



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ-ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΔΙΑΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΟΡΓΑΝΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΧΗΜΙΚΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Σύνθεση και Μελέτη Μοριακών Στροφών, Ιχνηθετών του
Καταλυτικού Κέντρου της Φωσφορυλάσης του Γλυκογόνου**

ΜΙΧΑΗΛ-ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΜΗΝΑΔΑΚΗΣ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2019

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Σύνθεση και Μελέτη Μοριακών Στροφών, Ιχνηθετών του Καταλυτικού Κέντρου της
Φωσφορυλάσης του Γλυκογόνου

ΜΙΧΑΗΛ-ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΜΗΝΑΔΑΚΗΣ

A.M.: 171508

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Αθανάσιος Γκιμήσης, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αθανάσιος Γκιμήσης, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Παναγιώτα Μουτεβελή-Μηνακάκη, Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Γεώργιος Βουγιουκαλάκης, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 21/10/2019

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο τομέας της μοριακής απεικόνισης ασχολείται με την ανίχνευση συγκεκριμένων μοριακών στόχων και την παρακολούθηση βιολογικών διεργασιών σε κύτταρα, ιστούς και ζωτικά όργανα με μη επεμβατικό τρόπο. Η συλλογή μοριακής φύσης πληροφορίας απαιτεί τη χρήση μορίων ιχνηθετών τα οποία παρουσιάζουν υψηλή εκλεκτικότητα για τις περιοχές ενδιαφέροντος. Οι μοριακοί στροφείς είναι μια οικογένεια συνθετικών φθορίζουσών ενώσεων οι οποίες μετά από φωτοδιέγερση, υφίστανται μια ενδομοριακή διαδικασία στρέψης ως αποτέλεσμα μεταφοράς φορτίου. Αυτή η κατηγορία μορίων έχει ως δομικά χαρακτηριστικά την ύπαρξη μίας ηλεκτρονιοδοτικής και μίας ηλεκτρονιοελκτικής ομάδας οι οποίες συνδέονται με ένα π-συζυγιακό σύστημα και έχουν τη δυνατότητα να περιστραφούν η μία σε σχέση με την άλλη. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (**GP**) είναι ένα από τα πιο σημαντικά ρυθμιστικά ένζυμα που ελέγχουν την ομοιόσταση της γλυκόζης και το μεταβολισμό του γλυκογόνου γενικότερα και παίζει καταλυτικό ρόλο στην διάσπαση του αποθηκευμένου στον οργανισμό γλυκογόνου, το οποίο αποτελεί τη βασικότερη αποθήκη ενέργειας μετά τον λιπώδη ιστό. Αναστολή της **GP** αποτελεί έναν πολλά υποσχόμενο τομέα στη θεραπεία του διαβήτη τύπου II.

Στα πλαίσια της παρούσας ερευνητικής εργασίας σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν δύο νέοι αναστολείς της **GP** (**RotA** και **RotB**) που ανήκουν στην οικογένεια των μοριακών στροφέων. Αναπτύχθηκε συνθετικό πρωτόκολλο και ειδικά για τον **RotA** προσδιορίστηκε η σταθερά αναστολής και επιβεβαιώθηκε, με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ του συμπλόκου ενζύμου : αναστολέα, ότι δεσμεύεται στο καταλυτικό κέντρο της **GP**. Φασματοσκοπικές μελέτες έδειξαν ότι ο νέος αυτός αναστολέας παρουσιάζει ιδιότητες μοριακού στροφέα οι οποίες εκφράζονται με αύξηση της έντασης φθορισμού μετά από σύμπλεξη στο κλειστό καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Κυτταρικά πειράματα έδειξαν ότι ο **RotA** μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μοριακός ιχνηθέτης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου σε κυτταρικό περιβάλλον. Συνολικά πρόκειται για ένα νέο εργαλείο που μπορεί να επιτρέψει μια εις βάθος μελέτη της δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου *in vitro* και *in vivo*.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Οργανική Χημεία

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Οργανική Σύνθεση, Αναστολείς GP, Φασματοσκοπική Μελέτη, Μοριακοί Στροφείς, Ιχνηθέτες Βιολογικής Δράσης

ABSTRACT

The field of molecular imaging deals with the detection of specific molecular targets and the monitoring of biological processes in cells, tissues and vital organs in a non-invasive manner. Collection of molecular information requires the use of probes which exhibit high selectivity for the regions of interest. Molecular rotors are a family of synthetic fluorescent compounds which undergo an intramolecular twist process as a result of charge transfer after photoexcitation. This class of molecules bears an electron donating and an electron accepting group linked through a π -conjugate system, that have the ability to rotate relative to each other. Glycogen phosphorylase (**GP**) is one of the most important regulatory enzymes that control glucose homeostasis and glycogen metabolism, playing a catalytic role in the breakdown of glycogen, a major energy source stored in the body. Inhibition of **GP** is a promising area in the treatment of type II diabetes.

In the context of this research work, two new **GP** inhibitors (**RotA** and **RotB**), which belong to the molecular rotor family, were designed and synthesized. A synthetic protocol was developed and, for RotA, the inhibition constant was determined and the binding to the catalytic center of **GP** was confirmed by X-ray crystallography of the enzyme : inhibitor complex. Spectroscopic studies have shown that this new inhibitor exhibits molecular rotor properties which are expressed by an increase in fluorescence intensity after clustering in the closed catalytic center of the enzyme. Cellular experiments have shown that **RotA** can be used as a molecular marker of glycogen phosphorylase in a cellular environment. Overall, this is a novel tool that can allow an in-depth study of glycogen phosphorylase activity both *in vitro* and *in vivo*.

SUBJECT AREA: Organic Chemistry

KEYWORDS: Organic Synthesis, RMGPb Inhibitors, Spectroscopic Study, Molecular Rotors, Biological Probes

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω πρώτα από όλα τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Αθανάσιο Γκιμήση, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όσον αφορά την εργασία σε ένα νέο και πρωτοπόρο θέμα για το εργαστήριό μας και φυσικά για τις πολύτιμες συμβουλές και τη βοήθειά του σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας ερευνητικής εργασίας.

Ευχαριστώ θερμά τα μέλη της τριμελούς επιτροπής μου, την καθηγήτρια Παναγιώτα Μουτεβελή-Μηνακάκη και τον επίκουρο καθηγητή Γεώργιο Βουγιουκαλάκη για τις πολύτιμες συμβουλές τους.

Ένα ακόμη ευχαριστώ αφιερώνεται στις Εσθήρ Σακκή και Κατερίνα Πασχαλίδου για τη λήψη των φασμάτων μάζας όπως και στην υποψήφια διδάκτορα Χριστιάνα Μαντζουράνη για τη λήψη των φασμάτων μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας.

Ευχαριστώ τον Διονύση Νεόφυτο και την Ειρήνη Εμμανουήλ όπως επίσης και την Δρ. Ευαγγελία Χρυσίνα για τα κινητικά και κρυσταλλογραφικά αποτελέσματα όπως και για τα υλικά που μου παρείχαν.

Επίσης, ευχαριστώ τον επίκουρο καθηγητή Ιωάννη Παπαευσταθίου και τα παιδιά της ερευνητικής του ομάδας που μου παρείχαν την πρόσβαση στο φθορισμόμετρο και φυσικά την παρέα τους. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στις υποψήφιες διδάκτορες Μαρία Πάσχου και Σταματία Καταραχιά, στη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Κατερίνα Γιαννοπούλου, στην προπτυχιακή φοιτήτρια Άρτεμη Κογκάκη και φυσικά στην αναπληρώτρια καθηγήτρια Παναγιώτα Παπαζαφείρη για τη λήψη των φωτογραφιών στο μικροσκόπιο φθορισμού και στο συνεστιακό μικροσκόπιο αλλά φυσικά και για τις πάσης φύσεως συμβουλές τους.

Ευχαριστώ ακόμη την ερευνητική ομάδα της Greta Varchi στη Μπολόνια και ειδικότερα το Marco Ballestri για την παρασκευή των νανοσωματιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ θα ήθελα να δώσω στον Κωνσταντίνο Μαυρέα για τη συνεχή υποστήριξή του και τις αμέτρητες συμβουλές που μου έδινε καθ' όλη τη διάρκεια τόσο της διπλωματικής εργασίας όσο και της παρούσας ερευνητικής εργασίας. Ευχαριστώ επίσης τα παιδιά της ερευνητικής μας ομάδας Ειρήνη Εμμανουήλ, Κατερίνα Δαλαλάκη και Γεώργιο Ατσαβέ για τις συμβουλές και την παρέα τους. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω πρώτα απ' όλα την οικογένειά μου για τη στήριξη και τα εφόδια που μου παρείχε όπως επίσης και τους φίλους μου για την στήριξη και τις συμβουλές τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	7
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	21
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	22
1.1 Τεχνικές μοριακής απεικόνισης	22
1.2 Οπτική Απεικόνιση	26
1.3 Μοριακοί φθορίζοντες ιχνηθέτες	33
1.3.1 NIR χρωστικές	41
1.4 Μοριακοί στροφείς.....	48
1.4.1 Δομή και λειτουργία.....	48
1.4.2 Εφαρμογές μοριακών στροφών	57
1.5 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως μοριακός στόχος.....	67
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ-ΘΕΩΡΙΑ ΤΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ.....	71
2.1 Σκοπός της Εργασίας	71
2.2 Θεωρία της Σύνθεσης.....	72
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ	82
3.1 Συνθετικό Μέρος.....	82
3.1.1 Μεθοδολογία της σύνθεσης (<i>E</i>)-2-κυανο-3-αρυλακρυλικών παραγώγων ..	82
3.1.2 Σύνθεση των γλυκοπυρανοζυλαμινών 85α,β	83
3.1.3 Σύζευξη του οξέος 83α με τις γλυκοπυρανοζυλαμίνες 85α,β και σύνθεση των τελικών αμιδίων 73δ,ζ,η	85
3.1.4 Σύνθεση της 6-(<i>N,N</i> -διμεθυλαμινο)-2-ναφθαλδεΐδης (69β)	87
3.1.5 Σύνθεση των (<i>E</i>)-2-κυανο-3-ναφθυλακρυλικών παραγώγων 73β,ε	88
3.2 Φασματοσκοπική μελέτη των εν δυνάμει μοριακών στροφών 73ζ και 73ε	92
3.2.1 Μελέτη του RotA (73ζ)	92
3.2.2 Επιβεβαίωση με τυφλά πειράματα	96

3.2.3	Μελέτη του RotB (73ε)	98
3.3	<i>In vitro</i> μελέτες με το στροφέα RotA και τα παράγωγά του	102
3.3.1	Κινητική και κρυσταλλογραφική μελέτη του στροφέα RotA	103
3.3.2	Κυτταρικές μελέτες με το στροφέα RotA και τα παράγωγά του	105
3.4	Συμπεράσματα	116
4.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	117
4.1	Γενικά	117
4.1.1	Όργανα και διατάξεις.....	117
4.1.2	Αντιδραστήρια-Ένζυμα και πρωτεΐνες-Χρωματογραφία.....	117
4.1.3	Διαλύτες-Ρυθμιστικά διαλύματα	118
4.2	Σύνθεση.....	119
4.2.1	1-Αζιδό-1-δεοξυ-2,3,4,6-τετρα-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζη (87α) ¹⁸² ..	119
4.2.2	1-Αμινο-1-δεοξυ-2,3,4,6-τετρα-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζη (85α) ¹⁸³ ..	120
4.2.3	(<i>E</i>)-2-Κυανο-3-(4-(<i>N,N</i> -διμεθυλαμινο)φαινυλο)ακρυλικό οξύ (83α) ¹⁸⁸	120
4.2.4	(<i>E</i>)-2-Κυανο-3-(4-(<i>N,N</i> -διμεθυλαμινο)φαινυλο)ακρυλοχλωρίδιο (84α)	121
4.2.5	(<i>E</i>)-2-Κυανο-3-(4-(<i>N,N</i> -διμεθυλαμινο)φαινυλο)- <i>N</i> -(2,3,4,6-τετρα-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)ακρυλαμίδιο (73α)	122
4.2.6	(<i>E</i>)-2-Κυανο-3-(4-(<i>N,N</i> -διμεθυλαμινο)φαινυλο)- <i>N</i> -(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)ακρυλαμίδιο (73ζ)	123
4.2.7	1-Αζιδό-1-δεοξυ-β-D-γλυκοπυρανόζη (88) ¹⁸⁴	124
4.2.8	1,1-Διμεθοξυτολουόλιο ¹⁸⁶	125
4.2.9	1-Αζιδό-1-δεοξυ-4,6-Ο-βενζυλιδενο-β-D-γλυκοπυρανόζη (89) ¹⁸⁴	125
4.2.10	1-Αζιδό-1-δεοξυ-2,3-δι-Ο-ακετυλο-4,6-Ο-βενζυλιδενο-β-D-γλυκοπυρανόζη (87β) ¹⁸⁷	126
4.2.11	1-Αμινο-1-δεοξυ-2,3-δι-Ο-ακετυλο-4,6-Ο-βενζυλιδενο-β-D-γλυκοπυρανόζη (85β)	127
4.2.12	(<i>E</i>)-2-Κυανο-3-(4-(<i>N,N</i> -διμεθυλαμινο)φαινυλο)- <i>N</i> -(2,3-δι-Ο-ακετυλο-4,6-Ο-βενζυλιδενο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)ακρυλαμίδιο (73γ)	128

4.2.13	(<i>E</i>)-2-Κυανο-3-(4-(<i>N,N</i> -διμεθυλαμινο)φαινυλο)- <i>N</i> -(2,3-δι- <i>O</i> -ακετυλο-β- <i>D</i> -γλυκοπυρανοζυλο)ακρυλαμίδιο (73δ)	129
4.2.14	(<i>E</i>)-2-Κυανο-3-(4-(<i>N,N</i> -διμεθυλαμινο)φαινυλο)- <i>N</i> -(6- <i>O</i> -ακετυλο-β- <i>D</i> -γλυκοπυρανοζυλο)ακρυλαμίδιο (73η)	130
4.2.15	(<i>E</i>)-2-Κυανο-3-(4-(<i>N,N</i> -διμεθυλαμινο)φαινυλο)ακρυλικός μεθυλεστέρας (90) 130	
4.2.16	6-Βρωμο-2-ναφθόλη (92) ²²³	131
4.2.17	6-Βρωμο-2-(<i>N,N</i> -διμεθυλο)ναφθυλαμίνη (93) ¹⁹²	132
4.2.18	2-Φορμυλο-6-(<i>N,N</i> -διμεθυλο)ναφθυλαμίνη (69β) ¹⁹²	133
4.2.19	(<i>E</i>)-2-Κυανο-3-(6-(<i>N,N</i> -διμεθυλαμινο)-2-ναφθυλο)ακρυλικό οξύ (83β).....	134
4.2.20	(<i>E</i>)-2-Κυανο-3-(6-(<i>N,N</i> -διμεθυλαμινο)-2-ναφθυλο)ακρυλοχλωρίδιο (84β)	134
4.2.21	(<i>E</i>)-2-Κυανο-3-(6-(<i>N,N</i> -διμεθυλαμινο)-2-ναφθυλο)- <i>N</i> -(2,3,4,6-τετρα- <i>O</i> -ακετυλο-β- <i>D</i> -γλυκοπυρανοζυλο)ακρυλαμίδιο (73β , μέσω αντίδρασης σύζευξης)	135
4.2.22	(<i>E</i>)-2-Κυανο-3-(6-(<i>N,N</i> -διμεθυλαμινο)-2-ναφθυλο)- <i>N</i> -(β- <i>D</i> -γλυκοπυρανοζυλο)-ακρυλαμίδιο (73ε , από αποπροστασία του 73β)	136
4.2.23	Κυανοακετυλο χλωρίδιο (94) ¹⁹⁴	137
4.2.24	2-Κυανο- <i>N</i> -(2,3,4,6-τετρα- <i>O</i> -ακετυλο-β- <i>D</i> -γλυκοπυρανοζυλο)ακεταμίδιο (95)	137
4.2.25	2-Κυανο- <i>N</i> -(β- <i>D</i> γλυκοπυρανοζυλο)ακεταμίδιο (96).....	138
4.2.26	(<i>E</i>)-2-Κυανο-3-(6-(<i>N,N</i> -διμεθυλαμινο)-2-ναφθυλο)- <i>N</i> -(2,3,4,6-τετρα- <i>O</i> -ακετυλο-β- <i>D</i> -γλυκοπυρανοζυλο)ακρυλαμίδιο (73β , από σύζευξη Knoevenagel μεταξύ 95 και 69β).....	139
4.2.27	(<i>E</i>)-2-Κυανο-3-(6-(<i>N,N</i> -διμεθυλαμινο)-2-ναφθυλο)- <i>N</i> -(β- <i>D</i> -γλυκοπυρανοζυλο)ακρυλαμίδιο (73ε, από σύζευξη Knoevenagel μεταξύ 96 και 69β) 140	
4.3	Φωτομετρικά πειράματα	141
4.3.1	Εξαγωγή μοριακού συντελεστή απορροφητικότητας	141
4.3.2	Περιβάλλον μεταβλητού ιξώδους	142
4.3.3	Δοκιμασία μη-ειδικής πρόσδεσης με BSA.....	142

4.3.4	Δοκιμασία μη-ειδικής πρόσδεσης με HK III	143
4.3.5	Υδατικά διαλύματα διαφορετικών pH	144
4.3.6	Μίγματα στροφέα RotA και RMGPb	145
4.3.7	Μίγματα στροφέα RotB και RMGPb	147
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	152

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Σκιαγραφικές ουσίες που έχουν χρησιμοποιηθεί στις κυριότερες τεχνικές μοριακής απεικόνισης (αναγράφονται τα εμπειρικά και τα εμπορικά ονόματα των ιχνηθετών καθώς και το ακρωνύμιο της τεχνικής). ²	23
Σχήμα 2: Δομές σημαντικών φυσικών χρωστικών.	34
Σχήμα 3: Σκελετός των αζινών/θειαζινών και χαρακτηριστικά παραδείγματα χρωστικών αυτής της οικογένειας.	34
Σχήμα 4: Βασικός σκελετός ξανθενίων και σημαντικότεροι εκπρόσωποι.	35
Σχήμα 5: Δύο σημαντικά μόρια της οικογένειας των υδροξυξανθενίων.	35
Σχήμα 6: Μοριακός φάρος για ανίχνευση καρκινικών κυττάρων. ²¹	36
Σχήμα 7: Δομές χαρακτηριστικών χρωστικών.	36
Σχήμα 8: Δομές των χρωστικών Ερυθρό του Κονγκό (18) και MTT (19)	37
Σχήμα 9: Βασικός σκελετός σε ακριδίνες και φαινανθριδίνες και χαρακτηριστικές χρωστικές αυτής της οικογένειας.	38
Σχήμα 10: Δραστικά χλωρίδια που χρησιμοποιούνται στη φθορίζουσα σήμανση.	39
Σχήμα 11: Πυρηνικές χρωστικές της οικογένειας των πολυμεθινών.	39
Σχήμα 12: Σκελετός των κουμαρινών (V) και χρωστικές DASPMI (29) και FM4-64 (30)	40
Σχήμα 13: Ο φθορίζων αναστολέας 31 που χρησιμοποιήθηκε στη δημοσίευση των Boura-Nencka (κόκκινο=αναγνωριστικό τμήμα, πράσινο=φθορίζον τμήμα).	41
Σχήμα 14: Σκελετοί κυριότερων NIR χρωστικών.	42
Σχήμα 15: Βασική συνθετική πορεία καρβοκυανινών. ³	42
Σχήμα 16: Σημαντικότερα μέλη της ομάδας των καρβοκυανινών.	43
Σχήμα 17: Μοριακός ιχνηθέτης που συντέθηκε στην εργασία του BugaJ και συνεργατών. ²⁹	44
Σχήμα 18: Παράγωγο σκουαράϊνης που συντέθηκε από την ομάδα του Ozinskas και συνεργατών. ³⁸	46

Σχήμα 19: Υπερμοριακή κατασκευή που χρησιμοποιείται για in vivo παρατήρηση μέσω TPM. ⁴²	47
Σχήμα 20: Μοριακοί στροφείς με διαφορετική διέδρη γωνία φ ₀ στη θεμελιώδη κατάσταση.	50
Σχήμα 21: Οικογένεια στροφέων τύπου DMABN και κάποιοι από του σημαντικότερους εκπροσώπους (πράσινο: ομάδες δότες, κόκκινο: ομάδες δέκτες).	53
Σχήμα 22: Γενική δομή στροφέων τύπου DBMN και δομές των DCVJ και CCVJ	54
Σχήμα 23: Στροφείς της οικογένειας των DBMN	54
Σχήμα 24: Σκελετός του μοριακού στροφέα BODIPY	55
Σχήμα 25: ΜΣ βασισμένοι στα χρωμοφόρα πορφυρινών και καρβοκυανινών.	56
Σχήμα 26: Νέοι ΜΣ που έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια.	56
Σχήμα 27: Μοντέλο ΜΣ ο οποίος έχει χρησιμοποιηθεί κατά κόρον στην εξερεύνηση των ιδιοτήτων τους.	58
Σχήμα 28: Λιπόφιλα παράγωγα ΜΣ για εκλεκτική στόχευση της κυτταρικής μεμβράνης.	58
Σχήμα 29: ΑΧ που αναπτύχθηκαν από την ομάδα του Θεοδωράκη και συνεργατών. ^{96,97}	60
Σχήμα 30: ΑΧ που φέρουν BODIPY ως χρωμοφόρα με ιδιότητες ΜΣ.	61
Σχήμα 31: ΜΣ τύπου BODIPY με λιπόφιλες αλυσίδες.	61
Σχήμα 32: Δομικά ανάλογα ΜΣ τύπου BODIPY	62
Σχήμα 33: Παράγωγα του ναφθαλενικού σκελετού DAN	64
Σχήμα 34: Ο ισχυρότερος και φθορίζων αναστολέας που έχει συνθέσει το εργαστήριό μας.	69
Σχήμα 35: Ενώσεις στόχοι (δομές 73ζ , 73ε) και υπέρθεση (XVII) με τη χωρική δομή XVI (οι στικτές γραμμές συμβολίζουν αρωματικά συστήματα).	71
Σχήμα 36: Ρετροσυνθετικό σχήμα για τη σύνθεση παραγώγων (<i>E</i>)-2-κυανο-3-αρυλακρυλικών οξέων.	72
Σχήμα 37: Ομάδες μοριακών στροφέων. ¹⁴⁹	73
Σχήμα 38: Υδρόφιλα παράγωγα μοριακών στροφέων. ¹⁵⁰	74

