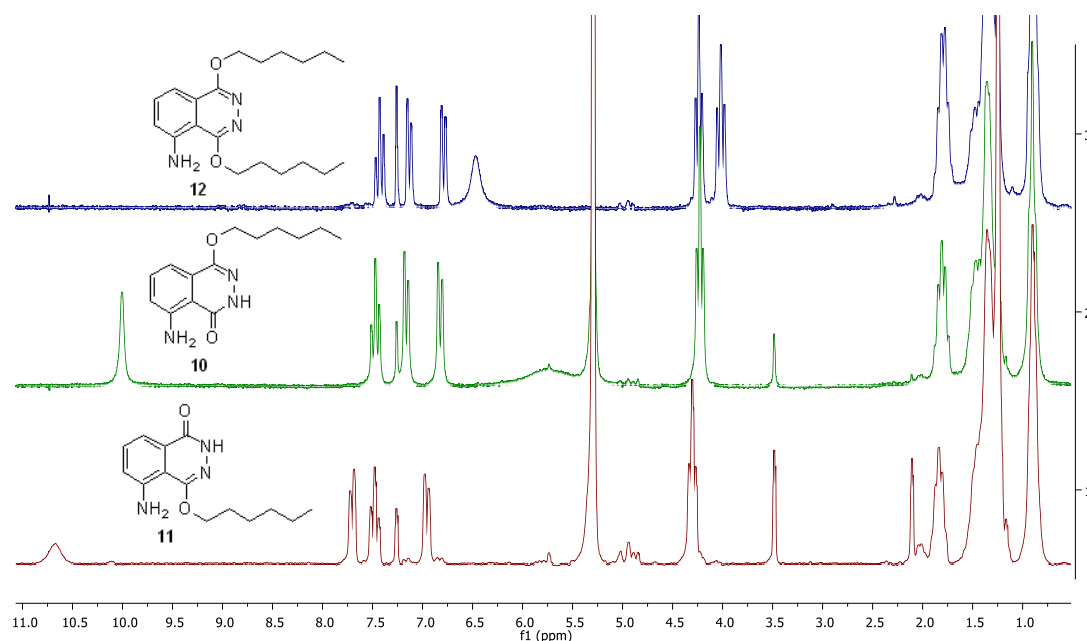
Κατ' αρχήν διερευνήθηκε η αλκυλίωση με ένα απλό αλκυλοβρωμίδιο, σε συνθήκες που αναφέρονταν στη βιβλιογραφία [48]. Έτσι, διάλυμα λουμινόλης και βρωμοεξανίου σε DMF θερμάνθηκε παρουσία ανθρακικού καλίου για 24 ώρες στους 90 °C. Το αποτέλεσμα δεν ήταν η βιβλιογραφικά αναμενόμενη 5-*N*-αλκυλιωμένη λουμινόλη (**9** Σχήμα 12), αλλά ένα μίγμα προϊόντων, το οποίο αφού διαχωρίστηκε με χρωματογραφία στήλης, διαπιστώθηκε ότι αποτελούνταν από τις *O*-αλκυλιωμένες ενώσεις **10-12**.



Σχήμα 12. Αλκυλίωση της λουμινόλης παρουσία βάσης. Συνθήκες: (i) Βρωμοεξάνιο, K₂CO₃, DMF, 90°C, 24h

Και οι 3 αυτές ενώσεις είναι διαλυτές σε χλωροφόρμιο (σε αντίθεση με τη λουμινόλη). Η ταυτοποίηση των προϊόντων βασίστηκε στα παρακάτω δεδομένα. Το ¹H-NMR του λιγότερο πολικού κλάσματος συμφωνεί με τη δομή της **12** (Εικόνα 9), καθώς εμφανίζει δύο έξυλο ομάδες για μία μονάδα λουμινόλης. Επίσης, η απουσία υδραζιδικών NH πρωτονίων και η παρουσία σήματος NH₂ (ευρεία στα 6.47 ppm) υποδηλώνει αλκυλίωση στο υδραζιδικό τμήμα της λουμινόλης και όχι στην 5-άμινο ομάδα. Τέλος, τα α-μεθυλενικά πρωτόνια των έξυλο ομάδων εμφανίζονται αρκετά αποπροστατευμένα, στα 4.23 και 4.01 ppm ως δύο τριπλές κορυφές, γεγονός που υποδεικνύει *O*-υποκατάσταση και όχι *N*-υποκατάσταση. Τη δομή αυτή υποδεικνύει και το φάσμα μάζας της ένωσης.

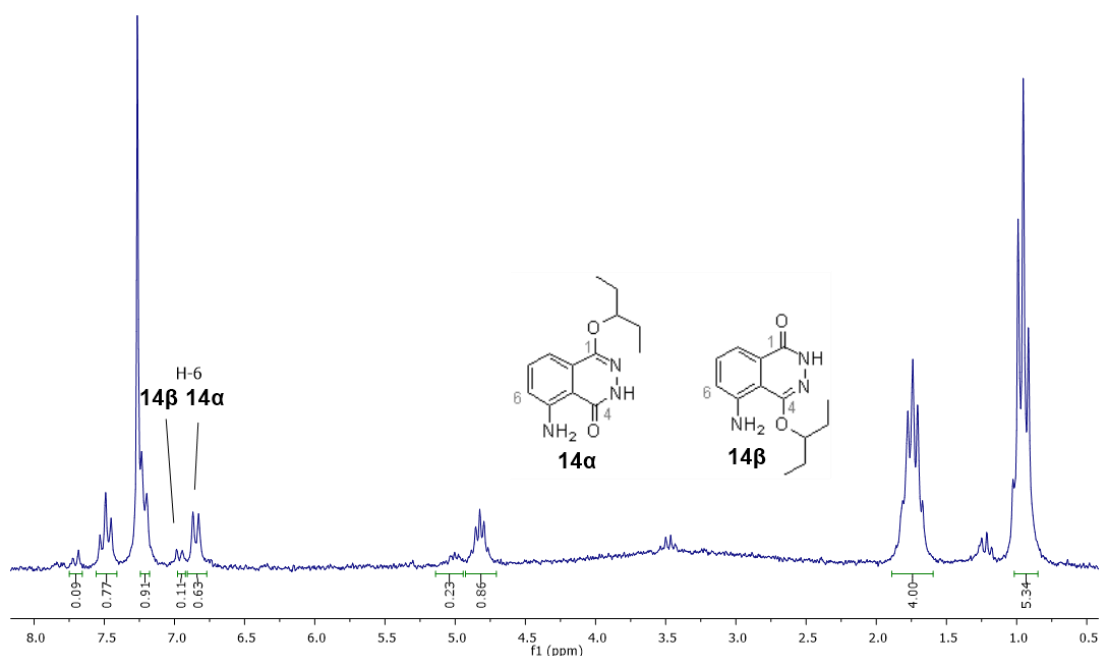
Τα επόμενα δύο κλάσματα που απομονώθηκαν από τη χρωματογραφία στήλης διαχωρίστηκαν σχετικά δύσκολα, καθώς εμφάνιζαν παραπλήσιο R_f, και ταυτοποιήθηκαν ως οι μονο-Ο-αλκυλιωμένες ενώσεις **10** και **11**. Οι δύο αυτές ισομερείς ενώσεις εμφανίζουν ταυτόσημο μοριακό ιόν στο φάσμα μάζας, ενώ η τριπλή κορυφή που οφείλεται στα α-μεθυλενικά πρωτόνια της έξυλο ομάδας εμφανίζεται και εδώ αρκετά αποπροστατευμένη στα 4.23 και 4.31 ppm για τις **10** και **11** αντίστοιχα. Στα φάσματα ¹³C-NMR, οι Ο-μεθυλενικοί άνθρακες των **10** και **11** αντίστοιχα, εμφανίζονται αρκετά αποπροστατευμένοι στα 67.01 και 67.72 ppm. Η σημαντικότερη διαφοροποίηση μεταξύ των **10** και **11** έγκειται στις μετατοπίσεις των σημάτων των υδραζιδικών και των αρωματικών πρωτονίων. Το υδραζιδικό πρωτόνιο της **11** εμφανίζεται πιο αποπροστατευμένο (10.68 έναντι 10.01 ppm) από αυτό της **10**, ενώ σημαντική είναι η επίδραση της θέσης της υποκατάστασης στη χημική μετατόπιση του Η-8 (p-NH), το οποίο εμφανίζεται στα 7.71 ppm στη **11** έναντι 7.47 ppm στην **10**.



Εικόνα 9 Φάσματα ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) των ενώσεων **12** (πάνω), **10** (μέση) και **11** (κάτω).

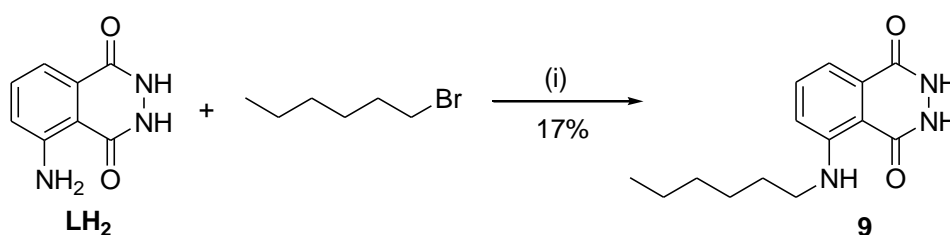
Επανάληψη της αντίδρασης αλκυλίωσης της λουμινόλης με 1-βρωμοεξάνιο (DMF, 90 °C) με άλλη βάση, η οποία λόγω αυξημένης διαλυτότητας, παρουσιάζει πιο βασικό χαρακτήρα (Cs₂CO₃ έναντι K₂CO₃), δεν

είχε διαφορετικό αποτέλεσμα. Με χρήση ασθενέστερης βάσης (Et_3N), δεν παρατηρήθηκε αντίδραση. Οι παραπάνω αντιδράσεις υποδεικνύουν ότι η αμινο ομάδα της λουμινόλης είναι πολύ ασθενές πυρηνόφιλο, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να δώσει αντίδραση υποκατάστασης σε αυτές τις συνθήκες. Η χρήση βάσης από την άλλη, αποπρωτονιώνει τα υδραζιδικά άτομα αζώτου, με αποτέλεσμα το σχηματισμό των ενολικών ανιόντων. Τα τελευταία φαίνεται ότι είναι ισχυρότερα πυρηνόφιλα από την αμινο ομάδα, δίνοντας αντιδράσεις πυρηνόφιλης υποκατάστασης. Είναι χαρακτηριστικό ότι όταν η ίδια αντίδραση επαναλήφθηκε, χρησιμοποιώντας το δευτεροταγές βρωμίδιο 3-βρωμοπεντάνιο αντί για το 1-βρωμοεξάνιο, απομονώθηκε ένα μίγμα του οποίου το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ υποδείκνυε την ύπαρξη κατά κύριο λόγο της **14α** και σε μικρότερο βαθμό της **14β**, (Εικόνα 10). Αυτή η διαφοροποίηση υποδεικνύει ότι οι στερικοί παράγοντες (γειτονική αμινο ομάδα) παίζουν σημαντικό ρόλο σε αυτή την περίπτωση και ευνοούν σημαντικά την 1-Ο έναντι της 4-Ο υποκατάστασης.



Εικόνα 10 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) του μίγματος της αντίδρασης της λουμινόλης με 3-βρωμοπεντάνιο παρουσία K_2CO_3 .

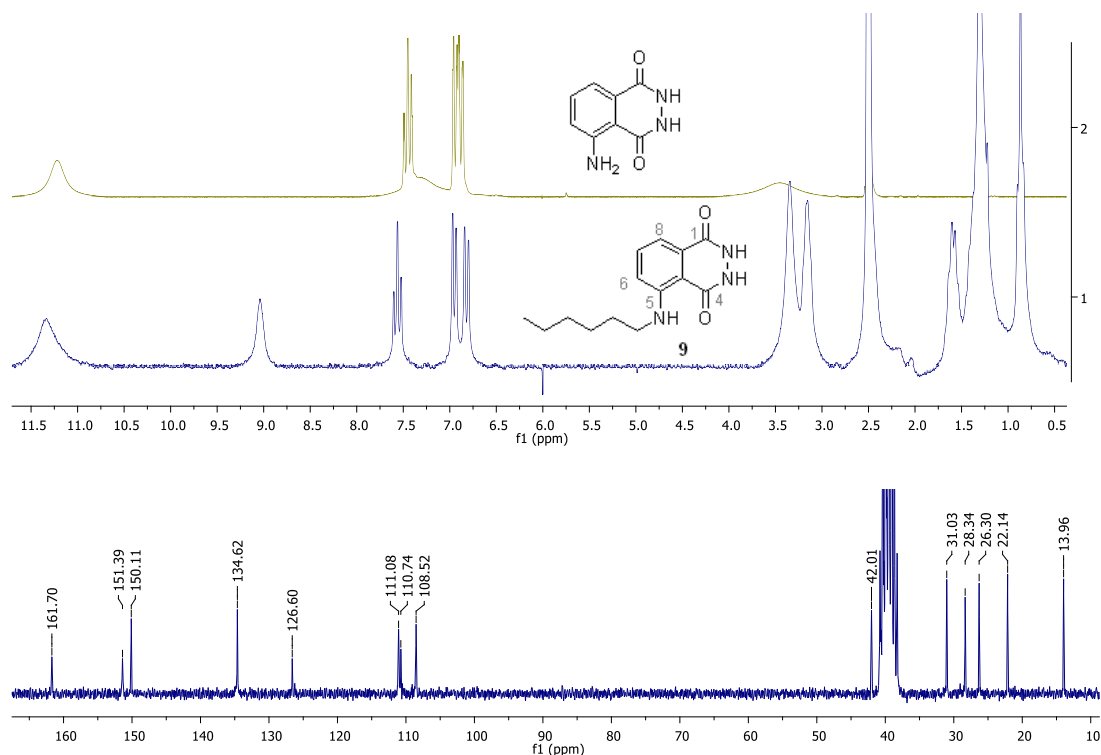
Τα παραπάνω αποτελέσματα υπέδειξαν ότι η χρήση βάσης έπρεπε να αποφευχθεί, προκειμένου να επιτευχθεί η άμινο αλκυλίωση της λουμινόλης. Επανάληψη της αντίδρασης αλκυλίωσης (1-βρωμοεξάνιο, DMF, 90 °C) χωρίς τη χρήση βάσης, δεν έδωσε κάποιο προϊόν. Η επιθυμητή 5-*N*-αλκυλίωση έγινε τελικά στους 110°C μετά από 2 μέρες. Με αυτό τον τρόπο, απομονώθηκε μετά από χρωματογραφία στήλης η 5-*N*-έξυλο λουμινόλη **9** (Σχήμα 13) με χαμηλή απόδοση (17%).



Σχήμα 13. 5-*N* αλκυλίωση της λουμινόλης. Συνθήκες: (i) DMF, 110°C, 48h.

Το φάσμα ¹H-NMR της **9** (Εικόνα 11), ομοιάζει με αυτό της λουμινόλης, με σημαντική διαφορά τη μετατόπιση του NH σε 9.04 ppm από τα 7.31 ppm του NH₂. Επίσης, η τριπλή κορυφή του H-7 εμφανίζεται στα 7.56 ppm στην **9** από τα 7.45 ppm της λουμινόλης. Στην περιοχή των αλειφατικών πρωτονίων, ξεχωρίζει στα 3.16 ppm το σήμα της *N*-μεθυλενικής ομάδας. Αυτή η εικόνα φάσματος είναι χαρακτηριστική των *N*-αλκυλιωμένων παραγώγων της λουμινόλης, και αποτελεί αναφορά για την επιτυχία ή όχι των αντιδράσεων αλκυλίωσης που επιχειρήθηκαν μετέπειτα.

Στο φάσμα ¹³C-NMR της **9**, τα σήματα στην περιοχή των αρωματικών / καρβονυλικών ανθράκων είναι σχεδόν ταυτόσημα με αυτά της λουμινόλης, με μόνη προφανή διαφορά τον C-6 (*o*-NH), ο οποίος εμφανίζεται στα 111.08 ppm, μετατοπισμένος κατά 5.5 ppm σε υψηλότερα πεδία σε σχέση με τον αντίστοιχο της λουμινόλης. Γενικότερα, ξεχωρίζει ο C-5 (*ipso*-NH) άνθρακας στα 161.70 ppm και οι δύο καρβονυλικοί στα 151.39 και 150.11. Στην αλειφατική περιοχή, ξεχωρίζει ο *N*-μεθυλενικός άνθρακας που συντονίζεται στα 42.01 ppm.

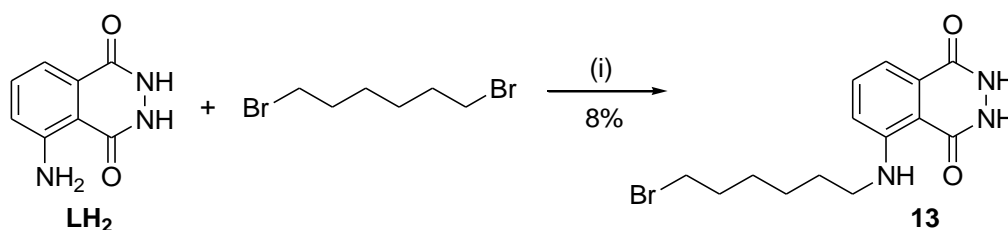


Εικόνα 11 Φάσματα $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO-d_6) της λουμινόλης (πάνω) και της **9** (μέση). Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, DMSO-d_6) της **9** κάτω.

6.2 Αλκυλίωση Λουμινόλης: Επιλογή Διαλύτη

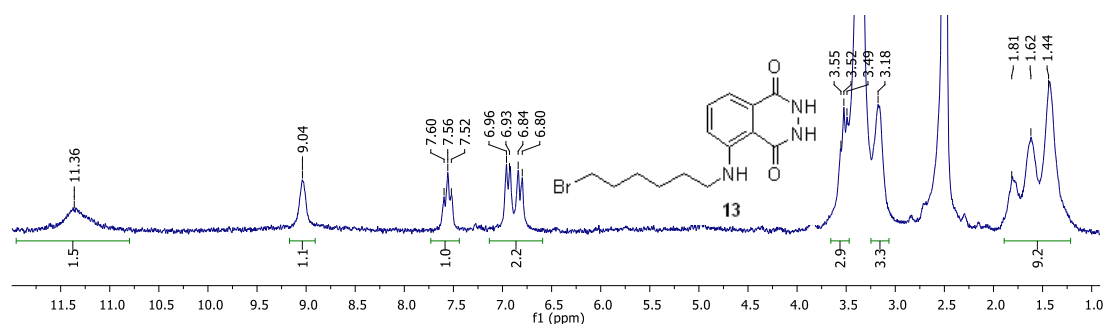
6.2.1 *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο

Από τα παραπάνω πειράματα, φαίνεται ότι η 5-*N*-αλκυλίωση της λουμινόλης από αλκυλοβρωμίδια επιτυγχάνεται σε DMF, απουσία βάσης, με θέρμανση στους 110°C , για 2 μέρες. Με αυτά τα δεδομένα, διερευνήθηκε η σύνθεση του βρωμοπαραγώγου **13** (Σχήμα 14). Η σύνθεση επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας 1 ισοδύναμο 1,6-διβρωμοεξανίου με θέρμανση στους 110°C για 3 μέρες.



Σχήμα 14. Αλκυλίωση λουμινόλης με διβρωμοεξάνιο. Συνθήκες: (i) DMF, 110°C , 72h.

Το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της **13** (Εικόνα 12) έχει τη χαρακτηριστική εικόνα 5-*N*-αλκυλιωμένου παραγώγου της λουμινόλης (δες πιο πάνω, Εικόνα 11), ενώ ξεχωρίζει επιπλέον η περιοχή περί τα 3.3 ppm ($\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$), όπου εμφανίζονται η τριπλή κορυφή στα 3.5 ppm ($\text{CH}_2\text{-Br}$) και η πολλαπλή στα 3.2 ppm ($\text{CH}_2\text{-N}$).

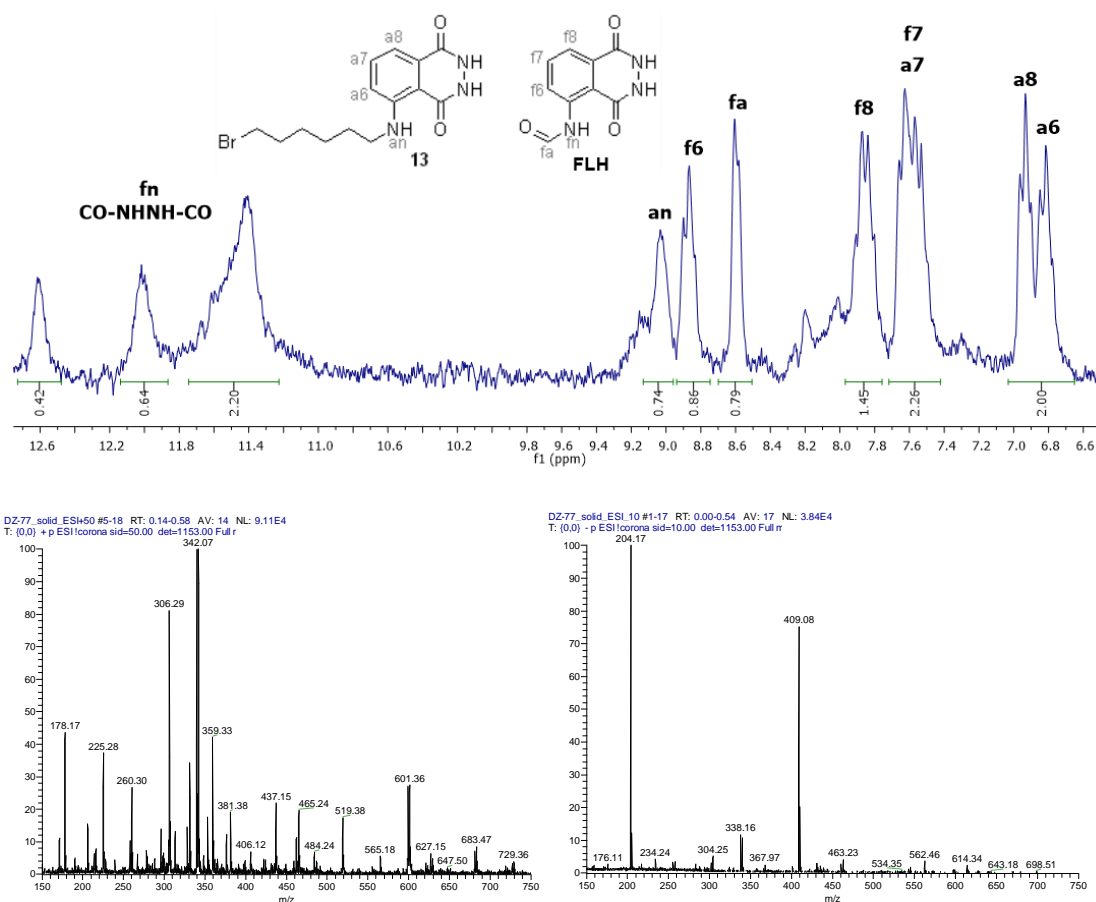


Εικόνα 12 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO-d_6) του βρωμοπαραγώγου **13**.

Η σύνθεση του παραγώγου **13** αποδείχθηκε πολύ πιο δύσκολη από την αλκυλίωση με το απλό βρωμοεξάνιο. Χρησιμοποιήθηκαν διάφορες συνθήκες (θερμοκρασία, ισοδύναμα διβρωμιδίου) παρακολουθώντας την εξέλιξη της αντίδρασης με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας και $^1\text{H NMR}$ των μιγμάτων της αντίδρασης, καταλήγοντας στις συνθήκες που προαναφέρθηκαν. Ακόμη όμως και σε αυτές τις συνθήκες, η απόδοση της αντίδρασης ήταν εξαιρετικά χαμηλή και μη επαναλήψιμη (1-8%), καθώς σχηματίζονταν αρκετά παραπροϊόντα, με αποτέλεσμα να καθίσταται πολύ δύσκολη η απομόνωση του επιθυμητού παραγώγου **13** στην επιθυμητή καθαρότητα.

Τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ και MS των μιγμάτων των αντιδράσεων, έδειχναν τον σχηματισμό ενός παραπροϊόντος, το οποίο εμφανιζόταν συστηματικά και στο οποίο αποδόθηκε η δομή **FLH** (Εικόνα 13). Συγκεκριμένα, όπως είδαμε πιο πάνω, τα πρωτόνια της **13** εμφανίζονται περί τα 6.8 ppm (α_8 , α_6), 7.6 ppm (α_7) και το NH (α_n) στα 9 ppm. Τα επιπλέον σήματα που εμφανίζονται,

φαίνεται ότι ανήκουν σε 5-*N*-ακυλιωμένη λουμινόλη, αφού οι μετατοπίσεις στα 7.6 (f7), 7.8 (f8) και 8.8 (f6) ppm έχουν αποδοθεί σε τέτοια παράγωγα. Η επιπλέον κορυφή στα 8.6 ppm (fa) θα μπορούσε να οφείλεται σε πρωτόνιο φορμαμιδίου. Το φάσμα μάζας στον θετικό ιονισμό έδειξε αρκετά και ασθενή σήματα, με κύριο αυτό της **13** ([M+H], 340-342), ενώ στον αρνητικό ιονισμό, ξεχώριζε αυτό της **FLH** ([M-H], 204) και του διμερούς της.



Εικόνα 13 Φάσματα μίγματος αντίδρασης λουμινόλης με 1,6-διβρωμοεξάνιο σε DMF/100°C/72h. Πάνω: φάσμα ¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆, αρωματική περιοχή). Κάτω: Φάσματα ES-MS θετικού (αριστερά) και αρνητικού (δεξιά) ιονισμού.

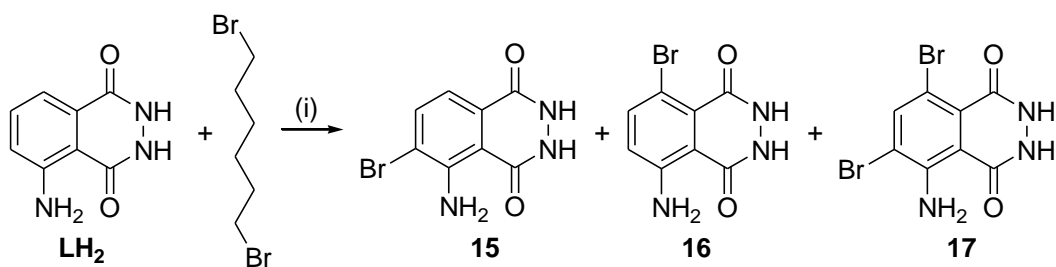
Ο μόνος τρόπος για να εξηγηθεί ο σχηματισμός του φορμυλιωμένου παραγώγου, είναι μέσω αντίδρασης της λουμινόλης με το DMF ή με κάποιο προϊόν διάσπασής του. Το γεγονός ότι η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 110°C για 3 ημέρες και μάλιστα απουσία βάσης, σημαίνει ότι όσο προχωράει

η αντίδραση αλκυλίωσης, τόσο πιο όξινες γίνονται οι συνθήκες (απελευθέρωση HBr), με πιθανό αποτέλεσμα τη διευκόλυνση διάσπασης του DMF. Όποιος όμως και να είναι ο μηχανισμός, το συμπέρασμα είναι ότι οι συγκεκριμένες συνθήκες δεν είναι ιδανικές για τη σύνθεση βρωμιωμένων παραγώγων της λουμινόλης όπως το **13** και πρέπει να αναζητηθούν αποδοτικότερες.

6.2.2 Διμεθυλοσουλφοξείδιο

Έχοντας ως σκοπό την αύξηση της απόδοσης της 5-*N*-αλκυλίωσης της λουμινόλης, έπρεπε να αποτρέψουμε το σχηματισμό του φορμυλιωμένου παραγώγου, ο σχηματισμός του οποίου συμπεράναμε ότι οφειλόταν στο DMF. Οι διαλύτες που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την αντίδραση περιορίζονταν τόσο από τη διαλυτότητα της λουμινόλης, η οποία είναι επαρκώς διαλυτή μόνο σε πολικούς μη πρωτικούς διαλύτες, όσο και από τη δυσκολία της ίδιας της αντίδρασης, που απαιτεί σχετικά υψηλή θερμοκρασία, άρα διαλύτες με υψηλό σημείο ζέσεως. Είναι χαρακτηριστικό ότι οι αντιδράσεις που δοκιμάστηκαν σε ακετονιτρίλιο ή 1,4-διοξάνη, δεν είχαν κανένα αποτέλεσμα. Το DMSO θα μπορούσε να είναι καλή εναλλακτική, αφού είναι πολικός μη πρωτικός διαλύτης υψηλού σημείου ζέσεως, και έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε τέτοιου τύπου αλκυλιώσεις.