Σχήμα 39: Γενική εικόνα της αντίδρασης Knoevenagel.	74
Σχήμα 40: Πρώτη συνθετική απόπειρα της αντίδρασης Knoevenagel. ¹⁵²	75
Σχήμα 41: Πρώτη επιτυχημένη απομόνωση του ακόρεστου προϊόντος της Knoevenagel. ¹⁵²	75
Σχήμα 42: Παραδείγματα αντίδρασης Knoevenagel σε διαφορετικά υποστρώματα και με διαφορετικές συνθήκες κατάλυσης.	76
Σχήμα 43: Γενική εικόνα του μηχανισμού της αντίδρασης Knoevenagel (χάριν ευκολίας παρουσιάζεται να καταλύεται από δευτεροταγή βάση).	77
Σχήμα 44: Αναλυτικός μηχανισμός της αντίδρασης καταλυόμενης από πιπεριδίνη.....	78
Σχήμα 45: Δυνατές στερεοχημικές καταστάσεις στο βήμα σχηματισμού του καρβανιόντος (η δεξιά είναι η προτιμητέα ενεργειακά).	79
Σχήμα 46: Παράγωγα του χρωμοφόρου της τελικής ένωσης 73ζ	79
Σχήμα 47: Εστερικά παράγωγα του χρωμοφόρου της τελικής ένωσης 73ε	80
Σχήμα 48: Πρώτη βιβλιογραφικά γνωστή εφαρμογή της Bucherer. ¹⁷⁹	80
Σχήμα 49: Αναλυτικός μηχανισμός της αντίδρασης Bucherer.	81
Σχήμα 50: i) Πιπεριδίνη, MeCN, θέρμανση, overnight, ii) SOCl ₂ , τολουόλιο, αναρροή, 4 ώρες ή (COCl) ₂ , διχλωρομεθάνιο, DMF (καταλυτικό), 0 °C σε rt, 2 ώρες, iii) Πυριδίνη, 0 °C σε rt, 1 ώρα, iv, v) 7 N NH ₃ σε MeOH, overnight, vi) AcOH 60%, θέρμανση, 2 ώρες, vii) AcOCl, διχλωρομεθάνιο, πυριδίνη, -80 °C, 3 ώρες.	82
Σχήμα 51: i) TMS-N ₃ , SnCl ₄ , διχλωρομεθάνιο, 2.5 ώρες, 0 °C σε rt (92%), ii) H ₂ , Pd/C, THF, 15', rt (ποσοτικά)	83
Σχήμα 52: i) MeONa/MeOH (καταλυτικό), MeOH, rt, 10' (ποσοτικά), ii) PhCH ₂ (OMe) ₂ , PTSA (καταλυτικό), DMF, rt σε 60 °C, overnight, (52%) iii) Ac ₂ O, πυριδίνη, 0 °C σε rt, 2 ώρες, (75%) iv) H ₂ , Pd/C, THF, 15', rt (ποσοτικά)	84
Σχήμα 53: i) Πιπεριδίνη, MeCN, θέρμανση, overnight (90%), ii) SOCl ₂ , τολουόλιο, αναρροή, 4 ώρες ή (COCl) ₂ , διχλωρομεθάνιο, DMF (καταλυτικό), 0 °C σε rt (ποσοτικά).	85
Σχήμα 54: i) Πυριδίνη, 0 °C σε rt, 1 ώρα, ii) 7 N NH ₃ σε MeOH, overnight (46%), iii) AcOH 60%, θέρμανση, 2 ώρες (75%), iv) AcOCl, διχλωρομεθάνιο, πυριδίνη, -80 °C, 3 ώρες (11%), v) MeOH, rt (ποσοτικά)	86

Σχήμα 55: i) 1) Br ₂ , AcOH, 2) Sn, HBr, θέρμανση, 3 ώρες (78%), ii) Na ₂ S ₂ O ₅ , Me ₂ NH, H ₂ O, 140 °C, 5 μέρες (66%), iii) 1) n-BuLi, THF, -80 °C 2) DMF, 2 ώρες (64%).....	87
Σχήμα 56: i) Πιπεριδίνη, MeCN, θέρμανση, overnight (90%), ii) (COCl) ₂ , διχλωρομεθάνιο, DMF (καταλυτικό), 0 °C σε rt, 2 ώρες (ποσοτικά), iii) Πυριδίνη, 0 °C σε rt, 1 ώρα (30% w/w σε ακάθαρτο προϊόν), iv) 7 N NH ₃ σε MeOH, overnight, 11% απόδοση 3 σταδίων (83β → 73ε).....	89
Σχήμα 57: i) (COCl) ₂ , διχλωρομεθάνιο, DMF (καταλυτικό), 0 °C σε rt, 30' (ποσοτικά), ii) 85α , διχλωρομεθάνιο, 0 °C σε rt, 30' (60%), iii) 69β , πιπεριδίνη, MeCN, θέρμανση, overnight (36%), iv) 7 N NH ₃ σε MeOH, overnight (ποσοτικά), v) 69β , πιπεριδίνη, MeOH, θέρμανση, overnight (68%)	90
Σχήμα 58: Γράφημα αύξησης φθορισμού του στροφέα RotA συναρτήσει του ιξώδους.	93
Σχήμα 59: Γράφημα αύξησης φθορισμού του στροφέα AcRotA συναρτήσει του ιξώδους.....	94
Σχήμα 60: Γράφημα αύξησης φθορισμού του στροφέα RotB συναρτήσει του ιξώδους.	99
Σχήμα 61: Γραφική αναπαράσταση ανασταλτικής ικανότητας του RotA	104

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Εγκεφαλική σάρωση με και χωρίς τη χρήση σκιαγραφικού υλικού. Στη δεξιά εικόνα φαίνεται ένας όγκος ο οποίος δε διακρινόταν χωρίς σκιαγραφικό. ⁵	24
Εικόνα 2: Θεραπεία κακοήθους σαρκώματος (T) με ανασταλτικό παράγοντα της κινάσης της τυροσίνης και απεικόνιση του όγκου με τεχνική FDG-PET/CT. Μετά από 4 εβδομάδες θεραπείας δε φαίνεται να προσλαμβάνεται FDG, η περίσσεια της οποίας συσσωρεύεται στα νεφρά (K) και απεκκρίνεται από την κύστη (B). ⁶	25
Εικόνα 3: (Αριστερά) Εικόνα σάρωσης CT. (Κέντρο) Εικόνα σάρωσης PET. (Δεξιά) Εικόνα σάρωσης CT-PET. ²	26
Εικόνα 4: Απλουστευμένο διάγραμμα Jablonski. ⁷	27
Εικόνα 5: «Οπτικό παράθυρο» NIR όπου οι απορροφήσεις αιμοσφαιρίνης, οξυαιμοσφαιρίνης και νερού παρουσιάζουν ελάχιστο. ⁹	29
Εικόνα 6: Διάγραμμα Jablonski για τη διέγερση με ένα (a) και δύο (b) φωτόνια. ¹¹	30
Εικόνα 7: Συνδυασμός γονιδιακής θεραπείας με οπτική απεικόνιση. Φαίνεται ένα πλασμίδιο το οποίο περιέχει το γονίδιο της GFP και ένα θεραπευτικό γονίδιο. Επιτυχής εισαγωγή του πλασμιδίου στο κύτταρο οδηγεί στην έκφραση της Tx και της GFP και παρατήρηση του φθορισμού της τελευταίας. ¹³	31
Εικόνα 8: Α) Διάγραμμα Jablonski για ΜΣ με ακτινοβολούσα κατάσταση TICT. Β) Διάγραμμα Jablonski για ΜΣ με μη-ακτινοβολούσα κατάσταση TICT. ⁵⁰ (LE=locally excited, τοπική διεγερμένη)	49
Εικόνα 9: Ενεργειακή επιφάνεια ενός ΜΣ. Οι τιμές φ_0 και φ_1 είναι περίπου 0 και 90°. Οι τιμές k_x ($x=a,d,f,f'$) αποτελούν τις σταθερές ταχύτητας για τις αντίστοιχες μετατροπές. ⁴⁹	50
Εικόνα 10: Ενεργειακά διαγράμματα για δύο διαφορετικούς τύπους στροφών. Ο τρόπος αποδιέγερσης από την TICT κατάσταση ρυθμίζεται από τη διαφορά στη διεγερμένη και τη θεμελιώδη κατάσταση. ⁵⁶	51
Εικόνα 11: Μεταβολή του φθορισμού του αναστολέα GLAC σε περιβάλλον αυξανόμενης συγκέντρωσης GP (τα βέλη υποδεικνύουν την αύξηση συγκέντρωσης του ενζύμου).	70

Εικόνα 12: Φάσματα ^1H -NMR των ενώσεων 89β και 87β . Από την απορρόφηση στα 7.4 ppm είναι φανερό πως η βενζυλακετάλη είναι άθικτη μετά την υδρογόνωση.	84
Εικόνα 13: Φάσμα ESI-MS του προϊόντος 73η	87
Εικόνα 14: Φάσμα ^{13}C NMR σε CDCl_3 (α) της αντίδρασης παρουσία $(\text{COCl})_2$ και DMF και σύγκριση με αυτά των (β) χλωριδίου 96 και (γ) οξέος 76 . ¹⁹³	91
Εικόνα 15: Φάσμα απορρόφησης του RotA σε συγκεντρώσεις 1-75 μM και διαλύτη DMSO.....	92
Εικόνα 16: Φάσματα απορρόφησης/φθορισμού ($\lambda_{\text{exc}}=425 \text{ nm}$) του στροφέα RotA (τα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση αύξησης του ιξώδους).....	93
Εικόνα 17: Φάσματα απορρόφησης/φθορισμού ($\lambda_{\text{exc}}=430 \text{ nm}$) του στροφέα AcRotA (τα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση αύξησης του ιξώδους).....	94
Εικόνα 18: Φάσματα απορρόφησης/φθορισμού ($\lambda_{\text{exc}}=440 \text{ nm}$) του RotA σε διαλύματα RMGPb: RotA = 0 – 1.6 (τα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση αύξησης της αναλογίας)....	95
Εικόνα 19: Φάσματα απορρόφησης/φθορισμού ($\lambda_{\text{exc}}= 416 \text{ nm}$) του RotA σε διαλύματα RMGPb: RotA = 1.6 - 10 (τα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση αύξησης της αναλογίας). .	96
Εικόνα 20: Φάσματα απορρόφησης του RotA σε υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα με pH = 1.7 – 12.0.....	97
Εικόνα 21: Φάσματα απορρόφησης του στροφέα RotA παρουσία BSA σε ισότονο διάλυμα HBS χωρίς γλυκόζη.	97
Εικόνα 22: Φάσματα απορρόφησης του στροφέα RotA παρουσία HK-III σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=7.5.	98
Εικόνα 23: Φάσμα απορρόφησης του RotB σε συγκεντρώσεις 1-75 μM σε διαλύτη DMSO.....	99
Εικόνα 24: Φάσματα απορρόφησης/φθορισμού του RotB σε ιξώδη διαλύματα ($\lambda_{\text{exc}} = 451 \text{ nm}$).	99
Εικόνα 25: Φάσματα απορρόφησης του συμπλόκου RMGPb· RotB όπου παρατηρείται απώλεια της κορυφής του στροφέα.	100
Εικόνα 26: Φάσματα απορρόφησης του στροφέα RotB σε υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα με pH = 2.0-12.0.....	101

Εικόνα 27: Σύγκριση των φασμάτων απορρόφησης του RotB σε pH = 6.8 σε ρυθμιστικά διαλύματα BRB και assay buffer.....	101
Εικόνα 27: Φάσματα απορρόφησης/φθορισμού ($\lambda_{exc} = 432 \text{ nm}$) του συμπλόκου RMGPb· RotB (σε assay buffer απουσία βME και NaN ₃).	102
Εικόνα 28: Χάρτης διαφοράς ηλεκτρονικής πυκνότητας ($2F_o - F_c$) στο καταλυτικό κέντρο του συμπλόκου RMGPb· RotA	104
Εικόνα 30: A431 παρουσία RotA για 20 ώρες α) κάτω από λευκό φως, β) με φίλτρο EGFP και γ) ένθετη μεγέθυνση των νηματοειδών δομών.	106
Εικόνα 31: Πολυχρωματική απεικόνιση του βάθους του σήματος του στροφέα RotA	107
Εικόνα 32: A431 παρουσία RotA α) πριν και β) μετά τη μονιμοποίηση και πλύσιμο με Triton-X.....	107
Εικόνα 33: α) A431 παρουσία του εστέρα 90 για 24 ώρες στο μικροσκόπιο φθορισμού (φίλτρο EGFP) και β) πολυχρωματική απεικόνιση του βάθους του σήματος του εστέρα 90	108
Εικόνα 34: A431 παρουσία α) RotA , β) mAcRotA , γ) dAcRotA και δ) AcRotA (επώαση 24 ώρες, φίλτρο EGFP).....	110
Εικόνα 35: α, γ) A431 και β, δ) HEPG2 επωασμένα 48 ώρες παρουσία TG06 και TG07 αντίστοιχα.	112
Εικόνα 36: Z-σωρός κυττάρων HEPG2 παρουσία TG07 για 48 ώρες α) με φίλτρο EGFP και β) πολυχρωματική απεικόνιση του βάθους του σήματος.	112
Εικόνα 37: Κύτταρα A431 α) λευκό φως, β) Φίλτρο EGFP (πράσινο: pAbGPBB), γ) Φίλτρο DAPI (μπλε: DAPI) και δ) Συγχώνευση καναλιών EGFP και DAPI.	113
Εικόνα 38: Κύτταρα A431 κάτω από α) λευκό φως, β) φίλτρο EGFP (πράσινο: RotA που απελευθερώνεται από τα TG07), γ) φίλτρο mCherry (κόκκινο: pAbGPBB) και δ) συγχώνευση καναλιών EGFP και mCherry.	114
Εικόνα 39: Κύτταρα HEPG2 κάτω από α) λευκό φως, β) φίλτρο EGFP (πράσινο: RotA που απελευθερώνεται από τα TG07), γ) φίλτρο mCherry (κόκκινο: pAbGPBB) και δ) συγχώνευση καναλιών EGFP και mCherry.	115

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Μήκη κύματος απορρόφησης και φθορισμού των βασικότερων καρβοκυανινών.....	43
Πίνακας 2. Μοριακοί στροφείς που χρησιμοποιήθηκαν σε κυτταρικές μελέτες.....	103
Πίνακας 3: Τελικές συγκεντρώσεις του ενζύμου και του RotA	145
Πίνακας 4: Τελικές τιμές διαλυμάτων του RotA παρουσία RMGPb.....	146
Πίνακας 5: Τελικές τιμές διαλυμάτων του RotB παρουσία RMGPb.....	148
Πίνακας 6: Τελικές τιμές διαλυμάτων του RotB παρουσία RMGPb στο νέο ρυθμιστικό.	149

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

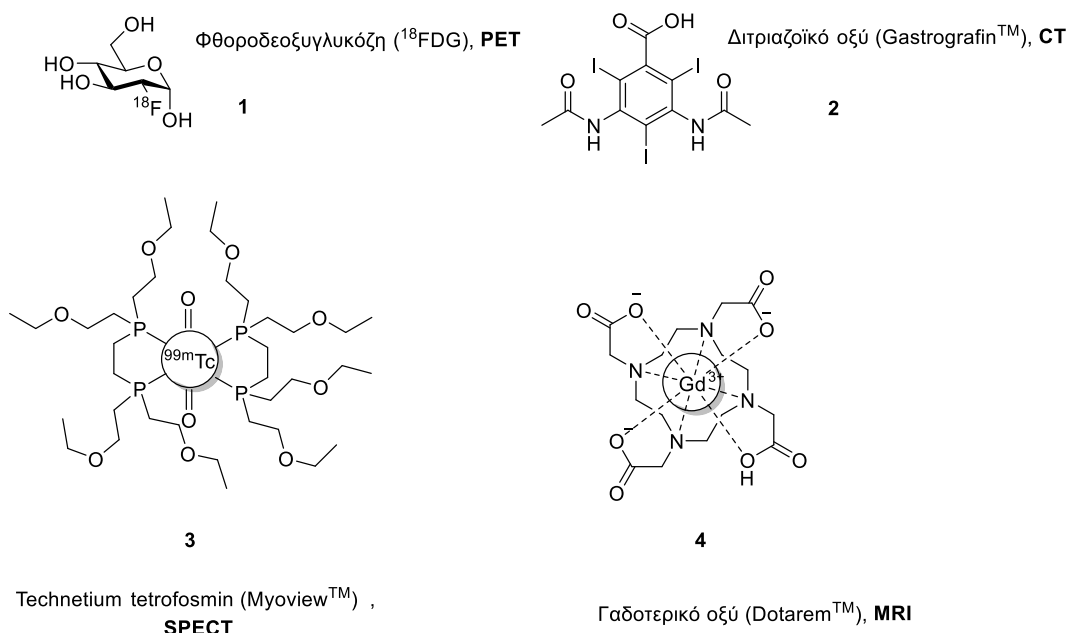
Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του καθηγητή Αθανάσιου Γκιμήση στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού προγράμματος «Οργανική Σύνθεση και Εφαρμογές στην Χημική Βιομηχανία». Η εργαστηριακή έρευνα ξεκίνησε τον Νοέμβριο του 2017 και ολοκληρώθηκε τον Οκτώβριο του 2019.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Τεχνικές μοριακής απεικόνισης

Στο σύγχρονο κόσμο είναι πλέον επιτακτική ανάγκη η χρήση τεχνικών οπτικοποίησης του εσωτερικού του ανθρώπινου σώματος με στόχο την έγκαιρη ανίχνευση και μελέτη περιοχών κλινικού ενδιαφέροντος. Ήδη από τα τέλη του 19^{ου} αιώνα μέχρι τις αρχές του 20^{ου} με την εμφάνιση τόσο των ακτινών-Χ όσο και των πρώτων ραδιοϊσοτόπων, είχαν τεθεί οι βάσεις για την ανάπτυξη ενός νέου τομέα. Ο τομέας της μοριακής απεικόνισης (molecular imaging-M.A), όπως άλλωστε προκύπτει και από το όνομά του, είναι το πεδίο που βρίσκεται στη διασταύρωση μεταξύ της μοριακής βιολογίας και των παραδοσιακών μεθόδων ιατρικής απεικόνισης.¹ Ο στόχος της M.A είναι η ανίχνευση συγκεκριμένων μοριακών στόχων και η παρακολούθηση βιολογικών διεργασιών σε κύτταρα, ιστούς και ζωτικά όργανα με μη επεμβατικό τρόπο και χωρίς να διαταράσσεται ο ίδιος ο οργανισμός.² Η συλλογή μοριακής φύσης πληροφορίας απαιτεί τη χρήση μορίων ιχνηθετών τα οποία δημιουργούν την αντίθεση στην εικόνα που λαμβάνεται και παρουσιάζουν υψηλή εκλεκτικότητα για τις περιοχές ενδιαφέροντος, σκιαγραφώντας πιθανές ανωμαλίες. Τέτοια μόρια ονομάζονται σκιαγραφικές ουσίες (ή σκιαγραφικές ενώσεις/υλικά-contrast agents) και ως αντίθεση σε μια εικόνα ορίζεται η διαφορά της έντασης του σήματος μεταξύ του υψηλότερου και του χαμηλότερου σημείου.³ Εκτός των μοριακών ιχνηθετών, χρειάζονται τρόποι ενίσχυσης του σήματος και σύγχρονα συστήματα με υψηλή ευαισθησία, ικανά να παραγάγουν εικόνες υψηλής ανάλυσης.

Σε μια περίοδο 40 περίπου χρόνων (1940-1980) αναπτύχθηκαν οι βασικότερες σύγχρονες μέθοδοι απεικόνισης όπως οι υπέρηχοι, οι μέθοδοι που στηρίζονται στον πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό (NMR και MRI), η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET), η πιο πρόσφατη αξονική τομογραφία (CT-CAT) και η υπολογιστική τομογραφία εκπομπής ενός φωτονίου (SPECT).² Άξια αναφοράς είναι τα βήματα που έχουν γίνει ώστε να η διάγνωση να ξεπεράσει το στάδιο όπου ασθένειες ή επιδράσεις φαρμάκων παρατηρούνται μόνο όταν εμφανιστούν ανατομικές ανωμαλίες. Πλέον, με εικόνες υψηλής ανάλυσης αλλά και την έλευση των μοριακών ιχνηθετών, μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για τη φυσιολογία του σώματος σε πραγματικό χρόνο. Στο παρακάτω **Σχήμα 1** φαίνονται μερικές από τις σκιαγραφικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται ως και σήμερα στις παραπάνω τεχνικές απεικόνισης:

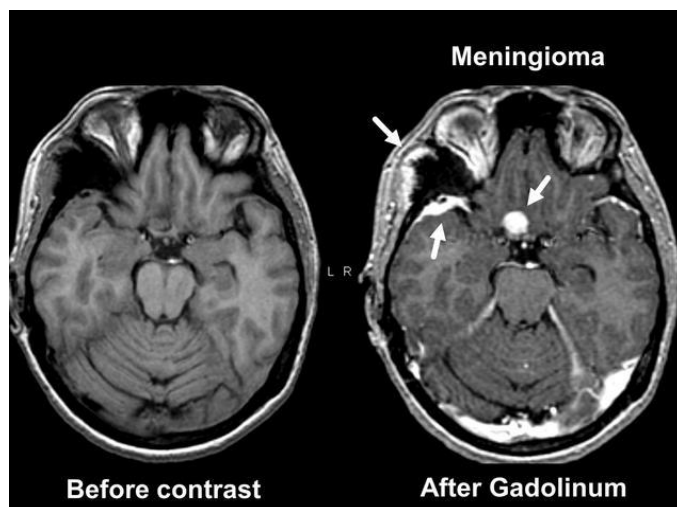


Σχήμα 1: Σκιαγραφικές ουσίες που έχουν χρησιμοποιηθεί στις κυριότερες τεχνικές μοριακής απεικόνισης (αναγράφονται τα εμπειρικά και τα εμπορικά ονόματα των ιχνηθετών καθώς και το ακρωνύμιο της τεχνικής).²

Τέλος, υπάρχει επιτέλους η δυνατότητα να παρατηρηθεί ένα μόριο που προσδένεται σε ένα στόχο ή ακόμα και ο ίδιος ο στόχος όπως επίσης και να παρακολουθηθούν οι φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητες μιας βιοδραστικής ένωσης. «Φανταστείτε να βλέπετε έναν συγκεκριμένο μοριακό στόχο σε ένα ζωντανό ζώο, να παρακολουθείτε στο ίδιο ζώο την διανομή ενός φαρμάκου και να ποσοτικοποιείτε την άμεση επίδραση αυτού στο στόχο, μέσα σε λίγα λεπτά».⁴ Με βάση όσα προαναφέρθηκαν, η παραπάνω πρόβλεψη των Rudin και Weissleder, δεν ανήκει πλέον στη σφαίρα της φαντασίας.

Η τεχνική MRI σκιαγραφεί τη χωρική κατανομή των μορίων νερού στο σώμα με βάση την ένταση του σήματος που προέρχεται από τους πυρήνες υδρογόνου, οι οποίοι αποδιεγείρονται μετά από διέγερση με κάποια ραδιοσυχνότητα. Χρησιμοποιείται κυρίως για διάγνωση μυοσκελετικών και σπλαχνικών ασθενειών, όπως καρδιοπαθειών αλλά και για τη μελέτη παθήσεων που σχετίζονται με το ΚΝΣ. Είναι από τις καλύτερες μεθόδους στο να παρέχουν ανατομικής φύσης λεπτομέρειες καθότι οι εικόνες της χαρακτηρίζονται από υψηλή ανάλυση και εξαιρετική αντίθεση μεταξύ των ιστών. Ωστόσο υστερεί σε ευαισθησία σήματος σε σχέση με τις ραδιολογικές μεθόδους λόγω του μικρού αριθμού πυρήνων που καταφέρνουν να διεγερθούν. Αυτό διορθώνεται σε ένα βαθμό με τη χρήση μορίων όπως της ένωσης **4** η οποία φέρει παραμαγνητικό

μεταλλικό ιόν και μεταβάλλει τις ιδιότητες των ιστού στον οποίο συγκεντρώνεται, αλλάζοντας τους χρόνους μαγνητικής χαλάρωσης των πυρήνων. Στην **Εικόνα 1** φαίνεται το πόσο σημαντικός είναι ένας ιχνηθέτης στην απεικόνιση ανωμαλιών:



Εικόνα 1: Εγκεφαλική σάρωση με και χωρίς τη χρήση σκιαγραφικού υλικού. Στη δεξιά εικόνα φαίνεται ένας όγκος ο οποίος δε διακρινόταν χωρίς σκιαγραφικό.⁵

Η τομογραφία PET βασίζεται στην ανίχνευση ακτινοβολίας γ η οποία έχει παραχθεί από αλληλεπίδραση ύλης (εν προκειμένω των ιστών) με εκπεμπόμενα ποζιτρόνια από ασταθή ραδιονουκλίδια που υφίστανται β-αποσύνθεση. Παρότι ανήκει στις πιο ευαίσθητες, δημοφιλείς και αξιόπιστες τεχνικές σε κλινικό και προκλινικό επίπεδο, περιορίζεται από τη χαμηλή ανάλυση στις εικόνες της και από τη χρήση μόνο ενός ραδιοϊσοτοπικά επισημασμένου μορίου. Αυτό συμβαίνει διότι ο μηχανισμός αποσύνθεσης είναι ίδιος για όλα τα ραδιονουκλίδια επομένως δεν υπάρχει η δυνατότητα διαφοροποίησης των ιστών. Χρησιμοποιείται κυρίως στην ογκολογία καθότι η ύπαρξη ενός όγκου συνεπάγεται αυξημένο αριθμό κυττάρων σε ένα σημείο επομένως και ένα ισχυρό σήμα ακτινοβολίας και δίνει τη δυνατότητα εντοπισμού ενός όγκου σε πρώιμο επίπεδο. Στην παρακάτω **Εικόνα 2** φαίνεται μια εφαρμογή της απεικόνισης με χρήση της ένωσης **1**. Η άλλη ραδιολογική μέθοδος (SPECT) διαφοροποιείται σημαντικά διότι η ανιχνευόμενη ακτινοβολία γ εκπέμπεται απευθείας από ένα επίσης επισημασμένο με μετασταθή ραδιενεργό πυρήνα ^{99m}Tc , όπως την ένωση **3**. Ένα βασικό πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η βελτιωμένη αντίθεση μεταξύ διαφορετικών λειτουργικά περιοχών με αποτέλεσμα τον ευκολότερο εντοπισμό ανωμαλιών.

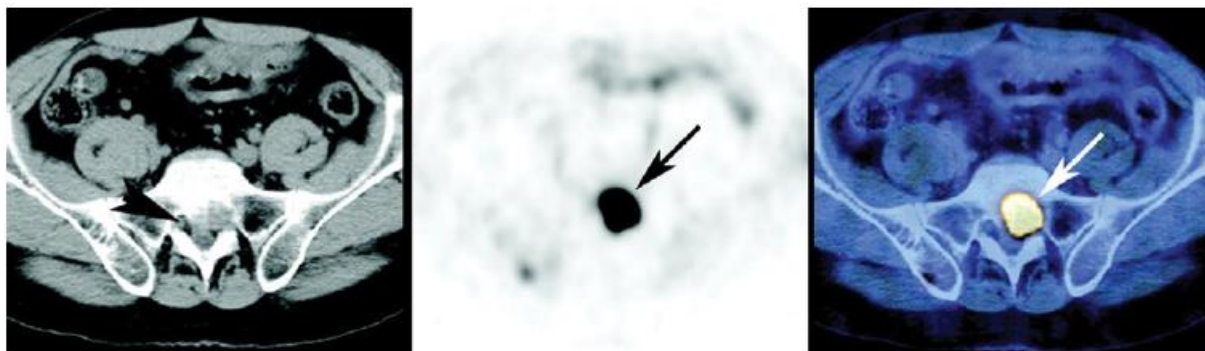


Εικόνα 2: Θεραπεία κακοήθους σαρκώματος (Τ) με ανασταλτικό παράγοντα της κινάσης της τυροσίνης και απεικόνιση του όγκου με τεχνική FDG-PET/CT. Μετά από 4 εβδομάδες θεραπείας δε φαίνεται να προσλαμβάνεται FDG, η περίσσεια της οποίας συσσωρεύεται στα νεφρά (Κ) και απεκκρίνεται από την κύστη (Β).⁶

Επιπρόσθετα, είναι περισσότερο προσβάσιμη σε σχέση με την PET λόγω των μεγαλύτερων χρόνων ημιζωής των ραδιοϊσοτόπων και λόγω της δυνατότητας χρήσης περισσότερων από ένα για εντοπισμό ακτινοβολίας από διαφορετικές περιοχές. Το κυριότερο μειονέκτημά της είναι οι μεγάλοι χρόνοι ανάλυσης που ενδεχομένως να προκαλέσουν δυσφορία στον ασθενή αλλά και η εύκολη παραγωγή σφάλματος από παράγοντες όπως κίνηση του ασθενούς. Αξίζει βέβαια να σημειωθεί πως οι ραδιολογικές μέθοδοι χρησιμοποιούν αρκετά μικρές ποσότητες ιχνηθετών, της τάξης των μερικών nM σε αντίθεση με τις τομογραφίες όπου οι συγκεντρώσεις κυμαίνονται στα mM. Τέλος, η αξονική τομογραφία CT που αποτελεί μια από τις δημοφιλέστερες μεθόδους χαρακτηρίζεται από ταχύτητα και υψηλή ανάλυση στις εικόνες της όμως είναι μια χρονοβόρα διαδικασία που πολλές φορές, αν χρειαστεί να επαναληφθεί, ο ασθενής δέχεται ένα σημαντικό ποσό ακτινοβολίας. Βρίσκει εφαρμογή κυρίως στη μελέτη σκελετικών και πνευμονικών παθήσεων ενώ συχνά χρησιμοποιείται τόσο για την επιβεβαίωση κάποιου κακοήθους όγκου όσο και για παροχή πληροφορίας αναφορικά με το μέγεθος και την τοποθεσία του.^{2,4} Μία ένωση που έχει χρησιμοποιηθεί αρκετά είναι η **2** η οποία περιέχει άτομα ιωδίου τα οποία μπλοκάρουν τις ακτίνες Χ και δημιουργούν έτσι την αντίθεση στην εικόνα.

Καθεμία από τις παραπάνω μεθόδους εμφανίζει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα όμως πλέον, όλες δένουν αρμονικά και πολλές φορές συνδυάζονται για να παραγάγουν την ολοκληρωμένη εικόνα μιας διάγνωσης. Για παράδειγμα, στην

παρακάτω **Εικόνα 3** φαίνεται πως οι τεχνικές CT και PET αλληλοσυμπληρώνονται παρέχοντας τη μέγιστη πληροφορία. Είναι φανερό όμως, πως χρειάζεται ένας πιο απλός τρόπος απεικόνισης ο οποίος θα παρέχει αναλυτικά αποτελέσματα γρήγορα και σε πραγματικό χρόνο. Για αυτό το λόγο έχει αναπτυχθεί αρκετά τις τελευταίες δεκαετίες το παρακλάδι των τεχνικών μοριακής απεικόνισης, οι μέθοδοι οπτικής απεικόνισης.



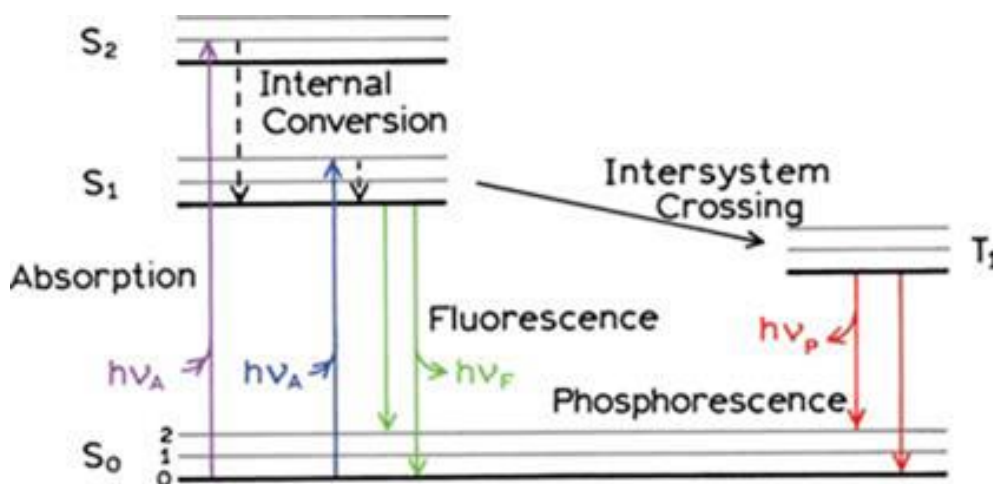
Εικόνα 3: (Αριστερά) Εικόνα σάρωσης CT. (Κέντρο) Εικόνα σάρωσης PET. (Δεξιά) Εικόνα σάρωσης CT-PET.²

1.2 Οπτική Απεικόνιση

Πολύ πριν τις σύγχρονες ανακαλύψεις, η οπτική παρατήρηση του ασθενούς ήταν ο κυριότερος τρόπος για μια διάγνωση. Η εφεύρεση του μικροσκοπίου πριν από περίπου 4 αιώνες συνέβαλλε δραματικά στην εξέλιξη της βιολογίας και των επιστημών ζωής και άλλαξε αυτά τα δεδομένα. Η οπτική μικροσκοπία αποτελεί θεμελιώδες εργαλείο για βιολογικής φύσης ανακαλύψεις για περισσότερο από 3 αιώνες. Με την έλευση του μικροσκοπίου φθορισμού στις αρχές του 20^{ου} αιώνα και την ανακάλυψη πολλών μορίων που δρουν ως φωτοβόλες χρωστικές (luminescent dyes), οι οπτικές τεχνικές έχουν εμφανιστεί ξανά στο προσκήνιο τα τελευταία 40 χρόνια. Οι μέθοδοι οπτικής απεικόνισης (Ο.Α) αξιοποιούν τις ιδιότητες του φωτός (περιοχές UV-Vis και NIR του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος) όπως την απορρόφηση, τη σκέδαση, την ανάκλαση, την πόλωση και τη φωταύγεια για να παράγουν την αντίθεση στις εικόνες.² Εφαρμόζονται κυρίως *in vitro* με ένα σημαντικό ποσοστό *ex vivo* / *in vivo* δοκιμών σε ιστούς και ζωντανά ζώα ενώ κάποιες λίγες εφαρμογές υπάρχουν και για τους ανθρώπους. Με φωτοβόληση των ιστών μπορούν να ληφθούν πληροφορίες σχετικά με τη δομή, τη σύστασή τους αλλά και την παθοφυσιολογική τους κατάσταση όμως λόγω των ασθενών σημάτων που λαμβάνονται, χρησιμοποιούνται χρωστικές ως ιχνηθέτες για

βελτίωση της αντίθεσης.³ Οι κυριότερες ιδιότητες που αξιοποιούνται είναι η απορρόφηση και η φωταύγεια, είτε με τη μορφή φθορισμού είτε ως βιοφωταύγεια.

Η ιδιότητα του φθορισμού συναντάται σε αρκετά μόρια όπως πολυαρωματικούς υδρογονάνθρακες ή ετεροκυκλικά συστήματα που ονομάζονται φθορισμοφόρα (fluorophores). Όταν αυτά διεγερθούν με απορρόφηση φωτός σε ένα μήκος κύματος, μπορούν να αποδιεγερθούν είτε μέσω θερμικής απώλειας της ενέργειας λόγω δονητικών μεταπτώσεων είτε μέσω μερικής απώλειας ενέργειας με τον ίδιο τρόπο και εκπομπή της υπολειπόμενης ως φθορισμό. Στο παρακάτω απλουστευμένο διάγραμμα Jablonski (**Εικόνα 4**) φαίνονται τα θεμελιώδη χαρακτηριστικά μιας ηλεκτρονιακής μετάπτωσης που οδηγεί σε φθορισμό. Το μόριο μεταβαίνει από τη θεμελιώδη κατάσταση (S_0) στην 1^η διεγερμένη κατάσταση (S_1) και στη συνέχεια, αφού απωλέσει ένα ποσό ενέργειας λόγω δονητικών μεταπτώσεων, επιστρέφει την υπολειπόμενη ενέργεια ως φθορίζουσα ακτινοβολία.

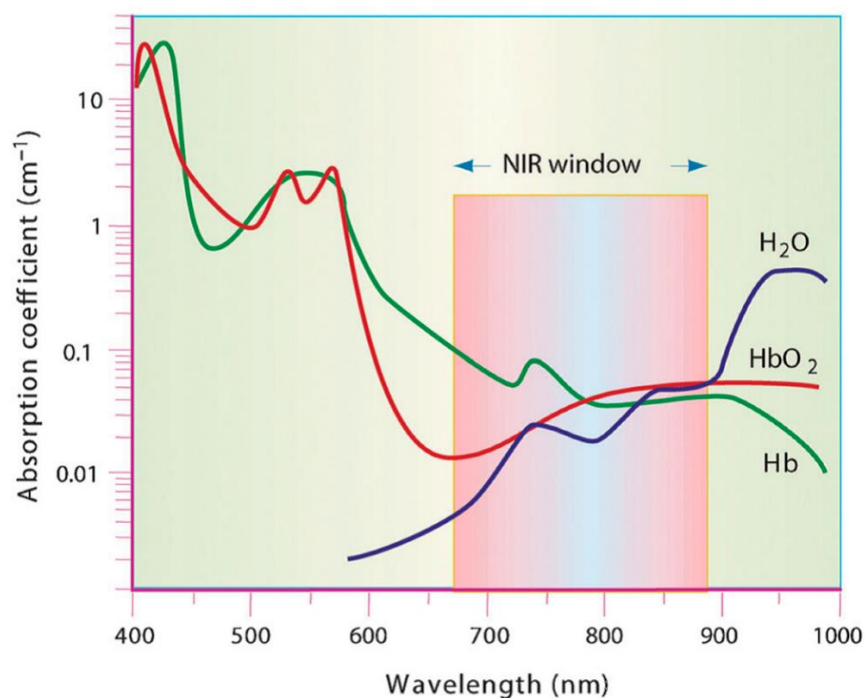


Εικόνα 4: Απλουστευμένο διάγραμμα Jablonski.⁷

Η ιδιότητα της βιοφωταύγειας χαρακτηρίζεται από παραγωγή ακτινοβολίας ως παραπροϊόν μιας ενζυμικής αντίδρασης με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα την οξείδωση της λουσιφερίνης από τη λουσιφεράση.⁸ Η λουσιφεράση της πυγολαμπίδας *Photinus pyralis* είναι η πιο γνωστή εκδοχή του ενζύμου που χρησιμοποιείται στη μοριακή απεικόνιση. Υπάρχουν αρκετά διαφορετικά ένζυμα λουσιφεράσης τα οποία, με τα αντίστοιχα υποστρώματά τους, παράγουν ακτινοβολία σε διαφορετικά μήκη κύματος. Το γεγονός αυτό επιτρέπει την σύγχρονη παρατήρηση δύο ή περισσότερων βιολογικών διεργασιών *in vivo*, με χρήση των κατάλληλων φίλτρων. Η βιοφωταύγεια συνήθως χρησιμοποιείται στη μελέτη μηχανισμών για διάφορες νόσους αλλά και στην επιτάχυνση της ανάπτυξης φαρμάκων σε προκλινικό επίπεδο.

Καθώς φωτοβολείται ένας ιστός, τα φωτόνια δεν ταξιδεύουν όλα κατά τον ίδιο τρόπο λόγω διαφορετικής, εξαρτώμενης από το μήκος κύματος σκέδασης. Με μαθηματική επεξεργασία είναι εφικτό να υπολογιστούν τα μονοπάτια κίνησης των φωτονίων, δίνοντας έτσι μια εικόνα του περιεχομένου του ιστού. Υπάρχει επίσης ένας αριθμός ενδογενών χρωμοφόρων όπως πορφυρίνες, μελανίνες, μυοσφαιρίνη, οξυαιμοσφαιρίνη και δεοξυαιμοσφαιρίνη, μόρια του κυτταρικού μεταβολισμού (NADH, NADPH και φλαβίνες) αλλά και συστατικά του ιστού (κολλαγόνο ή λιπαρές χρωστικές) τα οποία απορροφούν το φως και παρουσιάζουν φάσματα φθορισμού σε μια περιοχή που εκτείνεται από το ορατό έως και το εγγύς υπέρυθρο. Αυτός ο παραγόμενος φθορισμός ονομάζεται αυτοφθορισμός του ιστού και μπορεί να παρέχει πληροφορίες για την παθοφυσιολογική κατάστασή του. Ο μαθηματικός συνδυασμός των φαινόμενων σκέδασης αλλά και του αυτοφθορισμού του ιστού μπορούν να παραγάγουν έναν «χάρτη» των οπτικών ιδιοτήτων του.³

Αν και ο αυτοφθορισμός ενός ιστού παρέχει χρήσιμες πληροφορίες, οι εικόνες που λαμβάνονται παρουσιάζουν χαμηλό σήμα εξαιτίας του κακού λόγου ΣΠΥ (σήμα προς υπόβαθρο). Αυτό το ζήτημα επιλύεται είτε φωτοβολώντας με φως στην περιοχή του εγγύς υπέρυθρου (NIR), είτε χρησιμοποιώντας σκιαγραφικές ουσίες ως φορείς αντίθεσης είτε ακόμη συνδυάζοντας τις δυο στρατηγικές. Το NIR φως πλεονεκτεί έναντι αυτού της περιοχής UV-Vis διότι οι απορροφήσεις των ενδογενών χρωμοφόρων, συγκεκριμένα των αιμοσφαιρινών, αλλά και του νερού, παρουσιάζουν ελάχιστο στην περιοχή αυτή ενώ επίσης λόγω μεγαλύτερων μηκών κύματος, η σκέδαση είναι μειωμένη.³ Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 5**, η περιοχή αυτή βρίσκεται μεταξύ 700 και 900 nm και συχνά αποκαλείται «οπτικό παράθυρο». Ακόμη, σε σύγκριση με την UV-Vis ακτινοβολία η οποία έχει βάθος διείσδυσης μερικά χιλιοστά, οδηγώντας σε απορρόφηση μόνο από την επιφάνεια του ιστού, η NIR επιτρέπει την παρατήρηση βαθύτερα στον ιστό, μέχρι μερικά εκατοστά. Επιπρόσθετα, αν και η ακτινοβολία που χρησιμοποιείται στην Ο.Α. είναι αβλαβής, σε σχέση για παράδειγμα με τις ακτίνες γ των ραδιολογικών μεθόδων, το φως στην περιοχή NIR είναι πιο συμβατό με τις *in vivo* μελέτες λόγω χαμηλότερης ενέργειας και μειωμένης φωτολεύκανσης (photobleaching).



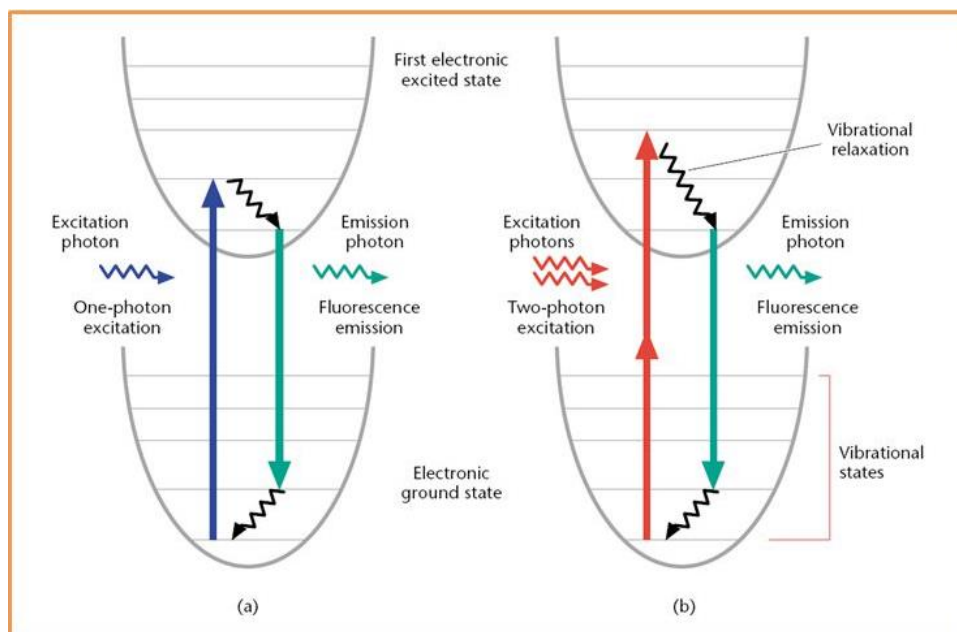
Εικόνα 5: «Οπτικό παράθυρο» NIR όπου οι απορροφήσεις αιμοσφαιρίνης, οξυαιμοσφαιρίνης και νερού παρουσιάζουν ελάχιστο.⁹

Η χρήση ενός ιχνηθέτη μπορεί να επηρεάσει τις ιδιότητες απορρόφησης και φθορισμού του περιβάλλοντος ιστού και να αυξήσει την αντίθεση της εικόνας, βελτιώνοντας έτσι την ποιότητά της. Αν ο ιχνηθέτης απορροφά στην περιοχή NIR, ο λόγος ΣΠΥ θα είναι εξαιρετικά καλός καθότι ο αυτοφθορισμός του ιστού είναι μειωμένος. Συμπερασματικά, παρότι οι ενδογενείς οπτικές ιδιότητες ενός ιστού παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για τη δομή του, η ανίχνευση κάποιας ασθένειας, απαιτεί τη χρήση μοριακών ιχνηθετών. Μεταβάλλοντας το περιβάλλον ενός νοσούντος ιστού, αλλάζουν οι οπτικές ιδιότητές του και μπορεί να διαφοροποιηθεί από έναν υγιή ιστό.

Από τη γέννηση του μικροσκοπίου φθορισμού το 1904, με την ανακάλυψη του συνεστιακού μικροσκοπίου laser (Laser Scanning Confocal Microscope-LSCM) τη δεκαετία του 1970-1980 και την έλευση της μικροσκοπίας δύο ή πολλαπλών φωτονίων το 1990, τοποθετήθηκαν γερά θεμέλια στην εξέλιξη της τεχνολογίας της Ο.Α. Η LSCM αποτελεί μια βελτιστοποίηση του κλασικού φωτονικού μικροσκοπίου ευρέως πεδίου. Στηρίζεται στην ακτινοβολήση του δείγματος μόνο σε ένα σημείο, αντί σε όλη την έκτασή του όπως στο φωτονικό μικροσκόπιο και στη συλλογή ακτινοβολίας φθορισμού μόνο από το επίπεδο εστίασης μέσω μιας οπής (pinhole). Η διέγερση πραγματοποιείται με ακτίνα laser αντί περάσματος του λευκού φωτός μέσω κατάλληλου φίλτρου. Το αποτέλεσμα είναι πως ο συνδυασμός laser και απαλοιφής της ακτινοβολίας εκτός

εστιακού επιπέδου, οδηγούν σε εικόνες υψηλότερης ανάλυσης με καλύτερο λόγο ΣΠΥ.² Επιπρόσθετα, η οπή μπορεί να μετακινηθεί δίνοντας τη δυνατότητα λήψης εικόνας από διαφορετικές τομές του δείγματος ούτως ώστε η επανένωσή τους ως προς τον άξονα Z να παραγάγει μια τρισδιάστατη εικόνα.