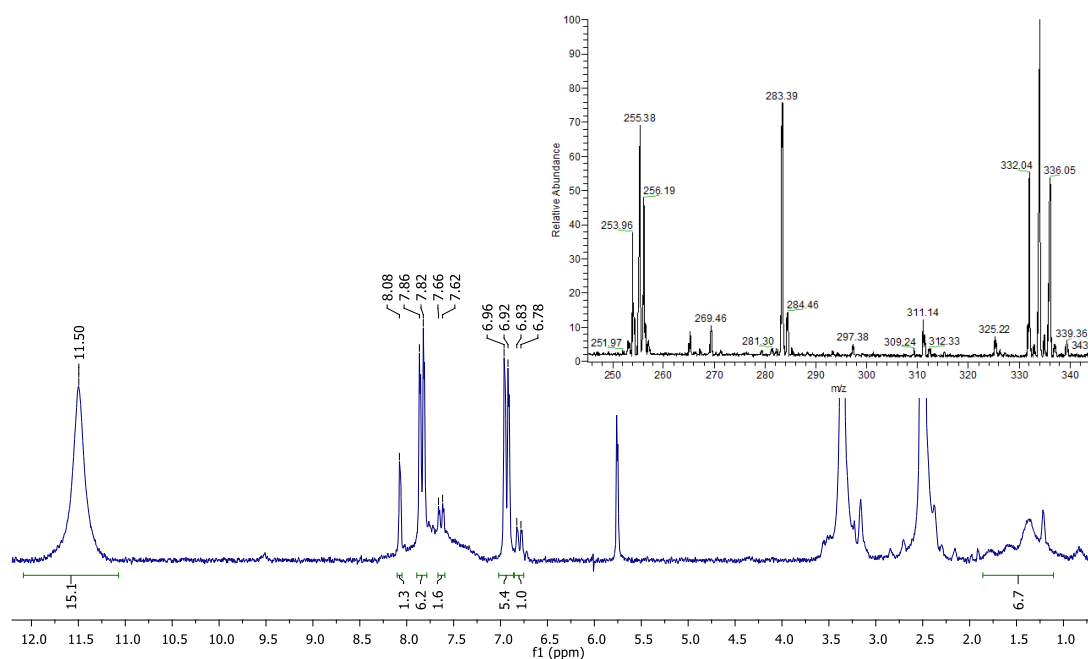
Η αντίδραση της λουμινόλης με διβρωμοεξάνιο (1 ισοδύναμο) σε DMSO στους 90°C ολοκληρώθηκε σε 3 ώρες όπως έδειξε στο TLC η κατανάλωση της λουμινόλης. Μετά από μια σύντομη επεξεργασία που περιλάμβανε απόχυση σε νερό, καταβύθιση ιζήματος, έκπλυση με νερό, ξήρανση και έκπλυση με εξάνιο, παραλήφθηκε ένα στερεό. Το στερεό αυτό αποτελείται από τις βρωμιωμένες ενώσεις **15-17** (Σχήμα 15) όπως υπέδειξαν τα φασματοσκοπικά δεδομένα, οι οποίες δεν κατέστη δυνατόν να διαχωριστούν.



Σχήμα 15. Αντίδραση λουμινόλης με διβρωμοεξάνιο. Συνθήκες: (i) DMSO, 90°C, 3h.

Το φάσμα ¹H-NMR του μίγματος της αντίδρασης (Εικόνα 14) δείχνει μια αρκετά καθαρή εικόνα ενός μίγματος τριών κυρίως ενώσεων με δύο ενδιαφέροντα στοιχεία: α) την απουσία τριπλών κορυφών στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων και β) την απουσία άλκυλο-αλυσίδας στα κύρια προϊόντα όπως φαίνεται από την απουσία σημάτων στην περιοχή 1-2 ppm. Επιπλέον, η απουσία τριπλών κορυφών υποδηλώνει υποκατάσταση στον αρωματικό δακτύλιο. Διακρίνονται δύο σετ διπλών κορυφών [7.81, 6.89 ppm (15) και 7.61, 6.78 ppm (16)] και μία απλή κορυφή στα 8.08 ppm (17) με σχετική αναλογία 1:0.2:0.2. Τα παραπάνω, σε συνδυασμό με τα ευρήματα του φάσματος μαζών, όπου διακρίνονται τα ιόντα των 15,16 ([M-H]⁻, 254-256) και του 17 ([M-H]⁻, 334), υποδεικνύουν τις προτεινόμενες δομές. Η απόδοση των κορυφών του φάσματος ¹H-NMR μεταξύ των ισομερών 15 και 16, έγινε με βάση την αναμενόμενη χημική μετατόπιση των πρωτονίων τους.

Η αντίδραση αυτή επαναλήφθηκε χρησιμοποιώντας διαφορετικές συνθήκες και τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 2. Σε θερμοκρασία δωματίου δεν γίνεται καμία αντίδραση, ενώ με ελαφριά θέρμανση (50°C) για 18 ώρες γίνεται βρωμίωση του δακτυλίου, δίνοντας ως κύριο προϊόν, το *o*-NH₂ βρωμοπαράγωγο 15, και σε μικρότερο βαθμό τα *p*-NH₂ 16 και διβρώμο 17 παράγωγα. Στους 90°C το αποτέλεσμα είναι παρόμοιο, αλλά επιτυγχάνεται συντομότερα (3 ώρες). Τέλος, χρησιμοποιώντας 3 ισοδύναμα διβρωμιδίου, ανιχνεύεται μόνο το διβρωμιωμένο προϊόν 17. Είναι αξιοσημείωτο ότι το επιθυμητό προϊόν της 5-*N*-αλκυλίωσης δεν ανιχνεύθηκε σε καμία περίπτωση. Το γεγονός ότι η αντίδραση βρωμίωσης είναι τόσο γρήγορη (3 ώρες στους 90°C), ίσως εξηγεί την απουσία προϊόντος 5-*N*-αλκυλίωσης (που είδαμε ότι σε DMF χρειάζεται 3 μέρες στους 110°C).



Εικόνα 14 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO-d_6) μίγματος της αντίδρασης της λουμινόλης με 1,6-διβρωμοεξάνιο σε $\text{DMSO}/90^\circ\text{C}/3\text{h}$. Ένθετο: Φάσμα ES-MS αρνητικού ιονισμού.

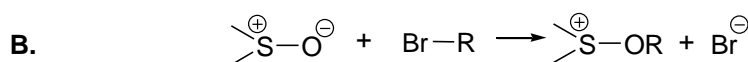
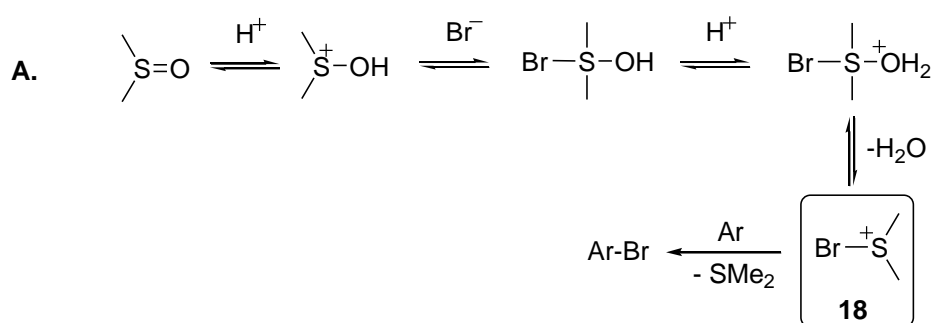
		Αναλογίες Προϊόντων ²		
A/A	Συνθήκες ¹	15	16	17
1	1eq, 90°C , 3h	1	0.2	0.2
2	1eq, r.t., o/n	0	0	0
3	1eq, 50°C , o/n	1	0.3	0.1
4	3eq, 90°C , o/n	0	0	1

¹Ισοδύναμα διβρωμοεξανίου, θερμοκρασία, χρόνος.

²Σχετική αναλογία με βάση το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του μίγματος της αντίδρασης.

Πίνακας 2 Αντιδράσεις της λουμινόλης με διβρωμοεξάνιο σε διαλύτη DMSO .

Όσον αφορά στη βρωμίωση αρωματικών δακτυλίων, έχει βρεθεί ότι αυτή μπορεί να γίνει με μίγμα DMSO – υδροβρωμικού οξέος. [49] Για αυτή την περίπτωση έχει προταθεί ο μηχανισμός του Σχήματος 16. Το DMSO αντιδρά με το HBr δίνοντας, μετά από αποβολή νερού, το βρωμοδιμεθυλοσουλφονικό άλας **18**. Αυτό, μπορεί να δώσει αντίδραση ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης με μία αρωματική ένωση, με ταυτόχρονη απελευθέρωση διμεθυλοσουλφιδίου. Στη δικιά μας περίπτωση, ενώ δεν έχουμε υδροβρωμικό οξύ, αυτό μπορεί να σχηματιστεί από την αντίδραση 5-*N*-αλκυλίωσης. Αν υποθέσουμε ότι η 5-*N*-αλκυλίωση προχωράει έστω και ελάχιστα, αυτό το λίγο HBr που σχηματίζεται μπορεί να είναι αρκετό για το σχηματισμό του βρωμιούχου άλατος **18**. Άλλωστε, μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης είναι εμφανής η χαρακτηριστική οσμή SMe_2 . Επιπλέον το βρωμίδιο μας μπορεί να αντιδράσει απευθείας με το DMSO όπως φαίνεται στο μηχανισμό B.



Σχήμα 16 Προτεινόμενος μηχανισμός βρωμίωση δακτυλίου A και πιθανή αντίδραση B

6.2.3 *N*-μεθυλοπυρρολιδόνη

Έχοντας ήδη δοκιμάσει το *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο χωρίς κάποιο αξιοσημείωτο αποτέλεσμα, καθώς και το διμεθυλοσουλφοξείδιο, το οποίο αποδείχθηκε αναποτελεσματικό ως προς την 5-*N*-αλκυλίωση της λουμινόλης,

αποφασίσαμε να δοκιμάσουμε και την *N*-μεθυλο-2-πυρρολιδόνη (NMP), που ανήκει στην ίδια κατηγορία διαλυτών (πολικός μη πρωτικός).

Έτσι, έγινε μία σειρά πειραμάτων αλκυλίωσης της λουμινόλης με 1,6-διβρωμοεξανίο σε *N*-μεθυλο-2-πυρρολιδόνη, και οι προσπάθειες που πραγματοποιήθηκαν αφορούσαν στη χρήση:

1. διαφορετικών ισοδύναμων διβρωμοεξανίου (1–3),
2. διαφορετικών θερμοκρασιών (90 – 180°C) και
3. διαφορετικής διάρκειας της αντίδρασης (8 ώρες – 6 ημέρες).

Τα πειράματα αυτά έδειξαν παρόμοια αποτελέσματα με αυτά των αντιδράσεων σε DMF (βλέπε υποκεφάλαιο 6.2.1), με τη διαφορά ότι δεν ανιχνευόταν ο σχηματισμός του φορμυλιωμένου παραγώγου (Εικόνα 13) στα φάσματα ¹H-NMR και MS του μίγματος της αντίδρασης. Έτσι, τα καλύτερα αποτελέσματα (με βάση την κατανάλωση της λουμινόλης και φαινομενικής ποσότητας σχηματισμού προϊόντος στα φάσματα ¹H-NMR των μιγμάτων των αντιδράσεων) ελήφθησαν για 1 ισοδύναμο διβρωμοεξανίου, σε 110°C, για 3 μέρες. Ενώ όμως το πρόβλημα του σχηματισμού του παραπροϊόντος της φορμυλίωσης που παρατηρούνταν στις αντιδράσεις σε DMF λυνόταν με τη χρήση του NMP, το πρόβλημα που προέκυπτε με τη χρήση του συγκεκριμένου διαλύτη ήταν στην κατεργασία της αντίδρασης. Το υψηλό σημείο ζέσεως του NMP (202°C) καθιστά αδύνατη την απόσταξή του, με αποτέλεσμα η απομάκρυνσή του να επιτυγχάνεται μετά από απόχυση του μίγματος της αντίδρασης σε νερό (δημιουργία όξινου δ/τος, pH ≈ 3-5), είτε με καταβύθιση του προϊόντος, είτε με εκχύλιση του προϊόντος με οξικό αιθυλεστέρα, στην περίπτωση που δεν παρατηρούταν καταβύθιση. Στην περίπτωση της εκχύλισης, παρατηρήθηκε ότι η ποσότητα του μίγματος των προϊόντων που συλλέγονταν στην οργανική φάση ήταν εξαιρετικά μικρή σε σχέση με την αναμενόμενη, υποδεικνύοντας ότι η μεγάλη μάζα παρέμενε στην υδατική φάση, επιδυσυαλυτώμενη προφανώς από το NMP. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, κρίθηκε απαραίτητο να επιδιωχθεί με κάθε τρόπο η καταβύθιση του προϊόντος κατά την απόχυση σε νερό. Έτσι, θεωρώντας ότι η συγκέντρωση των αντιδρώντων (άρα η σχετική «περίσσεια» του NMP) έπαιζε σημαντικό ρόλο στην καταβύθιση ή όχι ιζήματος, έγινε μια σειρά πειραμάτων

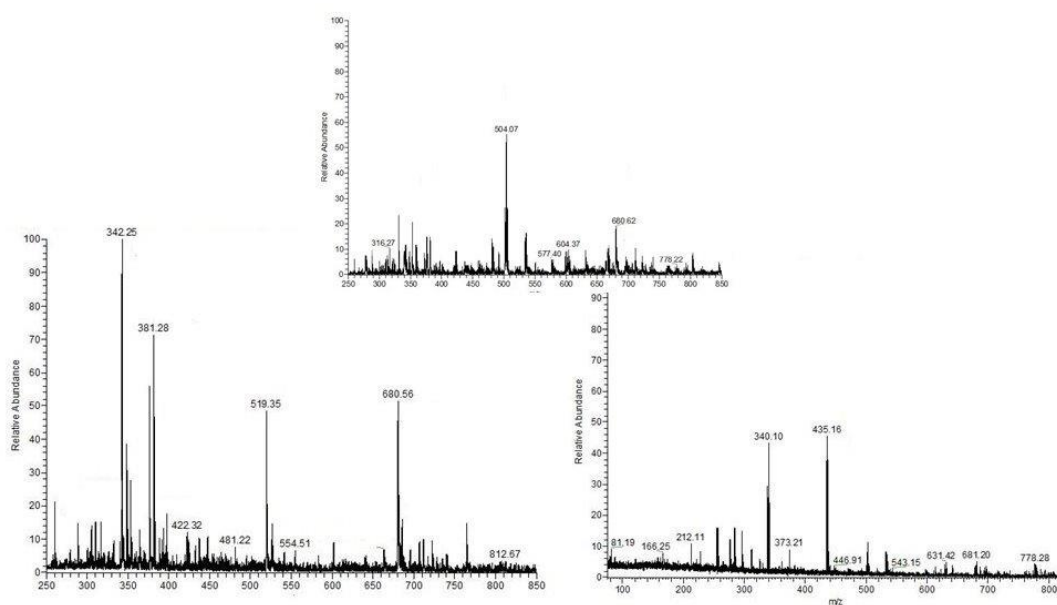
που φαίνονται στον Πίνακα 3. Συγκεκριμένα, η αντίδραση λουμινόλης (0.3 mmol) με ισομοριακή ποσότητα 1,6-διβρωμοεξανίου πραγματοποιήθηκε σε διάφορους όγκους NMP στους 110°C για 3 μέρες, το μίγμα της αντίδρασης αποχύθηκε σε νερό (20πλάσια αραιώση) και παρατηρήθηκε το αποτέλεσμα. Βρέθηκε ότι σχηματιζόταν ίζημα χρησιμοποιώντας 1 - 2 ml NMP ανά mmol λουμινόλης, ενώ αραιότερα ή πυκνότερα διαλύματα σχημάτιζαν διάλυμα ή λεπτόκκοκο ίζημα που δεν μπορούσε να απομονωθεί.

α/α	Όγκος NMP (μL)	Μορφή προϊόντος κατά την απόχυση του μίγματος της αντίδρασης σε νερό
1	80	Διάλυμα
2	100	Διάλυμα
3	150	Λεπτόκκοκο αιώρημα
4	200	Λεπτόκκοκο αιώρημα
5	300	Ίζημα
6	400	Ίζημα
7	450	Ίζημα
8	500	Λεπτόκκοκο αιώρημα
9	600	Λεπτόκκοκο αιώρημα
10	700	Λεπτόκκοκο αιώρημα

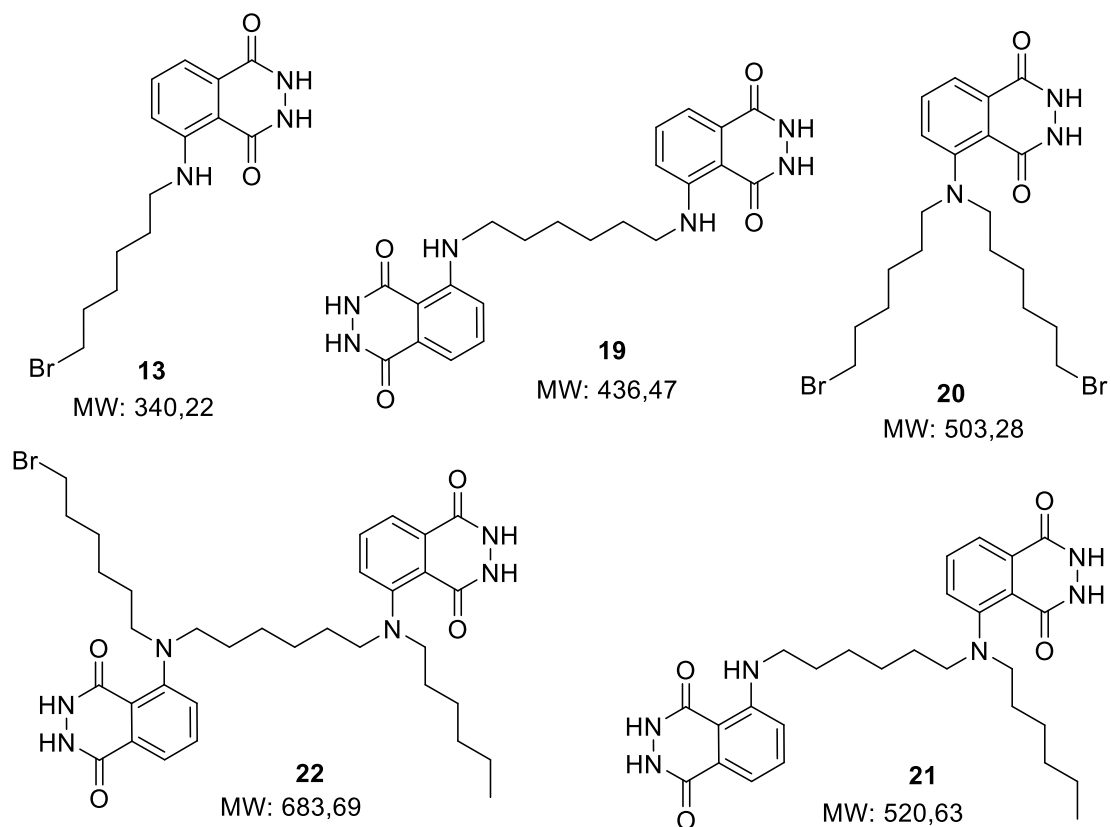
Πίνακας 3: Εύρεση του Ιδανικού όγκου NMP για σχηματισμό ιζήματος κατά την υδατική επεξεργασία της αντίδραση αλκυλίωσης 0.3 mmol λουμινόλης με 1,6-διβρωμοεξάνιο.

Η απομόνωση στερεού σε σχετικά καλή απόδοση, επέτρεψε μια σειρά επιπλέον παρατηρήσεων. Κατ' αρχήν, σε αρκετές περιπτώσεις, το προκύπτον

στερεό ήταν εξαιρετικά αδιάλυτο, με αποτέλεσμα να μην είναι εφικτός ο καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης όλου του δείγματος, παρά μόνο ενός μικρού μέρους του. Έτσι, η απόδοση του επιθυμητού προϊόντος που απομονωνόταν μετά από την χρωματογραφία ήταν εξαιρετικά μικρή και μη επαναλήψιμη. Τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ των ιζημάτων μαρτυρούσαν την πραγματοποίηση της αλκυλίωσης, εμφανίζοντας εικόνα παρόμοια με αυτή του επιθυμητού βρωμοπαραγώγου **13** (βλέπε παραπάνω, Εικόνα 12). Τα φάσματα MS όμως έδειχναν (Εικόνα 15), εκτός από τη μάζα του προϊόντος **13**, κορυφές που αντιστοιχούσαν σε διάφορες δομές δι- και ολιγο-μερισμού όπως φαίνεται στην Εικόνα 16. Η περίπτωση μίγματος ολιγομερών εξηγεί τόσο την εικόνα παρόμοιου φάσματος $^1\text{H-NMR}$ του μίγματος με αυτό της **13**, όσο και την περιορισμένη διαλυτότητά του.

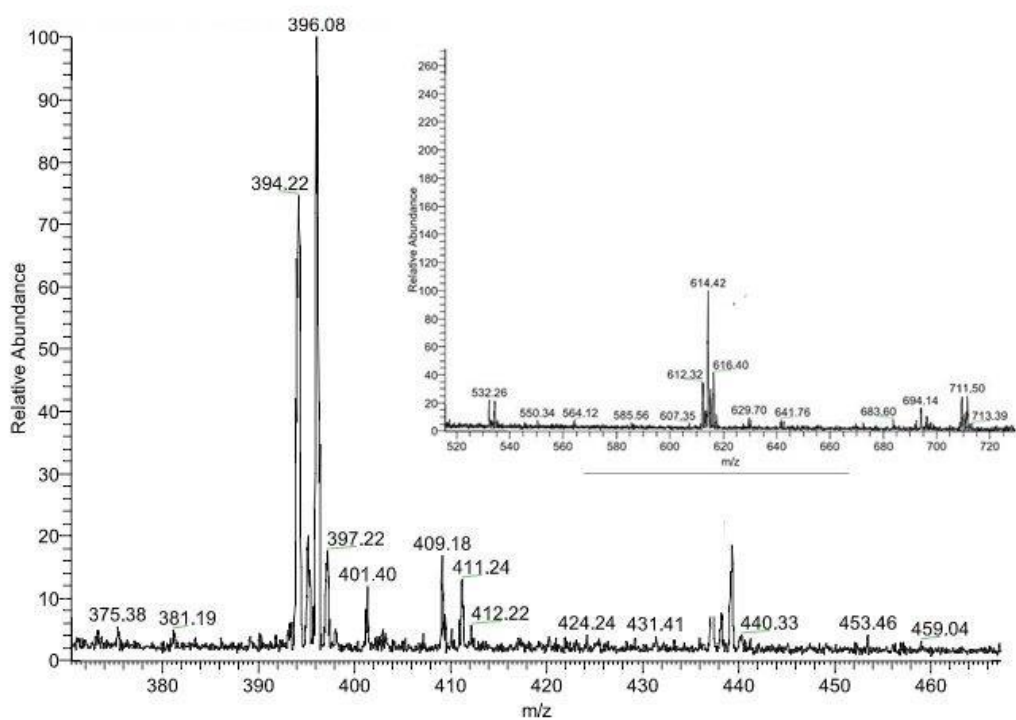


Εικόνα 15. Φάσματα MS των μιγμάτων των αντιδράσεων αλκυλίωσης της λουμινόλης με 1,6-διβρωμοεξάνιο σε NMP.

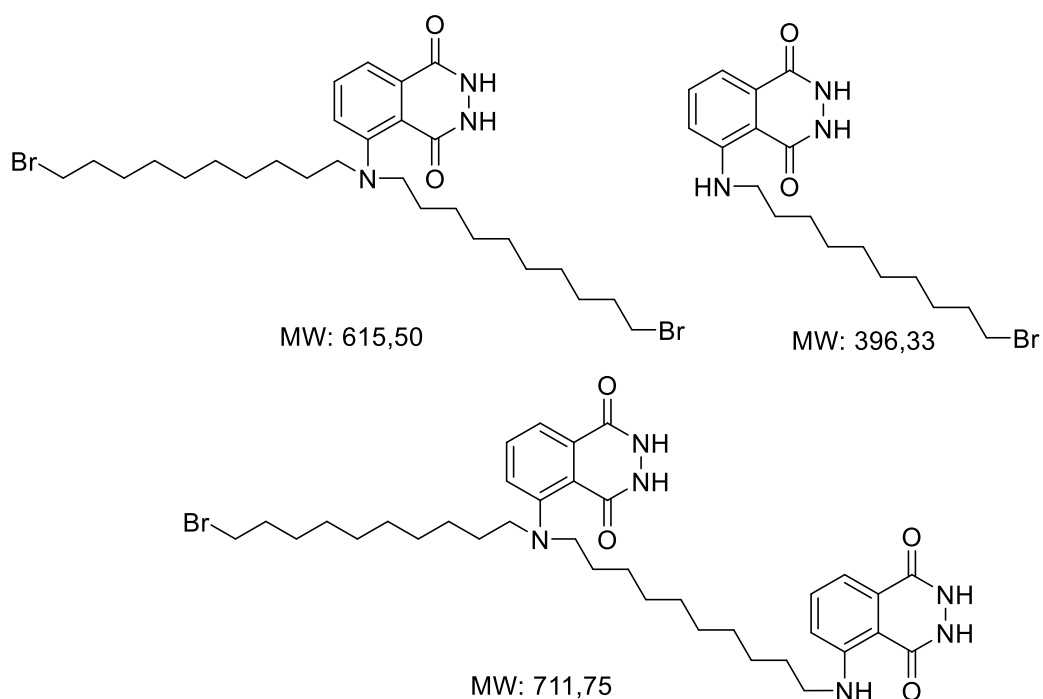


Εικόνα 16 Δομές που αντιστοιχούν σε σήματα των φασμάτων MS των μιγμάτων των αντιδράσεων αλκυλίωσης της λουμινόλης με 1,6-διβρωμοεξάνιο σε NMP.

Πέρα από την αλκυλίωση με διβρωμοεξάνιο, χρησιμοποιήθηκε και το διβρωμοδεκάνιο ως αλκυλιωτικός παράγοντας, προκειμένου να διερευνηθεί η αλκυλίωση και με μεγαλύτερη αλυσίδα. Τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια με αυτά του διβρωμοεξανίου. Έτσι, το φάσμα MS του μίγματος της αντίδρασης (Εικόνα 17) έδειξε την ύπαρξη ολιγομερικών μορφών, ανάλογων με αυτά της αντίδρασης με διβρωμοεξάνιο (Εικόνα 18).

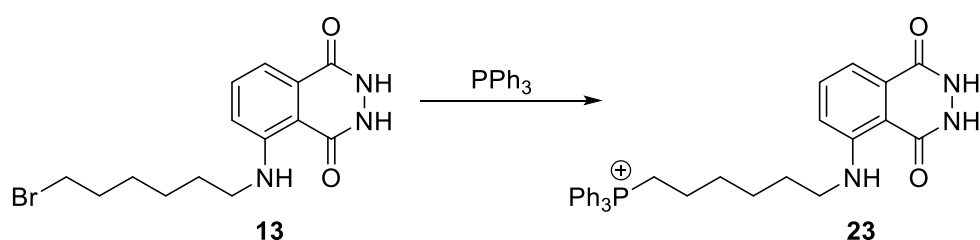


Εικόνα 17 Φάσμα MS του μίγματος της αντίδρασης αλκυλίωσης της λουμινόλης με 1,10-διβρωμοδεκάνιο σε NMP.



Εικόνα 18. Δομές που αντιστοιχούν σε σήματα του φάσματος MS του μίγματος της αντίδρασης αλκυλίωσης της λουμινόλης με 1,10-διβρωμοδεκάνιο σε NMP

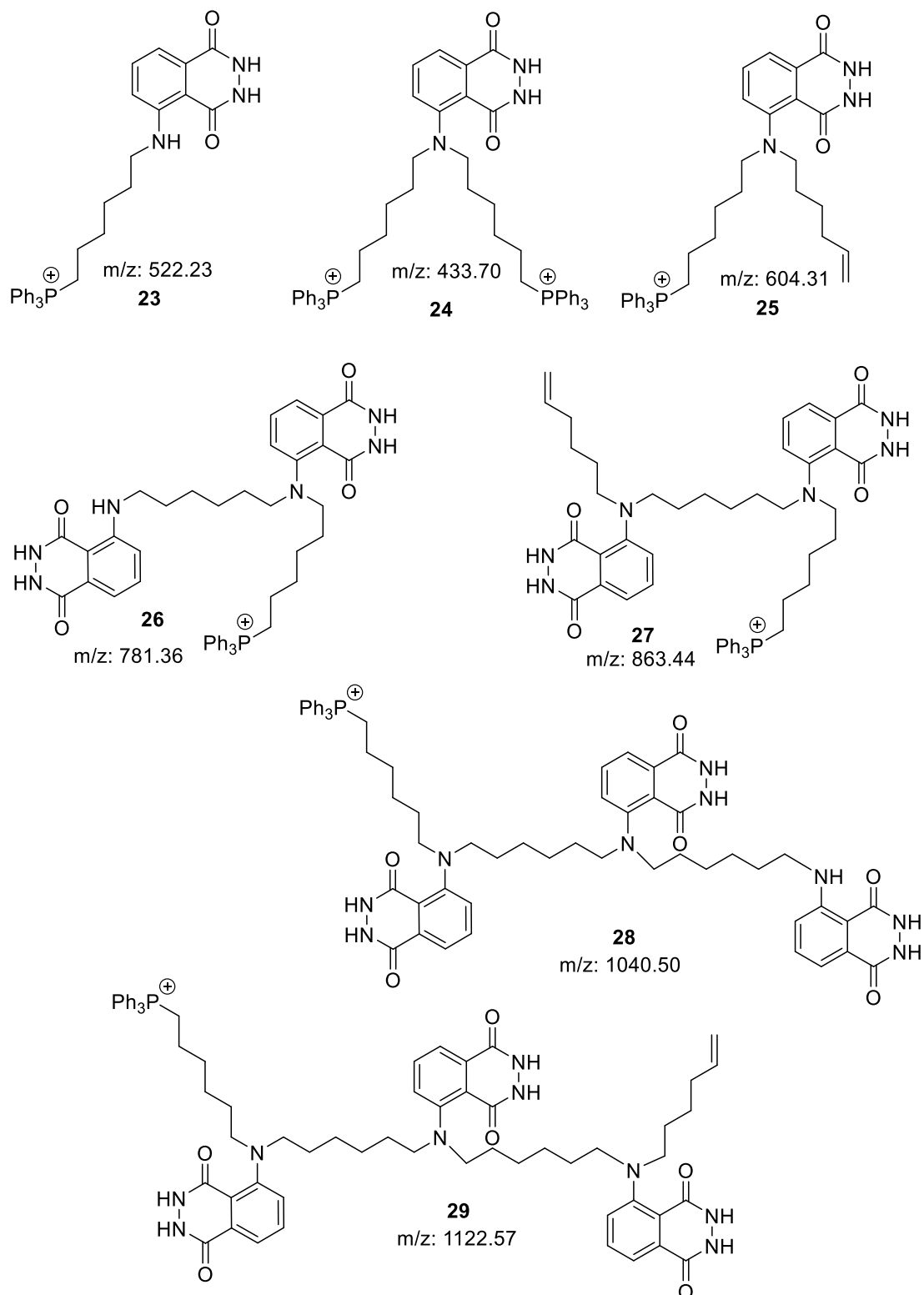
Επειδή δεν ήταν δυνατή η απομόνωση του βρωμιωμένου 5-*N*-αλκυλιωμένου παραγώγου **13** από την αντίδραση αλκυλίωσης της λουμινόλης, αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθεί το μίγμα της αντίδρασης αλκυλίωσης με διβρωμοεξάνιο που περιγράφηκε πιο πάνω, στο επόμενο στάδιο, σε αντίδραση με τριφαινυλοφωσφίνη. Η αντίδραση αυτή επιχειρήθηκε αφενός για να επιβεβαιωθεί ότι είναι εφικτός ο σχηματισμός του τελικού προϊόντος **23** (Σχήμα 17) με αυτή τη μέθοδο και αφετέρου, για την πιθανότητα η απομόνωσή του από το μίγμα της αντίδρασης να είναι ευκολότερη από την απομόνωση του βρωμιωμένου παραγώγου **13**.