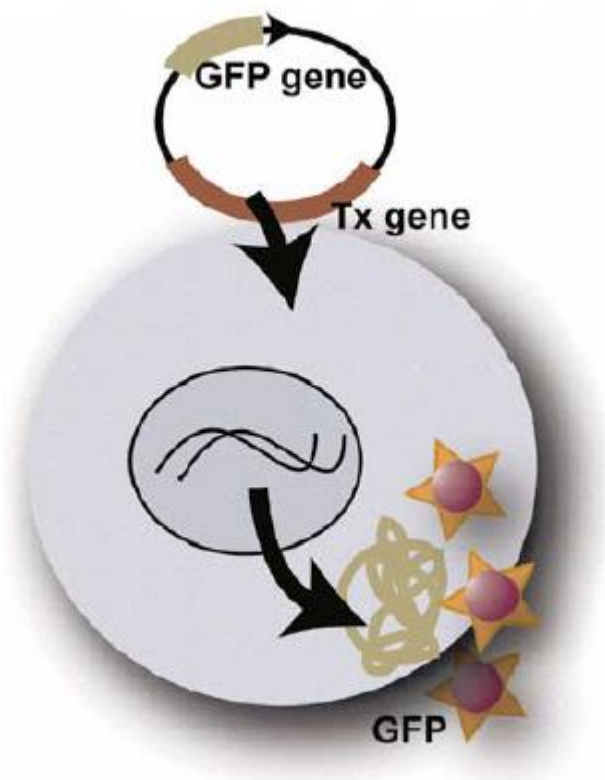
Η μικροσκοπία δύο ή πολλαπλών φωτονίων, εφευρέθηκε από τον Denk το 1990 (Two-Photon Microscopy-TPM και Multi-Photon Microscopy-MPM αντίστοιχα) και έφερε μια επανάσταση στην τρισδιάστατη εικόνα μικροσκοπίου.¹⁰ Αν ένα φθορισμοφόρο διεγερθεί από ένα φωτόνιο ενέργειας E και μήκους κύματος λ και αποδιεγειρόμενο παράγει φθορισμό, τότε η διέγερσή του με δύο φωτόνια ενέργειας περίπου $E/2$ και μήκους κύματος 2λ που εκπέμπονται σχεδόν ταυτόχρονα, μπορεί να οδηγήσει στο ίδιο αποτέλεσμα (**Εικόνα 6**). Αυτή είναι και η αρχή λειτουργίας της TPM και για να είναι επιτυχής απαιτούνται δύο συνθήκες: να χρησιμοποιηθεί αρκετά ισχυρό laser καθώς η πιθανότητα διέγερσης του ίδιου μορίου από δύο συνεχόμενα φωτόνια είναι τετραγωνική συνάρτηση της ισχύος του laser και το άθροισμα των ενεργειών των δύο φωτονίων να είναι λίγο μεγαλύτερο από την ενέργεια της επιθυμητής διεγερμένης κατάστασης. Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η χρήση NIR φωτονίων που είναι συμβατά με *in vivo* μελέτες λόγω χαμηλής, αβλαβούς ως προς τους ιστούς, ενέργειας και παρουσιάζουν χαμηλή σκέδαση επομένως και λίγες απώλειες κατά τη διαδρομή τους.¹¹



Εικόνα 6: Διάγραμμα Jablonski για τη διέγερση με ένα (a) και δύο (b) φωτόνια.¹¹

Η παρατήρηση βιολογικών συστημάτων μπορεί να γίνει με τη μέθοδο της φθορίζουσας σήμανσης (Φ.Σ/fluoro-tag method), είτε με άμεσο είτε με έμμεσο τρόπο.¹²

Ο έμμεσος τρόπος αναφέρεται στην εισαγωγή σε έναν οργανισμό ενός διαγονιδίου (transgene) του οποίου το μεταφραστικό περιεχόμενο είναι μία φθορίζουσα πρωτεΐνη (συνήθως η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη-GFP) ή κάποια εκδοχή της η οποία φθορίζει σε διαφορετικό μήκος κύματος. Για παράδειγμα, τα τελευταία χρόνια γίνονται προσπάθειες κλωνοποίησης γονιδίων που κωδικοποιούν την RFP, την αντίστοιχη NIR φθορίζουσα πρωτεΐνη. Όταν παραχθεί η πρωτεΐνη εντός του οργανισμού, μπορεί να ανιχνευτεί με φθορισμομετρικές μεθόδους. Αυτή η στρατηγική μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με τη μεταφορά εντός του κυττάρου όχι μόνο του γονιδίου που κωδικοποιεί την φθορίζουσα πρωτεΐνη αλλά και κάποιου γονιδίου το οποίο κωδικοποιεί θεραπευτική πρωτεΐνη (**Εικόνα 7**).¹³ Επομένως, μπορεί να φανεί μέσω φθορισμού αν η κατανομή του θεραπευτικού γονιδίου έχει γίνει επιτυχώς στα σημεία για τα οποία προορίζεται. Το θετικό αυτής της προσέγγισης είναι πως αποτελεί μια γενική μέθοδο όπου με λίγα μόνο φθορισμοφόρα, μπορούν να παρατηρηθούν πολλές διαφορετικές βιολογικές διεργασίες. Βέβαια, υστερεί στο ότι η εφαρμογή της περιορίζεται στη χρήση μόνο σε ζώα και ότι τέτοιες γενετικές τεχνικές είναι δαπανηρές και απαιτούν εκτεταμένη τεχνογνωσία.



Εικόνα 7: Συνδυασμός γονιδιακής θεραπείας με οπτική απεικόνιση. Φαίνεται ένα πλασμίδιο το οποίο περιέχει το γονίδιο της GFP και ένα θεραπευτικό γονίδιο. Επιτυχής εισαγωγή του πλασμιδίου στο κύτταρο οδηγεί στην έκφραση της Tx και της GFP και παρατήρηση του φθορισμού της τελευταίας.¹³

Ο άμεσος τρόπος αναφέρεται στη χρήση φθορισμοφόρων, ενεργών (active) και ενεργοποιούμενων (activatable). Τα ενεργά φθορισμοφόρα φθορίζουν σε όλες τις συνθήκες και προσδένονται μη-ειδικά στο μόριο στόχο είτε μέσω ομοιοπολικού δεσμού με κάποια δραστική ομάδα, όπως χλωρίδια, ισοθειοκυανικούς εστέρες ή σουκινιμίδια, η οποία θα αντιδράσει με αμινομάδες ή θειολομάδες ενδογενών καταλοίπων είτε μέσω αναγνώρισης κάποιου βιομορίου (π.χ. ολιγοπεπτίδιο, αντίσωμα ή τμήμα αντισώματος), με το οποίο είναι ήδη συνδεδεμένο, από τον αντίστοιχο ενδογενή υποδοχέα. Όσον αφορά τα ενεργοποιούμενα φθορισμοφόρα, φθορίζουν μόνο όταν προσδεθούν με τον επιθυμητό στόχο μέσω κάποιου σημείου αναγνώρισης που διαθέτουν. Αυτό συμβαίνει διότι ο φθορισμός τους είτε έχει υποστεί απόσβεση (quenching) λόγω μεταφοράς ενέργειας μέσω συντονισμού κατά Förster (Förster Resonance Energy Transfer-FRET) λόγω χωρικής εγγύτητας με ένα άλλο φθορισμοφόρο είτε λόγω του ότι απαιτείται κάποια χημική ή διαμορφωτική τροποποίησή τους ώστε να παραγάγουν φως.²

Ο μηχανισμός FRET βασίζεται στην αλληλεπικάλυψη των φασμάτων διέγερσης και φθορισμού δύο χρωμοφόρων τα οποία, εφόσον βρίσκονται σε χωρική εγγύτητα (10-100 Å), μεταφέρουν ενέργεια το ένα (δότης) στο άλλο (δέκτης) μέσω επικοινωνίας των διπολικών ροπών τους, με αποτέλεσμα την απόσβεση του φθορισμού τους.⁷ Η σύνδεση δύο φθορισμοφόρων συνήθως γίνεται μέσω αδρανούς πεπτιδικής φύσης σκελετού ο οποίος, όταν διασπαστεί ενζυμικά, απελευθερώνει τα μόρια και επαναφέρει το φθορισμό τους. Στην τελευταία περίπτωση τα μόρια ονομάζονται «μοριακοί φάροι ή διακόπτες» (molecular beacons-switches), μια ιδέα που εισήχθη στη βιβλιογραφία από τον Weissleder και τους συνεργάτες του.¹⁴ Είναι φανερό πως τα ενεργοποιούμενα φθορισμοφόρα υπερέχουν έναντι των ενεργών διότι παρέχουν έναν εμφανώς υψηλότερο λόγο ΣΠΥ καθότι δεν φθορίζουν μέχρι να δεσμευτούν στο στόχο τους. Φυσικά τα ενεργά φθορισμοφόρα είναι πιο γενικής φύσης με μεγαλύτερο εύρος εφαρμογών και μπορούν να πετύχουν αντίστοιχο αποτέλεσμα εφόσον περάσει αρκετή ώρα από τη χορήγησή τους μέχρι να παρατηρηθούν, ώστε η περίσσεια μη δεσμευμένων μορίων να έχει απομακρυνθεί από την κυκλοφορία του αίματος.

Στο κομμάτι της ανάπτυξης φαρμάκων γίνεται ιδιαίτερη μνεία στις οπτικές τεχνικές απεικόνισης. Αρχικά, πρόκειται για μη επεμβατικό, φτηνό, γρήγορο και άμεσο τρόπο παρατήρησης σε μοριακή κλίμακα. Η κατανόηση διεργασιών παθολογικής φύσης γίνεται πιο εφικτή και οδηγεί στη μείωση του χρόνου ανάπτυξης και στην βελτίωση της αξιολόγησης της αποτελεσματικότητας και ασφάλειας ενός φαρμάκου. Ακόμη, κάτι που

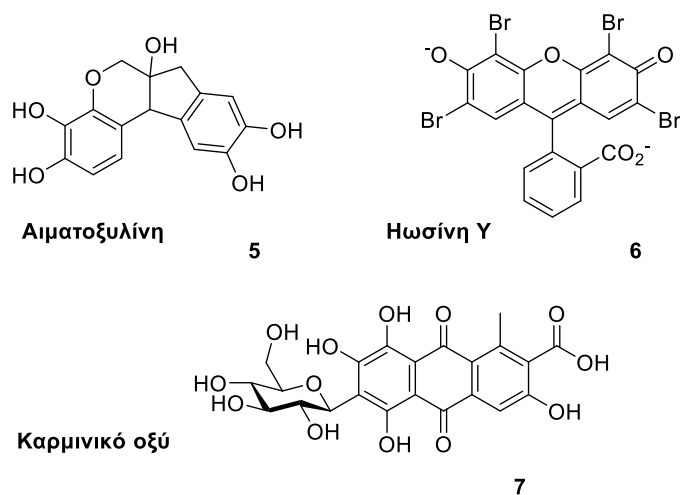
ίσως να μην είναι εύκολα αντιληπτό, είναι και η μείωση των πειραματόζων καθώς λόγω της φύσης της μεθόδου, πολλές δοκιμές μπορούν να γίνουν στο ίδιο ζώο.¹⁵

Γενικά, οι μέθοδοι οπτικής απεικόνισης υπερέχουν σε πλεονεκτήματα από τις συμβατικές μεθόδους που αναφέρθηκαν παραπάνω. Το βασικότερο μειονέκτημά τους είναι η χαμηλή ανάλυση εικόνας και η δυσκολία στην ποσοτικοποίηση του σήματος καθώς λόγω του μικρού βάθους διείσδυσης κατά την φωτοβόληση με φως στην περιοχή UV-Vis, οι απώλειες λόγω φαινομένων σκέδασης και απορρόφησης μειώνουν την ενέργεια που φτάνει στον ιχνηθέτη με αποτέλεσμα να είναι χαμηλός ο λόγος ΣΠΥ. Στα πλεονεκτήματα, αρχικά, η ακτινοβολία που χρησιμοποιείται είναι μη-ιονίζουσα επομένως λιγότερο βλαβερή και μπορεί να εφαρμοστεί επανειλημμένως για πολλές φορές στον ίδιο ασθενή. Επίσης, η ευαισθησία των μοριακών ανιχνευτών είναι συγκρίσιμη των ραδιολογικών αφού και στις δύο περιπτώσεις οι πηγές φωτονίων βρίσκονται μέσα στους ιστούς. Σε αντιπαράβολή με τις ραδιολογικές, οι οπτικές μέθοδοι δεν περιορίζονται από το χρόνο αποσύνθεσης των ραδιοϊσοτόπων. Τέλος, στην περίπτωση των ιχνηθετών που φωτοβολούνται στην περιοχή NIR, το σήμα τους ανιχνεύεται σχεδόν εκλεκτικά για τους λόγους που αναφέρθηκαν παραπάνω και δίνεται και η δυνατότητα διαφοροποίησης των μαλακών ιστών.¹⁶

1.3 Μοριακοί φθορίζοντες ιχνηθέτες

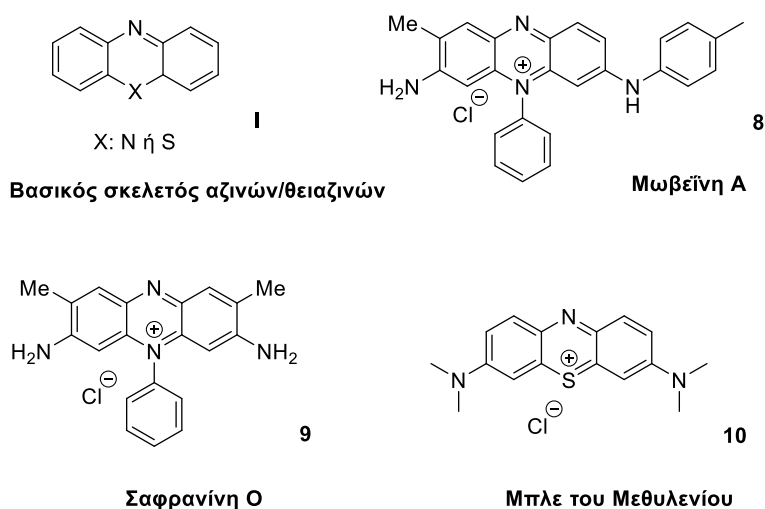
Η χρήση χρωστικών ως φορέων αντίθεσης για την παρατήρηση έμβιων συστημάτων δεν αποτελεί νέα ιδέα. Αν και η ιδέα της χρώσης κυττάρων καθιερώθηκε από τον H. C. Gram στα τέλη του 19^{ου} αιώνα, υπήρχαν ήδη παραδείγματα χρήσης χρωστικών όπως αυτό του Joseph von Gerlach ο οποίος το 1858 έδειξε πως αραιά υδατικά διαλύματα καρμίνης (φυσική χρωστική με βαθύ κόκκινο χρώμα που οφείλεται στο καρμινικό οξύ **7**, **Σχήμα 2**) μπορούσαν να απορροφηθούν από εγκεφαλικά κύτταρα και να χρωματίσουν τους πυρήνες τους.¹⁷ Είναι αξιοσημείωτο πως ακόμα εφαρμόζονται παλαιές μέθοδοι χρώσης με χαρακτηριστικότερα παραδείγματα της χρώσης κατά Gram για τον διαχωρισμό βακτηρίων με βάση την ύπαρξη ή μη τοιχώματος πεπτιδογλυκάνης και της μοναδικής φυσικής χρωστικής σε χρήση, της αιματοξυλίνης και ηωσίνης (H&E-haematoxylin & eosin, **5**, **6 Σχήμα 2**) που χρησιμοποιείται μεταξύ άλλων, για τη χρώση των πολυμορφοπύρηνων ουδετερόφιλων λευκών αιμοσφαιρίων σε βιοχημικές εξετάσεις. Αν και οι χρωστικές αυτές δεν είναι ειδικές ως προς την πρόσδεσή τους σε συγκεκριμένο στόχο, η απορρόφηση φωτός παράγει την επιθυμητή αντίθεση η οποία παλαιότερα ήταν αρκετή. Όμως, με την εξέλιξη του μικροσκοπίου όπως έχει αναφερθεί παραπάνω και την εισαγωγή των φθορίζουσών χρωστικών, η «δίψα» για ειδική χρώση

κυτταρικών διαμερισμάτων και παρατήρηση συγκεκριμένων μοριακών στόχων, πυροδότησε την έρευνα σε αυτό το πεδίο.



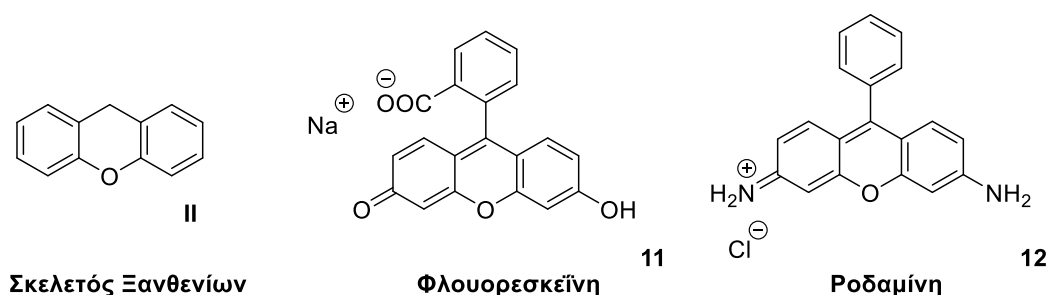
Σχήμα 2: Δομές σημαντικών φυσικών χρωστικών.

Ήδη από το 19^ο αιώνα είναι γνωστές πολλές οικογένειες φθοριζουσών χρωστικών με εκείνη των αζινών και θειαζινών να έχει ιδιαίτερη σημασία καθώς εκεί ανήκει η μωβεΐνη Α, η πρώτη συνθετική χρωστική που παρήχθη το 1856 (**8, Σχήμα 3**). Η γενική δομή (**I**) αυτής της οικογένειας φαίνεται και αυτή στο παρακάτω **Σχήμα 3**. Στην ίδια οικογένεια ανήκουν χρωστικές όπως η σαφρανίνη Ο και το μπλε του μεθυλενίου (**9, 10, Σχήμα 3**) οι οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί ως χρωστικές του πυρήνα του κυττάρου, ως συμπληρωματικές χρωστικές (counterstains) στην τεχνική Gram και ως μέσο ταυτοποίησης ερυθροκυττάρων σε συνδυασμό με ξανθενικές χρωστικές.²

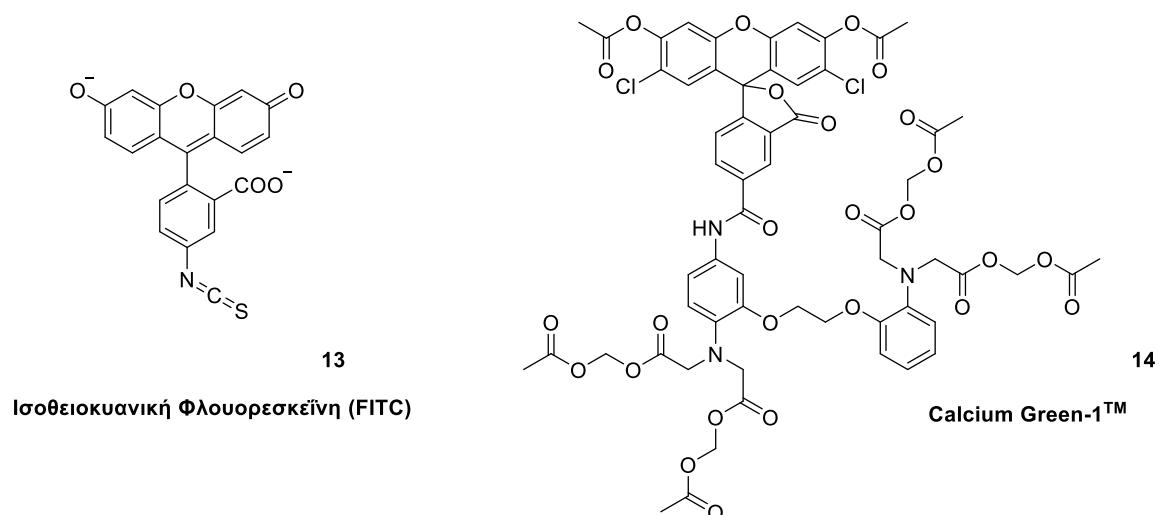


Σχήμα 3: Σκελετός των αζινών/θειαζινών και χαρακτηριστικά παραδείγματα χρωστικών αυτής της οικογένειας.

Η οικογένεια των ξανθενίων (II, **Σχήμα 4**) εμφανίστηκε με τη σύνθεση της πρώτης ανιοντικής χρωστικής, της φλουορεσκεΐνης, το 1871.² Οι δύο μεγάλες υποκατηγορίες αυτής της ομάδας είναι τα υδροξυξανθένια, με σημαντικότερη τη φλουορεσκεΐνη και τα αμινοξανθένια με σημαντικότερη τη ροδαμίνη (**11**, **12**, **Σχήμα 4**). Αυτές οι χρωστικές είναι θεμελιώδεις στον τομέα της Ο.Α. λόγω των εξαιρετικών φωτοχημικών τους ιδιοτήτων αλλά και της βιοσυμβατότητάς τους. Δύο παράγωγα της φλουορεσκεΐνης, τα οποία μάλιστα έχουν βρει ευρεία εφαρμογή, είναι το Calcium Green-1TM το οποίο χρησιμοποιείται για την παρατήρηση ροής ασβεστίου στα κύτταρα και η ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC) που έχει εγκριθεί από τον Αμερικάνικο Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration-FDA) και αρκετά χρόνια χρησιμοποιείται στον τομέα της οφθαλμολογίας ως εξέταση ρουτίνας.¹⁸ Τα παραπάνω παράγωγα φαίνονται στο παρακάτω σχήμα (**13**, **14**, **Σχήμα 5**).



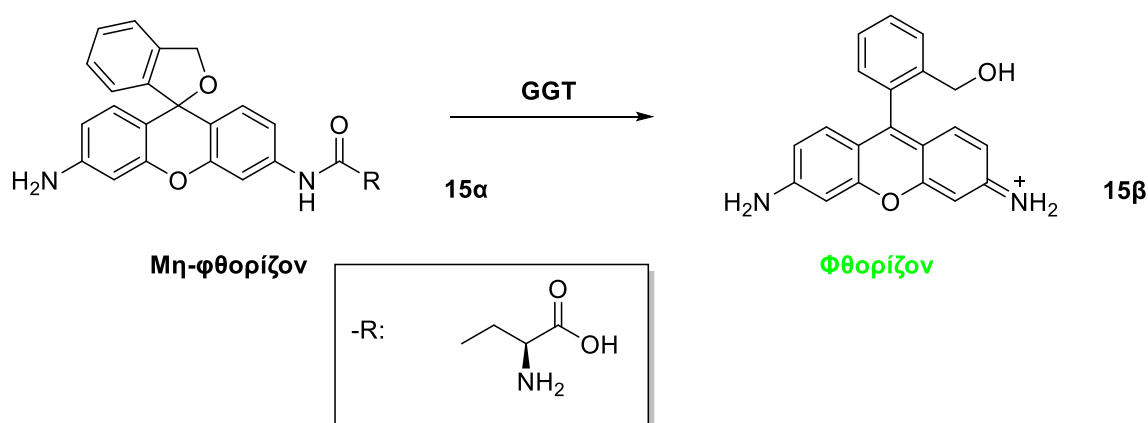
Σχήμα 4: Βασικός σκελετός ξανθενίων και σημαντικότεροι εκπρόσωποι.



Σχήμα 5: Δύο σημαντικά μόρια της οικογένειας των υδροξυξανθενίων.