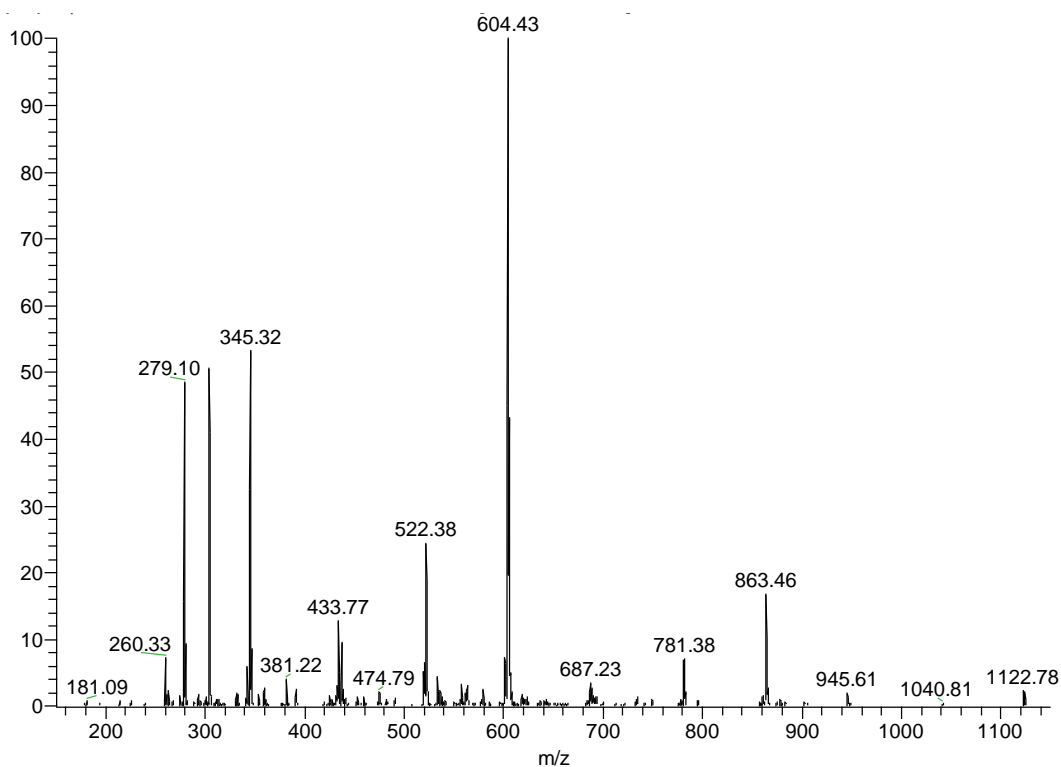
Σχήμα 17 Αντίδραση υποκατάστασης βρωμιδίου από τη φωσφίνη.

Η αντίδραση με περίσσεια τριφαινυλοφωσφίνης πραγματοποιήθηκε σε ακετονιτρίλιο υπό βρασμό για 3-4 μέρες, συνθήκες οι οποίες έδωσαν τα καλύτερα αποτελέσματα. Χρήση άλλου διαλύτη (π.χ. τολουόλιο) ή μικρότερος χρόνος / θερμοκρασία αντίδρασης είχε ως αποτέλεσμα τη μη πραγματοποίηση της αντίδρασης. Η επιτυχία ή μη της αντίδρασης αξιολογούνταν, πέρα από τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ και MS, και από το φάσμα $^{13}\text{P-NMR}$, όπου εμφάνιση κορυφής περί τα 25 ppm υποδείκνυε το σχηματισμό φωσφονιακών κατιόντων. Τα μίγματα των αντιδράσεων αυτών ήταν όμως επίσης αδύνατο να διαχωριστούν. Ωστόσο, τα φάσματα MS έδιναν ισχυρά μοριακά ιόντα για τα φωσφονιακά κατιόντα. Αυτή η παρατήρηση μας διευκόλυνε να καταλάβουμε καλύτερα τα προϊόντα της αλκυλίωσης (προηγούμενο στάδιο), αφού τα βρωμίδια σε αρκετές περιπτώσεις δεν δίνουν ισχυρά σήματα μοριακού ιόντος στο φάσμα MS, οπότε η μετατροπή τους σε φωσφονιακά κατιόντα, έκανε πιο εμφανή τα μοριακά ιόντα. Έτσι, τα μοριακά ιόντα των κατιοντικών δομών που φαίνονται στην Εικόνα 19 διακρίνονται στο φάσμα MS του μίγματος της αντίδρασης (Εικόνα 20), όπου εκτός από την

κορυφή του επιθυμητού προϊόντος **23**, διακρίνονται τουλάχιστον μέχρι και τριμερή όπως το **29**.



Εικόνα 19 Δομές που αντιστοιχούν σε σήματα του φάσματος MS του μίγματος της αντίδρασης βρωμιωμένων παραγώγων με τριφαινυλοφωσφίνη



Εικόνα 20 Φάσμα MS του μίγματος της αντίδρασης βρωμιωμένων παραγώγων με τριφαινυλοφωσφίνη.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα γίνεται φανερό ότι ως διαλύτης το NMP είναι καλύτερος από το DMF, αφού έτσι αποφεύγεται η ανεπιθύμητη αντίδραση φορμυλίωσης. Παρατηρείται όμως σχηματισμός ολιγομερικών μορφών αλκυλιωμένης λουμινόλης. Προσεκτικότερη μελέτη των φασμάτων MS των αντιδράσεων σε DMF έδειξε και εκεί σχηματισμό τέτοιων προϊόντων. Η αντίδραση διβρωμιδίου με πρωτοταγή αμίνη θεωρητικά δίνει τέτοια προϊόντα, αφού είναι γνωστό ότι οι δευτεροταγείς αμίνες είναι καλύτερα πυρηνόφιλα από τις πρωτοταγείς. [50] Στην περίπτωση της λουμινόλης, η ήδη υποκατεστημένη αμίνη (δευτεροταγής) αναμενόταν να αλκυλιώνεται δυσκολότερα λόγω στερικής παρεμπόδισης από την ανθρακική αλυσίδα και το γειτονικό καρβονυλικό οξυγόνο, αλλά τα πειράματα έδειξαν ότι δεν συμβαίνει κάτι τέτοιο.

6.3 Αλκυλίωση Λουμινόλης: Επιλογή αλκυλιωτικού μέσου

6.3.1 Διβρωμοαλκάνια

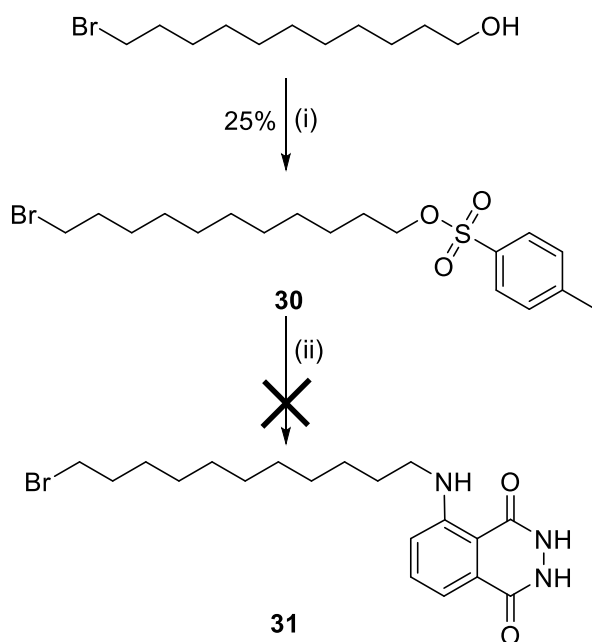
Τα διβρωμοαλκάνια μελετήθηκαν εκτενώς στο παραπάνω κεφάλαιο που προηγήθηκε, παράλληλα με την εύρεση του ιδανικού διαλύτη και των υπόλοιπων συνθηκών. Εν συντομία, χρειάζονται υψηλή θερμοκρασία (>110°C), και μεγάλο χρόνο αντίδρασης (3 μέρες), για να γίνει η 5-*N*-αλκυλίωση της λουμινόλης, με παράλληλο σχηματισμό παραπροϊόντων ολιγομερισμού, καθιστώντας την απομόνωση των επιθυμητών προϊόντων εξαιρετικά επίπονη και μη αποδοτική.

6.3.2 Τόσυλο-Βρωμοαλκάνια

Η επιλογή μιας καλύτερης από το βρώμιο αποχωρούσας ομάδας στην αλκυλιωτική αλυσίδα, ίσως να βελτιώνει την απόδοση του επιθυμητού προϊόντος μέσω της μείωσης του χρόνου και της θερμοκρασίας της αντίδρασης. Η τόσυλο ομάδα είναι μια εξαιρετική αποχωρούσα ομάδα σε αντιδράσεις πυρηνόφιλης αλειφατικής υποκατάστασης, οπότε και επιλέχθηκε ως εναλλακτική του βρωμίου. Αποφασίστηκε η σύνθεση αλυσίδας που στο ένα άκρο της θα έφερε ένα άτομο βρωμίου, και στο άλλο μια τόσυλο ομάδα. Κατ' αυτό τον τρόπο, αναμέναμε ότι η αντίδραση αλκυλίωσης της λουμινόλης θα γινόταν σε θερμοκρασία τέτοια (<110°C) ώστε να αντιδρούσε η τόσυλο ομάδα, ενώ το βρωμίδιο θα παρέμενε άθικτο, δίνοντας την ένωση **7** (X = Br, Σχήμα 11). Στο επόμενο βήμα, το βρωμίδιο της ένωσης **7** θα αντιδράσει με την κατάλληλη φωσφίνη προς το τελικό μιτοτροπικό παράγωγο **6**.

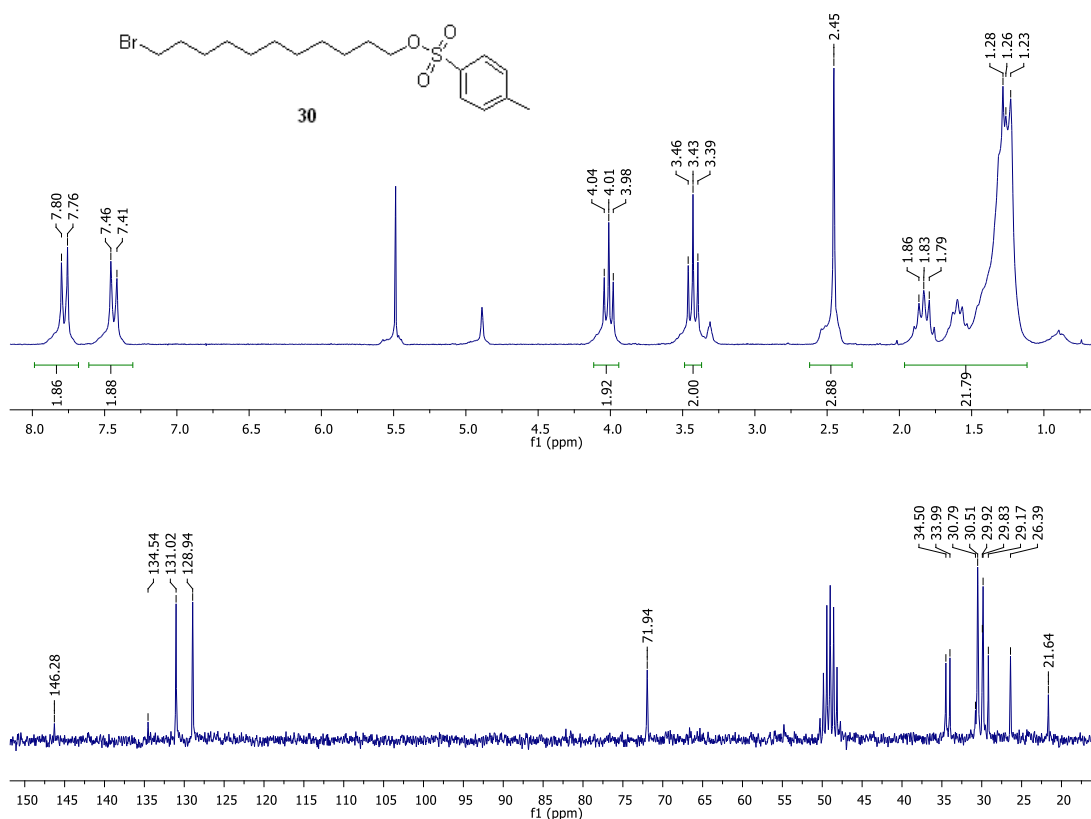
Το βρωμο-αλκυλο-τόσυλο παράγωγο που συνθέσαμε προήλθε από την τοσυλίωση της βρωμοενδεκανόλης. Η αντίδραση της 11-βρωμοενδεκανόλης με το τοσυλοχλωρίδιο επιχειρήθηκε σε διχλωρομεθάνιο παρουσία τριαιθυλαμίνης και DMAP και σε ακετονιτρίλιο παρουσία Cs₂CO₃ [51] [52] [53] χωρίς επιτυχία. Η αντίδραση τελικά πραγματοποιήθηκε σε τετραϋδροφουράνιο με χαμηλή απόδοση ως προς το προϊόν **30** (Σχήμα 18) καθώς, όπως φάνηκε από τα φασματοσκοπικά δεδομένα, παραγόταν ανταγωνιστικά και το αντίστοιχο χλωρίδιο. Έπειτα, επιχειρήθηκε η αντίδραση

αλκυλίωσης της λουμινόλης με το τοσυλο-παράγωγο **30** στους 90°C σε DMF. Το αποτέλεσμα ήταν η δημιουργία πολύ γρήγορα ενός μίγματος προϊόντων το οποίο δεν ήταν δυνατόν να ταυτοποιηθεί. Η αντίδραση επαναλήφθηκε σε χαμηλότερη θερμοκρασία, χωρίς όμως να δώσει κάποιο αποτέλεσμα.



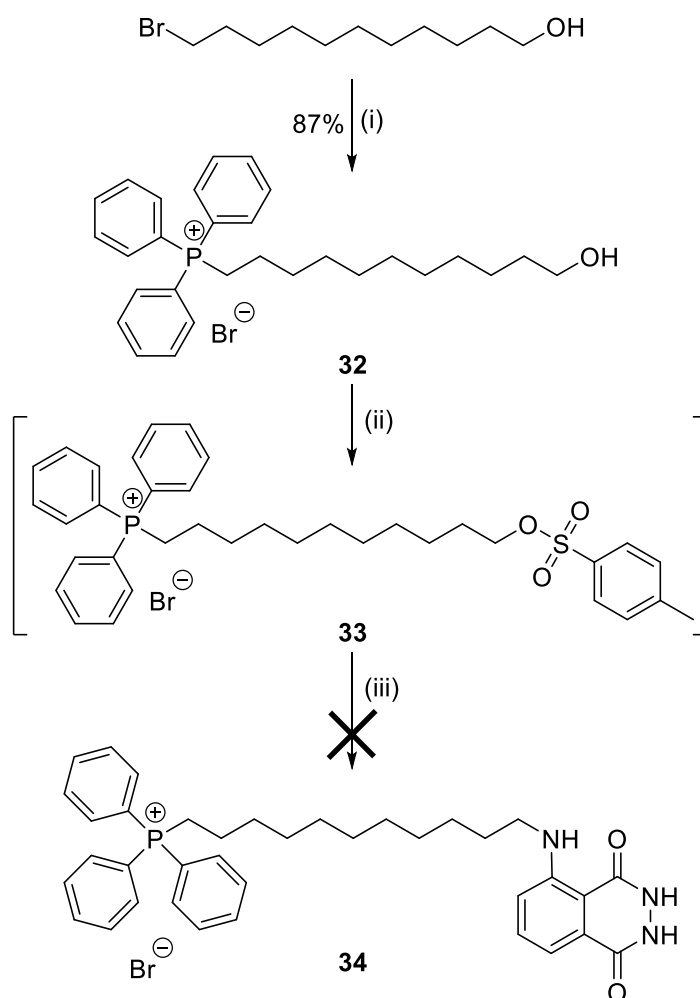
Σχήμα 18. Απόπειρα αλκυλίωσης της λουμινόλης με τοσυλοενδεκυλοβρωμίδιο. Συνθήκες: (i) TsCl, Et₃N, DMAP, THF, 0-20°C, 18h, (ii) LH₂, DMF, 90°C.

Όπως φαίνεται στο φάσμα ¹H-NMR της ένωσης **30** (Εικόνα 21), στα 7.79 και 7.41ppm συντονίζονται τα αρωματικά πρωτόνια της τόσυλο ομάδας, ενώ στα 2.45 ppm βλέπουμε τη χαρακτηριστική κορυφή των πρωτονίων του μεθυλίου. Οι τριπλές κορυφές στα 4.01 και 3.43 ppm αντιστοιχούν στα μεθυλενικά πρωτόνια σε άλφα θέση ως προς την τόσυλο ομάδα και το βρώμιο αντίστοιχα. Επιπλέον, στο φάσμα ¹³C-NMR, στα 131.02 και 128.94 ppm συντονίζονται οι τριτοταγείς άνθρακες του αρωματικού δακτυλίου, και στα 146.28 και 134.54 ppm συντονίζονται οι τεταρτοταγείς άνθρακες του αρωματικού δακτυλίου. Χαρακτηριστική κορυφή επίσης είναι στα 71.94 ppm, όπου συντονίζεται ο άνθρακας σε άλφα θέση ως προς το οξυγόνο της τοσυλομάδας, αλλά και στα 21.64 ppm όπου συντονίζεται ο άνθρακας της μεθυλομάδας, ενώ από τα 34.50 μέχρι τα 26.39 ppm συντονίζονται οι υπόλοιποι αλειφατικοί άνθρακες.



Εικόνα 21 Φάσματα $^1\text{H-NMR}$ (πάνω, 200 MHz, CD_3OD) και $^{13}\text{C-NMR}$ (κάτω, 50 MHz, CD_3OD) της ένωσης **30**.

Θεωρώντας ότι ο συνδυασμός του βρωμιδίου με την τόσυλο ομάδα μπορεί να ευθυνόταν για το παραπάνω κακό αποτέλεσμα, αποφασίστηκε η σύνθεση ενός παραγώγου ανθρακικής αλυσίδας, το οποίο θα έφερε τόσυλο ομάδα στο ένα άκρο και φωσφονιακό κατιόν στο άλλο. [54] Έτσι, συντέθηκε αρχικά το φωσφονιακό κατιόν **32** από την αντίδραση της 11-βρωμοενδεκανόλης με τριφαινυλοφωσφίνη σε ακετονιτρίλιο υπό βρασμό σε πολύ καλή απόδοση (Σχήμα 19). Έπειτα επιχειρήθηκε η τοσυλίωση του **32** με τον ίδιο τρόπο που πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της **30**. Το αποτέλεσμα ήταν ένα μίγμα το οποίο από τα φασματοσκοπικά δεδομένα έδειξε ότι αποτελούταν από το επιθυμητό προϊόν **33** και το αντίστοιχο προϊόν χλωρίωσης. Το μίγμα αυτό δεν ήταν δυνατό να διαχωριστεί, και χρησιμοποιήθηκε έτσι στο επόμενο στάδιο. Η αντίδραση όμως με τη λουμινόλη έδωσε πάλι πολύπλοκο μίγμα, από τα φασματοσκοπικά δεδομένα του οποίου δεν φάνηκε ο σχηματισμός του επιθυμητού προϊόντος **34**.

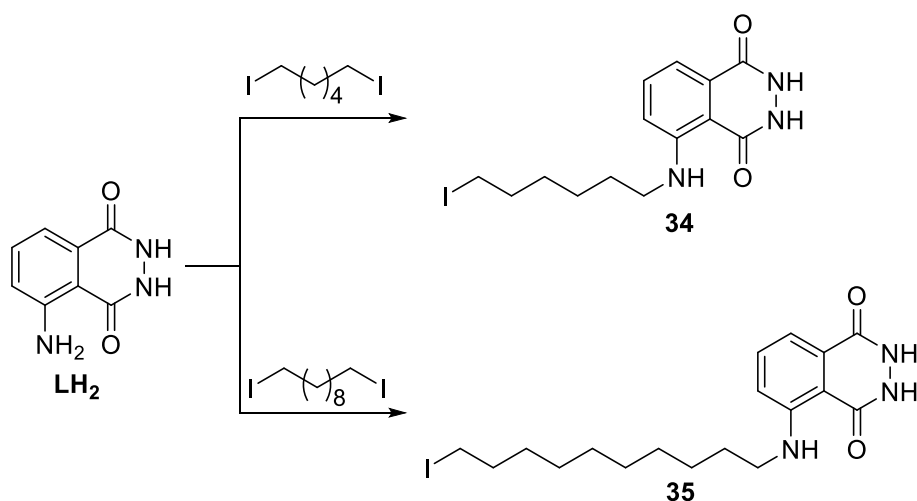


Σχήμα 19. Απόπειρα αλκυλίωσης της λουμινόλης με τοςυλοενδεκυλοφωσφινικό άλας. Συνθήκες: (i) PPh_3 , MeCN, Δ , (ii) TsCl, Et_3N , DMAP, THF, $0-20^\circ\text{C}$, 18h, (iii) LH_2 , DMF, 90°C .

6.3.3 Διωδοαλκάνια

Αφού τα τόσυλο παράγωγα δεν είχαν το επιθυμητό αποτέλεσμα, τα ιωδίδια ήταν η επόμενη εναλλακτική λύση ως πιο αποτελεσματική αποχωρούσα ομάδα σε σχέση με τα βρωμίδια. Έτσι πραγματοποιήθηκε μια σειρά αντιδράσεων αλκυλίωσης της λουμινόλης από διωδοεξάνιο και διωδοδεκάνιο (Σχήμα 20), προκειμένου να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες αντίδρασης, κατά τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκαν πιο πάνω στην περίπτωση των διβρωμιδίων. Από τα πειράματα που έγιναν, καταδείχθηκε ότι η αντίδραση απαιτεί 1 ισοδύναμο διωδοαλκάνιου με θέρμανση στους 110°C

για 1 μέρα. Επίσης, όπως και στην περίπτωση των βρωμιδίων, όταν η αντίδραση γίνεται σε DMF, παρατηρείται ο σχηματισμός φορμυλιωμένου προϊόντος τόσο στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ όσο και στο φάσμα MS του μίγματος της αντίδρασης. Έτσι, χρησιμοποιήθηκε το NMP ως εναλλακτικός διαλύτης, αλλά και εδώ (όπως και με τα διβρωμίδια) χρειάστηκαν διερευνητικές αντιδράσεις προκειμένου να γίνει καταβύθιση του προϊόντος και να αποφευχθεί η εκχύλιση που μειώνει εξαιρετικά την απόδοση. Παρόλα αυτά, και εδώ σχηματίζονται δι- και ολιγομερή παραπροϊόντα καθιστώντας αδύνατη την απομόνωση του μονοαλκυλιωμένου προϊόντος (**34** ή **35**) σε επαναλήψιμα αποδεκτή απόδοση και καθαρότητα. Τα παραπροϊόντα αυτά εμφανίζονταν καλύτερα στα φάσματα MS μετά την αντίδραση με τριφαινυλοφωσφίνη (όπως αναφέρθηκε παραπάνω στην περίπτωση των βρωμιδίων), ως σταθερά μοριακά ιόντα φωσφονιακών κατιόντων.



Σχήμα 20 Σχηματικές αντιδράσεις αλκυλίωσης της λουμινόλης με διωδοαλκάνια.

Συμπερασματικά, τα διωδιδία εμφανίζουν παρόμοια αποτελέσματα με τα διβρωμίδια, στο ένα τρίτο του χρόνου που απαιτούν τα τελευταία. Έτσι, το ίδιο αποτέλεσμα επιτυγχάνεται σε 3 ημέρες αντίδρασης των βρωμιδίων και σε 1 ημέρα αντίδρασης των ιωδιδίων. Είναι λοιπόν ξεκάθαρο ότι τα διωδιδία αποτελούν πιο αποτελεσματική επιλογή.

6.4 Συμπεράσματα

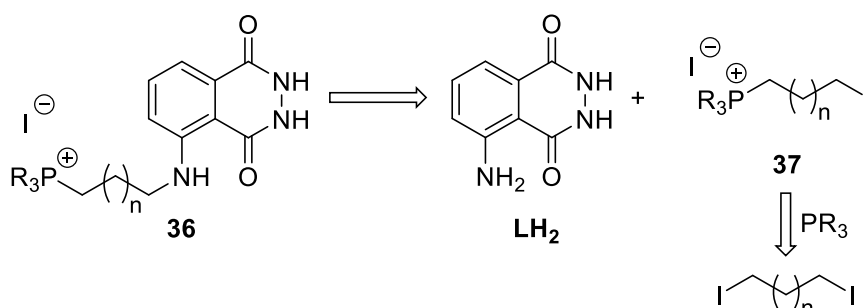
Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα που περιγράφηκαν σε αυτό το κεφάλαιο, μπορούμε να ξεχωρίσουμε τα εξής:

1. Η αλκυλίωση της άμινο ομάδας της λουμινόλης πρέπει να γίνει απουσία βάσης, καθώς οι βασικές συνθήκες ευνοούν την αλκυλίωση στα άτομα οξυγόνου του υδραζιδικού δακτυλίου.
2. Η αντίδραση πρέπει να γίνει με θέρμανση σε πολικό μη πρωτικό διαλύτη, και ειδικότερα σε NMP. Στις αντιδράσεις σε DMF εμφανίζεται ανεπιθύμητη άμινο φορμυλίωση, ενώ στο DMSO παρατηρείται βρωμίωση του αρωματικού δακτυλίου.
3. Το αλκυλιωτικό μέσο είναι προτιμότερο να είναι ιωδίδιο, καθώς τα ιωδίδια αντιδρούν ταχύτερα από τα αντίστοιχα βρωμίδια, μειώνοντας τον χρόνο της αντίδρασης στο 1/3. Τα τοσυλιωμένα παράγωγα αποδείχθηκαν αναποτελεσματικά.
4. Παρατηρείται σχηματισμός oligομερικών παραπροϊόντων, λόγω αντίδρασης των διαλογονιδίων με πρωτοταγή αμίνη. Ο σχηματισμός αυτών υποδεικνύει ότι η προσέγγιση αντίδρασης αλκυλίωσης της λουμινόλης με χρήση διαλογονιδίων πρέπει να εγκαταλειφθεί, και να διερευνηθούν συνθήκες αλκυλίωσης με μονοαλογονίδια, προς το σχηματισμό των ενώσεων στόχων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

Σύνθεση Μιτοτροπικών 5-*N*-Αλκυλιωμένων Παραγώγων της Λουμινόλης

Η δυσκολία απομόνωσης του προϊόντος, αλλά και ο πολυμερισμός που προέκυπτε λόγω διαλκυλίωσης της λουμινόλης, μας οδήγησαν στο να αλλάξουμε συνθετική πορεία. Έτσι προσπαθήσαμε να συνθέσουμε το μιτοτροπικό παράγωγο της λουμινόλης, συνδυάζοντας πρώτα την ανθρακική «γέφυρα» με τη φωσφίνη και στη συνέχεια να εισάγουμε τη λουμινόλη (Σχήμα 21).

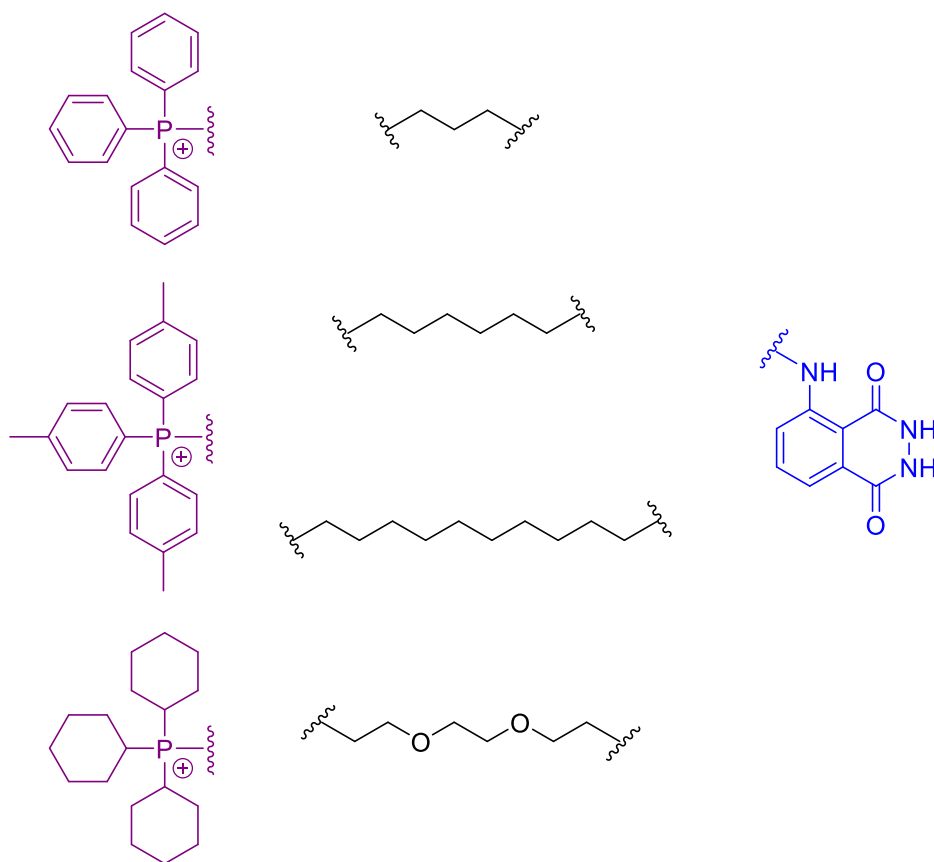


Σχήμα 21 Ρετροσυνθετικό σχήμα για τη δημιουργία των μιτοτροπικών παραγώγων της λουμινόλης.

Με αυτό τον τρόπο μπορούμε να μειώσουμε τον ολιγομερισμό της λουμινόλης, καθώς η αντίδραση αλκυλίωσής της πραγματοποιείται με ένα μονοιωδίδιο, και όχι διωδίδιο όπως στις μέχρι τώρα προσεγγίσεις. Επίσης, αυτή η προσέγγιση μπορεί να αποτρέψει και τη διαλκυλίωση της αμινο ομάδας της λουμινόλης. Η δευτεροταγής αμινο ομάδα του μονοαλκυλιωμένου προϊόντος **36**, είναι πολύ παρεμποδισμένη στερεοχημικά λόγω της ύπαρξης του ογκώδους (τριάρυλο ή τρικυκλοέξυλο) φωσφινικού κατιόντος στην άλλη άκρη της αλυσίδας, και αναμένεται να δυσχεραίνεται σημαντικά η αλκυλίωσή της από ακόμη ένα μόριο του κατιόντος **37**.

Για τη σύνθεση των παραγώγων αυτών, χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές φωσφίνες (τριφαίνυλο, τρις(*p*-τόλυλο), και τρικυκλοέξυλο) και τέσσερις διαφορετικές γέφυρες, τρεις αλκυλικές αλυσίδες μεταβλητού μήκους (δέκυλο, έξυλο, πρόπυλο) και μια αλυσίδα τριαιθυλενογλυκόλης (TEG) (Εικόνα 22). Ο συνδυασμός τους, έδωσε τα επιθυμητά προϊόντα, τα οποία

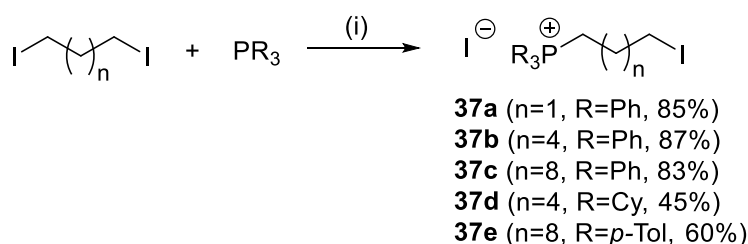
στη συνέχεια αποστάλησαν στα συνεργαζόμενα ερευνητικά ιδρύματα που συμμετέχουν στο σχετιζόμενο Ευρωπαϊκό Ερευνητικό Πρόγραμμα Horizon 2020, τόσο για φυσικοχημική όσο και για βιολογική αξιολόγηση. Αυτή η ποικιλομορφία στη δομή των μορίων έχει ως στόχο τη μελέτη της επιρροής του μήκους και της φύσης της γέφυρας, όπως και των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του μιτοχονδριοτροπικού τμήματος (φωσφονιακού άλατος) στη βιολογική δράση και φυσικοχημική συμπεριφορά των μορίων.



Εικόνα 22 Τα φωσφονιακά κατιόντα και οι αλυσίδες (spacers) που συνδυάστηκαν με τη λουμινόλη στα μιτοτροπικά παράγωγα.

7.1 Σύνθεση φωσφίνο-αλκυλο-ιωιδιδίων

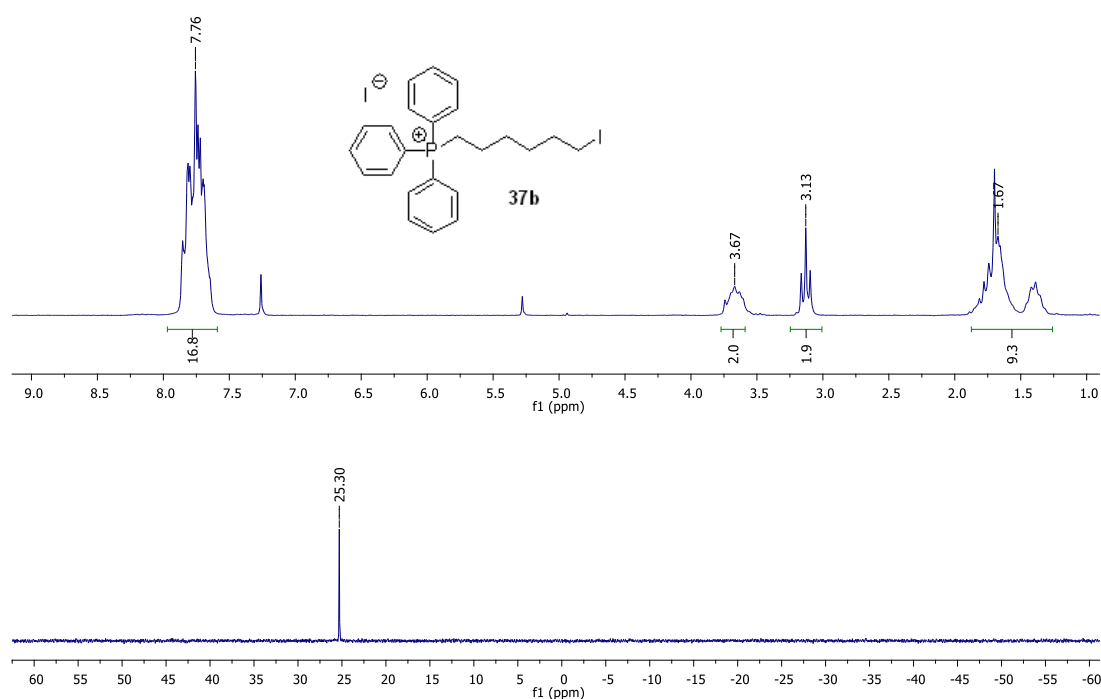
Αρχικά συνδυάστηκε η τριφαινυλοφωσφίνη με τα απαραίτητα διιωδιδία προκειμένου να παραληφθούν οι ενώσεις **37a-c** (Σχήμα 22), καθώς πραγματοποιήθηκε αντίδραση πυρηνόφιλης αλειφατικής υποκατάστασης S_N2 της τριφαινυλοφωσφίνης με τα εμπορικά διαθέσιμα διιωδιδία διιωδοπροπάνιο, διιωδοεξάνιο και διιωδοδεκάνιο. Τα διιωδιδία βρίσκονταν σε μεγάλη περίσσεια (5 eq) σε σχέση με τη φωσφίνη, προκειμένου να αποφευχθεί η διυποκατάσταση. [55] Και οι τρεις αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν χωρίς διαλύτη, με αρκετά καλές αποδόσεις (85, 87 και 83% αντίστοιχα) και τα προϊόντα παραλήφθησαν, μετά από έκπλυση με διαιθυλαιθέρα και καταβύθιση στερεού με χρήση διχλωρομεθανίου και δεκαπλάσιου όγκου διαιθυλαιθέρα μετά από δύο ημέρες στο ψυγείο. Με την ίδια μέθοδο συντέθηκαν και τα παράγωγα **37d** και **37e** που προέρχονται από την αλκυλίωση της τρικυκλοξυλο και τρις(*p*-τόλυλο) φωσφίνης αντίστοιχα.



Σχήμα 22. Σύνθεση των φωσφίνο-αλκυλο-ιωιδιδίων. Συνθήκες: (i) 100°C, 1.5 h.

Η επιτυχία των αντιδράσεων και η καθαρότητα των προϊόντων προσδιορίζεται αρκετά εύκολα μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας και από τα φάσματα ¹H-NMR και ³¹P-NMR, καθώς η φωσφίνη είτε καταναλώνεται πλήρως είτε απομακρύνεται πλήρως με την έκπλυση με το διαιθυλαιθέρα. Στην περίπτωση της τριφαινυλοφωσφίνης (και της τρις(*p*-τόλυλο)φωσφίνης), όπως είδαμε και σε προηγούμενο κεφάλαιο, το αλκυλιωμένο φωσφονιακό ιόν εμφανίζει κορυφή στα 24 – 26 ppm, ενώ ο φωσφόρος της τριφαινυλοφωσφίνης συντονίζεται στα -6 ppm. Αντίστοιχα, ο φωσφόρος της τρικυκλοξυλοφωσφίνης συντονίζεται στα 51 ppm, ενώ τα αλκυλιωμένα παράγωγά της δίνουν κορυφή στα 32 – 34ppm. Στην Εικόνα 23 φαίνονται τα

φάσματα $^1\text{H-NMR}$ και $^{31}\text{P-NMR}$ της ένωσης **37b**. Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$, στα 7.9 – 7.6 ppm συντονίζονται τα αρωματικά πρωτόνια της φωσφίνης, ενώ στα 3.67 ppm και 3.13 ppm συντονίζονται τα πρωτόνια σε άλφα θέση ως προς την τριφαινυλοφωσφίνη και το ιώδιο αντίστοιχα. Επίσης, στο φάσμα $^{31}\text{P-NMR}$, φαίνεται κορυφή στα 25.30 ppm, μια κορυφή που υποδηλώνει την ύπαρξη αλκυλιωμένης τριφαινυλοφωσφίνης.



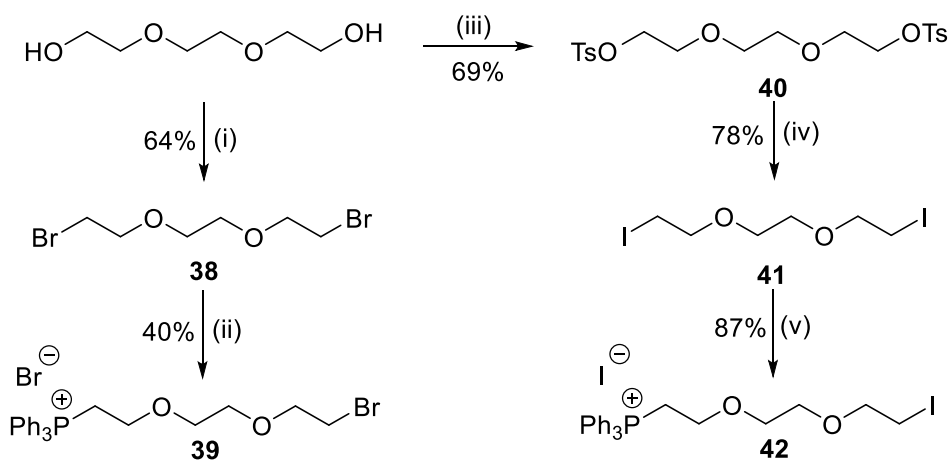
Εικόνα 23 Φάσματα $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3 , πάνω) και $^{31}\text{P NMR}$ (81 MHz, CDCl_3 , κάτω) της ένωσης **37b**.

7.2 Σύνθεση φωσφίνο-TEG-αλογονιδίων

Για τη σύνθεση του μιτοτροπικού παραγώγου της λουμινόλης που θα φέρει αλυσίδα τριαιθυλενογλυκόλης έπρεπε να συντεθούν πρώτα τα αντίστοιχα διαλογονίδια, τα οποία στη συνέχεια θα αντιδράσουν με την τριφαινυλοφωσφίνη προς το σχηματισμό των φωσφίνο-TEG-αλογονιδίων. Αποφασίστηκε η σύνθεση και του βρωμιδίου **39** και του ιωδιδίου **42** (Σχήμα 23), για να διερευνηθεί η σχετική δραστηριότητά τους ως προς την αλκυλίωση της λουμινόλης.

Η πρώτη ύλη και των δύο παραγώγων είναι η τριαιθυλενογλυκόλη. Η βρωμίωση της προς το διβρωμίδιο **38** έγινε με τετραβρωμάνθρακα σε περίσσεια (2.17 eq) παρουσία τριφαινυλοφωσφίνης σε διχλωρομεθάνιο για 3 ώρες με απόδοση 64% έπειτα από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης. [56] Έπειτα, η ένωση **38** αντέδρασε με τριφαινυλοφωσφίνη υπό τις συνθήκες που περιγράφηκαν πιο πάνω για τα αλκυλοϊωδίδια (χωρίς διαλύτη, 100°C), δίνοντας, μέσω αντίδρασης πυρηνόφιλης υποκατάστασης του ατόμου του βρωμίου από την τριφαινυλοφωσφίνη, το **39** σε απόδοση 40%.

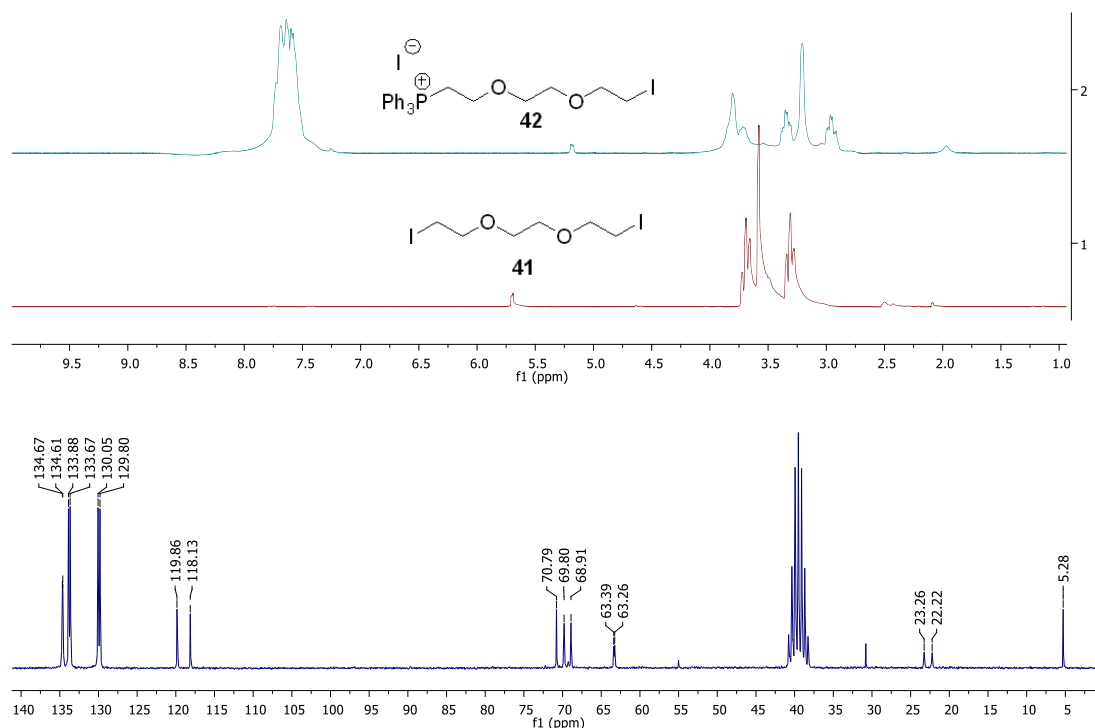
Όσον αφορά στο ιωδίδιο, [57] [58] η τριαιθυλενογλυκόλη τοσυλιώθηκε με περίσσεια (3 eq) 4-τολουολοσουλφόνυλο χλωριδίου παρουσία καυστικού καλίου σε διχλωρομεθάνιο για 3 ημέρες προκειμένου να λάβουμε το διτοσυλιωμένο παράγωγο **40** με απόδοση 69%. Αυτό μετατράπηκε στο διιωδίδιο **41** αφού αντέδρασε με ιωδιούχο νάτριο σε ακετόνη με απόδοση 78%. Στη συνέχεια, αντίδραση με τριφαινυλοφωσφίνη έδωσε το φωσφινό-TEG-ιωδίδιο **42** με απόδοση 87%.



Σχήμα 23 Σύνθεση των φωσφινό-TEG-αλογονιδίων **39** και **42**. Συνθήκες: (i) CBr₄, PPh₃, CH₂Cl₂, (ii) 100°C, 2 h, (iii) TsCl, KOH, CH₂Cl₂, (iv) KI, ακετόνη, (v) 100°C, 1.5 h.

Το φάσμα ¹H-NMR του φωσφινό-TEG-ιωδιδίου **42** (Εικόνα 24) εμφανίζει τα πρωτόνια της τριφαινυλοφώσφινο ομάδας στην αρωματική περιοχή, και αυτά της τριαιθυλενογλυκόλης στην περιοχή 4 – 2.8 ppm. Συγκρινόμενο με αυτό του πρόδρομου διιωδιδίου **41**, είναι φανερή η άρση της συμμετρίας που

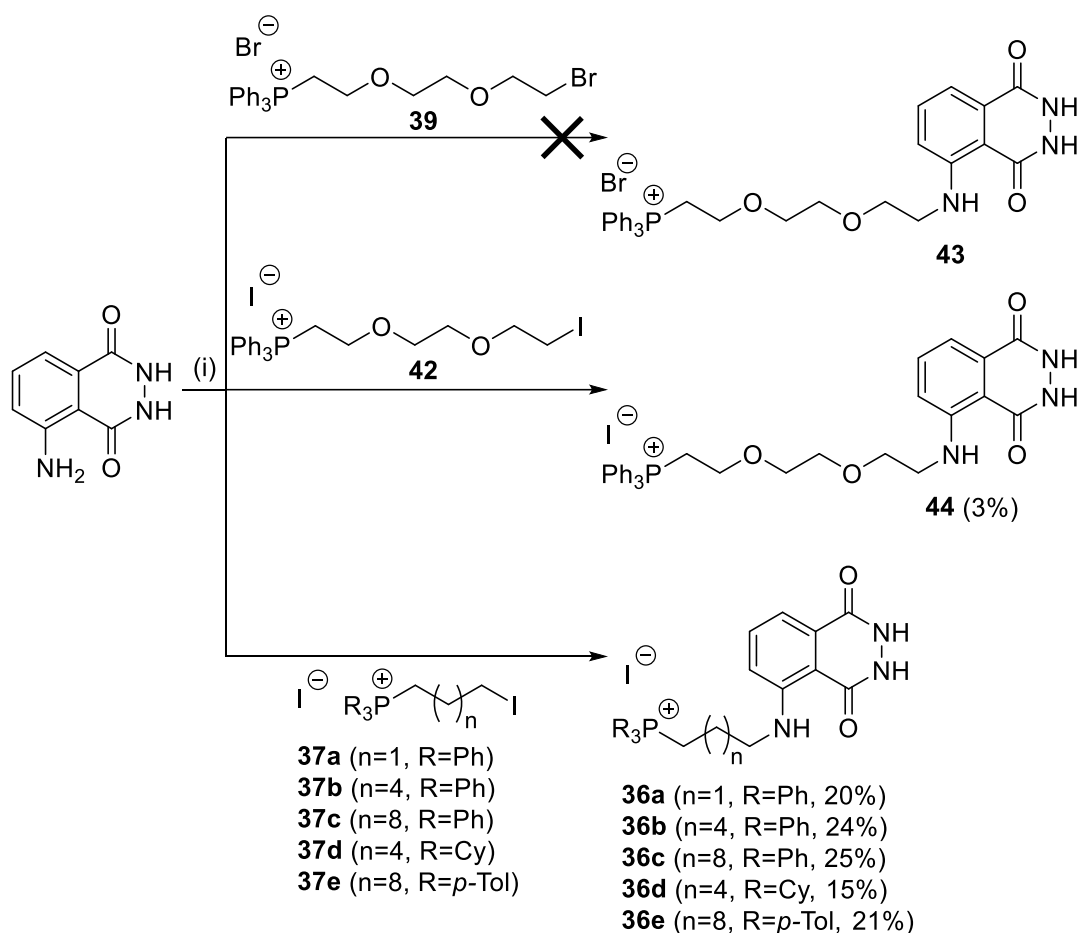
προκαλείται στην TEG αλυσίδα από την εισαγωγή της τριφαινυλοφώσφινο ομάδας. Επίσης, στο φάσμα ^{13}C -NMR της **42**, διακρίνονται οι 4 κεντρικοί άνθρακες της TEG αλυσίδας αρκετά αποπροστατευμένοι (71-63 ppm), ενώ οι άνθρακες σε θέση άλφα ως προς τον φωσφόρο και το ιώδιο εμφανίζονται στα 23.7 (διπλή) και 5.3 ppm αντίστοιχα.



Εικόνα 24 Φάσματα ^1H NMR των **42** (200 MHz, CDCl_3 , πάνω) και **41** (200 MHz, DMSO-d_6 , μέση). Κάτω: Φάσμα ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO-d_6) της ένωσης **42**.

7.3 Σύνθεση των μιτοτροπικών παραγώγων της λουμινόλης

Στη συνέχεια, αφού συντέθηκαν τα αλογονίδια που φέρουν τα φωσφονιακά κατιόντα, επιχειρήθηκε η αντίδρασή τους με τη λουμινόλη, σύμφωνα με τις συνθήκες που θεωρήθηκαν ως βέλτιστες στο προηγούμενο κεφάλαιο. Έτσι, η λουμινόλη αντέδρασε με το κατάλληλο αλογονίδιο (**37a-e**, **39** ή **42**) σε NMP στους 110-120°C σε άνυδρες συνθήκες για 18 ώρες (Σχήμα 24). Το αποτέλεσμα ήταν να παραληφθεί το επιθυμητό προϊόν σε κάθε περίπτωση, εκτός από την αντίδραση με το TEG-βρωμίδιο **39**.



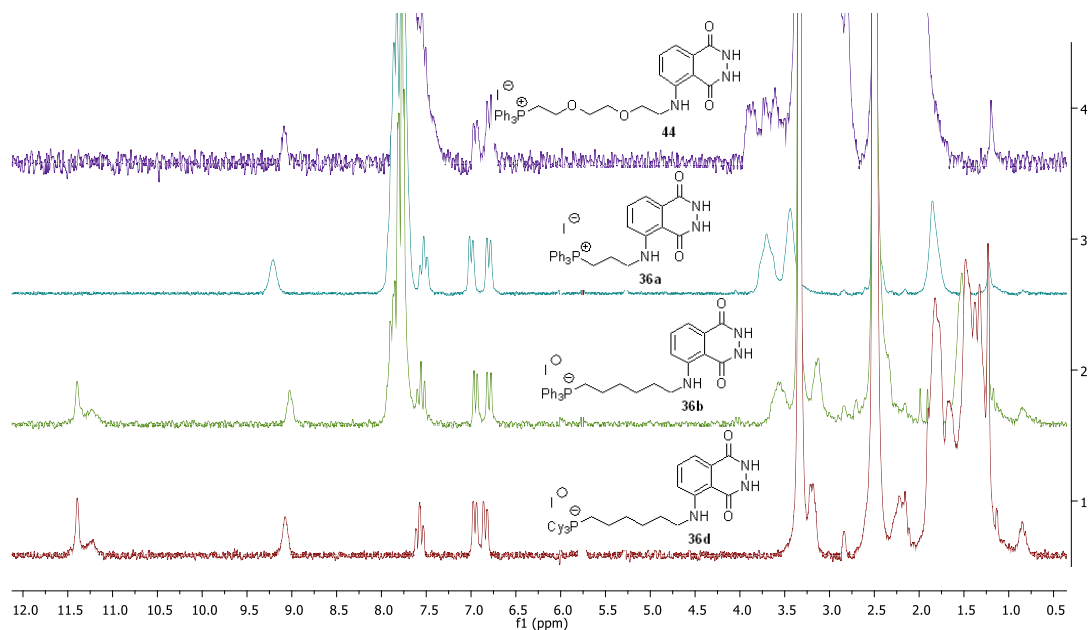
Σχήμα 24 Σύνθεση των μιτοτροπικών παραγώγων της λουμινόλης. Συνθήκες: (i) NMP, 110°C, 18 h.

Στις υπόλοιπες περιπτώσεις, το προϊόν παραλαμβάνεται έπειτα από εξαιρετικά δύσκολο χρωματογραφικό διαχωρισμό. Τόσο η (μη αντιδρώσα) λουμινόλη όσο και τα προϊόντα είναι αρκετά πολικές ενώσεις, με αποτέλεσμα να χρειάζονται αρκετά πολικά μίγματα διαλυτών έκλουσης στη χρωματογραφία στήλης. Η βέλτιστη αλληλουχία διαλυτών έκλουσης για να επιτευχθεί διαχωρισμός και να παραληφθεί το προϊόν καθαρό ήταν: DCM 100%, DCM/EA 50/50, DCM/EA/MeOH 50/50/3, DCM/EA/MeOH 45/45/10, DCM/EA/MeOH 60/30/10, DCM/MeOH 90/10, DCM/MeOH 80/20, DCM/MeOH 70/30, DCM/MeOH 60/40. Ο οξικός αιθυλεστέρας στον διαλύτη έκλουσης, παρασύρει τη λουμινόλη και, μετά την απομάκρυνσή της, το κλάσμα της μεθανόλης αυξάνεται με ταυτόχρονη μείωση του κλάσματος του οξικού αιθυλεστέρα, προκειμένου να παραληφθεί το προϊόν. Αρκετές φορές ήταν αναγκαίο να πραγματοποιηθούν 2 και 3 διαδοχικές στήλες

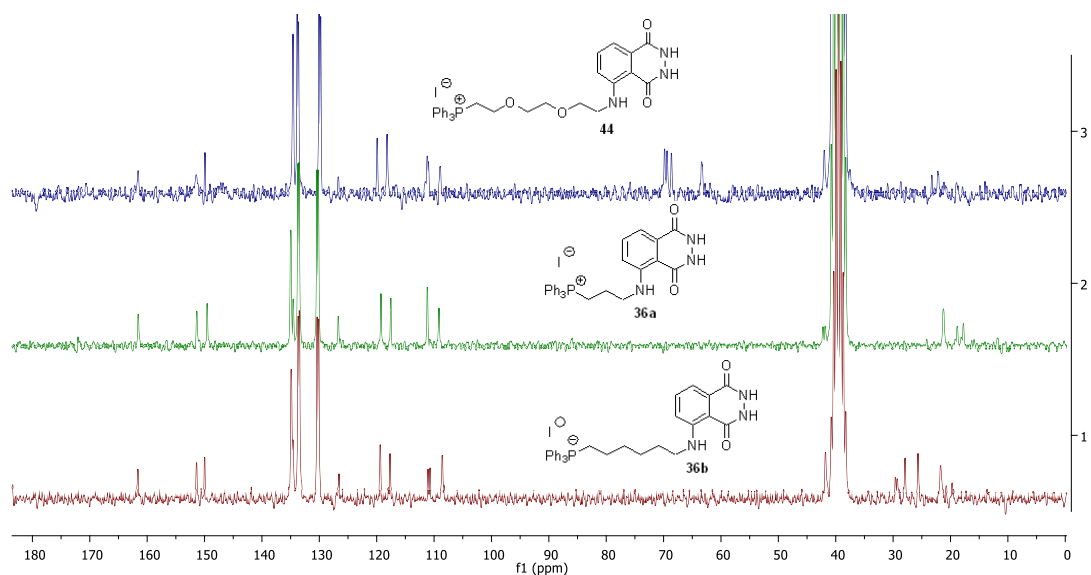
χρωματογραφίας προκειμένου να διαχωριστεί το προϊόν από τη λουμινόλη. Ειδικά στην περίπτωση του TEG παραγώγου **44**, χρειάστηκαν 4 διαδοχικοί χρωματογραφικοί καθαρισμοί, προκειμένου να πάρουμε ένα αρκετά δυσδιάλυτο προϊόν με απόδοση μόλις 3%. Η πλήρης απομάκρυνση της λουμινόλης ήταν εξαιρετικά μεγάλης σημασίας (Εικόνα 27), καθώς η πολύ ισχυρή χημειοφωταύγειά της θα προκαλούσε σημαντικό σφάλμα στις φωτοφυσικές μελέτες των μιτοτροπικών παραγώγων.