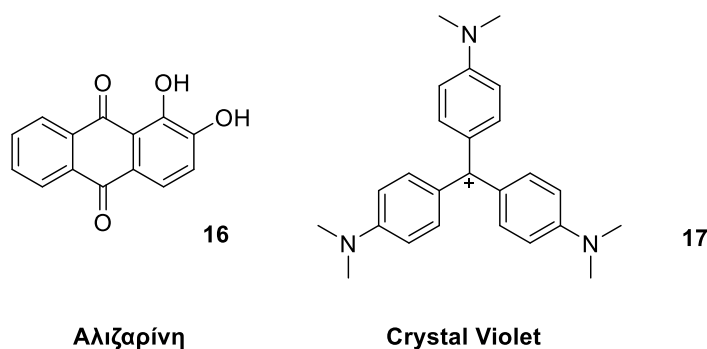
Στη βιβλιογραφία οι συνήθεις χρήσεις των ξανθενικών υποστρωμάτων είναι στη Φ.Σ, με στόχο την παρατήρηση και μελέτη μοριακών στόχων, αλλά και η αξιοποίησή τους ως δέκτες ενέργειας σε μηχανισμό FRET. Μερικά πρόσφατα παραδείγματα είναι η

ενδοκυτταρική παρατήρηση μοριακών στόχων όπως ενζύμων (π.χ. COX-2) ή πρωτεϊνικών δομών (πρωτεάσωμα 20S) με ιχνηθέτες οι οποίοι αποτελούνται από μία ομάδα που αναστέλλει τη δράση του στόχου και ένα φθορισμοφόρο.^{19,20} Οι παραπάνω μοριακοί στόχοι αποτελούν δείκτες φλεγμονής ή ανάπτυξης καρκίνου. Μία πολύ ενδιαφέρουσα εργασία των Urano και Kobayashi αναφέρεται στον εντοπισμό καρκινικών κυττάρων με το απενεργοποιημένο παράγωγο της ροδαμίνης **15α** το οποίο, όταν υποστεί ενζυμική τροποποίηση από τη γ-γλουταμυλοτρανσπεπτιδάση (GGT) στην επιφάνειά τους, μετατρέπεται στη φθορίζουσα εκδοχή της ένωσης **15β** και εισέρχεται στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον (**Σχήμα 6**).²¹



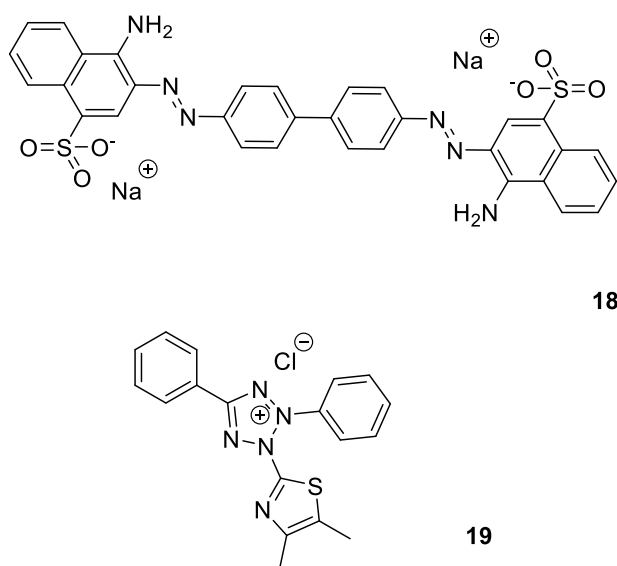
Σχήμα 6: Μοριακός φάρος για ανίχνευση καρκινικών κυττάρων.²¹

Δύο ακόμα κατηγορίες χρωστικών που αναπτύχθηκαν στα τέλη του 19^{ου} αιώνα είναι τα τριαρυλομεθίνια με ένωση αναφοράς την Crystal Violet (**17**, CV), κύρια χρωστική της τεχνικής Gram, και οι διυδροξυανθρακινόνες που χρησιμοποιούνται μέχρι και σήμερα για τον εντοπισμό ασβεστίου στα κύτταρα με σημαντικότερη την αλιζαρίνη (**16**), την πρώτη φυσική χρωστική που συντέθηκε χημικά το 1869 (**16**, **17 Σχήμα 7**). Μάλιστα, οι ιδιότητες της CV επεκτείνονται και στο φάσμα των μοριακών στροφένων, όπως θα αναλυθεί σε επόμενη ενότητα.



Σχήμα 7: Δομές χαρακτηριστικών χρωστικών.

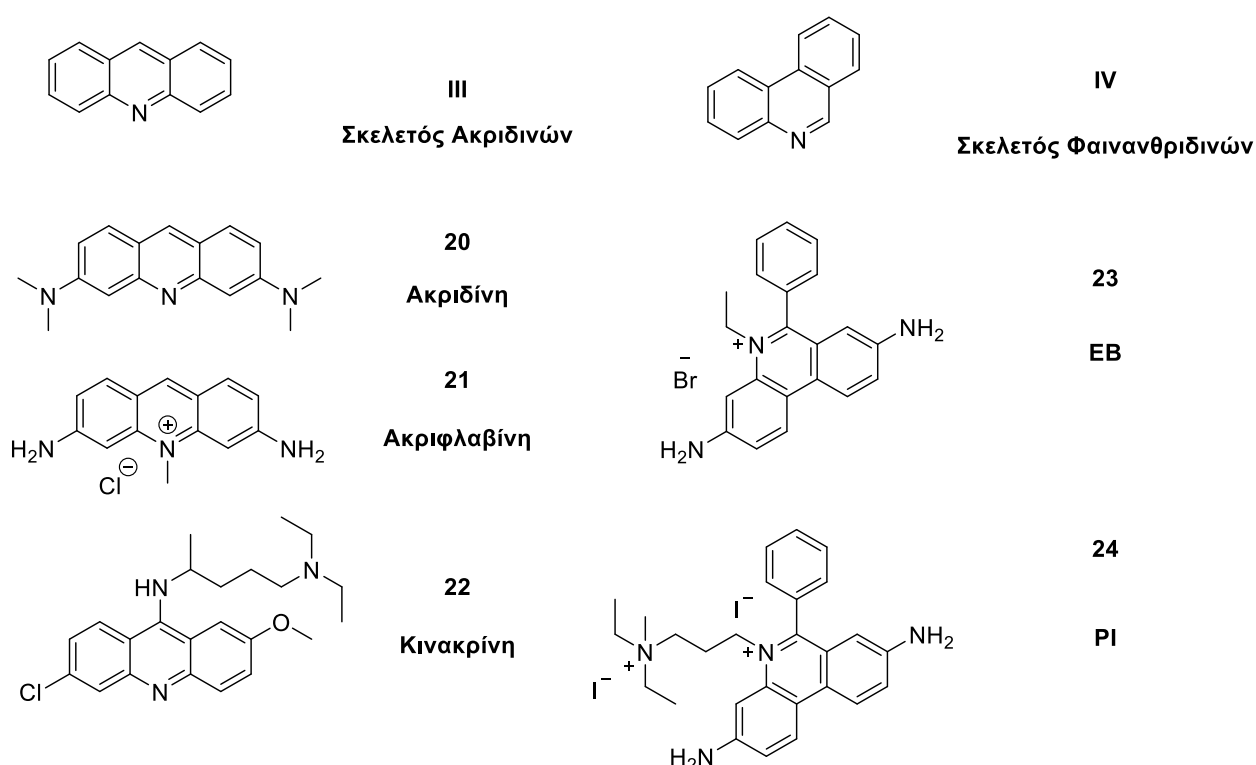
Αλλάζοντας χρονική περίοδο, κατά τον 20^ο αιώνα υπήρξε μια έκρηξη στην ανάπτυξη χρωστικών για αρκετές εφαρμογές μεταξύ αυτών και χρώσης ιστών. Οι οικογένειες των αζο, διαζο και τετραζολο ενώσεων αποτελούν τέτοιο παράδειγμα.² Οι δύο πρώτες έχουν ως σημαντικούς εκπροσώπους το ερυθρό του Κονγκό (**18**, **Σχήμα 8**) και το μπλε του Evans. Η χρωστική **18** έχει χρησιμοποιηθεί στη χρώση του κυτοπλάσματος όπως και των ερυθροκυττάρων αλλά και στον εντοπισμό αμυλοειδών πλακών.²² Το μπλε του Evans χρησιμοποιείται στη χρώση νεκρών κυττάρων, των οποίων η μεμβράνη δεν εμποδίζει τη διάχυσή της, όπου όντας συζευγμένο με την αλβουμίνη, μπορεί να αξιολογήσει την ακεραιότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Αντίστοιχη δράση αλλά με διαφορετικό μηχανισμό παρουσιάζει ίσως η πιο γνωστή ένωση της τρίτης κατηγορίας, το χλωρίδιο του 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζολίου (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium chloride-MTT, **19**, **Σχήμα 8**) το οποίο χρησιμοποιείται ως και σήμερα για τις μελέτες κυτταροτοξικότητας ανιχνεύοντας των αριθμό των νεκρών κυττάρων.



Σχήμα 8: Δομές των χρωστικών Ερυθρό του Κονγκό (18) και MTT (19).

Μια ακόμα σύγχρονη κατηγορία χρωμοφόρων είναι οι ακριδίνες και οι ισομερείς τους φαινανθριδίνες (**III** και **IV** αντίστοιχα, **Σχήμα 9**).² Λόγω του επίπεδου πολυαρωματικού σκελετού τους έχουν υψηλή συγγένεια για το DNA και RNA και αλληλεπιδρούν μαζί τους μέσω ενδοπαρεμβολής. Τα σημαντικότερα παραδείγματα ακριδινών είναι το πορτοκαλί της ακριδίνης **20**, η ακριφλαβίνη **21** και η κιν ακρίνη **22** οι οποίες χρησιμοποιούνται σαν χρωστικές του γενετικού υλικού (**Σχήμα 9**). Δύο ευρέως χρησιμοποιούμενες χρωστικές στην Ο.Α είναι το βρωμιούχο αιθίδιο (ethidium bromide-

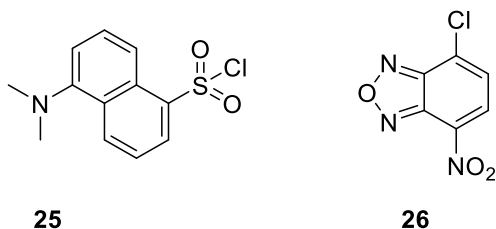
EB) και το ιωδιούχο προπιδίο (propidium iodide-PI) οι οποίες ανήκουν στην υποκατηγορία των φαινανθριδινών (**23** και **24**, **Σχήμα 9**). Το EB συνήθως συνδυάζεται με την **20** ώστε να δώσουν στοιχεία για τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Συγκεκριμένα, η **20** μπορεί να απορροφηθεί εξίσου από τα ζωντανά και νεκρά κύτταρα ενώ το EB μπορεί να εισέλθει στους πυρήνες των νεκρών κυττάρων. Η **20** παράγει πράσινο φθορισμό όταν δεσμευτεί στο DNA και πορτοκαλί αντίστοιχα για το RNA ενώ το EB έντονο πορτοκαλί με το DNA και αχνό κόκκινο με το RNA. Επομένως, στα ζωντανά κύτταρα θα φανεί πράσινος πυρήνας και κόκκινο κυτόπλασμα ενώ στα νεκρά έντονα πορτοκαλί και τα δύο διαμερίσματα. Ένας αντίστοιχος συνδυασμός είναι αυτός του PI με την μπλε χρωστική Hoechst 33342, η οποία θα αναφερθεί παρακάτω.



Σχήμα 9: Βασικός σκελετός σε ακριδίνες και φαινανθριδίνες και χαρακτηριστικές χρωστικές αυτής της οικογένειας.

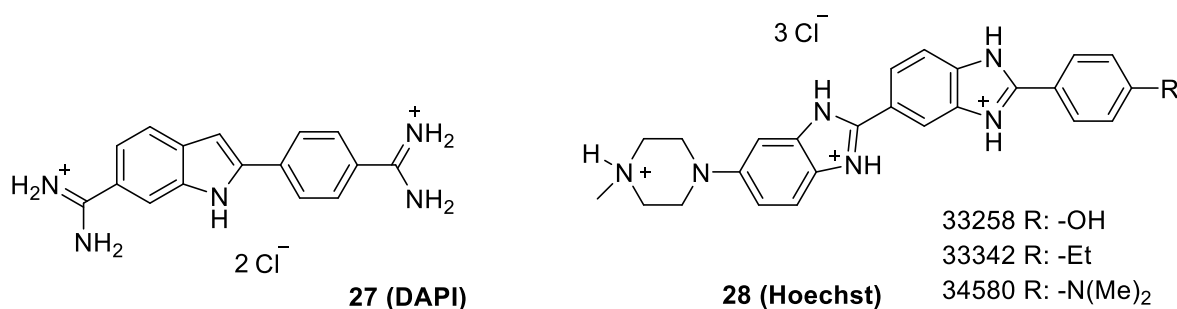
Συχνά στη βιβλιογραφία χρησιμοποιούνται δύο φθορίζοντα δραστικά χλωρίδια (**25**, **26**, **Σχήμα 10**) τα οποία με τη μέθοδο της Φ.Σ βοηθούν στη μελέτη βιολογικών στόχων. Το 4-χλωρο-7-νιπροβενζο-2-οξα-1,3-διαζόλιο (χλωρίδιο NBD, **26**) είναι συμβατό με ζωντανά κύτταρα και σχηματίζει δεσμούς συνήθως με εκτεθειμένες αμινο, θειολο, και υδροξυλομάδες. Έχει χρησιμοποιηθεί στην σύνθεση αναστολέων της COX-2 οι οποίοι μπορούν να παρατηρηθούν *in vitro*.²³ Αντίστοιχα, το 5-(N,N-διμεθυλαμινο)ναφθυλο-1-

σουλφονυλο χλωρίδιο (δάνσυλο χλωρίδιο, **25**) έχει αξιοποιηθεί στη σήμανση βιομορίων όπως πεπτιδίων, πρωτεϊνών και αντισωμάτων ενώ στη δημοσίευση του Griffin και συνεργατών αποτελεί τμήμα πεπτιδομιμητικού και φθορίζοντος αναστολέα της τρανσγλουταμινάσης 2.²⁴



Σχήμα 10: Δραστικά χλωρίδια που χρησιμοποιούνται στη φθορίζουσα σήμανση.

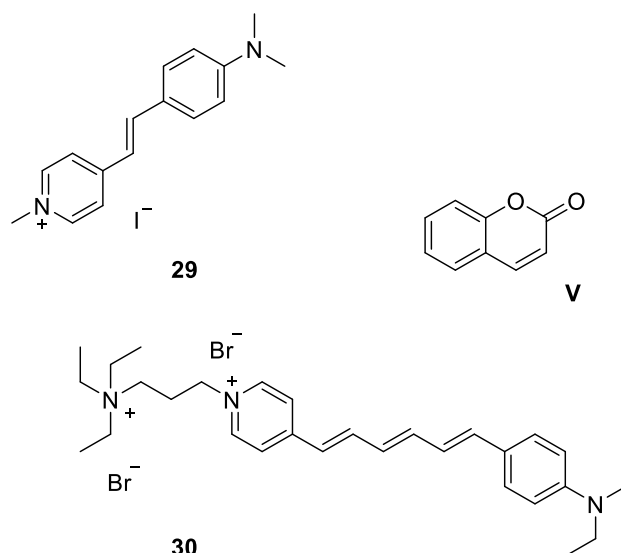
Μια μεγάλη κατηγορία χρωμοφόρων είναι τα πολυμεθίνια και χωρίζεται σε μικρότερες υποκατηγορίες όπως τις ινδολενίνες, τα βενζιμιδαζόλια, τα στιλβένια, τις κουμαρίνες και τις καρβοκυανίνες.² Οι δύο πρώτες υποκατηγορίες εκπροσωπούνται από τις πυρηνικές χρωστικές DAPI και Hoechst (**27** και **28** αντίστοιχα, **Σχήμα 11**). Αμφότερες παράγουν μπλε φθορισμό όταν διεγερθούν από υπεριώδη ακτινοβολία και δεσμεύονται στο γενετικό υλικό, ειδικά στις πλούσιες σε A-T αλληλουχίες περιοχές. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη Hoechst 33342 υπερέρχει έναντι του DAPI έχοντας χαμηλότερη κυτταροτοξικότητα και καλύτερη διεισδυτική ικανότητα.



Σχήμα 11: Πυρηνικές χρωστικές της οικογένειας των πολυμεθινίων.

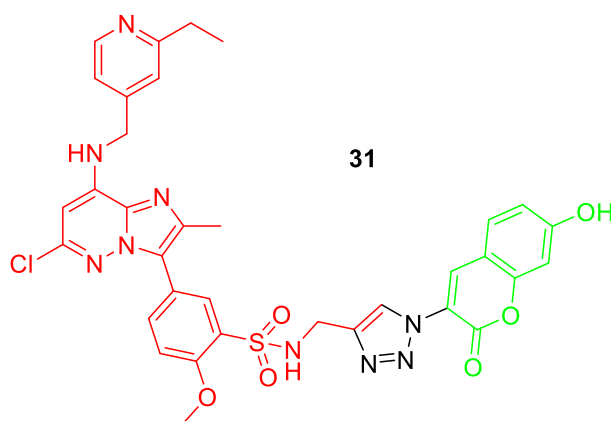
Τα στιλβένια αποτελούνται από ένα σκελετό στυρενίου στις δύο άκρες του οποίου υπάρχουν μια ομάδα δότης και μια ομάδα δέκτης ηλεκτρονίων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι το 4-(4-(*N,N'*-διμεθυλαμινο)στυρυλο)-*N*-μεθυλοπυριδινυλο ιωδίδιο (4-(4-(*N,N'*-dimethylamino)styryl)-*N*-methylpyridinium iodide-DASPMI, **29**, **Σχήμα 12**) το οποίο χρησιμοποιείται στη χρώση μιτοχονδρίων σε ζωντανά κύτταρα και οι χρωστικές πλασματικής μεμβράνης τύπου FM (π.χ. FM4-64 ή **30**, **Σχήμα 12**). Και αυτή η

κατηγορία ενώσεων εμφανίζει ιδιότητες μοριακών στροφένων, όπως θα σχολιαστεί παρακάτω. Οι κουμαρίνες (**V**, **Σχήμα 12**) είναι μια οικογένεια χρωμοφόρων πολύ χρήσιμων στις οπτικές τεχνικές λόγω της υψηλής κβαντικής απόδοσής τους και της βιοσυμβατότητάς τους. Λόγω του υψηλής ενέργειας φθορισμού τους χρησιμοποιούνται ως δότες ενέργειας σε μηχανισμούς FRET και λόγω της συμβατότητάς τους με βιολογικά συστήματα, όταν φέρουν δραστικές ομάδες όπως μαλεϊμίδια ή σουκινιμιδικούς εστέρες, συχνά συνδέονται με βιομόρια για Φ.Σ.



Σχήμα 12: Σκελετός των κουμαρινών (V) και χρωστικές DASPMI (29) και FM4-64 (30).

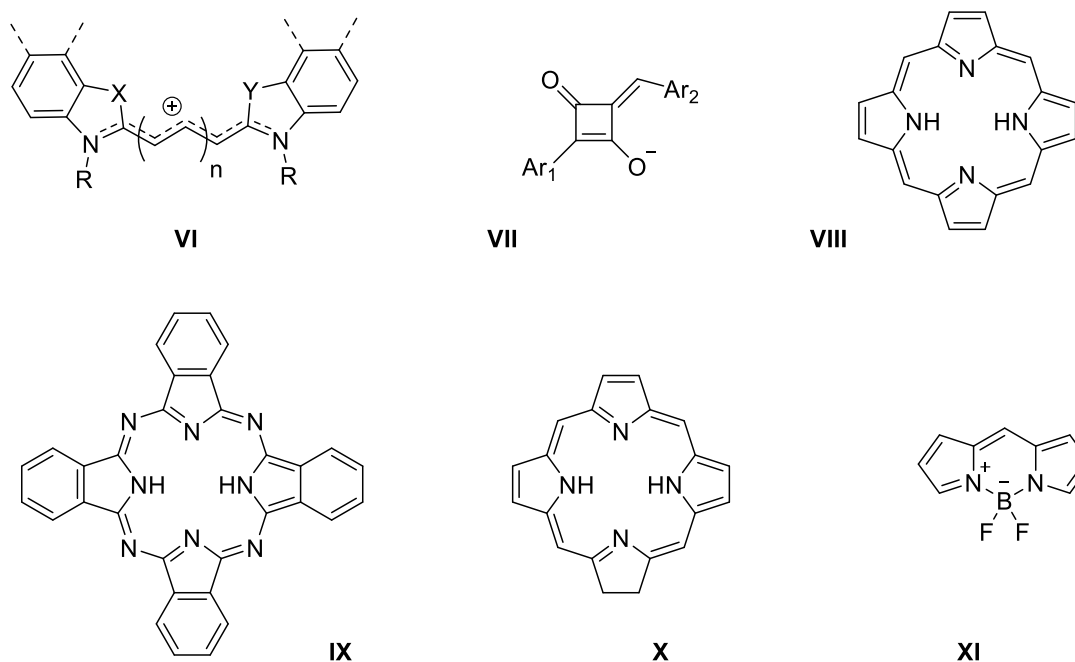
Μία πολύ ενδιαφέρουσα εργασία είναι η δημοσίευση των Boura και Nencka όπου, με χρήση ενός φθορίζοντος αναστολέα (ο οποίος φέρει ομάδα κουμαρίνης) της λιπιδικής κινάσης PI4KB, προσδιορίζονται οι σταθερές πρόσδεσης K_d γνωστών αναστολέων και συγκρίνονται με τις τιμές των IC_{50} τους (**31**, **Σχήμα 13**). Αρχικά προσδιορίζουν την K_d του αναστολέα παρατηρώντας τις αλλαγές στην ανισοτροπία φθορισμού και στη συνέχεια ξεκινώντας από ένα σύμπλοκο του τελευταίου με το ένζυμο, προσδιορίζουν την ισχύ γνωστών αναστολέων με βάση το βαθμό αντικατάστασης του φθορίζοντος μορίου από τον αναστολέα. Η σημαντικότητα αυτής της μεθόδου έγκειται στο ότι η φθορισμομετρική μέθοδος μπορεί να εξελιχθεί σε υψηλής απόδοσης (high throughput) σύστημα για εύρεση ισχυρότερων αναστολέων ενζύμων με χρήση ενός μόνο φθορισμοφόρου.



Σχήμα 13: Ο φθορίζων αναστολέας **31** που χρησιμοποιήθηκε στη δημοσίευση των Boura-Nencka (κόκκινο=αναγνωριστικό τμήμα, πράσινο=φθορίζον τμήμα).

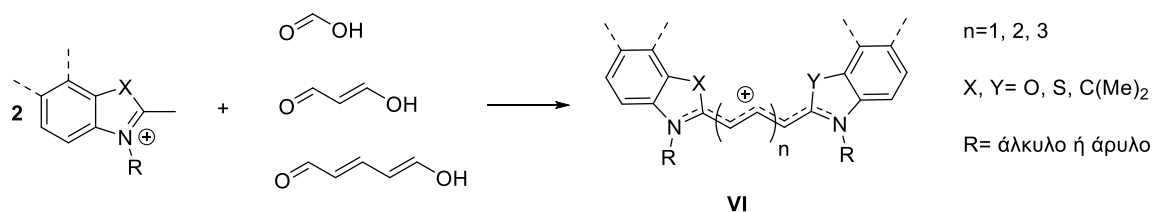
1.3.1 NIR χρωστικές

Όπως φάνηκε στις προηγούμενες παραγράφους παρά το γεγονός ότι υπάρχει μια πληθώρα χρωστικών για *in vitro* και *in vivo* εφαρμογές, ιδιαίτερο ενδιαφέρον δίνεται στις χρωστικές NIR. Συνοπτικά, η χρήση τους πλεονεκτεί στο ότι είναι δυνατόν να μελετηθεί σε μεγαλύτερο βάθος ένας ιστός (μερικά χιλιοστά), ο λόγος ΣΠΥ είναι υψηλός λόγω χαμηλής σκέδασης και αυτοφθορισμού του ιστού και η φωτόλυση του ιστού είναι ελάχιστη λόγω της χαμηλής ενέργειας ακτινοβολίας. Παρόλα αυτά, μέχρι και σήμερα λίγες είναι οι οικογένειες χρωστικών που έχουν βρει τέτοιες εφαρμογές και στο παρακάτω **Σχήμα 14** φαίνονται οι βασικοί σκελετοί τους. Επιπρόσθετα, αυτού του τύπου χρωστικές μπορούν να χωριστούν σε αυτές που έχουν εγγενή την ιδιότητα απορρόφησης στην περιοχή NIR και αυτές που χρειάζονται χημική τροποποίηση για να την αποκτήσουν. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι καρβοκυανίνες **VI** και οι σκουαράινες (squaraines, **VII**) ενώ στη δεύτερη οι τετραπυρρολικές χρωστικές (πορφυρίνες **VIII**, φθαλοκυανίνες **IX** και χλωρίνες **X**) καθώς και τα 4,4-διφθορο-4-βορα-3a,4a-διαζα-s-ινδακένια (**XI**, BODIPY).^{2,3}



Σχήμα 14: Σκελετοί κυριότερων NIR χρωστικών.

Η οικογένεια των καρβοκυανινών απαρτίζεται από μόρια που έχουν ως βασικά δομικά χαρακτηριστικά δύο μονάδες ινδολενίνης (όμοιες ή μη) είτε με είτε χωρίς υποκαταστάτες, οι οποίες συνδέονται με ένα δίκτυο περιπτού αριθμού διπλών δεσμών (Σχήμα 15).³



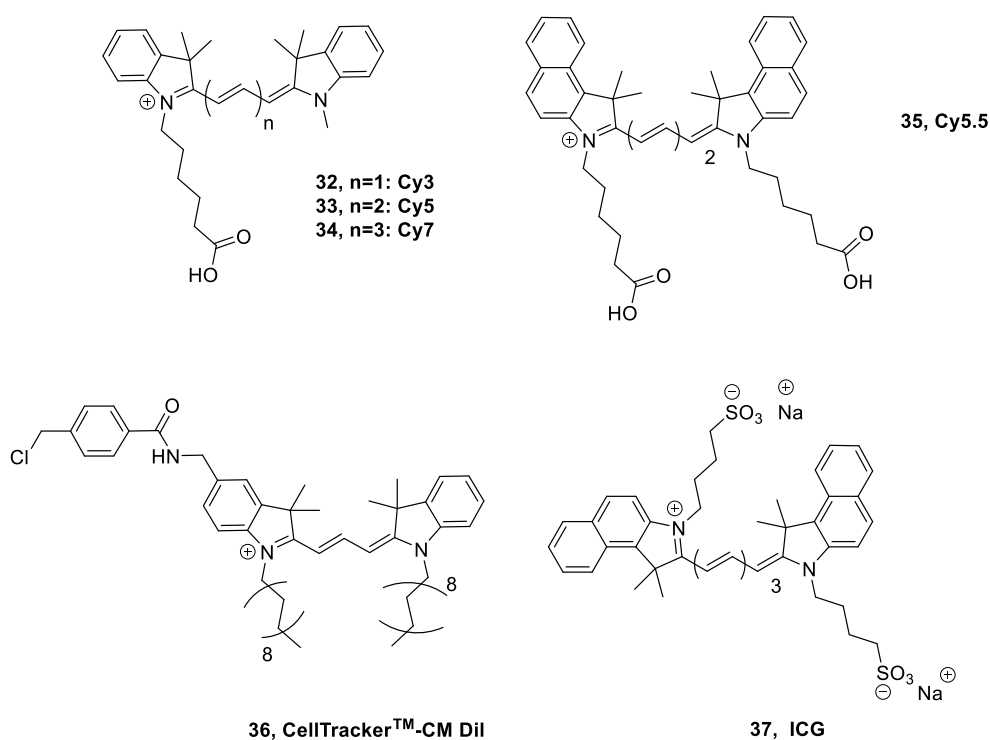
Σχήμα 15: Βασική συνθετική πορεία καρβοκυανινών.³

Αποτελούν μια σημαντική τάξη φορτισμένων φθορισμοφόρων τα οποία εμφανίζουν απορρόφηση και φθορισμό στην περιοχή που εκτείνεται από το ορατό μέχρι το εγγύς υπέρυθρο (450-900 nm). Παρουσιάζουν κβαντικές αποδόσεις πάνω από 0.5, υψηλούς συντελεστές απορροφητικότητας (πάνω από $150.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), έχουν αξιοποιηθεί ως ενεργά συστατικά σε laser, ημιαγώγιμα υλικά, μέσα οπτικής εγγραφής και βαφές ενώ αρχικά χρησιμοποιούνταν στη φωτογραφική βιομηχανία στη δημιουργία των φιλμ.²⁵ Οι σημαντικότεροι εκπρόσωποι αυτής της κατηγορίας φαίνονται στο **Σχήμα 16** ενώ στον ακόλουθο **Πίνακα 1** αναφέρονται συνοπτικά τα μήκη κύματος

απορρόφησης και φθορισμού τους όπου είναι ξεκάθαρο πως όσο αυξάνεται ο αριθμός των ενδιάμεσων διπλών δεσμών, τόσο παρατηρείται μία βαθυχρωμική μετατόπιση.

Πίνακας 1: Μήκη κύματος απορρόφησης και φθορισμού των βασικότερων καρβοκυανινών.

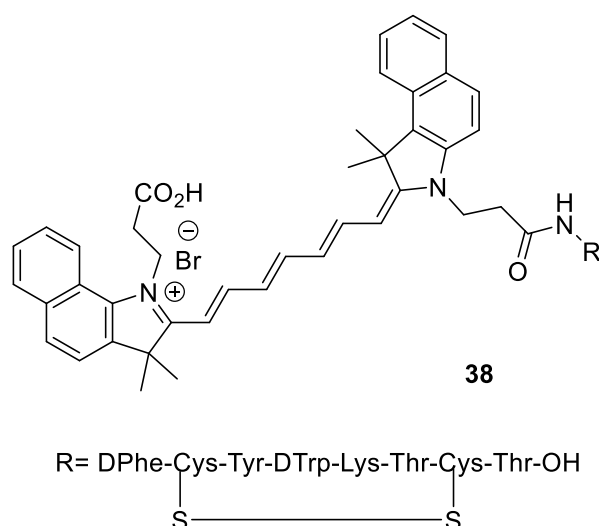
Όνομα χρωστικής	Μέγιστο μήκος κύματος απορρόφησης (λ_{abs})	Μέγιστο μήκος κύματος φθορισμού (λ_{flu})
Cy3	550	570
CM-Dil	553	570
Cy5	650	670
Cy5.5	675	694
Cy7	743	767
ICG	770	830



Σχήμα 16: Σημαντικότερα μέλη της ομάδας των καρβοκυανινών.

Οι χρωστικές χωρίζονται σε ειδικές και μη ως προς τη συγγένειά τους με ενδομοριακούς στόχους. Στη δεύτερη κατηγορία οι πιο γνωστές είναι η ινδοκυανίνη του πράσινου (**37**, indocyanine green-ICG) και η CM-Dil (**36**, CellTracker™). Η **36** είναι μεμβρανική χρωστική η οποία χρησιμοποιείται για μακροπρόθεσμη χρώση και

παρακολούθηση κυττάρων αλλά και δομών όπως λιποσώματα, λιποπρωτεΐνες ακόμα και ιοί.²⁶ Η χλωροβενζυλομάδα που φέρει αξιοποιείται ως μέσο σύζευξης με θειολομάδες πεπτιδίων και πρωτεϊνών για Φ.Σ.² Η **37** έχει εξέχουσα σημασία ως μόριο καθώς είναι η πρώτη και μοναδική ως σήμερα NIR χρωστική που χρησιμοποιείται σε ανθρώπους. Από το 1959 και έπειτα είναι κλινικά ενδεδειγμένη από τον FDA και χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο σε εξετάσεις αγγειογραφίας φθορισμού στην οφθαλμολογία.²⁷ Σε άλλες ιατρικής φύσης εφαρμογές έχει χρησιμοποιηθεί στη μελέτη της αγγείωσης του εγκεφάλου και του εγκεφαλονωτιαίου υγρού, στον έλεγχο της ηπατικής λειτουργίας και καρδιακής φυσιολογίας, στον εντοπισμό καρκίνου στους μαστούς και στην αγγειογραφία του γαστρεντερικού συστήματος.²⁸ Οι Bugaj και Achilefu αξιοποίησαν τις δυνατότητες της ICG με τη μέθοδο της Φ.Σ για την ανίχνευση όγκων συνδέοντάς τη με πεπτίδια (**38**, **Σχήμα 17**) που αναγνωρίζονται από τον υποδοχέα της σωματοστατίνης (SST) ο οποίος εκφράζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό σε καρκινικούς όγκους.^{29,30}



Σχήμα 17: Μοριακός ιχνηθέτης που συντέθηκε στην εργασία του Bugaj και συνεργατών.²⁹

Οι χρωστικές τύπου CyDye (όπου Dye=3, 5, 5.5, 7) φέρουν ηλεκτρονιόφιλες ομάδες ώστε να μπορούν να συνδεθούν ομοιοπολικά με πρωτεϊνικά υποστρώματα ή αντισώματα για φθορίζουσα σήμανση. Οι Folli και Ballou ήταν οι πρώτοι που συνέδεσαν τις **32** και **33** με αντισώματα ώστε να παρατηρήσουν καρκινικούς όγκους *in vivo*.^{31,32} Η τεχνική αυτή βέβαια, είχε ως επακόλουθο χαμηλό λόγο ΣΠΥ διότι τα μη-δεσμευμένα μόρια του ανιχνευτή αργούσαν να απομακρυνθούν από την κυκλοφορία του αίματος. Η λύση αυτού του προβλήματος ήρθε από τους Neri και Birchler οι οποίοι χρησιμοποίησαν τμήματα αντισωμάτων, συγκεκριμένα μιας ισομορφής της

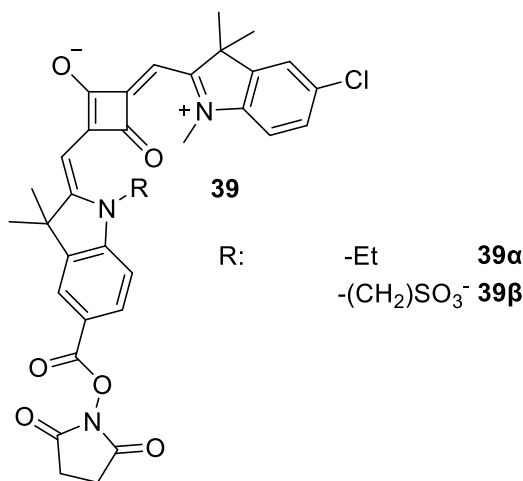
φιμπρονεκτίνης η οποία σχετίζεται με αυξημένη αγγειογένεση στους όγκους, με φθορίζουσα «ετικέτα» την χρωστική **34** έτσι ώστε τα τελικά προϊόντα να διατηρήσουν τη συγγένειά τους ως προς το αντίστοιχο αντιγόνο.^{33,34} Τέλος, η ιδέα των μοριακών φάρων του Weissleder, που αναφέρθηκε σε προηγούμενη παράγραφο, βασίστηκε στη σύνδεση της **35** με ένα συμπολυμερές πολυ-L-λυσίνης και μεθοξυπολυαιθυλενογλυκόλης (MPEG). Όταν το πεπτιδικής φύσης συμπολυμερές υποστεί ενζυμική διάσπαση, απελευθερώνεται το φθορισμοφόρο ακολουθούμενο από μια μεγάλη αύξηση της κβαντικής απόδοσής του και έντονο φωτεινό σήμα.¹⁴ Η τακτική αυτή χρησιμοποιήθηκε από τον Tung και συνεργάτες για παρατήρηση όγκων βασιζόμενοι στην υπερέκφραση ενζύμων σε καρκινικές σειρές κυττάρων. Συγκεκριμένα, ο σκελετός του πρωτεϊνικού συμπολυμερούς μπορεί να διασπαστεί από το ένζυμο καθεψίνη D και να απελευθερωθεί το ενεργό φθορισμοφόρο.³⁵

Οι καρβοκυανίνες, αν και είναι οι πιο γνωστές χρωστικές αντιμετωπίζουν κάποια προβλήματα τα οποία είναι κυρίως φωτοχημικής φύσης. Συγκεκριμένα, τα οπτικά χαρακτηριστικά τους όπως η απορρόφηση στο μέγιστο μήκος κύματος (λ_{max}) είναι χαμηλά σε υδατικά περιβάλλοντα με παράδειγμα, την κβαντική απόδοση φθορισμού τους να είναι 15% χαμηλότερη ενώ επίσης παρουσιάζουν και μια έλλειψη φωτοσταθερότητας. Ένα ακόμα αρνητικό είναι πως, αν και η προσθήκη κάθε διπλού δεσμού αυξάνει το μήκος κύματος μέχρι και 80-100 nm, «κοστίζει» στο ότι καθιστά το μόριο περισσότερο λιπόφιλο και ασταθές.³ Έτσι, παρότι κατέχουν σημαντική θέση στον τομέα της NIR σήμανσης και παρακολούθησης ενδοκυτταρικών διεργασιών, το μέλλον αυτού του τομέα βρίσκεται σε άλλες κατηγορίες ενώσεων.

Ειδικότερα, τα παράγωγα του τετραπυρρολικού σκελετού όπως οι πορφυρίνες, φθαλοκυανίνες και χλωρίνες, οι σκουαραΐνες και τα BODIPY είναι ομάδες στις οποίες έχει στραφεί το ενδιαφέρον για νέους NIR ανιχνευτές.³⁶ Το μεγάλο πλεονέκτημά αυτών των χρωστικών είναι οι ανώτερες οπτικές ιδιότητες, η στιβαρότητά τους και η σταθερότητά τους σε μεγαλύτερο χρόνο έκθεσης σε ακτινοβολία. Με εξαίρεση τις σκουαραΐνες, οι υπόλοιπες ομάδες δεν ανήκουν στις NIR χρωστικές όμως μέσω χημικών τροποποιήσεων, μπορούν να αποκτήσουν τέτοιες ιδιότητες.

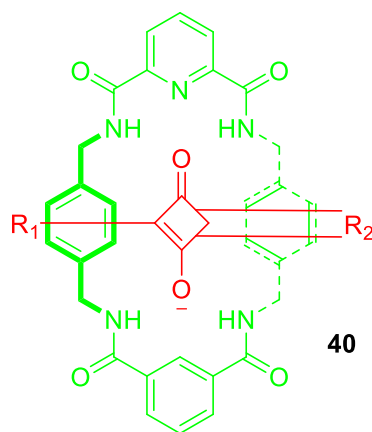
Οι σκουαραΐνες αποτελούνται από έναν ηλεκτρονιακά φτωχό οξοκυκλοβουτενολικό σκελετό ο οποίος φέρει στα άκρα του αρωματικές ή αλειφατικές ομάδες και ακολουθείται το μοτίβο D-π-A-π-D όπου δέκτης ηλεκτρονίων (A) είναι ο κεντρικός οξοκυκλοβουτενολικός σκελετός.³⁷ Παρουσιάζουν εξαιρετικές φυσικοχημικές ιδιότητες όπως έντονες ζώνες απορρόφησης, υψηλές τιμές μοριακής

απορροφητικότητας και καλή φωτοαγωγιμότητα.^{25,36} Βέβαια, λόγω των μεγάλων π-συζυγιακών υδρόφοβων δομών τους, εμφανίζουν το πρόβλημα ασυμβατότητας με υδατικά περιβάλλοντα και για αυτό το λόγο έχουν γίνει έντονες προσπάθειες για την παρασκευή υδατοδιαλυτών παραγώγων. Η ομάδα του Ozinskas έχει συνθέσει υδρόφιλες σκουαραΐνες οι οποίες φέρουν στο σκελετό τους ομάδες για σύνδεση με πρωτεϊνικά υποστρώματα.³⁸ Η ίδια ερευνητική ομάδα τις έχει χρησιμοποιήσει στην ανίχνευση πρωτεϊνών, όπου παράγωγα με *N*-υδροξυσουκινιμιδικές ομάδες δεσμεύονται στην ανθρώπινη αλβουμίνη ορού (Human Serum Albumin-HSA) για να προσδιοριστούν τα επίπεδα της στο αίμα (**39α,β**, **Σχήμα 18**).³⁹ Σημειώνεται πως η δέσμευση των χρωστικών αυτών σε πρωτεΐνες σε υδατικό περιβάλλον ακολουθείται από μια σημαντική αύξηση της κβαντικής απόδοσης.



Σχήμα 18: Παράγωγο σκουαραΐνης που συντέθηκε από την ομάδα του Ozinskas και συνεργατών.³⁸

Οι σκουαραΐνες χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο ως φωτοευαισθητοποιητές στη φωτοδυναμική θεραπεία (Photodynamic Therapy-PDT) όπου η ακτινοβολήση ενός τέτοιου μορίου, το οποίο έχει απορροφηθεί εκλεκτικά από έναν όγκο, οδηγεί σε παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species-ROS), ενός υψηλά κυτταροτοξικού παράγοντα.⁴⁰ Φυσικά υπάρχουν και εφαρμογές τους στην *in vitro* και *in vivo* παρατήρηση τόσο με μικροσκοπία ενός όσο και δύο φωτονίων. Οι ομάδες των Smith και Haas και των συνεργατών τους χρησιμοποίησαν υπερμοριακές κατασκευές (**40**, **Σχήμα 19**) που περιείχαν σκουαραΐνες ώστε να παρατηρήσουν εκλεκτικά βακτηριακή μόλυνση σε ποντίκια και νευρωνικά δίκτυα σε γυρίνους αντίστοιχα, με μικροσκοπία τόσο ενός όσο και δύο φωτονίων^{41,42}



Σχήμα 19: Υπερμοριακή κατασκευή που χρησιμοποιείται για *in vivo* παρατήρηση μέσω TPM.⁴²

Οι τετραπυρρολικές χρωστικές και τα BODIPY εμφανίζουν πολύ ισχυρές φωτοχημικές ιδιότητες και στιβαρότητα, χαρακτηριστικά που τις καθιστούν ιδανικές για θεμέλια στην ανάπτυξη NIR χρωστικών. Έχουν χρησιμοποιηθεί τόσο ως φωτοευαίσθητοποιητές στη φωτοδυναμική θεραπεία όσο και στον εντοπισμό καρκινικών δεικτών *in vivo*. Παραδείγματα όπως η αιματοπορφυρίνη και η χλωρίνη Ε6 έχουν συζευχθεί με πεπτίδια, αντισώματα και πρωτεΐνες (π.χ. αλβουμίνη, τρανσφερίνη) ώστε να απορροφηθούν από καρκινικούς όγκους στο πλαίσιο της φωτοδυναμικής θεραπείας.^{43–45} Οι ομάδες της Kralova και του Phillips συνέθεσαν διμερή πορφυρινών τα οποία έχουν εφαρμοστεί σε θανάτωση κυττάρων μέσω PDT και μικροσκοπία φθορισμού. Συγκεκριμένα, η πρώτη εργασία αφορούσε αναγνώριση κάποιων ολιγοσακχαριτών που εμφανίζονται σε κακοήθεις όγκους από διμερή τύπου «σάντουιτς» υποκατεστημένων πορφυρινών σε σύζευξη με χολικά οξέα που προσδίδουν υδατοδιαλυτότητα.⁴⁶ Στην εργασία του Phillips και συνεργατών τα διμερή που συντέθηκαν φέρουν κέντρα ψευδαργύρου και μπορούν να παρατηρηθούν με TPM. Μελετήθηκε επίσης η κατανομή τους στο εσωτερικό του κυττάρου και φάνηκε πως υπάρχει μεγάλη πιθανότητα συνεντοπισμού τους με γνωστές χρωστικές σε διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα.⁴⁷

Το βασικό χρωμοφόρο BODIPY που έχει παρουσιαστεί σε παραπάνω σχήμα, αποτελεί έναν από τους πιο ευέλικτους στην τροποποίηση σκελετούς για σύνθεση φθορίζοντων ανιχνευτών ενώ ξεχωρίζουν οι εξαιρετικές του ιδιότητες όπως υψηλή φωτοσταθερότητα και κβαντική απόδοση φθορισμού, οξείες κορυφές στα φάσματα απορρόφησης/φθορισμού και ουδέτερο ολικό φορτίο. Μπορεί να παραγοντοποιηθεί με αναγνωριστικές μονάδες για εκλεκτική ενδοκυτταρική στόχευση, με υδρόξυ και αλκόξυ ομάδες όπως για να αυξηθεί η υδροφιλικότητά του και με αρωματικά συστήματα ώστε

να αποκτήσει ιδιότητες NIR χρωστικής ή μοριακού στροφέα, όπως θα αναλυθεί παρακάτω. Ακόμη, μπορεί να δράσει ως ενεργοποιούμενο φθορισμοφόρο με ενεργοποίηση μέσω μηχανισμού FRET ή αλλαγής pH. Έχει αξιοποιηθεί για την παρατήρηση υποδοχών νευροδιαβιβαστών αλλά και συγκεκριμένων ενζύμων σε διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα.⁴⁸

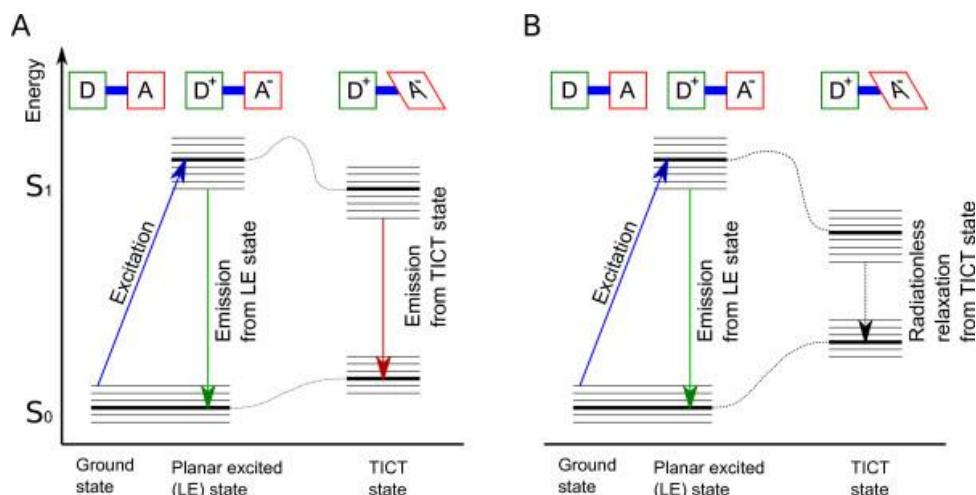
1.4 Μοριακοί στροφείς

1.4.1 Δομή και λειτουργία

Οι μοριακοί στροφείς (ΜΣ, molecular rotors) είναι μια οικογένεια συνθετικών φθορίζοντων ενώσεων οι οποίες μετά από φωτοδιέγερση, υφίστανται μια ενδομοριακή διαδικασία στρέψης ως αποτέλεσμα μεταφοράς φορτίου.⁴⁹ Αυτή η κατηγορία μορίων χαρακτηρίζεται δομικά από την ύπαρξη μίας ηλεκτρονιοδοτικής και μίας ηλεκτρονιοελκτικής ομάδας οι οποίες συνδέονται με ένα π-συζυγιακό σύστημα και έχουν τη δυνατότητα να περιστραφούν η μία σε σχέση με την άλλη. Κατά τη φωτοβόλησή του το μόριο διεγείρεται σε μια κατάσταση υψηλότερης ενέργειας (τοπική διεγερμένη ή ΤΔ), η οποία όμως διατηρεί την επίπεδη γεωμετρία της θεμελιώδους κατάστασης. Ο ΜΣ σε αυτό το σημείο, έχει την επιλογή αποδιέγερσης μέσω δύο διαφορετικών οδών, μία όπου παράγεται ακτινοβολία φθορισμού και μία όπου είτε παράγεται φθορισμός χαμηλότερης ενέργειας είτε η ενέργεια χάνεται θερμικά. Η ειδοποιός διαφορά αυτής της κατηγορίας ενώσεων σε σχέση με τα κοινά φθορισμοφόρα, έγκειται στο γεγονός πως η επιλογή του μονοπατιού που θα ακολουθηθεί, καθορίζεται κατά κύριο λόγο από το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται. Στο μόριο που βρίσκεται στην ΤΔ κατάσταση μπορεί να γίνει μεταφορά ενός ολόκληρου ηλεκτρονιακού φορτίου από την ομάδα δότη στην ομάδα δέκτη, με επακόλουθες δομικές αλλαγές λόγω της αυξημένης διπολικής ροπής.