Στα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ των μιτοτροπικών προϊόντων (Εικόνα 25) είναι εμφανείς οι κορυφές που υποδεικνύουν 5-*N*-αλκυλίωση της λουμινόλης, όπως παρατηρήθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο. Συγκεκριμένα, παρατηρείται ένα ζεύγος διπλών κορυφών στην περιοχή 7-6.7 ppm και μια τριπλή στα 7.55 ppm που οφείλονται στα πρωτόνια του αρωματικού δακτυλίου, ενώ το πρωτόνιο της αμινο ομάδας συντονίζεται στην περιοχή 9.2-9 ppm. Τα όξινα υδραζιδικά πρωτόνια δεν είναι πάντα εμφανή, αλλά συνήθως φαίνονται ως ευρείες στην περιοχή 11.5-11 ppm. Τα πρωτόνια της μεθυλένο ομάδας σε άλφα θέση ως προς την αμίνη εμφανίζονται στα ≈ 3.1 ppm, εκτός από αυτά της **36a** που επηρεάζονται και από τη φώσφινο ομάδα, και εμφανίζονται στα 3.4 ppm. Η μεθυλένο ομάδα σε άλφα θέση ως προς το φωσφόρο εμφανίζεται στα ≈ 3.7 ppm, εκτός από αυτά της **36d** (κυκλοεξυλοφωσφινικό ιόν) που εμφανίζονται στα 2.2 ppm. Λόγω της πολύ χαμηλής διαλυτότητας του TEG παραγώγου **44** ακόμη και σε DMSO, κάποιες κορυφές του στην περιοχή των αλειφατικών πρωτονίων δεν είναι πολύ εμφανείς, αφού καλύπτονται από τα σήματα διαλυτών και υγρασίας.

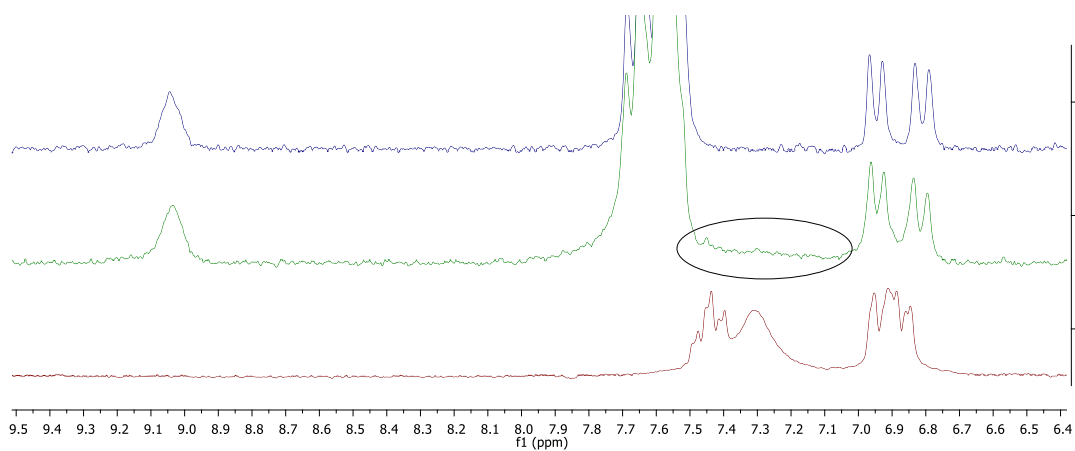
Στα φάσματα $^{13}\text{C NMR}$ (Εικόνα 26) των προϊόντων, παρουσιάζεται ένα επαναλαμβανόμενο μοτίβο όσον αφορά στην περιοχή των αρωματικών και καρβονυλικών ανθράκων. Στην περιοχή των αλειφατικών, η κορυφή στα ≈ 42 ppm αποδίδεται στον άνθρακα της αλυσίδας σε άλφα θέση ως προς το 5-αμινικό άζωτο.



Εικόνα 25 Φάσματα ^1H NMR (200 MHz, DMSO-d_6) των **44**, **36a,b** και **36d** (200 MHz, DMSO-d_6).



Εικόνα 26 Φάσματα ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO-d_6) των **44**, **36a** και **36b**.



Εικόνα 27 Φάσματα ^1H NMR (200 MHz, DMSO-d_6) του **36c** μετά τον καθαρισμό από δύο (πάνω) και μια στήλες χρωματογραφίας (μέση, διακρίνονται οι κορυφές της λουμινόλης). Κάτω: φάσμα ^1H NMR (200 MHz, DMSO-d_6) της λουμινόλης.

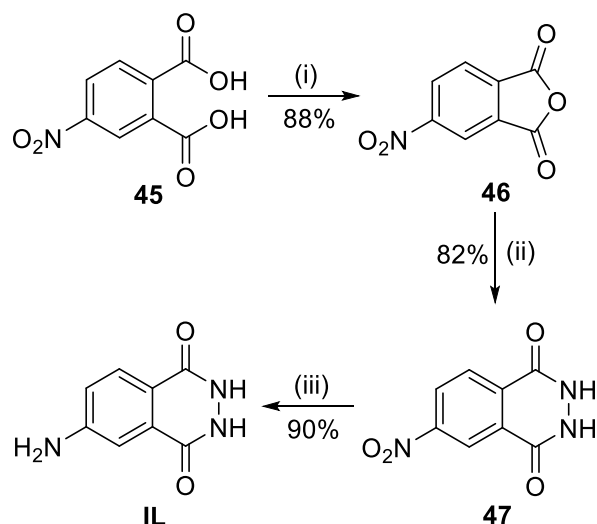
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

Απόπειρες σύνθεσης 6-*N*-αλκυλιωμένων μιτοτροπικών παραγώγων της ισολουμινόλης

Σκοπός του δεύτερου μέρους της παρούσας εργασίας ήταν η σύνθεση μιτοτροπικών αλκυλιωμένων παραγώγων της ισολουμινόλης (6-αμινοφθαλαζινοδιόνη, ισομερές της λουμινόλης). Η 6-*N*-αλκυλίωση της ισολουμινόλης είναι γνωστό βιβλιογραφικά ότι ενισχύει τη χημειοφωταύγεια των παραγώγων. Αυτή η παρατήρηση έχει αποδοθεί σε ηλεκτρονιακούς παράγοντες: η αλκυλίωση της αμινο ομάδας καθιστά ηλεκτρονικά πιο πλούσιο τον αρωματικό δακτύλιο, ενισχύοντας έτσι τη χημειοφωταύγεια, αφού έχει παρατηρηθεί ότι υποκαταστάτες δότες ηλεκτρονίων ενισχύουν τη χημειοφωταύγεια των φθαλυδραζιδικών παραγώγων. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι η 6-*N*-αλκυλίωση (και ακόμα περισσότερο η 6-*N,N*-διαλκυλίωση) ενισχύει τη χημειοφωταύγεια των παραγώγων. Κάποια από αυτά εμφανίζονται να παρουσιάζουν ισχυρότερη χημειοφωταύγεια όχι μόνο σε σχέση με την ισολουμινόλη (η οποία παρουσιάζει το 1/10 της φωταύγειας της λουμινόλης), αλλά έως και διπλάσια από αυτή της λουμινόλης. [59] [60] Για αυτό το λόγο, επιδιώχθηκε η 6-*N*-αλκυλίωση της ισολουμινόλης κατά τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε για τη σύνθεση των αλκυλιωμένων παραγώγων της λουμινόλης στο προηγούμενο κεφάλαιο.

8.1 Σύνθεση Ισολουμινόλης

Για τις αντιδράσεις αλκυλίωσης, χρησιμοποιήθηκε ισολουμινόλη που συντέθηκε στο εργαστήριο όπως φαίνεται στο Σχήμα 25 βασιζόμενοι στη βιβλιογραφία [61] [39] [62], καθώς η εμπορικά διαθέσιμη ισολουμινόλη είναι αρκετά ακριβή.



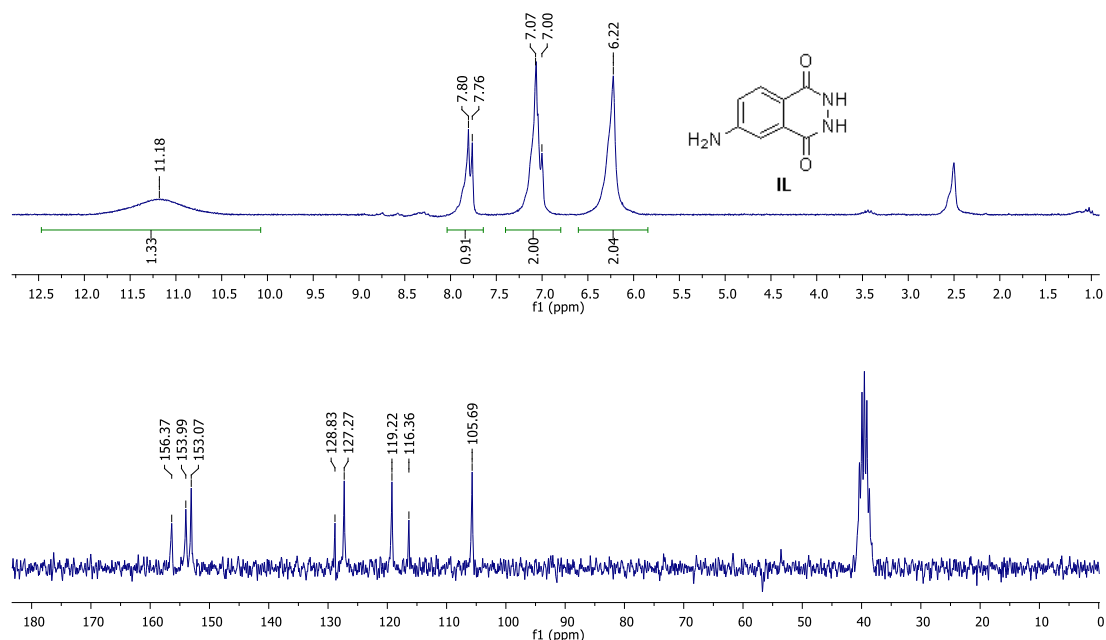
Σχήμα 25. Πορεία σύνθεσης της ισολουμινόλης. Συνθήκες: (i) Ac₂O, Δ, (ii) NH₂NH₂, AcOH, Δ, (iii) H₂, 10% Pd/C, MeOH, 40°C.

Ξεκινώντας από το εμπορικά διαθέσιμο 4-νιτροφθαλικό οξύ **45**, το οποίο αφήσαμε για μισή ώρα υπό αναρροή με οξικό ανυδρίτη, παραλάβαμε τον φθαλικό ανυδρίτη **46** σε απόδοση 88%. Αντίδραση του **46** με υδραζίνη σε διάλυμα οξικού οξέος, έδωσε το νιτροφθαλυδραζίδιο **47** με απόδοση 82%. Σε αυτό το βήμα, παρατηρήσαμε ότι για μικρές ποσότητες του **46**, αρκεί ισομοριακή ποσότητα της υδραζίνης (1.05 eq) ως προς το **46**. Όταν όμως η ποσότητα του **46** είναι μεγαλύτερη του 1 γραμμαρίου, απαιτούνται περισσότερα ισοδύναμα υδραζίνης (1.5 – 2 eq) για να παραληφθεί το προϊόν σε καλή απόδοση. Για το τελευταίο βήμα της αναγωγής της νιτροομάδας πραγματοποιήθηκαν αρκετές αντιδράσεις προκειμένου να βρεθούν οι ιδανικές συνθήκες καταλυτικής υδρογόνωσης (Πίνακας 4). Τελικά καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι αν δεν χρησιμοποιήσουμε αυτόκλειστο δοχείο (περίπτωση 4), χρειαζόμαστε 10% παλλάδιο σε άνθρακα (10%) σε απόλυτη αιθανόλη, για να απομονώσουμε την ισολουμινόλη με απόδοση 82% (περίπτωση 1).

Στην Εικόνα 28 φαίνεται το φάσμα ¹H-NMR της ισολουμινόλης που συνθέσαμε. Στα 7.78 ppm εμφανίζεται ως διπλή το πρωτόνιο σε θέση μέτα ως προς την αμινομάδα (H-8), ενώ στα 7.05 ppm εμφανίζονται αυτά σε θέση όρθο ως προς την αμινομάδα (H-5, H-7). Τα πρωτόνια της αμινομάδας δίνουν μια ευρεία στα 6.22 ppm, ενώ στα περίπου 11 ppm εμφανίζονται τα υδραζιδικά πρωτόνια ως πολύ ευρεία.

α/α	w/w % Pd/C 10%	Διαλύτης	Απόδοση
1	10%	Απόλυτη αιθανόλη	82%
2	5%	Απόλυτη αιθανόλη	63%
3	10%	Αιθανόλη 99.8%	62%
4	10%	Μεθανόλη (40°C)	90%
5	10%	Μεθανόλη (40°C)	75%

Πίνακας 4. Συνθήκες υδρογόνωσης της **47** προς σχηματισμό ισολουμινόλης.

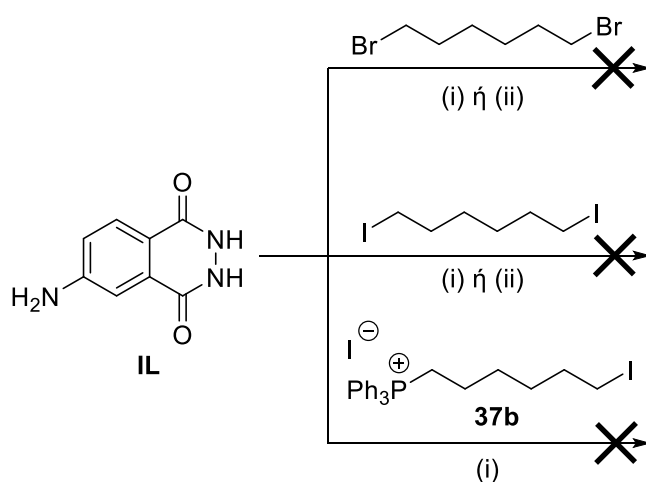


Εικόνα 28 Φάσματα ^1H NMR (200 MHz, DMSO-d_6 , πάνω) και ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO-d_6 , κάτω) της ισολουμινόλης.

8.2 Προσπάθειες 6-*N*-αλκυλίωσης της ισολουμινόλης

Αφού συντέθηκε η ισολουμινόλη, έγιναν προσπάθειες αλκυλίωσής της, με βάση τις συνθήκες που έγιναν οι αλκυλιώσεις της λουμινόλης που περιγράφηκαν στα προηγούμενα κεφάλαια. Θεωρήσαμε ότι η 6-αμινομάδα της ισολουμινόλης θα ήταν περισσότερο πυρηνόφιλη από την 5-αμινομάδα της λουμινόλης, αφού η πρώτη δεν έχει καρβονύλιο σε όρθο θέση για να την απενεργοποιεί. Έτσι, χρησιμοποιήσαμε τα αντιδρώντα που έδωσαν τα πιο

αξιόλογα αποτελέσματα και τις ιδανικές συνθήκες στους διαλύτες DMF και NMP στην περίπτωση της λουμινόλης, προκειμένου να τα συγκρίνουμε με τα αποτελέσματα που θα δώσουν οι αντιδράσεις αλκυλίωσης της ισολουμινόλης. Στο Σχήμα 26 φαίνονται κάποιες επιλεγμένες αντιδράσεις αλκυλίωσης που επιχειρήθηκαν. Συγκριτικά με τις αντίστοιχες της λουμινόλης, τα προϊόντα των αντιδράσεων είχαν χαμηλότερη διαλυτότητα, και μεγαλύτερη δυσκολία στην απομόνωση των προϊόντων. Έτσι, σε καμία περίπτωση δεν απομονώθηκε κάποιο προϊόν, πόσο μάλλον το επιθυμητό.



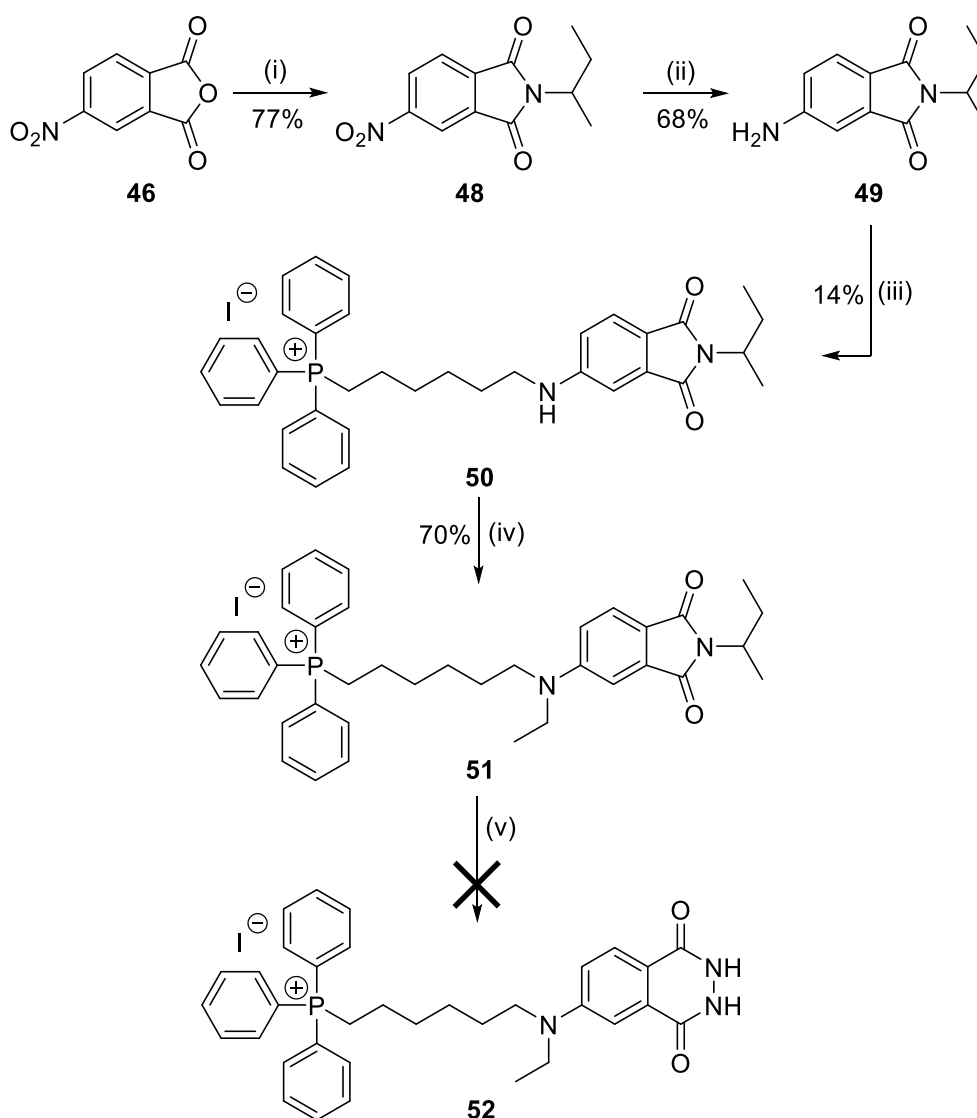
Σχήμα 26. Απόπειρες αλκυλίωσης της λουμινόλης. Συνθήκες: (i) NMP, 110°C, (ii) DMF, 110°C.

8.3 Προσπάθειες σύνθεσης 6-*N*-αλκυλιωμένων παραγώγων της ισολουμινόλης μέσω φθαλιμιδίων

Από τη στιγμή που δεν ήταν δυνατή η αλκυλίωση της ισολουμινόλης, επιχειρήθηκε η βιβλιογραφική μέθοδος σύνθεσης 6-*N*-αλκυλιωμένων παραγώγων της ισολουμινόλης μέσω φθαλιμιδίων (Σχήμα 27), και πιο συγκεκριμένα η σύνθεση του *N,N*-διαλκυλιωμένου παραγώγου **52**. [59][44]

Αρχικά, ο ανυδρίτης **46** αντιδρά με δευτεροταγή βουτυλαμίνη, προς το φθαλιμίδιο **48**, το οποίο ουσιαστικά είναι μια σταθερή προστατευμένη μορφή του φθαλυδραζιδίου, το οποίο θα παραχθεί από την υδραζινόλυση του φθαλιμιδίου. Το νιτροφθαλιμίδιο **48** ανάγεται στο αμινοφθαλιμίδιο **49** με καταλυτική υδρογόνωση. Ακολουθεί αντίδραση αλκυλίωσης με το μιτοτροπικό

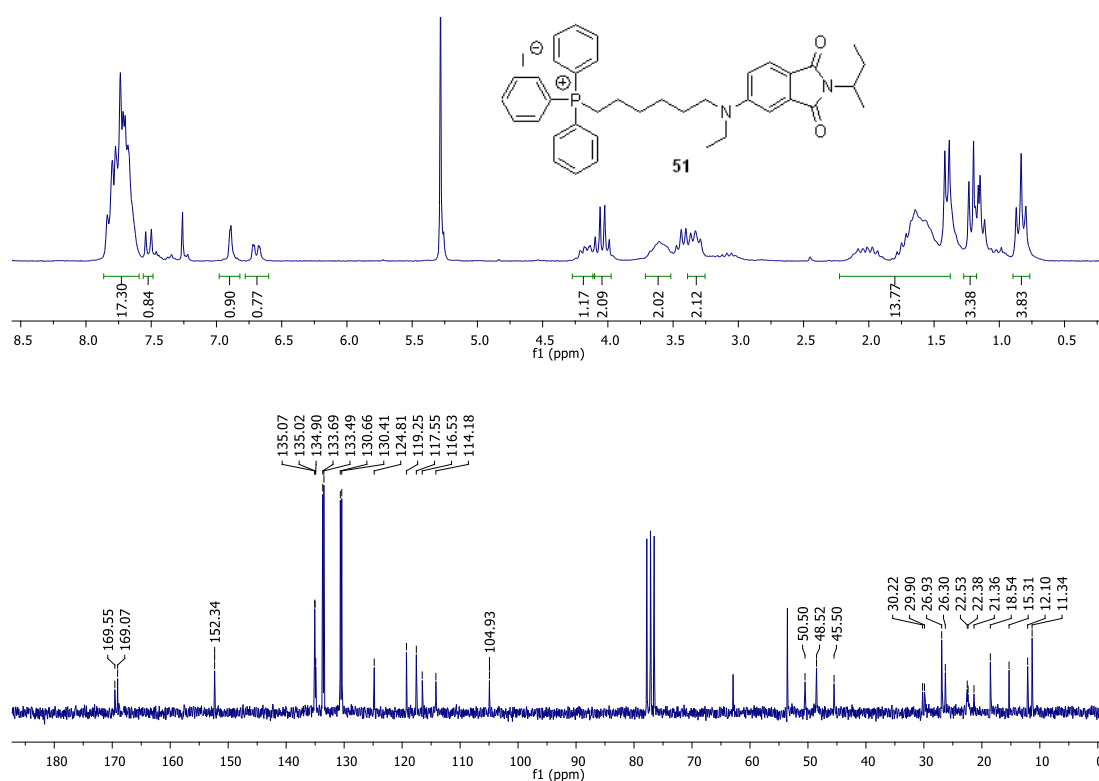
ιωδίδιο **37b** χρησιμοποιώντας τις βέλτιστες συνθήκες αλκυλίωσης (NMP, 120°C). Μετά την υδατική επεξεργασία, το μίγμα της αντίδρασης καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης, οπότε και παραλαμβάνεται η ένωση **50** σε απόδοση 14%, μια απόδοση που είναι αναμενόμενη, καθώς το αντίστοιχο βήμα στη λουμινόλη δίνει αποδόσεις της τάξης του 15-20%. Κατόπιν, αντίδραση αιθυλίωσης της **50** με θειικό διαιθυλαιθέρα δίνει, ύστερα από καθαρισμό του μίγματος της αντίδρασης με χρωματογραφία στήλης, την ένωση **51** σε απόδοση 70%.



Σχήμα 27. Συνθετική προσέγγιση του διαλκυλιωμένου παραγώγου **52**. Συνθήκες: (i) *sec*-BuNH₂, AcOH, Δ, (ii) H₂, 10% Pd/C, MeOH, (iii) **37b**, NMP, 120°C, (iv) Et₂SO₄, 140°C, (v) NH₂NH₂, EtOH, Δ.

Οι απόπειρες υδραζίνωσης της **51** με υδραζίνη σε απόλυτη αιθανόλη υπό επαναρροή δεν είχαν αποτέλεσμα, καθώς ναι μεν καταναλωνόταν η **51** αλλά

δεν παραγόταν το επιθυμητό προϊόν **52**, παρά ένα μίγμα μη απομονώσιμων προϊόντων. Από τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μίγματος φαινόταν ότι κατά πάσα πιθανότητα παράγονταν παραπροϊόντα που οφείλονταν σε αποκοπή της ομάδας της τριφαινυλοφωσφίνης από το μόριο. Αυτό το αποτέλεσμα υποδεικνύει ότι η ομάδα του φωσφωνιακού κατιόντος είναι ασταθής στις συνθήκες της υδραζινόλυσης, και ότι θα πρέπει να αναζητηθούν άλλοι τρόποι σύνθεσης του μιτοτροπικού φθαλυδραζιδίου **52**. Όσον αφορά στο χαρακτηρισμό της **52**, στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (Εικόνα 29) διακρίνεται στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων η μεγάλη πολλαπλή κορυφή των φαινυλίων του φωσφινικού κατιόντος, ενώ πιο προστατευμένα φαίνονται τα πρωτόνια της ισολουμινόλης στα 7.52 (διπλή), 6.89 (απλή) και 6.69 (διπλή). Στην περιοχή των αλειφατικών πρωτονίων, φαίνονται οι χαρακτηριστικές κορυφές στην περιοχή 4.2 – 3.2 ppm των πρωτονίων που βρίσκονται σε θέση άλφα ως προς ετεροάτομα. Χαρακτηριστική εδώ είναι η πολλαπλή κορυφή στα 4.1 ppm που οφείλεται στο πρωτόνιο του τριτοταγούς άνθρακα της sec-βούτυλο ομάδας.



Εικόνα 29 Φάσματα $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3 , πάνω) και $^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, CDCl_3 , κάτω) της **51**.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΠΟΡΕΙΕΣ ΚΑΙ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

9.1 Γενικό Πειραματικό Μέρος

9.1.1 Αντιδραστήρια και Διαλύτες

Τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των ενώσεων που περιγράφονται στην παρούσα εργασία ήταν εμπορικά διαθέσιμα προϊόντα των εταιρειών Sigma-Aldrich, Fluka, Alfa Aesar, Acros και Fluorochem. Η καθαρότητα των αντιδραστηρίων ήταν μεγαλύτερη του 99% και δεν πραγματοποιήθηκε περαιτέρω καθαρισμός αυτών. Για την ξήρανση των διαλυτών, όπου ήταν αναγκαίο, έγινε απόσταξη ή/και χρησιμοποιήθηκαν μοριακά κόσκινα διαμέτρου 4 Å. Η συμπύκνωση των διαλυτών έγινε υπό ελαττωμένη πίεση σε περιστροφικό εξατμιστήρα ή στη γραμμή κενού.

9.1.2 Όργανα και Διατάξεις

Η ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν έγινε με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και με φασματομετρία μάζας (MS). Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (^1H , ^{13}C NMR) ελήφθησαν σε όργανο Varian τύπου Mercury 200MHz και ως δευτερωμένοι διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν CDCl_3 , CD_3OD , και DMSO-d_6 . Οι χημικές μετατοπίσεις εκφράζονται σε ppm και οι σταθερές σύζευξης J σε Hz, ενώ για δεδομένα των χημικών μετατοπίσεων στα φάσματα ^1H NMR παρουσιάζονται με την εξής σειρά: αριθμός πρωτονίων, πολλαπλότητα, σταθερές σύζευξης J και στο τέλος η ταυτοποίηση των κορυφών. Η ταυτοποίηση των κορυφών έγινε βάσει βιβλιογραφικών δεδομένων, σύγκρισης με πρόδρομες ενώσεις, αλλά και υπολογισμών με τη χρήση προγραμμάτων πρόβλεψης φασμάτων NMR. Η αρίθμηση στις δομές δεν ταυτίζεται απαραίτητα με αυτή της ονοματολογίας, αλλά διευκολύνει στην ταυτοποίηση των σημάτων των φασμάτων.

Τα φάσματα μάζας ελήφθησαν σε όργανο φασματομετρίας μαζών ThermoFinnigan Surveyor MSQ Plus με την τεχνική του ιονισμού μέσω ηλεκτροψεκασμού (electron spray ionization, ESI-MS). Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν MeOH καθαρότητας HPLC.