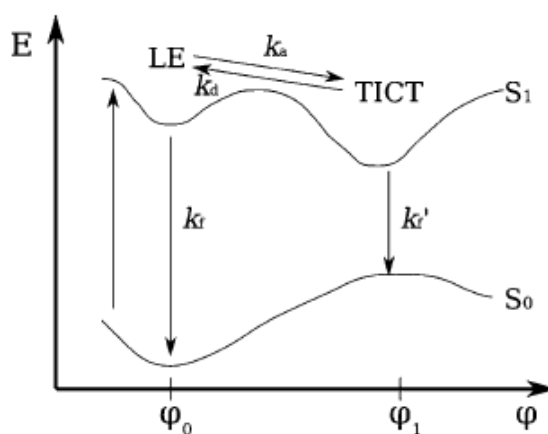
Συγκεκριμένα, η μία ομάδα περιστρέφεται γύρω από έναν σ δεσμό μέχρι να αρθεί η επιπεδότητα του μορίου, σχηματίζοντας μια στρεπτή κατάσταση ενδομοριακής μεταφοράς φορτίου (Twisted Intramolecular Charge Transfer-TICT). Αναλόγως των ενεργειών της θεμελιώδους και διεγερμένης κατάστασης, τόσο στην ΤΔ όσο στην TICT διαμόρφωση, υπάρχουν ΜΣ που παρουσιάζουν είτε μία είτε δύο ζώνες φθορισμού. Ο φθορισμός από την TICT κατάσταση πάντα θα εμφανίζει βαθυχρωμική μετατόπιση διότι ένα ποσό ενέργειας σπαταλάται από τα μόρια του διαλύτη τα οποία αναδιατάσσονται λόγω αλλαγής της διπολικής ροπής του μορίου.⁵⁰ Η TICT κατάσταση είναι ευαίσθητη στην πολικότητα του μέσου και ευνοείται σε περισσότερο πολικούς διαλύτες λόγω

σταθεροποίησής της.⁵¹ Αντιθέτως, τα μόρια που παρουσιάζουν μία ζώνη φθορισμού από την ΤΔ κατάσταση, θα έχουν εξαρτώμενη από το περιβάλλον κβαντική απόδοση και θερμική αποδιέγερση από την TICT. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 8**, αν η διαφορά ενέργειας μεταξύ ΤΔ και TICT είναι αρκετά μικρή (**B**) θα πραγματοποιηθεί θερμική αποδιέγερση ενώ αν οι τιμές τους είναι συγκρίσιμες (**A**), θα υπάρξει εκπομπή φθορισμού:

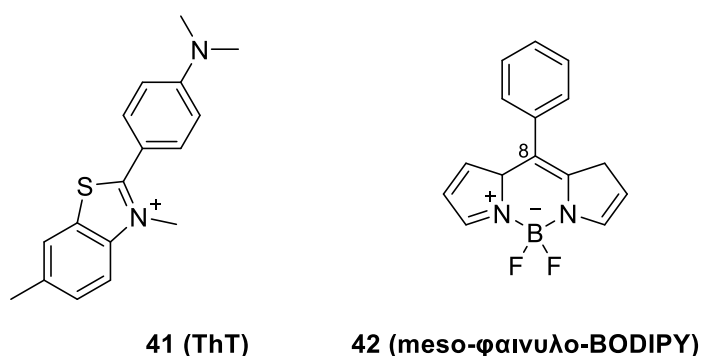


Εικόνα 8: Α) Διάγραμμα Jablonski για ΜΣ με ακτινοβολούσα κατάσταση TICT. Β) Διάγραμμα Jablonski για ΜΣ με μη-ακτινοβολούσα κατάσταση TICT.⁵⁰ (LE=locally excited, τοπική διεγερμένη)

Η ισορροπία μεταξύ των καταστάσεων ΤΔ και TICT επηρεάζεται κυρίως από τον ελεύθερο όγκο που υπάρχει γύρω από το φθορισμοφόρο αλλά και από τα δομικά του χαρακτηριστικά. Στην παρακάτω ενεργειακή επιφάνεια (**Εικόνα 9**), ανάμεσα στη μετατροπή από την ΤΔ κατάσταση (LE) στην TICT μεσολαβεί ένα μικρό ενεργειακό μέγιστο. Η γωνία ϕ_0 είναι η διέδρη γωνία που σχηματίζουν τα επίπεδα των ομάδων δότη και δέκτη στη θεμελιώδη κατάσταση και συνήθως είναι μια τιμή κοντά στις 0° . Παρόλα αυτά υπάρχουν περιπτώσεις ΜΣ οι οποίες φαίνονται στο **Σχήμα 20** όπου η τιμή αυτή απέχει από την επιπεδότητα όπως στη θειοφλαβίνη T (ThT, **41**) στην οποία η τιμή είναι ίση με 37° ^{52,53} και στο meso-φαίνυλο BODIPY (**42**) στο οποίο είναι 55° .⁵⁴ Αυτός είναι και ο βασικός λόγος που οι στροφείς τύπου BODIPY δε λειτουργούν όπως οι περισσότεροι, κάτι που θα αναλυθεί σε επόμενη παράγραφο.

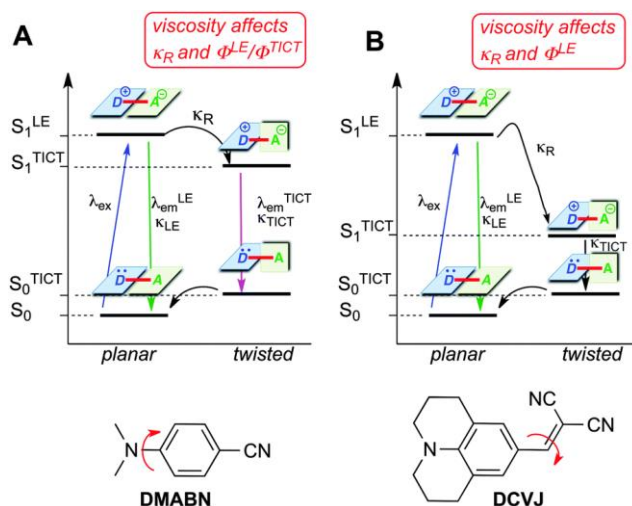


Εικόνα 9: Ενεργειακή επιφάνεια ενός ΜΣ. Οι τιμές ϕ_0 και ϕ_1 είναι περίπου 0 και 90°. Οι τιμές k_x ($x=a,d,f,f'$) αποτελούν τις σταθερές ταχύτητας για τις αντίστοιχες μετατροπές.⁴⁹



Σχήμα 20: Μοριακοί στροφείς με διαφορετική δίδεδρη γωνία ϕ_0 στη θεμελιώδη κατάσταση.

Αν ο ΜΣ βρίσκεται για παράδειγμα σε περιβάλλον με υψηλό ιξώδες ή δεσμευμένος σε κάποιο βιομόριο, η κίνησή του είναι περιορισμένη με αποτέλεσμα να αυξάνεται αυτό το μέγιστο και να καθίσταται πολύ πιο δύσκολο για το μόριο να το ξεπεράσει. Αντίστοιχα, αν η ομάδα δότης βρίσκεται σε μικτό κυκλικό σύστημα, η περιστροφή της κατά το σχηματισμό της TICT δυσχεραίνεται και η ισορροπία και πάλι ευνοεί την ΤΔ. Τέλος υπάρχει και μια ακραία κατάσταση όπου διαλύματα της χρωστικής στους 77 K (-196 °C) στερεοποιούνται και παρατηρείται φθορισμός αποκλειστικά από την ΤΔ με κβαντική απόδοση κοντά στη μονάδα.⁵⁵ Στην **Εικόνα 10** αυτό γίνεται ξεκάθαρο με τους στροφείς π-(*N,N*-διμεθυλαμινο)βενζονιτρίλιο (dimethylamino-benzomalononitrile-DMABN, **43**, **Σχήμα 21**) και δικυανοβινυλοζουολιδίνη (dicyano-vinyl-Julolidine-DCVJ, **45**, **Σχήμα 22**) όπου στον δεύτερο (**B**) η ενεργειακή διαφορά είναι αρκετά μικρή και η αποδιέγερση από την TICT πραγματοποιείται θερμικά. Αυτή η ρύθμιση των ιδιοτήτων των ΜΣ με αλλαγή του περιβάλλοντός τους, είναι το στοιχείο που τους κάνει τόσο σημαντικά εργαλεία και αντικείμενο εκτενούς έρευνας.



Εικόνα 10: Ενεργειακά διαγράμματα για δύο διαφορετικούς τύπους στροφένων. Ο τρόπος αποδιέγερσης από την TICT κατάσταση ρυθμίζεται από τη διαφορά στη διεγερμένη και τη θεμελιώδη κατάσταση.⁵⁶

Το έναυσμα για την ανάπτυξη αυτού του πεδίου ήταν η αναφορά των ασυνήθιστων οπτικών ιδιοτήτων του DMABN οι οποίες δημοσιεύτηκαν το 1962 από τους Lippert και Lüden.⁵⁷ Σύμφωνα με τους συγγραφείς, το DMABN παρουσιάζει δύο ζώνες φθορισμού, μια υψηλής και μια χαμηλής ενέργειας (**A**, **Εικόνα 10**), τις οποίες προσπαθούσαν να αποδώσουν στην ύπαρξη διαφορετικών χημικών ειδών στη θεμελιώδη κατάσταση, χωρίς όμως να προκύπτει κάποια στέρεα αιτιολόγηση. Το 1973 ο Grabowski και συνεργάτες, μελετώντας το DMABN και κάποια, υποκατεστημένα στον δακτύλιο, παράγωγά του, απέδωσαν το διπλό φθορισμό σε δύο διαφορετικά διαμορφωμερή του DMABN στο ένα εκ των οποίων, η διμεθυλαμινομάδα βρίσκεται εκτός του επιπέδου του αρωματικού συστήματος.⁵⁸ Αυτή η δημοσίευση συνοδεύτηκε από την γέννηση του μοντέλου TICT στο οποίο μέχρι και σήμερα, περισσότερα από 40 χρόνια αργότερα, στηρίζεται η ερμηνεία της λειτουργίας των ΜΣ. Εκτός της θεωρίας TICT, έχει αποδειχθεί μέσω πολλών πειραμάτων πως το ιξώδες του μέσου συσχετίζεται με μεγέθη όπως η ένταση φθορισμού (I_{EM}), η κβαντική απόδοση (Φ_F) και ο χρόνος ζωής φθορισμού (fluorescence lifetime, τ).^{55,59–61} Οι σχέσεις που συνδέουν τα παραπάνω μεγέθη εξήχθησαν από τους Förster και Hoffmann το 1971 με στόχο να ποσοτικοποιηθεί η εξάρτηση των οπτικών ιδιοτήτων τριαρυλομεθινίων, μιας άλλης κατηγορίας ΜΣ, από το ιξώδες του μέσου.⁶² Οι σχέσεις φαίνονται παρακάτω με πιο σημαντική την (1) που ονομάζεται και εξίσωση Förster-Hoffmann:

$$\log \Phi_F = C + x * \log \eta \quad (1)$$

$$\Phi_F = \tau / \tau_0 \quad (2)$$

$$\eta = \left(\frac{\tau}{\tau_0 * C} \right)^{\frac{1}{x}} \quad (3)$$

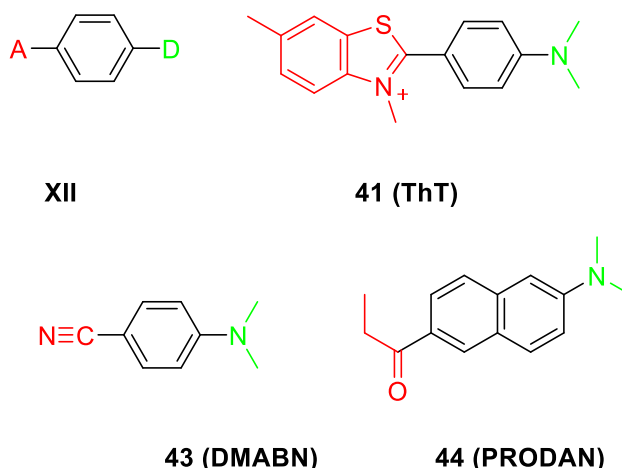
$$I_{EM} = k * \eta^x \quad (4)$$

Το ιξώδες του μέσου συμβολίζεται ως η , ως C , x και k συμβολίζονται σταθερές που εξαρτώνται από το διαλύτη, τη φύση του μορίου και το σύνολο αυτών, αντίστοιχα, ενώ τέλος τ_0 είναι ο χρόνος ζωής φθορισμού χωρίς καμία μη-ακτινοβολούσα διαδικασία. Σημειώνεται επίσης πως το όνομα «μοριακοί στροφείς» εισήχθη στη βιβλιογραφία το 1982 σε μια εργασία του Loutfy και συνεργατών, μίας από τις ομάδες που έχουν συνεισφέρει σημαντικά στη μελέτη αντίστοιχων ενώσεων.⁶³

Ο τομέας των ΜΣ μελετάται ήδη πάνω από μισό αιώνα και ως τώρα έχουν συντεθεί ένα πλήθος μορίων τα οποία είναι παράγωγα κάποιων βασικών σκελετών. Συνοπτικά, οι σημαντικότερες οικογένειες είναι οι στροφείς όπως το DMABN και η ThT, τα π-διαλκυλαμινοβενζομαλονονιτρίλια (dialkylaminobenzomalononitriles-DBMN) και τα παράγωγά τους, τα τριαρυλομεθίνια όπως η Crystal Violet και οι τύπου BODIPY υποκατεστημένοι στη 8-θέση. Υπάρχουν βέβαια και άλλες ενδιαφέρουσες ομάδες που δεν συναντώνται τόσο συχνά στη βιβλιογραφία όπως τα διμερή των πορφυρινών ή κάποια παράγωγα των καρβοκυανινών. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί και κάποια νέα είδη μοριακών στροφείων όπως παράγωγα κυκλοπεντα[b]ναφθαλενίου και ναφθαλιμιδίου, διοξαβορίνες και πυρρολικά παράγωγα μαλονονιτριλίων. Οι ομάδες που αναφέρθηκαν θα σχολιαστούν στις επόμενες παραγράφους.

Οι στροφείς τύπου DMABN (**XII**, **Σχήμα 21**) είναι η πρώτη οικογένεια που μελετήθηκε με ιδιαίτερο χαρακτηριστικό τους τη διπλή ζώνη φθορισμού. Η αλλαγή ομάδων δότη και δέκτη δεν επηρεάζει ουσιαστικά αυτή την ιδιότητα όμως η υποκατάσταση του αρωματικού σκελετού μπορεί να μεταβάλλει την ισορροπία μεταξύ ΤΔ και TICT. Για παράδειγμα, είναι πιθανό υποκαταστάτες του αρωματικού σκελετού να δυσχεραίνουν επιπεδοποίηση του μορίου, ενισχύοντας την εκπομπή από την TICT κατάσταση. Η ύπαρξη της δεύτερης, ευαίσθητης στην πολικότητα του περιβάλλοντος, ζώνης φθορισμού από την κατάσταση TICT μπορεί να διαφοροποιήσει ένα υδρόφοβο περιβάλλον από ένα υδρόφιλο μέσω βαθυχρωμικής μετατόπισης της χαρακτηριστικής κορυφής στο φάσμα φθορισμού. Μια εφαρμογή αυτού είναι για παράδειγμα η μελέτη του υδρόφοβου εσωτερικού των κυκλοδεξτρινών όπου με την είσοδο του στροφέα στον

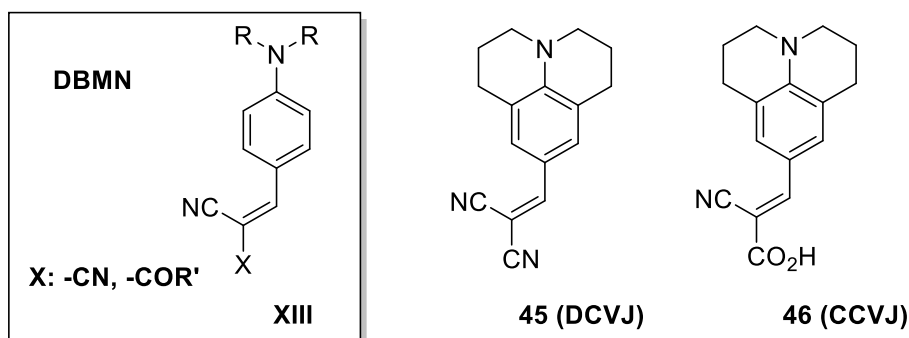
πυρήνα τους, θα ακολουθήσει μια αλλαγή στο μήκος κύματος φθορισμού της δεύτερης ζώνης.⁶⁴ Ο στροφέας που έχει χρησιμοποιηθεί σε αυτή την εφαρμογή είναι ο PRODAN (2-propionyl-6-*N,N*-dimethyl naphthylamine **44**, **Σχήμα 21**) ο οποίος θα σχολιαστεί στην επόμενη ενότητα. Σημαντικός εκπρόσωπος αυτής της οικογένειας είναι επίσης η ThT (**41**, **Σχήμα 21**) όπου αντί για κυανομάδα, ο δέκτης ηλεκτρονίων είναι ένα 3-*N*-6-διμεθυλο-βενζοθειαζόλιο. Αυτός ο ΜΣ έχει αναπτυχθεί ως ανιχνευτής συσσωματωμάτων πεπτιδίων Αβ, πρώιμων μορφών των πλακών γήρατος στη νόσο Alzheimer.⁶⁵



Σχήμα 21: Οικογένεια στροφέν τύπου DMABN και κάποιοι από του σημαντικότερους εκπροσώπους (πράσινο: ομάδες δότες, κόκκινο: ομάδες δέκτες).

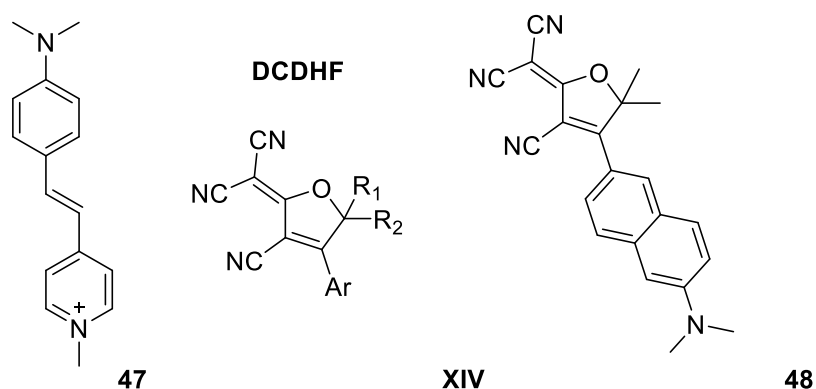
Τα DBMN (**XIII**, **Σχήμα 22**) είναι ίσως η σημαντικότερη οικογένεια ΜΣ που έχει αναπτυχθεί έως σήμερα με τις πρώτες ενώσεις αυτού του τύπου να αναφέρονται στη βιβλιογραφία το 1977.⁶⁶ Πρόκειται για μόρια με εκτεταμένη π-συζυγία τα οποία παρουσιάζουν μία ζώνη φθορισμού, μόνο από την ΤΔ κατάσταση. Ο συνηθισμένος δότης ηλεκτρονίων είναι η διμεθυλαμινομάδα ενώ ο δέκτης είναι η κυανομάδα όμως στην εργασία του Θεοδωράκη και συνεργατών, φάνηκε πως αλλάζοντας αυτά τα στοιχεία, όπως επίσης και τον αρωματικό σκελετό, μπορούν να προκύψουν μόρια με ποικίλες οπτικές ιδιότητες.⁶⁷ Η πιο γνωστή ένωση είναι η DCVJ (**45**, **Σχήμα 22**) η οποία έχει μελετηθεί εκτενέστατα σε πολλά διαφορετικά περιβάλλοντα. Αν η κυανομάδα που βρίσκεται *anti* του αρωματικού συστήματος αντικατασταθεί από μία καρβοξυλομάδα, τότε προκύπτουν τα παράγωγα των DBMN στα οποία ανήκουν και τα μόρια που συντέθηκαν στην παρούσα εργασία όπως και το πιο γνωστό παράγωγο της DCVJ, η καρβοξυκυανοβινυλJυλολιδίνη (carboxycyanovinylJυlolidine-CCVJ, **46**, **Σχήμα 22**) Αυτή η τροποποίηση καθιστά εύκολη την παραγοντοποίηση και τη χρήση των ΜΣ ως

φθορίζουσες «ετικέτες». Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η εισαγωγή λιπόφιλων αλυσίδων ώστε τα μόρια να εντοπιστούν σε λιπιδικές διπλοστιβάδες ή στην κυτταρική μεμβράνη.⁶⁸



Σχήμα 22: Γενική δομή στροφών τύπου DBMN και δομές των DCVJ και CCVJ.

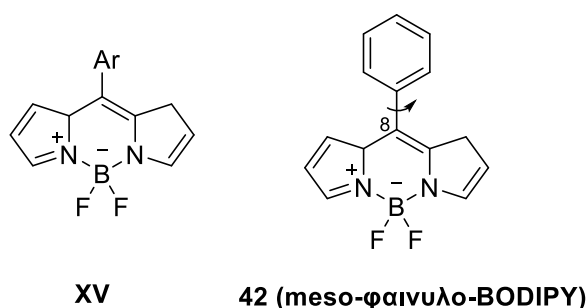
Υποκατηγορίες των DBMN αποτελούν τα στιλβένια και τα δικυανοδιυδροφουράνια (dicyanodihydrofuranes-DCDHF, **XIV**, Σχήμα 23) με ακόμα περισσότερο εκτεταμένο το π-σύστημα και φθορισμό σε μήκη κύματος πιο κοντά στο κόκκινο.⁴⁹



Σχήμα 23: Στροφείς της οικογένειας των DBMN.

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη παράγραφο, τα φθορισμοφόρα τύπου BODIPY έχουν ανώτερες οπτικές ιδιότητες, φωτοσταθερότητα και μπορούν με απλές τροποποιήσεις να παραχθούν από αυτά πλήθος συναφών ενώσεων με χαρακτηριστικά που επιλέγονται κατά βούληση. Όταν στη θέση 8 (meso-θέση) συνδεθεί αρωματικό σύστημα, το καινούριο σύστημα (**XV**, Σχήμα 24) συμπεριφέρεται πλέον ως ΜΣ, με δυνατότητα ανίχνευσης αλλαγών στο μικροπεριβάλλον του. Τα δύο επίπεδα συστήματα, στη θεμελιώδη κατάσταση, βρίσκονται υπό γωνία 55 ° όπως αναφέρθηκε νωρίτερα και όσο υφίσταται δυνατότητα ελεύθερης περιστροφής το μόριο, μετά από

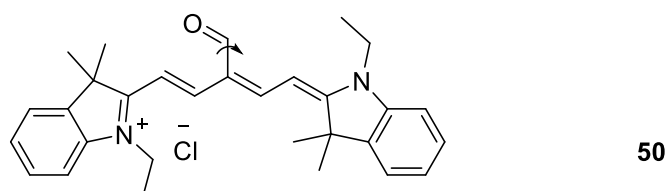
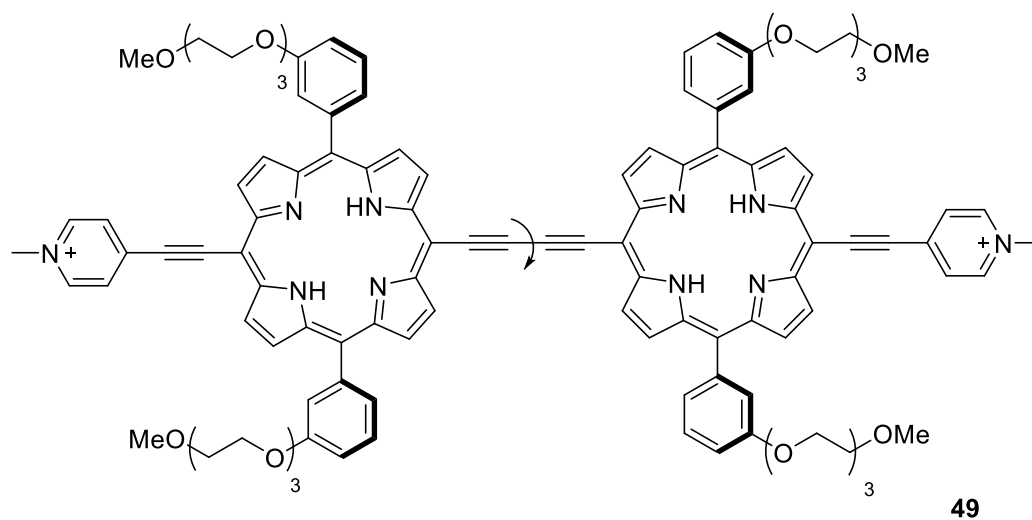
φωτοβόληση, αποδιεγείρεται με επιπεδοποίηση αυτών, μέσω περιστροφής από τον απλό δεσμό. Σε περιβάλλον υψηλού ιξώδους η περιστροφή δεν ευνοείται και όσο παραμένουν υπό γωνία χωρίς «επικοινωνία» των p-τροχιακών, παράγεται φθορισμός.⁶⁹ Ο κυριότερος λόγος της ανάπτυξής τους ως ΜΣ είναι οι υψηλότεροι χρόνοι ζωής φθορισμού τους που μπορούν να αξιοποιηθούν για πιο αξιόπιστα αποτελέσματα στον προσδιορισμό οπτικών μεγεθών όπως η κβαντική απόδοση. Αυτό υφίσταται διότι στη μέτρηση της έντασης φθορισμού, για την εξαγωγή τέτοιων αποτελεσμάτων, υπεισέρχονται σφάλματα όπως η ανισοκατανομή του χρωμοφόρου στο διάλυμα, κάτι που δεν ισχύει στον χρόνο διάρκειας καθότι είναι εγγενές μέγεθος, ανεπηρέαστο από αυτούς τους παράγοντες.