Τα φάσματα HRMS ελήφθησαν σε φασματόμετρο QTOF maxis impact (Bruker), όπου ο ιονισμός των ενώσεων έγινε μέσω της τεχνικής ηλεκτροψεκασμού (Electron Spray Ionization, ESI)

Οι αντιδράσεις σε αυτόκλειστο πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση αυτόκλειστου δοχείου της εταιρείας Parr instrument του έτους 2014 σε πίεση 20psi bar υδραργύρου.

9.1.3 Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (*Thin Layer Chromatography, TLC*)

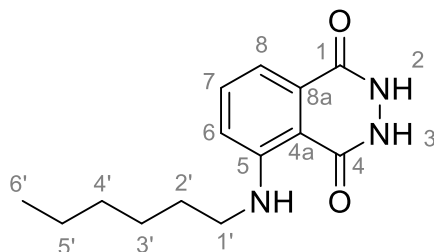
Οι πορείες των αντιδράσεων και η σειρά έκλουσης των ουσιών κατά τη διενέργεια χρωματογραφίας στήλης ελέγχθηκαν με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC), για την οποία χρησιμοποιήθηκαν φύλλα αλουμινίου 0.2 mm επιστρωμένα με silica gel 60 και φθορίζοντα δείκτη F254 (Merck, Art. 5714). Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας χρησιμοποιήθηκε επίσης για την επιβεβαίωση της καθαρότητας διαφόρων προϊόντων (σε συνδυασμό με ^1H και ^{13}C NMR) (Rf). Για την εμφάνιση των χρωματογραφημάτων χρησιμοποιήθηκαν: λυχνία UV ($\lambda=254$ nm και 365 nm) ή/και αιθανολικό διάλυμα φωσφομολυβδαινικού οξέος 7.5% ή/και όξινο διάλυμα *p*-ανισαλδεΰδης.

9.1.4 Χρωματογραφία Στήλης

Ο καθαρισμός των προϊόντων, όπου ήταν απαραίτητο, έγινε με χρωματογραφία στήλης. Η έκλουση έγινε με εφαρμογή πίεσης αέρα. Στις στήλες χρησιμοποιήθηκε silica gel 60 (230-400 mesh) της Merk. Τα συστήματα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται χωριστά για κάθε προϊόν.

9.2 Πειραματικές πορείες και Χαρακτηρισμός Προϊόντων

Σύνθεση της 5-(εξυλαμινο)-2,3-διυδροφθαλαζιν-1,4-διόνης 9



Βρωμοεξάνιο (93 mg, 0.56 mmol), προστέθηκε σε διάλυμα λουμινόλης (100 mg, 0.56 mmol) σε ξηρό διμεθυλοφορμαμίδιο (7.5 ml) σε προξηραμένη δίκλιμη σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 10 ml και το μίγμα θερμάνθηκε στους 110°C για 48 ώρες. Στη συνέχεια, το μίγμα της αντίδρασης ψύχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, προστέθηκε νερό (80 ml) και ακολούθησε εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα (3x20 ml). Οι οργανικές φάσεις συνενώθηκαν και ακολούθησε έκπλυσή τους με απιονισμένο νερό, ξήρανση με θειικό νάτριο και συμπύκνωση υπό κενό. Το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (οξικός αιθυλεστέρας / πετρελαϊκός αιθέρας: 20/80, 40/60, 60/40, 80/20) απ' όπου απομονώθηκε η ένωση **9**.

Κίτρινο κολλώδες στερεό: 25 mg

Απόδοση: 17 %

Μοριακό Βάρος: 261.31

Μοριακός τύπος: C₁₄H₁₉N₃O₂

R_f (MeOH / DCM: 3/97): 0.32

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 12.00 (bs, 2H, NHCO), 8.48 (bs, 1H, NH), 7.46 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-7), 7.12 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-8), 6.68 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-6), 3.09 (t, *J* = 6.7, 2H, H-1'), 1.74 – 1.12 (m, 8H, CH₂), 1.02 – 0.81 (m, 3H, H-6').

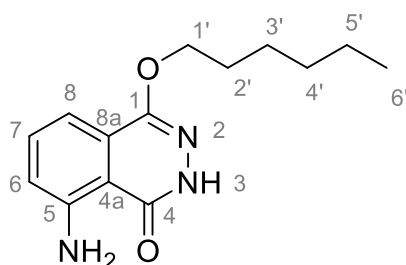
^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6) δ 161.71 (C-5), 151.39 (C-4), 150.11 (C-1), 134.62 (C-7), 126.61 (C-8a), 111.08 (C-6), 110.75 (C-4a), 108.52 (C-8), 42.02 (C-1'), 31.03 (C-2'), 28.34 (C-4'), 26.30 (C-3'), 22.14 (C-5'), 13.96 (C-6').

ES-MS m/z για $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ υπολογίστηκε 260.1 και βρέθηκε 260.3.

Αλκυλίωση της λουμινόλης με 1-βρωμοεξάνιο παρουσία βάσης.

Βρωμοεξάνιο (93 mg, 0.56 mmol) προστέθηκε σε αιώρημα λουμινόλης (100 mg, 0.56 mmol) και ανθρακικού καλίου (232 mg, 1.69 mmol) σε ξηρό διμεθυλοφορμαμίδιο (7.5 ml) σε προξηραμένη δίκαιμη σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 10ml, και το όλο θερμάνθηκε στους 90°C για 24 ώρες. Στη συνέχεια, το μίγμα της αντίδρασης ψύχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, οξινίστηκε με διάλυμα υδροχλωρίου 1M σε pH = 5 και ακολούθησε εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα (3x20 ml). Οι οργανικές φάσεις συνενώθηκαν και ακολούθησε έκπλυσή τους με απιονισμένο νερό, ξήρανση με θειικό νάτριο και συμπύκνωση υπό κενό. Το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (οξικός αιθυλεστέρας / πετρελαϊκός αιθέρας : 20/80, 40/60, 60/40, 100/0) απ' όπου απομονώθηκαν 3 κλάσματα. Το πρώτο ταυτοποιήθηκε ως η ένωση **21** το δεύτερο ως η ένωση **10** και το τρίτο ως η ένωση **11**.

5-αμινο-1-(εξυλοξυ)φθαλαζιν-1(2H)-όνη **10**



Κίτρινο κολλώδες στερεό: 21 mg

Απόδοση: 16%

Μοριακό Βάρος: 261.31

Μοριακός τύπος: C₁₄H₁₉N₃O₂

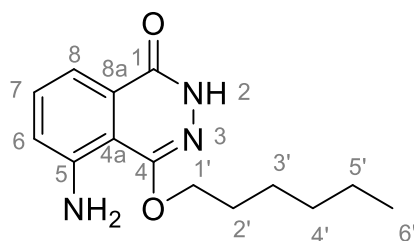
R_f (MeOH / DCM: 3/97): 0.31

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ: 10.01 (bs, 1H, NHCO), 7.47 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-7), 7.16 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-8), 6.82 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-6), 5.74 (bs, 2H, NH₂), 4.23 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, H-1'), 1.94 – 0.9 (m, 11H, H-2'-6').

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ: 162.65 (C-5), 151.96 (C-4), 149.78 (C-1), 134.44 (C-7), 126.78 (C-8a), 117.18 (C-6), 111.60 (C-4a), 110.98 (C-8), 67.01 (C-1'), 31.69 (C-4'), 29.82 (C-2'), 28.86 (C-3'), 22.74 (C-5'), 14.19 (C-6').

ES-MS m/z για C₁₄H₁₉N₃O₂ [M+H]⁺ υπολογίστηκε 262.16 και βρέθηκε 262.13

5-αμινο-4(εξυλοξυ)φθαλαζιν-2(1H)-όνη 11



Κίτρινο κολλώδες στερεό: 22 mg

Απόδοση: 17%

Μοριακό Βάρος: 261.31

Μοριακός τύπος: C₁₄H₁₉N₃O₂

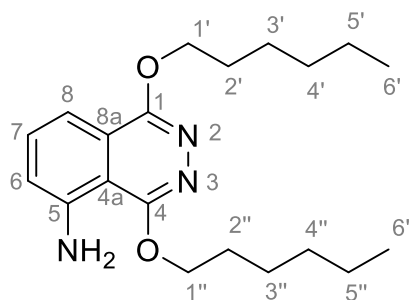
R_f (MeOH / DCM: 3/97): 0.30

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ: 10.68 (bs, 1H, NHCO) 7.71 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-8), 7.51 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-7), 6.97 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-6), 5.19 (bs, 2H, NH₂), 4.31 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, H-1'), 2.11 – 1.75 (m, 2H, H-2'), 1.56 – 1.11 (m, 6H, CH₂), 0.90 (t, *J* = 6.1 Hz, 3H, H-6').

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ: 160.85 (C-5), 152.72 (C-1), 145.62 (C-4), 132.88 (C-7), 130.25 (C-8a), 119.73 (C-6), 115.70 (C-8), 110.05 (C-4a), 67.72 (C-1'), 31.70 (C-4'), 29.92 (C-2'), 28.92 (C-3'), 22.78 (C-5'), 14.23 (C-6').

ES-MS m/z για C₁₄H₁₉N₃O₂ [M+H]⁺ υπολογίστηκε 262.16 και βρέθηκε 262.33

1,4 δις(εξυλοξυ)φθαλαζιν-5-αμίνη 12



Κίτρινο κολλώδες στερεό: 11 mg

Απόδοση: 11%

Μοριακό Βάρος: 345.47

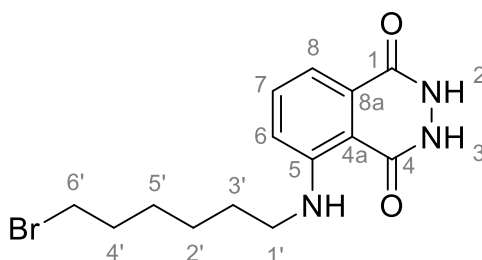
Μοριακός τύπος: C₂₀H₃₁N₃O₂

R_f (EA / PE: 20/80): 0.62

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.43 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-7), 7.13 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-8), 6.84 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H-6), 6.47 (bs, 2H, NH₂), 4.24 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂O), 4.02 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂O), 1.79 (d, *J* = 6.4 Hz, 4H, H-2',2''), 1.50 – 1.26 (m, 14H), 0.94 – 0.84 (m, 6H, CH₃).

ES-MS m/z για C₁₄H₁₉N₃O₂ [M+H]⁺ υπολογίστηκε 346.25 και βρέθηκε 346.33

Σύνθεση της 5-(6-βρωμοεξυλαμινο)-2,3-διυδροφθαλαζιν-1,4-διόνης 13



Διβρωμοεξάνιο (137 mg, 0.56 mmol), προστέθηκε σε διάλυμα λουμινόλης (100 mg 0.56 mmol) σε ξηρό διμεθυλοφορμαμίδιο (7.5 ml) σε προξηραμένη δίλιμη σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 10 ml και το μίγμα θερμάνθηκε στους 110 °C για 48 ώρες. Στη συνέχεια, το μίγμα της αντίδρασης ψύχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, προστέθηκε νερό (50 ml) ακολούθησε εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα (3x20 ml). Οι οργανικές φάσεις συνενώθηκαν και ακολούθησε έκπλυσή τους με απιονισμένο νερό, ξήρανση με θειικό νάτριο και συμπύκνωση υπό κενό. Το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (οξικό αιθυλεστέρα / πετρελαϊκό αιθέρα : 20/80, 40/60, 60/40, 80/20, 100/0) απ' όπου απομονώθηκε η ένωση **13**.

Κίτρινο κολλώδες στερεό: 17mg

Απόδοση: 8%

Μοριακό Βάρος: 340.21

Μοριακός τύπος: C₁₄H₁₈BrN₃O₂

R_f (MeOH / DCM: 3/97): 0.29

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 11.79 (bs, 2H, NHCO), 8.35 (bs, 1H, NH), 7.33 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-7), 6.99 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-8), 6.47 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-6), 3.51 – 3.39 (m, 2H, H-6'), 3.05 – 2.93 (m, 2H, H-1'), 2.03 – 1.30 (m, 8H, CH₂).

¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.37 (C-5), 150.96 (C-4), 150.70 (C-1), 135.25 (C-7), 127.22 (C-8a), 111.72 (C-6), 111.36 (C-4a), 109.16 (C-8), 42.52 (C-1'), 35.76 (C-6'), 32.83 (C-5'), 28.80 (C-2'), 26.92 (C-4'), 26.34 (C-3').

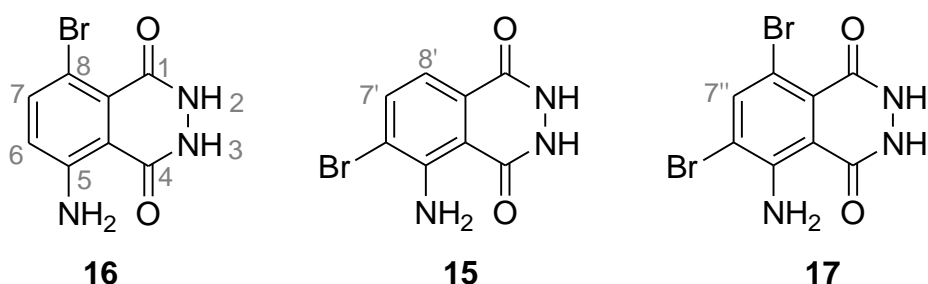
ES-MS *m/z* για C₁₄H₁₉BrN₃O₂ [M+H]⁺ υπολογίστηκε για τα ισότοπα του βρωμίου 340.05 και 342.05 και βρέθηκε 340.19 και 342.10.

ES-HRMS *m/z* για C₁₄H₁₇BrN₃O₂ [M-H]⁻ υπολογίστηκε 338.0510 και βρέθηκε 340.0496.

Αντίδραση της λουμινόλης με 1,6-διβρωμοεξάνιο σε DMSO.

Διβρωμοεξάνιο (17 μl, 0.112 mmol), προστέθηκε σε διάλυμα λουμινόλης (20 mg, 0.112 mmol) σε 1.5 ml ξηρού διμεθυλοσουλφοξειδίου σε προξηραμένη

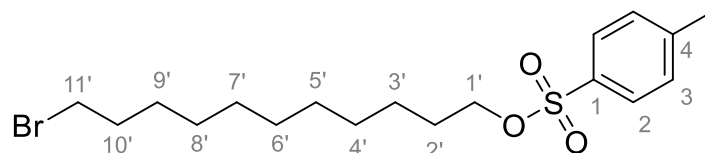
μονόλαιμη σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 5ml και το μίγμα θερμάνθηκε στους 90°C για 3 ώρες. Στη συνέχεια, το μίγμα της αντίδρασης ψύχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθεται απιονισμένο νερό (25 ml). Το ίζημα που καταβυθίστηκε, διηθήθηκε από υάλινο πορώδη ηθμό (G₃) και εκπλύθηκε με νερό, δίνοντας υπόλευκο στερεό. Το φάσμα ¹H-NMR του ιζήματος έδειξε την ύπαρξη μίγματος το οποίο δεν ήταν δυνατό να διαχωριστεί. Από τα φασματοσκοπικά δεδομένα συμπεραίνεται ότι αποτελείται από τα βρωμιωμένα παράγωγα **16**, **15** και **17** σε σχετική αναλογία 0.2:1:0.2.



¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.46 (bs, NHCO), 8.07 (s, 7, H-7''), 7.81 (d, *J* = 8.3 Hz, H-7'), 7.61 (d, *J* = 8.7 Hz, H-7), 7.53 (bs, NH₂), 6.89 (d, *J* = 8.3 Hz, H-8'), 6.78 (d, *J* = 8.7 Hz, H-6).

ES-MS *m/z* υπολογίστηκαν για C₈H₅BrN₃O₂ [M-H]⁻ (**27**, **28**) και C₈H₄Br₂N₃O₂ [M-H]⁻ (**29**) 253.96 και 333.86 αντίστοιχα και βρέθηκαν 253.96 και 333.97.

Σύνθεση του 4-τολουολοσουλφονικού 11-βρωμοενδεκυλεστέρα **30**



11-βρωμοενδεκανόλη (200 mg, 0.79 mmol) προστίθεται σε διάλυμα τριαιθυλαμίνης (242 mg 2.4 mmol) και DMAP (11 mg 0.1 mmol) σε 5 ml ξηρό τετραυδροφουράνιο σε προξηραμένη δίλαιμη σφαιρική φιάλη χωρητικότητας

25 ml. Το μίγμα της αντίδρασης ψύχεται στους 0°C, προστίθεται στάγδην 4-τολουολοσουλφονυλοχλωρίδιο (179 mg 0.94 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 ώρες. Στη συνέχεια προστίθεται νερό (40 ml), ακολουθεί εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο (40 ml), οι φάσεις διαχωρίζονται και η υδατική στιβάδα εκπλένεται με διχλωρομεθάνιο (3x20 ml). Οι οργανικές φάσεις συνενώνονται, ξηραίνονται με θειικό νάτριο και ο διαλύτης απομακρύνεται. Το υπόλειμμα υποβάλλεται σε χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο/εξάνιο: 50/50) από την οποία απομονώνεται το προϊόν **30**.

Υποκίτρινο στερεό: 81 mg

Απόδοση: 25%

Μοριακό Βάρος: 405.39

Μοριακός τύπος: C₁₈H₂₉BrO₃S

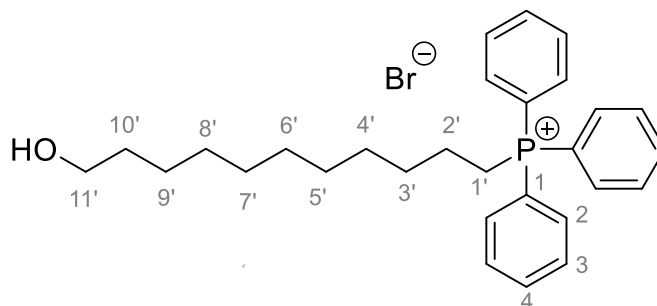
R_f (DCM/ Hex: 50/50): 0.46

¹H NMR (200 MHz, CD₃OD) δ 7.78 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H-2, H-6), 7.44 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H-3, H-5), 4.00 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, H-11'), 3.42 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, H-1'), 2.45 (s, 3H, CH₃), 1.88 – 1.25 (m, 18H, H-2'-10').

¹³C NMR (50 MHz, CD₃OD) δ 146.28 (C-1), 134.54 (C-4), 131.02 (C-3), 128.94 (C-2), 71.94 (C-1'), 34.50 (C-11'), 33.99 (C-10'), 30.52, 30.49, 30.46, 29.93, 29.83, 29.82, 29.17, 26.39 (C-3'), 21.64 (CH₃).

ES-MS *m/z* για C₁₈H₃₃NBrO₃S [M+NH₄]⁺ υπολογίστηκε 424.13 και βρέθηκε 424.21

Σύνθεση του 11-υδρόξυενδεκυλοτριφαινυλοφωσφονιακού βρωμίδιο **32**



11-βρωμοενδεκανόλη (1 g, 0.0039 mol) προστίθεται σε διάλυμα τριφαινυλοφωσφίνης (1.04 g 0.0038 mol) σε ξηρό ακετονιτρίλιο (16 ml) σε προξηραμένη δίκλιμη σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 25 ml. Μετά από 48 ώρες, το ίζημα που έχει δημιουργηθεί διηθείται σε υάλινο πορώδη ηθμό (G₃) και εκπλένεται με διαιθυλαιθέρα (3 x 10 ml), δίνοντας την αλκοόλη **32**.

καφέ στερεό: 1.68 g

Απόδοση: 87%

Μοριακό Βάρος: 433.26

Μοριακός τύπος: C₂₉H₃₈BrOP

R_f (MeOH/DCM: 5/95): 0.35

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ: 7.82 – 7.60 (m, 15H, ArH) 3.66 – 3.48 (m, 2H, , 11') 2.36 (bs, 1H, OH), 1.68-1.05 (m, 18H, H-2'-10').

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ: 135.08 (d, *J* = 2.6 Hz, C-4), 133.59 (d, *J* = 10.0 Hz, C-2), 130.54 (d, *J* = 12.4 Hz, C-3), 118.20 (d, *J* = 85.7 Hz, C-1), 62.61 (C-11'), 32.66 (C-10'), 30.35 (d, *J* = 15.8 Hz, C-3'), 29.32, 29.25, 29.22, 29.02, 25.67 (C-9'), 22.70 (d, *J* = 49.3 Hz, C-1'), 22.52 (d, *J* = 3.2 Hz, C-2').

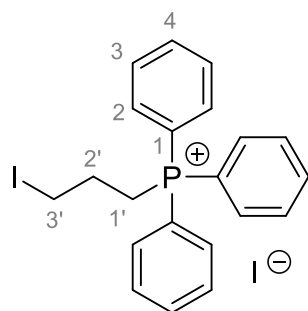
³¹P NMR (81 MHz, CDCl₃) δ: 25.19.

ES-MS m/z για C₂₉H₃₈BrOP [M]⁺ υπολογίστηκε 433.26 και βρέθηκε 433.27

Γενική μέθοδος σύνθεσης των ιωδο-αλκυλο-φωσφονιακών ιωδιδίων 37

Σε προξηραμένη και προθερμασμένη στους 100°C σφαιρική φιάλη, προσθέτουμε υπό αργό το διιωδοαλκάνιο και τη φωσφίνη, και το μίγμα αναδεύεται για 3 ώρες απουσία φωτός. Στη συνέχεια, το μίγμα της αντίδρασης φέρεται σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται διαιθυλαιθέρας, το προκύπτον ίζημα διηθείται και εκπλένεται με διαιθυλαιθέρα. Το στερεό διαλύεται σε διχλωρομεθάνιο, και το προϊόν ιωδο-αλκυλο-φώσφινο ιωδίδιο καταβυθίζεται με προσθήκη δεκαπλάσιου όγκου διαιθυλαιθέρα, έπειτα από δύο ημέρες ψύξης.

3-ιωδοπροπυλο)τριφαινυλοφωσφονιακό ιωδίδιο 37a



Από διωδοπροπάνιο (1.4 g, 5 mmol) και τριφαινυλοφωσφίνη (250 mg, 1 mmol).

καφέ κολλώδες στερεό: 452 mg

Απόδοση: 85%

Μοριακό Βάρος: 558.17

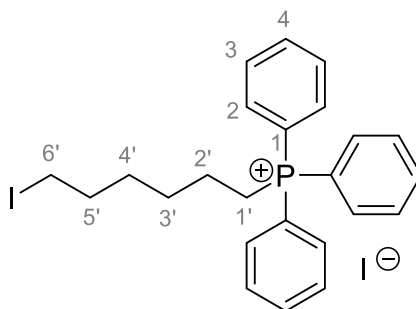
Μοριακός τύπος: C₂₁H₂₁I₂P

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ: 7.8 – 7.6 (m, 15H, ArH), 4.07 – 3.88 (m, 2H, H-1'), 3.61 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, H-3'), 2.28 – 2.11 (m, 2H, H-2')

³¹P NMR (81 MHz, CDCl₃) δ 24.77.

ES-MS m/z για C₂₁H₂₁IP [[M+MeOH+Na]⁺ υπολογίστηκε 486.04 και βρέθηκε 487.27

(6-ιωδοεξυλο)τριφαινυλοφωσφονιακό ιωδίδιο 37b



Από διωδοεξάνιο (5.5 g, 16.27 mmol) και τριφαινυλοφωσφίνη (0.853 g, 3.25 mmol).

καφέ κολλωδές: 1.69 g

Απόδοση: 87%

Μοριακό Βάρος: 600.26

Μοριακός τύπος: C₂₄H₂₇I₂P

R_f (MeOH/DCM: 5/95): 0.45

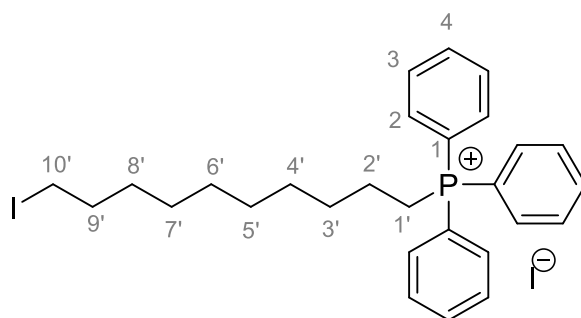
¹H NMR (200 MHz, MeOD-d₄) δ 7.91 – 7.65 (m, 15H, ArH), 3.78 – 3.56 (m, 2H, H-1'), 3.14 (t, J = 6.8 Hz, 2H, H-6'), 1.95 – 1.38 (m, 8H).

¹³C NMR (50 MHz, MeOD-d₄) δ 136.28 (d, J = 2.7 Hz, C-4), 134.81 (d, J = 10.0 Hz, C-2), 131.52 (d, J = 12.6 Hz, C-3), 119.82 (d, J = 85.6 Hz, C-1), 34.29 (C-5'), 30.65 (C-4'), 30.35 (d, J = 23.9 Hz, C-3'), 23.35 (d, J = 4.0 Hz, C-2'), 22.60 (d, J = 53.2 Hz, C-1'), 6.55 (C-6').

³¹P NMR (81 MHz, CDCl₃) δ 25.33

ES-MS m/z για C₂₄H₂₇IP [M]⁺ υπολογίστηκε 473.09 και βρέθηκε 473.10

(10-ιωδοδεκυλο)τριφαινυλοφωσφινικό ιωδίδιο 37c



Από διωδοδεκάνιο (12 g, 0.03 mol) και τριφαινυλοφωσφίνη (1.6 g, 0.006 mol).

καφέ κολλωδές στερεό: 2.95 g

Απόδοση: 83%

Μοριακό Βάρος: 656.36

Μοριακός τύπος: C₂₈H₃₅I₂P

R_f (MeOH/DCM: 5/95): 0.42

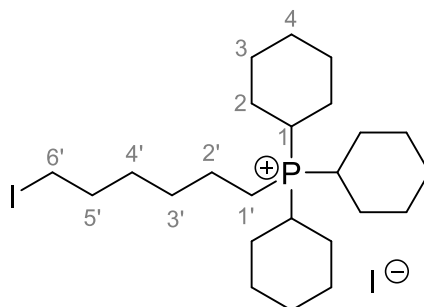
¹H NMR (200 MHz, MeOD-d₄) δ 7.91 – 7.60 (m, 15H, ArH) 3.50 – 3.36 (m, 2H, H-1') 3.11 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, H-10'), 1.80 – 1.02 (m, 16H).

¹³C NMR (50 MHz, MeOD-d₄) 136.01 (d, *J* = 2.3 Hz, C-4), 134.68 (d, *J* = 9.5 Hz, C-2), 131.39 (d, *J* = 12.4 Hz, C-3), 119.54 (d, *J* = 86.1 Hz, C-1), 34.45 (C-9'), 31.24 (C-8'), 30.14 (C-6'), 30.08 (C-5'), 30.02 (d, *J* = 25.5 Hz, C-3'), 29.39 (C-4'), 29.34 (C-7'), 23.38 (d, *J* = 5.1 Hz, C-2'), 22.70 (d, *J* = 53.2 Hz, C-1'), 8.13 (C-10').

³¹P NMR (81 MHz, DMSO) δ 24.10.

ES-MS m/z για C₂₈H₃₅IP [M]⁺ υπολογίστηκε 529.15 και βρέθηκε 529.45

Τρικυκλοεξυλο(6-ιωδοεξυλο)φωσφονιακό ιωδίδιο 37d



Από διιωδοεξάνιο (2.01 g, 6.2 mmol) και τρικυκλοεξυλοφωσφίνη (347 mg, 1.24 mmol).

Καφέ στερεό: 280 mg

Απόδοση: 45%

Μοριακό Βάρος: 618.39

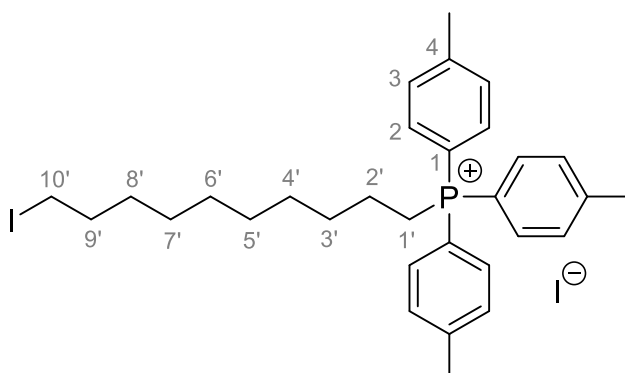
Μοριακός τύπος: C₂₄H₄₅I₂P

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 3.47 (m, 2H, H-1'), 3.22 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, H-6'), 2.76 – 2.43 (m, 5H, H-1,1'), 2.14 – 1.21 (m, 38H, CH₂).

³¹P NMR (81 MHz, CDCl₃) δ 33.29.

ES-MS m/z για C₁₄H₄₅IP [M]⁺ υπολογίστηκε 491.23 και βρέθηκε 491.27.

(10-ιωδοδεκυλο)τρι-ρ-τολυλοφωσφονιακό ιωδίδιο 37e



Από διωδοδεκάνιο (2.19 g, 5.9 mmol) και τρι-ρ-τολυλοφωσφίνη (361 mg, 1.19 mmol).

Καφέ στερεό: 503 mg

Απόδοση: 60%

Μοριακό Βάρος: 698.10

Μοριακός τύπος: C₃₁H₄₁I₂P

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ: 7.60 – 7.23 (m, 12H, ArH), 3.35 – 3.00 (m, 4H, H-1', 10'), 2.40 (s, 9H, CH₃), 1.80 – 1.00 (m, 16H).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 146.15 (d, J = 2.9 Hz, C-4), 133.22 (d, J = 10.3 Hz, C-2), 131.06 (d, J = 12.9 Hz, C-3), 114.59 (d, J = 88.9 Hz, C-1), 33.21 (C-9'), 30.35 (d, J = 12.2 Hz, C-3'), 30.15 (C-8'), 29.07, 28.87, 28.25, 28.17, 23.09 (d, J = 50.4 Hz, C-1'), 22.30 (d, J = 3.5 Hz, C-2'), 21.78 (Me), 7.70 (C-10').

³¹P NMR (81 MHz, CDCl₃) δ 24.07.

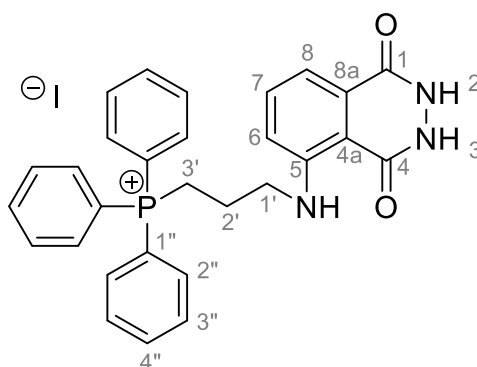
ES-MS m/z για C₃₁H₄₁IP [M]⁺ υπολογίστηκε 571.20 και βρέθηκε 571.35.

Γενική μέθοδος σύνθεσης των 5-N-υποκατεστημένων μιτοτροπικών παραγώγων της λουμινόλης 36

Σε διάλυμα του ιωδοάλκυλο φωσφονιακού άλατος σε N-μεθυλοπυρρολιδίνη (2.5 ml), προστίθεται η λουμινόλη και το όλο αναδεύεται στους 110°C για 24

ώρες. Στο μίγμα της αντίδρασης προστέθηκε νερό (5 ml), με αποτέλεσμα την καταβύθιση ιζήματος, το οποίο διηθήθηκε και εκπλύθηκε με διάλυμα θειοθειικού νατρίου και νερού. Το προκύπτον στερεό διαλύθηκε σε διχλωρομεθάνιο και πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο, διχλωρομεθάνιο / οξικός αιθυλεστέρας 50/50, διχλωρομεθάνιο / οξικός αιθυλεστέρας / μεθανόλη 50/50/3, διχλωρομεθάνιο / οξικός αιθυλεστέρας / μεθανόλη 60/30/10, διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 90/10, διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 80/20, διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 70/30, διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 60/40, από την οποία παραλήφθηκε η αναμενόμενη υποκατεστημένη λουμινόλη.

(3-((1,4-διδόξο-1,2,3,4-τετραύδροφθαλαζιν-5-υλο)αμινο)προπυλο)τριφαινυλο-φωσφονιακό ιωδίδιο 36a



Από το ιωδίδιο **37a** (450 mg, 0.8 mmol) και τη λουμινόλη (142 mg, 0.8 mmol).

Κίτρινο στερεό: 100 mg

Απόδοση: 20%

Μοριακό Βάρος: 607.42

Μοριακός τύπος: C₂₉H₂₇IN₃O₂P

R_f (MeOH/DCM 5/95): 0.21

¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.33 (bs, 2H, NHCO), 9.22 (bs, 1H, NH), 7.92 – 7.69 (m, 15H, PPh₃), 7.53 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-7), 7.00 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-8), 6.80 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H-6), 3.78 – 3.64 (m, 2H, H-3'), 3.50 – 3.37 (m, 2H, H-1'), 1.90 – 1.76 (m, 2H, H-2').

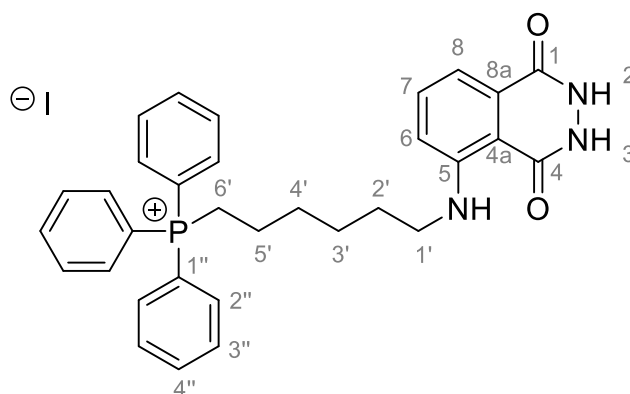
^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6) δ 161.56 (C-5), 151.37 (C-4), 149.54 (C-1), 134.98 (d, $J = 2.4$ Hz, C-4''), 134.54 (C-7), 133.62 (d, $J = 10.2$ Hz, C-2''), 130.29 (d, $J = 12.4$ Hz, C-3''), 126.69 (C-8a), 118.41 (d, $J = 86.0$ Hz, C-1''), 111.18 (C-6), 111.16 (H-4a), 109.14 (C-8), 42.04 (d, $J = 20.2$ Hz, C-1'), 21.22 (d, $J = 6.4$ Hz, C-2'), 18.27 (d, $J = 53.6$ Hz C-3').

^{31}P NMR (81 MHz, DMSO) δ 25.48.

ES-MS m/z για $\text{C}_{29}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_2\text{P}$ $[\text{M}]^+$ υπολογίστηκε 480.18 και βρέθηκε 480.47

(6-((1,4-διοξο-1,2,3,4-τετραϋδροφθαλαζιν-5-υλο)αμινο)εξυλο)

τριφαινυλοφωσφονιακό ιωδίδιο 36b



Από το ιωδίδιο **37b** (1.937 g, 3.22 mmol) και τη λουμινόλη (571 mg, 3.22 mmol).

Κίτρινο στερεό: 460 mg

Απόδοση: 24%

Μοριακό Βάρος: 649.51

Μοριακός τύπος: $\text{C}_{32}\text{H}_{33}\text{I}\text{N}_3\text{O}_2\text{P}$

R_f (MeOH/DCM 5/95): 0.21

^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6) δ 11.39 (bs, 1H, NHCO), 11.24 (bs, 1H, NHCO), 9.02 (bs, 1H, NH), 7.92 – 7.70 (m, 15H, PPh₃), 7.56 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-7), 6.95 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-8), 6.80 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-6), 3.65 – 3.45 (m, 2H, H-6'), 3.20 – 3.10 (m, 2H, H-1'), 1.65 – 1.35 (m, 8H, CH₂)

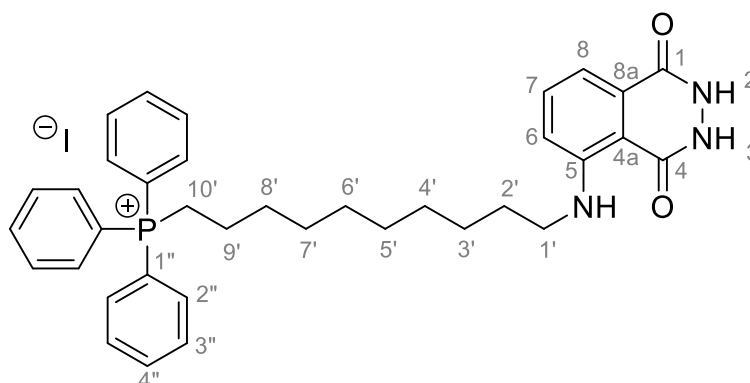
^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6) δ 161.64 (C-5), 151.39 (C-4), 150.00 (C-1), 134.89 (d, $J = 2.6$ Hz, C-4''), 134.61 (C-7), 133.57 (d, $J = 10.1$ Hz, C-2''), 130.25 (d, $J = 12.3$ Hz, C-3''), 126.58 (C-8a), 118.52 (d, $J = 85.5$ Hz, C-1''), 111.06 (C-6), 110.70 (H-4a), 108.56 (C-8), 41.79 (C-1'), 29.44 (d, $J = 16.6$ Hz, C-4'), 27.91 (C-2'), 25.66 (C-3'), 21.70 (d, $J = 4.0$ Hz, C-5'), 20.23 (d, $J = 52.3$ Hz, C-6').

^{31}P NMR (81 MHz, DMSO- d_6) δ 25.10.

ES-MS m/z για $\text{C}_{32}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_2\text{P}$ $[\text{M}]^+$ υπολογίστηκε 522.23 και βρέθηκε 522.35.

ES-HRMS m/z για $\text{C}_{32}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_2\text{P}$ $[\text{M}]^+$ υπολογίστηκε 522.2305 και βρέθηκε 522.2311.

(10-((1,4-διοξο-1.2.3.4-τετραϋδροφθαλαζιν-5-υλ)αμινο)δεκυλο)τριφαινυλο-φωσφονιακό ιωδίδιο 36c



Από το ιωδίδιο **37c** (1.5 g, 2.23 mmol) και τη λουμινόλη (395 mg, 2.23 mmol). Τσέκαρε τις ποσότητες γιατί δεν είναι 1:1.

Κίτρινο στερεό: 391 mg

Απόδοση: 25%

Μοριακό Βάρος: 705,62

Μοριακός τύπος: $\text{C}_{36}\text{H}_{41}\text{I}_2\text{N}_3\text{O}_2\text{P}$

R_f (MeOH/DCM 5/95): 0,19

^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6) δ 11.39 (bs, 1H, NHCO), 11.22 (bs, 1H, NHCO), 9.04 (s, 1H, NH), 7.95 – 7.72 (m, 15H, PPh₃), 7.56 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H,

H-7), 6.95 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-8), 6.82 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-6), 3.62 – 3.47 (m, 2H, H-10'), 3.20 – 3.10 (m, 2H, H-1'), 1.62 – 1.16 (m, 16H, CH₂).

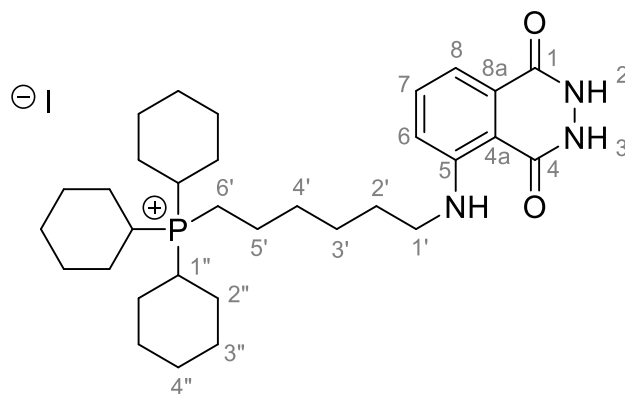
¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.68 (C-5), 151.40 (C-4), 150.06 (C-1), 134.88 (d, $J = 2.3$ Hz, C-4''), 134.58 (C-7), 133.59 (d, $J = 10.1$ Hz, C-2''), 130.24 (d, $J = 12.4$ Hz, C-3''), 126.53 (C-8a), 118.57 (d, $J = 85.6$ Hz, C-1''), 111.03 (C-6), 110.71 (H-4a), 108.49 (C-8), 41.96 (C-1'), 29.76 (d, $J = 17.3$ Hz, C-8'), 28.81, 28.68, 28.61, 28.29, 28.08, 26.54 (C-3'), 21.71 (d, $J = 4.1$ Hz, C-9'), 20.15 (d, $J = 49.2$ Hz, C-10').

³¹P NMR (81 MHz, DMSO-*d*₆) δ 25.10.

ES-MS m/z για C₃₆H₄₁N₃O₂P [M]⁺ υπολογίστηκε 578.29 και βρέθηκε 578.29.

ES-HRMS m/z για C₃₆H₄₁N₃O₂P [M]⁺ υπολογίστηκε 578.2931 και βρέθηκε 578.2962.

Τρικυκλοεξυλο(6-((1,4-διοξο-1,2,3,4-τετραϋδροφθαλαζιν-5-υλο)αμινο)εξυλο)-φωσφονιακό ιωδίδιο 36d



Από το ιωδίδιο **37d**(270 mg, 0.52 mmol) και τη λουμινόλη (93 mg, 0.52 mmol).

Κίτρινο στερεό: 23 mg

Απόδοση: 15%

Μοριακό Βάρος: 667.64

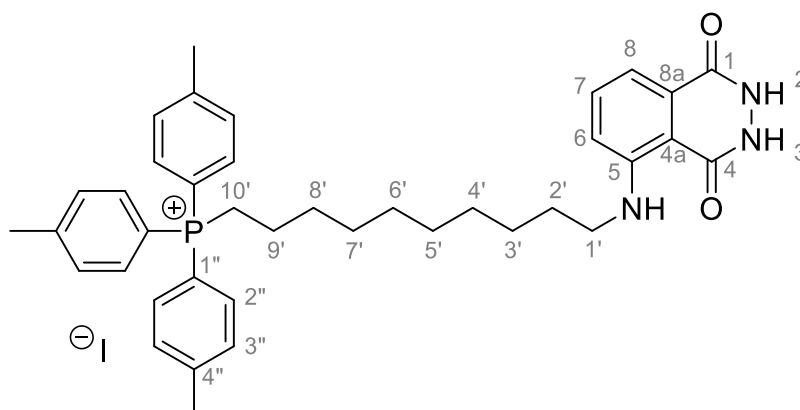
Μοριακός τύπος: C₃₂H₅₁N₃O₂P

R_f (MeOH/DCM 5/95): 0.23

¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 11.39 (bs, 1H, NHCO), 11.22 (bs, 1H, NHCO), 9.07 (bs, 1H, NH), 7.57 (t, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-7), 6.96 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, H-8), 6.84 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-6), 3.24 – 3.14 (m, 2H, H-1'), 2.29 – 2.14 (m, 2H, H-6'), 1.95 – 1.26 (m, 41H, CH₂).

³¹P NMR (81 MHz, DMSO-d₆) δ 33.60.

(10-((1,4-διοξο-1,2,3,4-τετραυδροφθαλαζιν-5-υλο)αμινο)δεκυλο)τρι-*p*-τολυλοφωσφονιακό ιωδίδιο **36e**



Από το ιωδίδιο **37e** (400 mg, 0.69 mmol) και τη λουμινόλη (123 mg, 0.69 mmol).

Κίτρινο στερεό: 110 mg

Απόδοση: 21%

Μοριακό Βάρος: 747.68

Μοριακός τύπος: C₃₉H₄₇IN₃O₂P

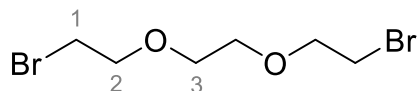
R_f (MeOH/DCM 10/90): 0.29

¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 11.49 (bs, 2H, NHCO), 9.04 (bs, 1H, NH), 7.70 – 7.51 (m, 13H, PArH, H-7), 6.95 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-8), 6.81 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-6), 3.50 – 3.40 (m, 2H, H-10'), 3.20 – 3.10 (m, 2H, H-1'), 2.44 (s, 9H, CH₃), 1.63 – 1.17 (m, 16H, CH₂).

ES-MS m/z για C₃₉H₄₇N₃O₂P [M]⁺ υπολογίστηκε 620.34 και βρέθηκε 620.34.

ES-HRMS m/z για C₃₉H₄₇N₃O₂P [M]⁺ υπολογίστηκε 620.3404 και βρέθηκε 620.3403.

Σύνθεση του 1,2-δισ(2-βρωμοαιθοξυ)αιθανίου 38



Σε διάλυμα τριαιθυλενογλυκόλης (2 g, 0.013 mol) σε 40 ml ξηρού διχλωρομεθανίου στους 0°C, προστέθηκε τετραβρωμάνθρακας (9.35 g, 0.028 mol) και τριφαινυλοφωσφίνη (7.44 g, 0.284 mol) υπό αργό, και το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε σε γρήγορη ανάδευση για 3 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης το μίγμα συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού και το υπόλειμμα που παραλήφθηκε, εκπλύθηκε με εξάνιο. Τα εκπλύματα συμπυκνώθηκαν υπό κενό και υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία στήλης (μεθανόλη / διχλωρομεθάνιο: 0 / 100, 3 / 93, 5 / 95) από όπου παραλήφθηκε το προϊόν **38**.

Λευκό στερεό: 1.543 g

Απόδοση: 64%

Μοριακό Βάρος: 275.96

Μοριακός τύπος: C₆H₁₂Br₂O₂

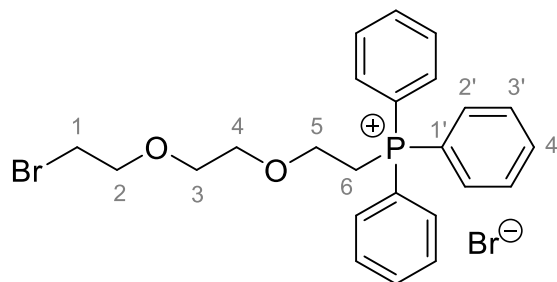
R_f (MeOH/DCM 5/95): 0.78

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ: 3.79 (t, *J* = 6.2 Hz, 4H, H-2), 3.65 (s, 4H, H-3), 3.44 (t, *J* = 6.2 Hz, 4H, H-1)

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 70.36 (C-2), 69.54 (C-3), 32.15 (C-1)

Σύνθεση του (2-(2-(2-βρωμοαιθοξυ)αιθοξυ)αιθυλο)τριφαινυλοφωσφονιακού

βρωμιδίου 39



Σε προξηραμένη και προθερμασμένη στους 100°C σφαιρική φιάλη, προστίθεται υπό αργό το διβρωμίδιο **38** (750 mg, 2.72 mmol) και τριφαινυλοφωσφίνη (143 mg, 0.54 mmol), και το μίγμα αναδεύεται για 2 ώρες απουσία φωτός. Στη συνέχεια, το μίγμα της αντίδρασης φέρεται σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται διαιθυλαιθέρας, το προκύπτον ίζημα διηθείται και εκπλένεται με διαιθυλαιθέρα. Το στερεό διαλύεται σε διχλωρομεθάνιο, και το προϊόν καταβυθίζεται με προσθήκη δεκαπλάσιου όγκου διαιθυλαιθέρα.

Λευκό στερεό: 100 mg

Απόδοση: 33%

Μοριακό Βάρος: 554.24

Μοριακός τύπος: C₂₄H₂₇Br₂O₂P

R_f (MeOH/DCM 5/95): 0.41

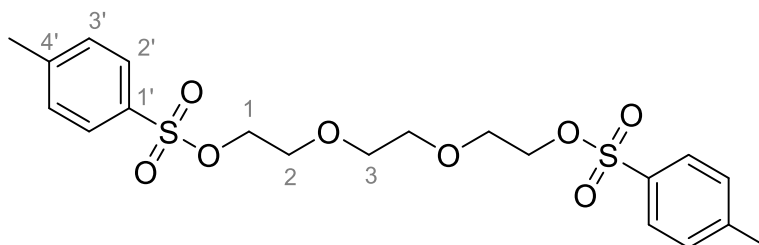
¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ: 7.82 – 7.56 (m, 15H, PPh₃), 4.16 – 3.74 (m, 4H, H-5,6), 3.45 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, H-1), 3.31 – 3.21 (m, 6H, H-3,4,2).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ: 134.68 (d, *J* = 3.0 Hz, H-4'), 133.95 (d, *J* = 10.3 Hz, H-2'), 130.04 (d, *J* = 12.8 Hz, H-3'), 118.73 (d, *J* = 86.9 Hz, H-1'), 70.76 (H-4), 70.20 (H-2), 69.76 (H-3), 63.96 (d, *J* = 6.8 Hz, H-5), 30.59 (H-1), 25.17 (d, *J* = 53.3 Hz, H-6).

³¹P NMR (80 MHz, CDCl₃) δ: 26.7

ES-MS m/z για C₂₄H₂₇BrO₂P [M]⁺ υπολογίστηκε για τα δύο ισότοπα 457.09 και 459.09 και βρέθηκε 458.18 και 459.30

Σύνθεση του δις(4-τολουολοσουλφονικού) (αιθανο-1,2-διυλοδισ(οξυ))δισ-
(αιθανο-2,1-διυλεστέρα) 40



Σε προξηραμένη υπό ροή αργού σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 250 ml που περιέχει διάλυμα τριαιθυλενογλυκόλης (6 g, 0.04 mol) σε ξηρό διχλωρομεθάνιο (150 ml), προστίθεται στους 0°C και υπό ανάδευση καυστικό κάλιο (6 g, 0.1 mol). Μετά την προσθήκη, το μίγμα αναδεύεται για 40 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται τοσυλοχλωρίδιο (22 g, 1.2 mol) και η αντίδραση αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ημέρες. Στη συνέχεια ακολουθεί διήθηση του τοσυλοχλωριδίου από υάλινο πορώδη ηθμό (G3). Το προϊόν λαμβάνεται έπειτα από συμπύκνωση του διηθήματος υπό κενό.

άσπρο στερεό: 10 g

Απόδοση: 69%

Μοριακό Βάρος: 458.54

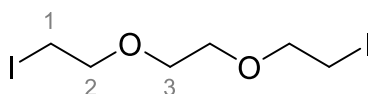
Μοριακός τύπος: C₂₀H₂₆O₈S₂

R_f (MeOH/DCM 10/90): 0.18

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ: 7.76 (d, J = 8.3, 4H, H-2'), 7.32 (d, J = 8.3, 4H, H-3'), 4.14 – 4.09 (m, 4H, H-1), 3.65 – 3.60 (m, 4H, H-2), 3.49 (s, 4H, CH₂), 2.34 (s, 6H, CH₃).

¹³C NMR (50 MHz CDCl₃) δ: 144.94, 132.86, 129.89, 127.93, 70.63, 69.30, 68.69, 21.64.

Σύνθεση του 1,2-δισ(2-ιωδοαιθοξυ)αιθανίου 41



Σε προξηραμένη υπό ροή αργού σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 250ml προστίθεται ιωδιούχο νάτριο (9.5 g, 0.06 mol) σε διάλυμα του τοσυλεστέρα **40** (10 g, 0.02 mol) σε ακετόνη (150ml), και το όλο αναδεύεται στους 60 °C για 16 ώρες. Στη συνέχεια ακολουθεί διήθηση του ιωδιούχου νατρίου από υάλινο πορώδη ηθμό (G₃) και συμπύκνωση διηθήματος υπό κενό. Το προϊόν λαμβάνεται μετά από εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο / νερό, έκπλυση της οργανικής φάσης με απιονισμένο νερό και ξήρανση με θειικό νάτριο.

Υποκίτρινο στερεό: 6 g,

απόδοση: 78%

Μοριακό Βάρος: 369.97

Μοριακός τύπος: C₆H₁₂I₂O₂

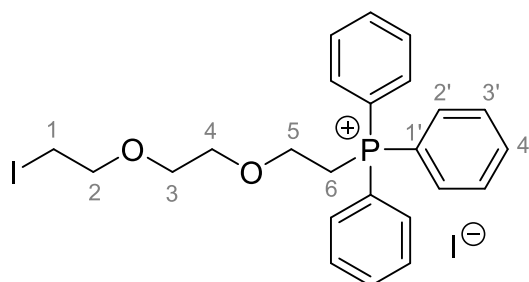
R_f (MeOH/DCM: 5/95) = 0.21

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ: 3.72 (t, *J* = 6.4 Hz, 4H, H-2), 3.61 (s, 4H, H-3), 3.34 (t, *J* = 6.4 Hz, 4H, H-1).

¹³C NMR (50 MHz CDCl₃) δ: 70.90 (C-2), 69.28 (C-3), 5.46 (C-1).

Σύνθεση του (2-(2-(2-ιωδοαιθοξυ)αιθοξυ)αιθυλο)τριφαινυλοφωσφονιακού

ιωδιδίου 42



Σε προξηραμένη και προθερμασμένη στους 100°C σφαιρική φιάλη, προστίθεται υπό αργό το διωδίδιο **70** (3 g, 0,0081 mol) και τριφαινυλοφωσφίνη (430 mg, 0,0016 mmol), και το μίγμα αναδεύεται για 2 ώρες απουσία φωτός. Στη συνέχεια, το μίγμα της αντίδρασης φέρεται σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται διαιθυλαιθέρας, το προκύπτον ίζημα διηθείται και εκπλένεται με διαιθυλαιθέρα. Το στερεό διαλύεται σε διχλωρομεθάνιο, και το προϊόν **42** καταβυθίζεται με προσθήκη δεκαπλάσιου όγκου διαιθυλαιθέρα έπειτα από δύο ημέρες ψύξης.

Υποκίτρινο στερεό: 0,870 g

απόδοση: 87%

Μοριακό Βάρος: 632.26

Μοριακός τύπος: C₂₄H₂₇I₂O₂P

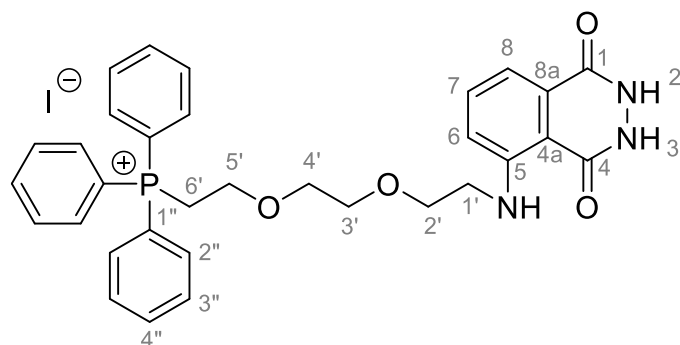
¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ: 7.73 – 7.51 (m, 15H, PPh₃), 3.90 – 3.67 (m, 4H, H-5,6), 3.35 (t, J = 6.4 Hz, 2H, H-1), 3.21 (s, 4H, H-3,4), 2.97 (t, J = 6.4 Hz, 2H, H-2).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ: 134.61 (d, J = 3.1 Hz, H-4'), 133.64 (d, J = 10.3 Hz, H-2'), 129.91 (d, J = 12.9 Hz, H-3'), 118.19 (d, J = 87.0 Hz, H-1'), 71.15 (H-2), 70.05 (H-4), 69.23 (H-3), 63.58 (d, J = 6.9 Hz, H-5), 25.25 (d, J = 52.5 Hz, H-6), 3.15 (H-1).

³¹P NMR (81 MHz, CDCl₃) δ 26.07

ES-MS m/z για C₂₄H₂₇I₂O₂P [M]⁺ υπολογίστηκε 505.07 και βρέθηκε 505.07

Σύνθεση του (2-(2-(2-((1,4-διοξο-1,2,3,4-τετραυδροφθαλαζιν-5-υλο)αμινο)αιθοξυ)αιθοξυ)αιθυλο)τριφαινυλοφωσφονιακού ιωδιδίου **44**



Σε διάλυμα του ιωδιδίου **42** (1,27 g 2.01 mmol) σε *N*-μεθυλοπυρρολιδόνη (2.5 ml), προστίθεται λουμινόλη (350 mg 2.01 mmol), και το όλο αναδεύεται στους 110°C για 24 ώρες. Στο μίγμα της αντίδρασης προστέθηκε νερό (5 ml), με αποτέλεσμα την καταβύθιση ιζήματος, το οποίο διηθήθηκε και εκπλύθηκε με διάλυμα θειοθειικού νατρίου και νερού. Το προκύπτον στερεό εκπλύθηκε με μεγάλη ποσότητα μεθανόλης, τα εκπλύματα συμπυκνώθηκαν υπό κενό και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης 100% μεθανόλη δύο φορές. Στη συνέχεια το βρώμικο 98 που παραλήφθηκε, υποβλήθηκε σε τρίτη χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / οξικός αιθυλεστέρας / μεθανόλη 50 / 50 / 10, διχλωρομεθάνιο / οξικός αιθυλεστέρας / μεθανόλη 60 / 30 / 10, διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 90 / 10, διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 80 / 20, διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 70 / 30, διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 60 / 40, οπότε και παραλήφθηκε το προϊόν **44**.

Κίτρινο στερεό: 25 mg

Απόδοση: 3%

Μοριακό Βάρος: 681.50

Μοριακός τύπος: C₃₂H₃₃IN₃O₄P

R_f (MeOH/DCM 10/90): 0.12

¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.25 (bs, 2H, NHCO), 9.13 (bs, 1H, NH), 7.90 – 7.50 (m, 15H, PPh₃), 7.59 (t, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-7), 6.99 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-8), 6.84 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-6), 3.98 – 3.62 (m, 4H, H-5',6'), 3.45 – 2.85 (m, 6H, H-1'-4').

¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.56 (C-5), 151.41 (C-4), 149.93 (C-1), 134.59 (d, *J* = 2.7 Hz, C-4''), 134.53 (C-7), 133.74 (d, *J* = 10.4 Hz, C-2''),

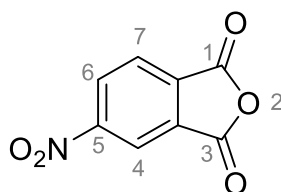
129.90 (d, $J = 12.6$ Hz, C-3"), 126.69 (C-8a), 119.04 (d, $J = 86.6$ Hz, C-1"), 111.17 (C-6), 110.98 (H-4a), 108.90 (C-8), 69.82 (H-2'), 69.38 (H-4'), 68.64 (H-3'), 63.34 (d, $J = 6.0$ Hz, H-5'), 41.99 (H-1'), 22.74 (d, $J = 51.5$ Hz, H-6').

^{31}P NMR (81 MHz, DMSO- d_6) δ 25.85.

ES-MS m/z για $\text{C}_{32}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_4\text{P}$ $[\text{M}]^+$ υπολογίστηκε 554.22 και βρέθηκε 554.22.

ES-HRMS m/z για $\text{C}_{32}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_4\text{P}$ $[\text{M}]^+$ υπολογίστηκε 554.2203 και βρέθηκε 554.2200.

Σύνθεση της 5-νιτροίσοβενζοφουρανο-1,3-διόνης 46



Σε προξηραμένη υπό ροή αργού σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 250 ml προστέθηκε 4-νιτροφθαλικό οξύ (10.13 g, 0.048 mol) και οξικός ανυδρίτης (9 ml) και το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε σε επαναροή (reflux) για μια ώρα. Έπειτα, το μίγμα αποστάχθηκε υπό κενό για να απομακρυνθεί το παραγόμενο οξικό οξύ με τη βοήθεια τολουολίου (500 ml) και τελικά το προϊόν **46** παραλήφθηκε ύστερα από καταβύθιση από διαιθυλαιθέρα (80 ml).

Υποκίτρινο στερεό: 8.78 g

απόδοση: 87.5%

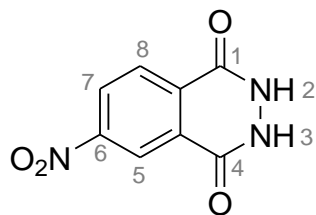
Μοριακό Βάρος: 193.11

Μοριακός τύπος: $\text{C}_8\text{H}_3\text{NO}_5$

R_f (MeOH/DCM: 40/60) = 0.11

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ : 8.84 (s, 1H, H-4), 8.77 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-6) 8.25 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-7).

Σύνθεση της 6-νίτρο-2,3-διυδροφθαλαζινο-1,4-διόνης 47



Διάλυμα της 5-νιτροϊσοβενζοφουρανο-1,3-διόνης 46 (4 g, 0.02 mol) και οξικό οξύ (16 mL), έβρασε με επαναρροή (reflux) για μία ώρα. Στη συνέχεια αφού το διάλυμα ψύχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου προστέθηκε υδατικό διάλυμα υδραζίνης (1 ml, 0.021 mol) και το μίγμα έβρασε εκ νέου με επαναρροή (reflux) για μισή ώρα υπό ροή αργού. Το ίζημα που καταβυθίστηκε μετά από ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου, διηθήθηκε από υάλινο πορώδη ηθμό (G₃) και το στερεό διαλύθηκε σε υδατικό διάλυμα 5% καυστικού νατρίου και καταβυθίστηκε στερεό μετά από όξυνση του με δεκαπλάσιο όγκο οξικού οξέος. Το προϊόν **47** παραλήφθηκε με διήθησε μετά από έκλυσή του με 100 ml νερό και 80 ml

κίτρινο στερεό: 3,4 g

απόδοση: 82%

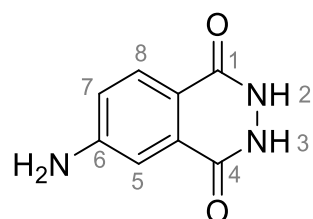
Μοριακό Βάρος: 207,14

Μοριακός τύπος: C₈H₅N₃O₄

R_f (MeOH/DCM: 40/60) = 0.4

¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.08 (bs, 2H, 2xNH), 8.74 (s, 1H, H-5), 8.62 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-7), 8.27 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-8).

Σύνθεση της 6-άμινο-2,3-διυδροφθαλαζινο-1,4-διόνης **IL**



Σε προξηραμένη υπό ροή αργού σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 250 ml προστέθηκε η διόνη **47** (1 g, 0.0048 mol) σε μεθανόλη (190 ml), και αφού το

μίγμα της αντίδρασης απαερώθηκε για μισή ώρα υπό ατμόσφαιρα αργού, προστέθηκε παλλάδιο 10% σε ενεργό άνθρακα ως καταλύτης και το μίγμα αφέθηκε να αναδεύεται υπό ατμόσφαιρά υδρογόνου σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες και στη συνέχεια στους 40°C για 4 ώρες. Το μίγμα της αντίδρασης διηθήθηκε από celite και εκπλύθηκε με θερμή μεθανόλη. Το διήθημα και τα εκπλύματα συνενώθηκαν, και ο διαλύτης αποστάχθηκε, δίνοντας την ισολουμινόλη **IL**.

κίτρινο στερεό: 0.735 g

απόδοση: 86.5%

Μοριακό Βάρος: 177.16

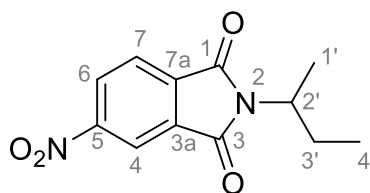
Μοριακός τύπος: C₈H₇N₃O₂

R_f (MeOH/DCM: 40/60) = 0.4

¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.60 (s, 2H, NHCO), 7.72 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-8), 7.02 (s, 1H, H-5), 6.97 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-7), 6.18 (s, 2H, NH₂)

¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 156.36 (C-6), 153.96 (C-1), 153.05 (C-4), 128.80 (C-4a), 127.27 (C-8), 119.23 (C-7), 116.34 (C-8a), 105.71 (C-5).

Σύνθεση της 2-(*sec*-βουτυλο)-5-νιτροϊσοϊνδολινο-1,3-διόνης **48**



Σε προξηραμένη υπό ροή αργού σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 100 ml προστέθηκε η διόνη **46** (2 g, 0.01 mol), *sec*-βουτυλαμίνη (0.760 g, 0.02 mol) και οξικό οξύ (50 ml) ως διαλύτης. Το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε σε επαναροή (reflux) για 3.5 ώρες. Έπειτα, ακολούθησε συμπύκνωση του μίγματος της αντίδρασης, διάλυση του υπολείμματος σε διχλωρομεθάνιο (50 ml) και εκπλύσεις της οργανικής φάσης με νερό (3 x 20 ml). Το προϊόν **48** παραλήφθηκε έπειτα από ξήρανση της οργανικής φάσης με θειικό μαγνήσιο και συμπύκνωση υπό κενό.

Καφέ στερεό : 1.915 g

απόδοση 77%

Μοριακό Βάρος: 248.24

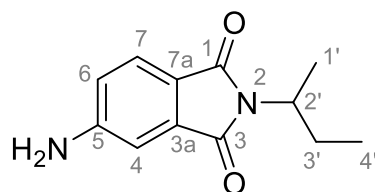
Μοριακός τύπος: C₁₂H₁₂N₂O₄

R_f(DCM) = 0.69

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ: 8.59 (s, 1H, H-4), 8.56 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, 6), 8.00 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-7), 4.38 – 4.14 (m, 1H, H-2'), 2.15 – 1.66 (m, 2H, H-3'), 1.46 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, H-1'), 0.85 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, H-4').

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ: 167.01 (C-1), 165.73 (C-2), 151.71 (C-5), 136.07 (C-7a), 133.41 (C-3a), 129.20 (C-7), 124.35 (C-6), 118.56 (C-4), 50.05 (C-2'), 26.79 (C-3'), 18.30 (C-1'), 11.29 (C-4').

Σύνθεση της 5-αμινο-2-(sec-βουτυλο)ισοϊνδολινο-1,3-διόνης **49**



Σε προξηραμένη υπό ροή αργού φιάλη προστέθηκε η διόνη **48** (1.915 g) σε μεθανόλη (20 ml) και αφού το μίγμα της αντίδρασης απαερώθηκε για μια ώρα υπό ατμόσφαιρα αργού, προστέθηκε παλλάδιο 10% σε ενεργό άνθρακα ως καταλύτης (150 mg) και το μίγμα αφέθηκε σε αυτόκλειστο δοχείο για 24 ώρες σε πίεση 10 atm. Έπειτα, το μίγμα της αντίδρασης διηθήθηκε από celite, εκπλύθηκε με μεθανόλη. Το διήθημα και τα εκπλύματα συνενώθηκαν, και ο διαλύτης αποστάχθηκε, δίνοντας την αμίνη **49**.

Πορτοκάλι στερεό : 1.170 g

Απόδοση 68%

Μοριακό Βάρος: 218.26

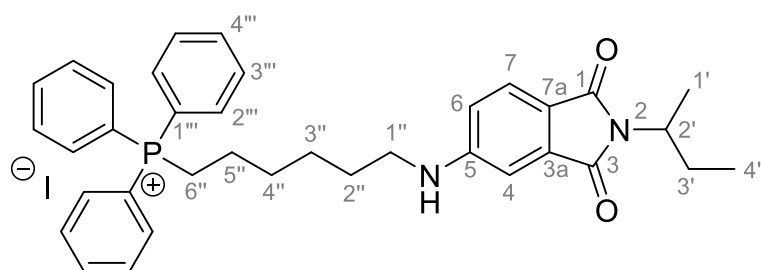
Μοριακός τύπος: C₁₂H₁₄N₂O₂

R_f(DCM) = 0.75

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ : 7.45 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-7), 6.89 (s, 1H, H-4), 6.78 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-6), 6.45 (s, 2H, NH_2), 4.33 – 3.81 (m, 1H, H-2'), 2.09 – 1.52 (m, 2H, H-3'), 1.34 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, H-1'), 0.76 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, H-4').

$^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 168.55 (C-1), 168.27 (C-3), 155.02 (C-5), 134.29 (C-3a), 124.81 (C-7), 116.65 (C-6), 116.49 (C-7a), 106.83 (C-4), 47.77 (C-2'), 26.45 (C-3'), 18.45 (C-1'), 11.22 (C-4').

Σύνθεση του 6((2σεκβουτυλ)-1.3-διοξισοινδολιν-5υλ)αμινο)εξυλ)τριφαινυλοφωσφονιακού ιωδιδίου 50



Σε προξηραμένη υπό ροή αργού σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 5ml, προστίθεται το φθαλιμίδιο **49** (500 mg, 2.29 mmol), το ιωδίδιο **37b** (1.3 g, 2.29 mmol) και NMP (1.5 ml) και το όλο αναδεύεται στους 120 °C για 24 ώρες. Ακολουθείται εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο (x3), έκπλυση της οργανικής στιβάδας με υδατικό διάλυμα θειοθειικού νατρίου και ξήρανση με θειικό νάτριο. Στη συνέχεια, η οργανική στιβάδα συμπυκνώθηκε υπό κενό και υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (Μεθανόλη / διχλωρομεθάνιο: 0 / 100, 5 / 95, 10 / 90, 20 / 80). Από τη χρωματογραφία παρελήφθηκε το προϊόν σχετικά καθαρό, και χρησιμοποιήθηκε στο επόμενο στάδιο

Κίτρινο στερεό : 215 mg

Απόδοση 13.5%.

Μοριακό Βάρος: 690.61

Μοριακός τύπος: $\text{C}_{36}\text{H}_{40}\text{IN}_2\text{O}_2\text{P}$

R_f (MeOH/DCM: 5/95): 0.75

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ : 7.84 – 7.65 (m, 15H, PPh_3), 7.36 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-7), 7.04 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-6), 6.89 (s, 1H, H-4), 4.21 – 4.06 (m, 1H, H-2'), 3.68 – 3.50 (m, 2H, H-6''), 3.27 – 3.11 (m, 2H, H-1''), 2.12 – 1.37 (m, 13H, H-2-5, H-1',3'), 0.80 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, H-4').

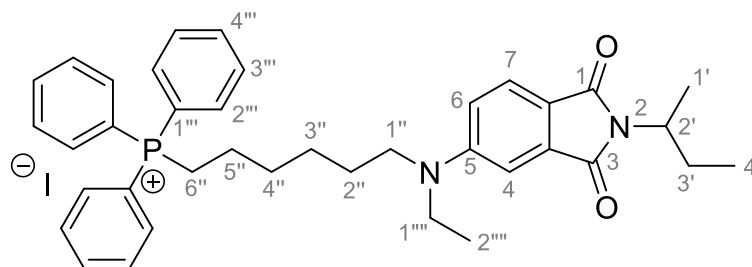
$^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ 169.14 (C-1), 168.93 (C-2), 153.85 (C-5), 134.92 (d, $J = 2.6$ Hz, C-4'''), 134.40 (C-3a), 133.35 (d, $J = 10.0$ Hz, C-2'''), 130.33 (d, $J = 12.5$ Hz, C-3'''), 123.96 (C-7), 117.73 (d, $J = 86.2$ Hz, C-1'''), 116.28 (C-7a), 110.13 (C-6), 104.16 (C-4), 48.68 (C-2'), 42.24 (C-1''), 30.32 (d, $J = 12.9$ Hz, C-4''), 27.58 (C-2''), 26.65 (C-3'), 25.87 (C-3''), 22.11 (d, $J = 4.7$ Hz, C-5''), 21.90 (d, $J = 51.3$ Hz, C-6''), 18.25 (C-1'), 11.06 (C-4').

$^{31}\text{P NMR}$ (81 MHz, DMSO) δ 25.04.

ES-MS m/z για $\text{C}_{36}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_2\text{P}$ $[\text{M}]^+$ υπολογίστηκε 563.28 και βρέθηκε 563.28

ES-HRMS m/z για $\text{C}_{36}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_2\text{P}$ $[\text{M}]^+$ υπολογίστηκε 563.2822 και βρέθηκε 563.2856

Σύνθεση του (6-((2-sec-βουτυλο)-1,3-διοξισοινδολιν-5-υλο)(εθυλο)αμινο)εξυλο)τριφαινυλοφωσφονιακού ιωδιδίου 51



Το φθαλιμίδιο **50** (150 mg, 0.127 mmol) προστίθεται σε δίλιμη προξηραμένη υπό ροή αργού φιάλη χωρητικότητας 5 ml με θειικό διαιθυλεστέρα (241 mg, 1.6 mmol) για μία ώρα στους 140°C. Στη συνέχεια, επαναφέρεται σε θερμοκρασία δωματίου, και προστίθεται πάγος προκειμένου να παραληφθεί ένα σκουροπράσινο κολλώδες υγρό. Το προϊόν αυτό ανακρυσταλλώνεται με 50% νερό / οξικό οξύ και το φθαλιμίδιο **82** απομονώνεται ύστερα από χρωματογραφία στήλης (μεθανόλη/διχλωρομεθάνιο: 0/100, 3/97, 5/95, 7/93).

Κίτρινο στερεό: 110 mg,

Απόδοση 70%.

Μοριακό Βάρος: 718.64

Μοριακός τύπος: C₃₈H₄₄N₂O₂P

R_f (DCM): 0.08

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.84 – 7.65 (m, 15H, PPh₃), 7.52 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-7), 6.89 (s, 1H, H-4), 6.69 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-6) 4.21 – 4.06 (m, 1H, H-2'), 4.04 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H, H-1'''), 3.68 – 3.53 (m, 2H, H-6''), 3.33 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, H-1''), 2.12 – 1.37 (m, 13H, H-2-5, H-1',3'), 1.20 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, H-2'''), 0.83 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, H-4').

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 169.71 (C-1), 169.23 (C-2), 152.50 (C-5), 135.20 (d, *J* = 2.8 Hz, C-4'''), 135.06 (C-3a), 133.75 (d, *J* = 9.9 Hz, C-2'''), 130.69 (d, *J* = 12.5 Hz, C-3'''), 124.97 (C-7), 118.56 (d, *J* = 85.9 Hz, C-1'''), 116.68 (C-7a), 114.33 (C-6), 105.09 (C-4), 50.66 (C-1''), 48.68 (C-2'), 45.65 (C-1'''), 30.22 (d, *J* = 16.5 Hz, C-4''), 27.10 (C-2''), 27.08 (C-3''), 26.46 (C-3'), 22.72 (d, *J* = 3.3 Hz, C-5''), 22.03 (d, *J* = 51.2 Hz, C-6''), 18.69 (C-1'), 12.26 (C-2'''), 11.49 (C-4').

³¹P NMR (80 MHz, CDCl₃): 25.11

ES-MS m/z για C₃₈H₄₄N₂O₂P [M]⁺ υπολογίστηκε 591.94 και βρέθηκε 591.37

ES-HRMS m/z για C₃₈H₄₄N₂O₂P [M]⁺ υπολογίστηκε 591.3135 και βρέθηκε 591.3170

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ- ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ- ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

ALA	αμινολεβουλινικό οξύ
DCM	Διχλωρομεθάνιο
DMAP	4 διμεθυλάμινο πυριδίνη
DMF	διμεθυλοφορμαμίδιο
DMSO	διμεθυλοσουλφοξείδιο
E.A.	Οξικός αιθυλεστέρας
Et	αίθυλο
MS	Φάσμα μάζας (mass spectrum)
NMP	N μέθυλο πυρρολιδόνη
NMR	Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
P.ether	Πετρελαϊκός αιθέρας
(p _{tol}) ₃	Τριπαρατόλυλο
Cy ₃	Τρικυκλοέξυλο
PDT	Φωτοδυναμική θεραπεία
Ph ₃	Τριφαινυλο
PpIX	Πρωτοπορφυρίνη 9
ROS	Ενεργές μορφές οξυγόνου
RT	Θερμοκρασία δωματίου
THF	τετραυδροφουράνιο

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- [1] K. Anjum, B. Shagufta, S. Abbas, S. Patel, I. Khan, S. Shah, N. Akhter και S. Hassan, «Current status and future therapeutic perspectives of glioblastoma multiforme (GBM) therapy: A review,» *Biomed Pharmacother*, **2017**, 92, 681-689.
- [2] C. Abbruzzese, S. Matteoni, M. Signore, L. Cardone, K. Nath, J. Glickson και M. Paggi, «Drug repurposing for the treatment of glioblastoma multiforme,» *J Exp Clin Cancer Res.*, **2017**, 169, 1-11.
- [3] S. H. Soomro, L. R. Ting, Y. Y. Qing και M. Ren, «Molecular biology of glioblastoma: Classification and mutational locations,» *J Pak Med Assoc*, **2017**, 67.
- [4] R. S. Snell, «Κλινική Νευροανατομική,» Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, **2010**, 61.
- [5] R. Pottier, Photodynamic Therapy with ALA, The Royal Society of Chemistry, **2006**, 157.
- [6] P. Kleihues, F. Soylemezoglu, B. Schäuble, B. Scheithauer και P. Burger, «Histopathology, Classification, and Grading of Gliomas,» *Glia*, **1995**, 15, 211-216, 1995.
- [7] X. Wang, Q. Zhang, L. Lv, J. Fu, Y. Jiang, H. Xin και Q. Yao, «Glioma and microenvironment dual targeted nanocarrier for improved antiglioblastoma efficacy,» *Drug Deliv.*, **2017**, 24, 1401–1405.
- [8] C. Dupont, A.-S. Vignion, S. Mordon, N. Reyns και M. Vermandel, «Photodynamic Therapy for Glioblastoma: A Preliminary Approach for Practical Application of Light Propagation Models,» *Lasers Surg Med*,

2017, 1.

- [9] M. R. Hamblin, Imaging in Photodynamic Therapy, **2017**, 137.
- [10] J. T. F. Lau, Towards Dual and Targeted Cancer Therapy with Novel Phthalocyanine-based Photosensitizers, Springer, **2013**, 1-2.
- [11] B. Bonavida, Resistance to Targeted Anti-Cancer Therapeutics, 5, Springer, **2015**, 5-8.
- [12] Σωτηρίου, Απάλλα και Σωτηριάδης, «Φωτοδυναμική Θεραπεία: Βασικές αρχές λειτουργίας και ανασκόπηση των θεραπευτικών εξελίξεων,» *Ελληνική Επιθεώρηση Δερματολογίας Αφροδισιολογίας*, **2014**, 25.
- [13] Σ. Ειρήνη, «Φωτοδιάγνωση και φωτοδυναμική θεραπεία HPV λοιμώξεων του δέρματος και δερματοβλεννογόνιων περιοχών,» Κρήτη, **2002**.
- [14] D.-E. Hider και G. Jori, Comprehensive Series in Photosciences 2, **2001**, 8.
- [15] A. Periasamy, Imaging in Photodynamic Therapy, CRC press, **2017**, 38, 94, 136-138.
- [16] Δ. Καρακάσης, «Ενδιάμεσα προϊόντα της βιοσυνθετικής οδού της αίμης επί μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων» **1993**.
- [17] M. H. Abdel-Kader, Photodynamic Therapy From Theory to Application, Springer, **2014**, 73.
- [18] B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts και P. Walter, Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας, Πασχαλίδης, **2011**, 778-780.
- [19] J. E. Hall, Ιατρική Φυσιολογία, Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου, **2013**, 10,13-14.

- [20] S. R. Jean, D. V. Tulumello, S. P. Wisnovsky, E. K. Lei, M. P. Pereira και S. O. Kelley, «Molecular Vehicles for Mitochondrial chemical biology and drug delivery,» *ACS Chem. Biol*, **2014**, 9, 323-328.
- [21] S. Fluda, L. Galluzzi και G. Kroemer, «Targeting mitochondria for cancer therapy,» *Nature Reviews*, **2010**, 9, 447-448.
- [22] Trendeleva, A. Rogov, D. Cherepanov, E. I. Sukhanova, T. Il'yasova, I. Severina και R. AZvyagil'skaya, «Interaction of tetraphenylphosphonium and dodecyltriphenylphosphonium with lipid membranes and mitochondria,» *Biochemistry (Mosc)*, **2012**, 77, 1021-1025.
- [23] A. L. Kierszenbaum και L. L. Tres, Ιστολογία με στοιχεία κυτταρικής βιολογίας, Π.Χ. Πασχαλίδης, **2013**, 118.
- [24] M. P. Murphy, «Targeting lipophilic cations to mitochondria,» *Biochem. Biophys Acta*, **2008**, 1777, 1028-1031.
- [25] J. Neuzil, S. Pervaiz και S. Fulda, Mitochondria: The Anti-cancer Target for the Third Millennium, Springer, **2014**, 169.
- [26] A. J. Moreno, D. L. Santos, S. Magalhaes-Novais και P. J. Oliveira, «Measuring Mitochondrial membrane potential with a tetraphenylphosphonium selective electrode,» *Current protocols in toxicology*, **2015**, 25.5.1-25.5.16.
- [27] C. Dodeigne, L. Thunus και R. Lejeune, «Chemiluminescence as diagnostic tool. A review,» *Talanta*, **1999**, 51, 415-439.
- [28] F. Barni, S. W. Lewis, A. Berti, G. M. Miskelly και G. Lago, «Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection,» *Talanta*, **2007**, 72, 896-913.
- [29] A. M. Garcia-Campana, Chemiluminescence in analytical chemistry, USA:

Dekker, **2001**, 14, 108-110.

- [30] Ι. Χατζηανέστης, «Μελέτη της μεταφοράς ενέργειας κατά τη χημειοφωταύγεια σε ομοιογενή και προσανατολισμένα συστήματα,» Αθήνα, **1992**.
- [31] G. Merenyi, J. Lind, X. Shen και T. Eriksen, «Oxidation potential of luminol: is the autooxidation of singlet organic molecules an outer-sphere electron transfer,» *J. Phys. Chem.*, **1990**, 748-752.
- [32] G. Merenyi, J. Lind και T. E. Eriksen, «Luminol Chemiluminescence : Chemistry,Excitation, Emitter,» *J Biolumin Chemilumin*, **1990**, 5, 53-56.
- [33] H. Chen, L. Lin, H. L και J.-M. Lin, «Quantum dots-enhanced chemiluminescence: Mechanism and application,» *Coordination Chemistry Reviews*, **2014**, 1, pp. 86-89.
- [34] H. Albrecht, «Chemiluminescence of aminophthalic hydrazide,» *Z. phys Chem*, **1928**, 321.
- [35] L. J. Kricka, «Chemiluminescence and bioluminescence,» *Anal. Chem*, **1995**, 67, 499-502.
- [36] N. Barnett και P. Francis, «Chemiluminescence: overview. Encyclopedia of analytical science”,Elsevier, **2005**.
- [37] K. L. Williamson, Macro scale and micro scale organic experiments, D.C. Heath, **1994**.
- [38] A. Ault, Techniques and experiments for organic chemistry, California: University Science Book, **1998**.
- [39] G. Chattopadhyay και P. Sinha., «Hydrazine-hydroquinone complex as an efficient solid phase hydrazine donor: high yield synthesis of luminol and isolumino,» *J.Chem Res.*, **2011**, 35, 326-328.

- [40] H. D. K. Drew και F. H. Pearman, «Chemiluminescent organic compounds. Part IV. Amino- and hydrazino-cyclophthalhydrazides and their relative luminescent power,» *J. Am. Chem. Soc.*, **1937**, 132, 586-592.
- [41] H. D. K. Drew, H. H. Hatt και F. A. Hobart, «Chemiluminescent organic compounds. Part III. N-Methylated phthalaz-1 : 4-diones,» *J. Chem. Soc.*, **1937**, 0, 33-37.
- [42] R. Maeztu, G. Gonza, Iez-Gaitano και G. Tardajos, «Enhancement of the Chemiluminescence of Two Isoluminol Derivatives by Nanoencapsulation with Natural Cyclodextrins,» *J. Phys. Chem.*, **2010**, 114.
- [43] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, *Organic Chemistry*, Oxford University Press, 2001.
- [44] S. Neelakantan, I. Surjawan, H. Karacelik, C. Hicks, P. Crooks, «Synthesis of novel isoluminol probes and their use in rapid bacterial assays,» *Bioorg Med Chem*, **2009**, 19, 5722-5726.
- [45] E. H. White και D.F. Roswell, «The Chemiluminescence of Organic Hydrazides,» *Acc. Chem. Res.*, **1970**, 3, 54-60.
- [46] K. D. Gundermann και M. Drawert, «Sterical resonance hindrance in alkylated aminophthalylhydrazides,» *Chem. Ber.*, **1962**, 2018-2026.
- [47] A. Abdelazeem, S. Khan, S. White, K. Sufka και C. McCurdy, «Design, synthesis and biological evaluation of bivalent benzoxazolone and benzothiazolone,» *Bioorg. Med. Chem.*, αρ. 23, pp. 3248-3259, 2015.
- [48] T. S. Reddy και A. R. Reddy, «Synthesis and fluorescence study of Naphthalimide-Coumarin Naphthalimide-Luminol conjugates,» *J Fluoresc*, **2014**, 24, 1571-1580.

- [49] *J. Org. Chem*, **1997**, 62, 4321-4326.
- [50] M. G. Molone, *How to Solve Organic Reaction Mechanisms*, Wiley, **2015**.
- [51] J. Vogelgesang, G. Huttner, E. Kaifer, P. Kircher, P. Rutsch και S. Cunskis, «Chiral Chelate Ligands Based on a Neopentane Framework Introducing Indenyl and Fluorenyl Donor Groups,» *Eur.J.Inorg.Chem*, **1999**, 2187-2199.
- [52] A. C. Bissember, A. Levina και G. C. Fu, «A Mild, Palladium-Catalyzed Method for the Dehydrohalogenation of Alkyl Bromides: Synthetic and Mechanistic Studies,» *Angew. Chem*, **1999**, 134, 14232-14237.
- [53] M. B. M. Reddy και M. A. Pasha, «Cs₂CO₃ Catalyzed Rapid and Efficient Conversion of Amines into Sulfonamides; Alcohols and Phenols into Sulfonic Esters,» *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, **2016**, 186, 1867-1875.
- [54] M. Couturier, Y. L. Dory, F. RouiUard και P. Desloagchamps, «Studies Directed Towards the Total Synthesis of Aldosterone and Naturally Occurring Analogues. A Unified Approach Using the Transannular Diels-Alder Reaction,» *Tetrahedron*, **1998**, 54, 1529-1562.
- [55] J. Wang, J. Zhang, B. Arbogast και C. S. Maier, «Tandem Mass Spectrometric Characterization of Thiol Peptides Modified by the Chemoselective Cationic Sulfhydryl Reagent (4-Iodobutyl) Triphenylphosphonium» *J Am Soc Mass Spec*, **2011**, 22, 1771-1783.
- [56] M. Rosini, E. Simoni, M. Bartolini, E. Soriano, J. Marco-Contelles, V. Andrisano, B. Monti, M. Windisch, B. Hutter-Paier, D. McClymont, I. Mellor και M. Bolognesi, «The Bivalent Ligand Approach as a Tool for Improving the in vitro Anti-Alzheimer Multitarget Profile of Dimebon,» *ChemMedChem*, **2013**, 8, 1276-1281.

- [57] S. K. Lee, M. K. Park, H. E. Jhang, J. Yi, K. Nahm, D. W. Cho, C. S. Ra, K. Musilek, A. Horova, J. Korabecny, R. Dolezal, D. Jun και K. Kuca, «Preparation of 7-Methoxy Tacrine Dimer Analogs and Their In vitro/In silico Evaluation as Potential Cholinesterase Inhibitors,» *Bull. Korean Chem*, **2015**, 36, 1654-1660.
- [58] D. F. Caffrey και T. Gunnlaugsson, «Displacement assay detection by a dimeric lanthanide luminescent ternary Tb(III)–cyclen complex: high selectivity for phosphate and nitrate anions,» *Dalton Trans*, **2014**, 43, 17965-17970.
- [59] K. Hajime, «Microenvironmental Effects of Water-Soluble Polymers on the Chemiluminescence of Luminol and Its Analogs» *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **1987**, 60, 2023-2029.
- [60] H. Yoshida, R. Nakao, H. Nohta και M. Yamaguchi, «Chemiluminescent properties of some luminol-related compounds» *Dyes and Pigments*, **2000**, 27, 239-245.
- [61] J. Han, J. Jose, E. Mei και K. Burgess, «Chemiluminescent Energy-Transfer Cassettes Based on Fluorescein and Nile Red,» *Angew. Chemie*, **2007**, 1684-1687.