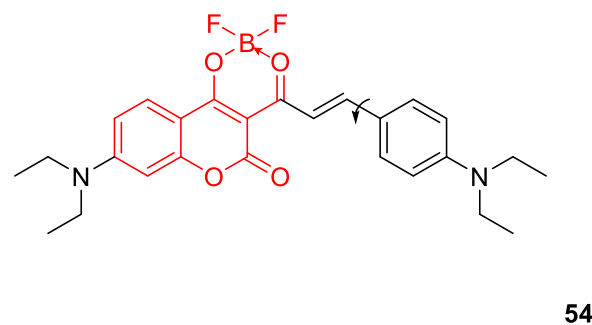
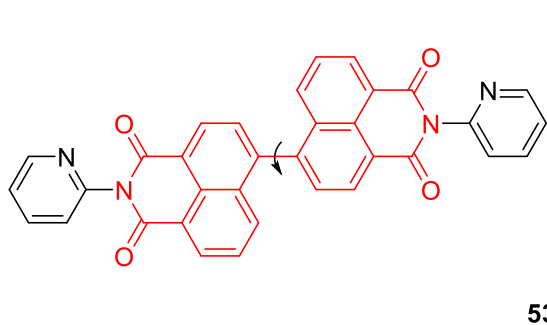
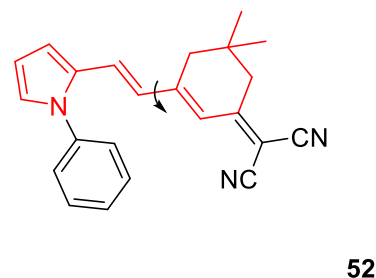
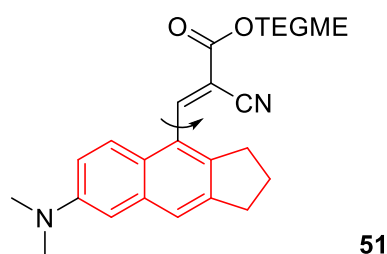
Σχήμα 24: Σκελετός του μοριακού στροφέα BODIPY.

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη παράγραφο, οι κυανίνες και οι πορφυρίνες χρειάζονται τροποποιήσεις ώστε να αποκτήσουν ιδιότητες ΜΣ. Πράγματι, έχει συντεθεί διμερές πορφυρίνης (**49**, **Σχήμα 25**) το οποίο χρησιμοποιείται ταυτόχρονα ως φωτοευαίσθητοποιητής και μοριακός στροφέας, αναφέροντας αλλαγές στο κυτοπλασματικό ιξώδες ζωντανού κυττάρου καθώς αυτό θανατώνεται.⁷⁰ Ομοίως, έχει συντεθεί και παράγωγο καρβοκυανίνης το οποίο φέρει σε συγκεκριμένη θέση φορμυλομάδα η οποία αποτελεί τον δέκτη ηλεκτρονίων και δίνει τη δυνατότητα σχηματισμού ή όχι TICT κατάστασης (**50**, **Σχήμα 25**). Τέλος, στο **Σχήμα 26** φαίνονται χαρακτηριστικά παραδείγματα νέων οικογενειών ΜΣ τα οποίων ο βασικός σκελετός είναι χρωματισμένος. Πρόκειται για ομάδες ΜΣ οι οποίες έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία 4 χρόνια και έχουν συντεθεί με στόχο να έχουν ανώτερες οπτικές ιδιότητες σε σχέση με τους γνωστούς. Στροφείς όπως ο **51** είναι κυανοακρυλικά παράγωγα του κυκλοπεντα[b]ναφθαλενικού σκελετού που αναφέρθηκε πρώτη φορά από την ομάδα του Θεοδωράκη.⁷¹ Ο στροφέας **52** αποτελεί μία παραλλαγή του σκελετού των μαλονονιτριλίων, με ομάδα δότη υποκατεστημένο πυρρόλιο, και παρουσιάζει σήμα φθορισμού κατά μία τάξη ισχυρότερο από αυτό των κλασικών με υποκατεστημένα

φαινύλια.⁷² Τέλος, οι στροφείς όπως ο **53** και ο **54** βασίζονται στο σκελετό ναφθαλιμιδίου και διοξαβορινών αντίστοιχα.^{73,74}



Σχήμα 25: ΜΣ βασισμένοι στα χρωμοφόρα πορφυρινών και καρβοκυανινών.



Σχήμα 26: Νέοι ΜΣ που έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια.

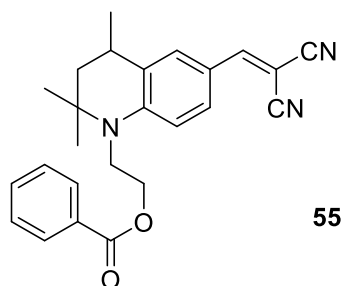
1.4.2 Εφαρμογές μοριακών στροφών

Οι ιδιότητες των ΜΣ τους καθιστούν ένα σημαντικό εργαλείο στις οπτικές μεθόδους και αναμένεται να γίνουν αναπόσπαστο κομμάτι αυτού του τομέα στα επόμενα χρόνια. Οι σημαντικότεροι τομείς στους οποίους έχουν βρει εφαρμογή είναι ως αισθητήρες αλλαγών του μικροπεριβάλλοντός τους και ως ανιχνευτές πρωτεϊνικής φύσης δομών. Συγκεκριμένα, έχουν χρησιμοποιηθεί στην ιξωδομετρία, στην παρακολούθηση ανάπτυξης πολυμερών αλλά και στη μελέτη της πολικότητας, κυρίως εσωτερικά και εξωτερικά του γενετικού υλικού. Ως ανιχνευτές πρωτεϊνών έχουν αξιοποιηθεί κατά κύριο λόγο στη μελέτη της νόσου Alzheimer όπως και στην ιχνηθέτηση, λειτουργώντας ως μοριακοί διακόπτες. Μία ακόμα εφαρμογή είναι η χρήση τους σε πρωτόκολλα φθορισμομετρικού προσδιορισμού ισχύος εν δυνάμει αναστολέων πρωτεϊνών ή ενζύμων, όπως έχει ήδη αναφερθεί στην **Παρ. 1.3, σελ. 40**. Επιτυχής ανάπτυξη μιας τέτοιας μεθόδου, αναμένεται να αντικαταστήσει τις συμβατικές που χρησιμοποιούνται ως τώρα όπως για παράδειγμα τον κινητικό προσδιορισμό σταθεράς αναστολής της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου,⁷⁵ όπως θα αναφερθεί σε επόμενη ενότητα.

Στην ιξωδομετρία οι ΜΣ έχουν εφαρμοστεί στη μέτρηση μικροϊζώδους σε τεχνητές διπλοστιβάδες, μικυλλιακές δομές, στην κυτταρική μεμβράνη και στο κυτόπλασμα. Ακόμη, έχει δοκιμαστεί και μέτρηση του ιζώδους στο πλάσμα του αίματος με αρκετά μεγάλη επιτυχία σε σύγκριση με τις κλασικές μηχανικές μεθόδους.⁷⁶ Η ρευστότητα των μεμβρανών στα βιολογικά συστήματα είναι κρίσιμη ιδιότητα διότι αλλαγές σε αυτή απορυθμίζουν τη λειτουργία των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών και ενζύμων και αποτελούν έναυσμα για παθολογικές καταστάσεις.^{77,78} Ειδικότερα, αλλαγές στο μικροϊζώδες έχουν βρεθεί πως συνδέονται με παθήσεις όπως υπερχοληστερολαιμία,⁷⁹ αθηροσκλήρωση,^{80,81} γήρανση^{82,83} ακόμα και διαβήτη (λόγω μείωσης της δραστηριότητας της κινάσης του υποδοχέα της ινσουλίνης).⁸⁴ Επιπλέον, μεταβολές στο ιζώδες της μεμβράνης των συστατικών του αίματος (ερυθρά κύτταρα, αιμοπετάλια) αλλά και του ορού έχουν αποδειχθεί να είναι βιολογικοί δείκτες υπέρτασης,⁸⁵ ηπατικής δυσλειτουργίας⁸⁶ αλλά και νόσου του Alzheimer.⁸⁷

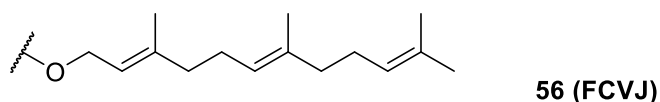
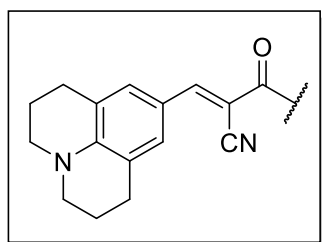
Στροφεείς όπως οι DCVJ (45), CCVJ (46) και 55 (**Σχήμα 27**) χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά στη μελέτη των αλλαγών του μικροϊζώδους καθώς και στον προσδιορισμό του, τόσο σε μικυλλιακές δομές που δημιουργούνται από επιφανειοδραστικές ουσίες όπως ο αποδιατακτικός παράγοντας SDS (sodium dodecyl sulfate) όσο και σε τεχνητές διπλοστιβάδες που προκύπτουν από φωσφολιπίδια όπως

η διπαλμιτόϋλοφωσφατιδυλοχολίνη (dipalmitoylphosphatidylcholine-DPPC) και η διστεαρόϋλοφωσφατιδυλοχολίνη (distearoylphosphatidylcholine-DSPC).^{88–90}

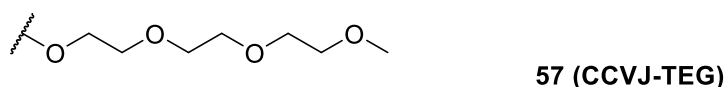


Σχήμα 27: Μοντέλο ΜΣ ο οποίος έχει χρησιμοποιηθεί κατά κόρον στην εξερεύνηση των ιδιοτήτων τους.

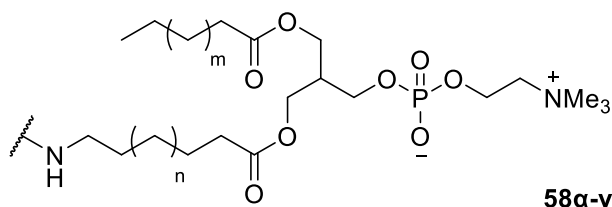
Η ομάδα του Θεοδωράκη και συνεργατών πραγματοποίησε μελέτη των αλλαγών στο ιξώδες της κυτταρικής μεμβράνης ενδοθηλιακών κυττάρων κάτω από συνθήκες αυξημένης ροής (shear stress).⁶⁰ Η ίδια ομάδα, για εκλεκτική χρώση της μεμβράνης ανέπτυξε μια σειρά λιπόφιλων παραγώγων της CCVJ (**46**) μεταξύ αυτών του FCVJ (**56**, **Σχήμα 28**), του CCVJ-TEG (**57**, **Σχήμα 28**) ή ακόμα και των πιο εκλεκτικών ως προς τον μεμβρανικό εντοπισμό τους **58α-γ** (**Σχήμα 28**).^{91,92} Αναφέρεται πως τα παράγωγα **58α-γ** «βάφουν» αποκλειστικά τη μεμβράνη παρουσιάζοντας το μικρότερο βαθμό διάχυσης στο κυτόπλασμα σε σχέση είτε με την πρόδρομη ένωση DCVJ (**45**) είτε με το φαρνέσυλο-παράγωγο FCVJ.⁹²



56 (FCVJ)



57 (CCVJ-TEG)



58α-γ

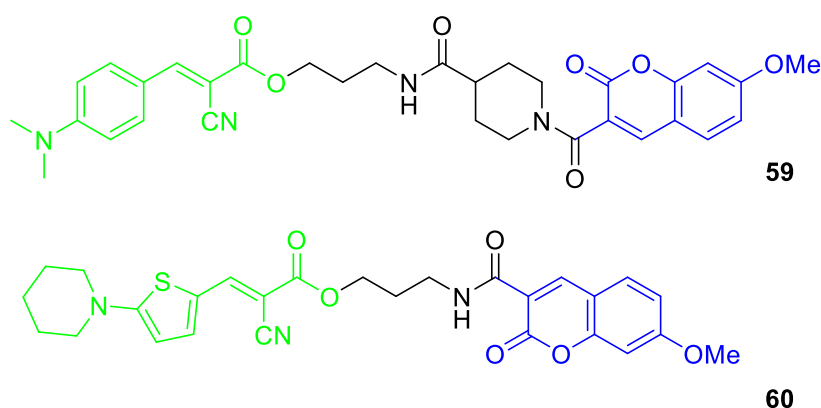
(n, m)= **α** (1, 8), **β** (1, 12), **γ** (6, 12)

Σχήμα 28: Λιπόφιλα παράγωγα ΜΣ για εκλεκτική στόχευση της κυτταρικής μεμβράνης.

Επιπρόσθετα, σε μία ακόμη δημοσίευσή τους, χρησιμοποίησαν τους στροφεείς DCVJ (45), CCVJ (46) και κάποια εστερικά παράγωγα του τελευταίου για τον προσδιορισμό του ιξώδους στο πλάσμα του αίματος, χωρίς μηχανική καταπόνηση των κυττάρων.⁹³ Η μέθοδος αυτή έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον διότι ως τώρα η μέτρηση μεγάλων όγκων δειγμάτων γίνεται αποκλειστικά με μηχανικά ιξωδόμετρα όπως για παράδειγμα τριχοειδούς ροής, πτήσης σωμάτων και περιστροφής. Παρόλα αυτά, η διαδικασία μέτρησης με αυτά είναι χρονοβόρα, υπάρχει ανάγκη για μεγάλους όγκους δειγμάτων (έως και 5 mL) ενώ απαιτείται σχολαστικός καθαρισμός των μεταλλικών επιφανειών μετά το πέρας των μετρήσεων, από πρωτεΐνες που ενδεχομένως να έχουν προσκολληθεί. Αντίθετα με αυτές τις μεθόδους, οι ΜΣ μπορούν να παρέχουν γρήγορα αποτελέσματα σε πραγματικό χρόνο χρησιμοποιώντας μικρούς όγκους δείγματος και με ακρίβεια τουλάχιστον ισάξια με αυτή των μηχανικών μεθόδων.⁷⁶ Παρά το γεγονός ότι οι ΜΣ έχουν δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά τον προσδιορισμό του ιξώδους στη μεμβράνη, τόσο αυτή όσο και το κυτόπλασμα παρουσιάζουν ανομοιογένεια η οποία αποτελεί πηγή σφάλματος. Συγκεκριμένα υπάρχει ανασφάλεια ως προς το αν οι αλλαγές στην ένταση των φθορισμοφόρων προέρχονται από το διαφορετικό ιξώδες που εντοπίζουν ή από τη διαφορετική τους συγκέντρωση. Αν και έχουν ήδη αναπτυχθεί φθορισμομετρικές τεχνικές ανεξάρτητες από τον παράγοντα συγκέντρωση, όπως η ανισοτροπία φθορισμού (FA) και η ανάκτηση φθορισμού μετά από φωτολεύκανση (FRAP), συναντώνται κάποιοι περιορισμοί στη χρήση τους.⁹⁴

Η ανάπτυξη μίας νέας οικογένειας φθορισμοφόρων, των αυτοβαθμονομούμενων χρωστικών (AX), αποτέλεσε τη μία προσέγγιση για τη λύση αυτού του προβλήματος. Η ιδέα ενός τέτοιου συστήματος υπήρχε ήδη από το 1993 όπου, στη δημοσίευση της Luby-Phelps και συνεργατών, χρησιμοποιήθηκε ένα μίγμα των καρβοκυανινών Cy3 και Cy5 (32, 33 **Σχήμα 16**) των οποίων ο λόγος των εντάσεων φθορισμού βρέθηκε ανάλογος του ιξώδους του μέσου.⁹⁵ Αυτό οφείλεται στη φύση του π-σκελετού ο οποίος στην Cy3 αποτελείται από 3 άτομα άνθρακα που αποτρέπουν τις ινδολικές μονάδες να έρθουν στο ίδιο επίπεδο και προσδίδουν ευελιξία περιστροφής, καθιστώντας εφικτή την ενδομοριακή στρέψη ως μηχανισμό αποδιέγερσης. Αντίθετα, τα 5 άτομα άνθρακα στην Cy5 επιτρέπουν στις ινδολικές μονάδες να βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο, καθιστώντας έτσι το μόριο πιο στιβαρό και λιγότερο ευαίσθητο στις αλλαγές του ιξώδους. Το σύστημα εφαρμόστηκε επιτυχώς σε ζωντανά κύτταρα με μικροέγχυση των χρωστικών χρησιμοποιώντας μόρια-μεταφορείς όπου, εφαρμόζοντας τη μέθοδο FRAP, προσδιορίστηκε το ιξώδες στο κυτόπλασμα και φάνηκε πως δε διαφέρει πολύ από αυτό

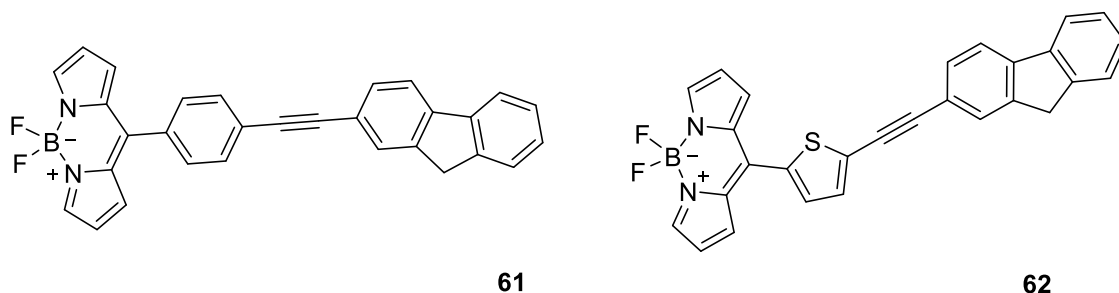
του νερού. Η εξέλιξη των ΑΧ προήλθε από την ομάδα των Haidekker και Θεοδωράκη όπου συντέθηκαν νέα μοριακά συστήματα τα οποία φέρουν δύο φθορισμοφόρα, ένα με εξαρτώμενη και ένα με ανεπηρέαστη από το ιζώδες ένταση φθορισμού (**59**, **60**, **Σχήμα 29**).^{96,97} Τα δύο φθορισμοφόρα σχηματίζουν ένα ζεύγος FRET όπου το κύριο φθορισμοφόρο (εν προκειμένω η κουμαρίνη, χρωματισμένη μπλε) είναι ο δότης ενέργειας με ένταση που δεν εξαρτάται από το ιζώδες ενώ το δευτερεύον παρουσιάζει ιδιότητες ΜΣ (χρωματισμένο πράσινο). Όταν φωτοβοληθεί αυτό το σύστημα, το κύριο φθορισμοφόρο εκπέμπει ποσότητα της απορροφούμενης ενέργειας ως φθορισμό, μέρος του οποίου απορροφάται από το δευτερεύον το οποίο εκπέμπει με τη σειρά του δικό του φθορισμό, έντασης ανάλογης με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται. Με αυτό τον τρόπο, η ένταση φθορισμού του πρώτου λειτουργεί σαν εσωτερικό πρότυπο με αποτέλεσμα να απαλείφονται παράγοντες όπως η τοπική συγκέντρωση του ΜΣ σε ένα ανομοιογενές περιβάλλον όπως το εσωτερικό του κυττάρου. Στο **Σχήμα 29** φαίνονται δύο παραδείγματα τέτοιων χρωστικών:



Σχήμα 29: ΑΧ που αναπτύχθηκαν από την ομάδα του Θεοδωράκη και συνεργατών.^{96,97}

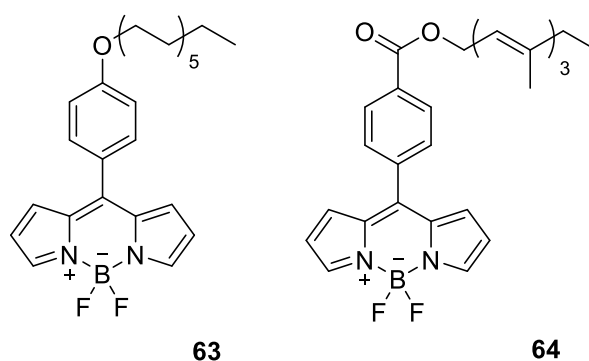
Συστήματα ΑΧ με διαφορετικούς τύπους μοριακών στροφών αναπτύχθηκαν από τις ομάδες των Kuimova-Ogilby, Peng και Farfán. Η πρώτη συνέθεσαν το διμερές πορφυρινών **49** (**Σχήμα 25**) το οποίο παρουσιάζει δύο διαφορετικές ζώνες φθορισμού στην περιοχή NIR από την στρεπτή και την επίπεδη διαμόρφωσή του, αντίστοιχα.⁷⁰ Ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται, η ένταση φθορισμού από την στρεπτή κατάσταση μεταβάλλεται όμως, με δεδομένη τη σταθερή ένταση φθορισμού από τη δεύτερη ζώνη, ο λόγος τους εξαρτάται από το ιζώδες απαλείφοντας άλλους παράγοντες που ενδεχομένως να αποτελέσουν πηγές σφάλματος. Η ομάδα του Peng συνέθεσε τη νέα καρβοκυανίνη **50** (**Σχήμα 25**) η οποία φέρει μία φορμυλομάδα που προσδίδει στο μόριο ιδιότητες ΜΣ.⁹⁸ Η λειτουργία της είναι όμοια με αυτή της ένωσης **49**. Η

ιδιαιτερότητά της είναι πως μπορεί να χρησιμοποιηθεί για υπολογισμό ιξώδους μέσω απεικόνισης χρόνου ζωής φθορισμού (Fluorescence Lifetime Imaging-FLIM) και ταυτόχρονα να ανιχνεύει αλλαγές μέσω του του λόγου των εντάσεων φθορισμού. Τέλος, η ομάδα του Farfán χρησιμοποίησε meso-υποκατεστημένα BODIPY σε συνδυασμό με σκελετό φλουορενίου ώστε να σχηματιστούν τα νέα μόρια AX (**61**, **62**, **Σχήμα 30**).⁹⁹



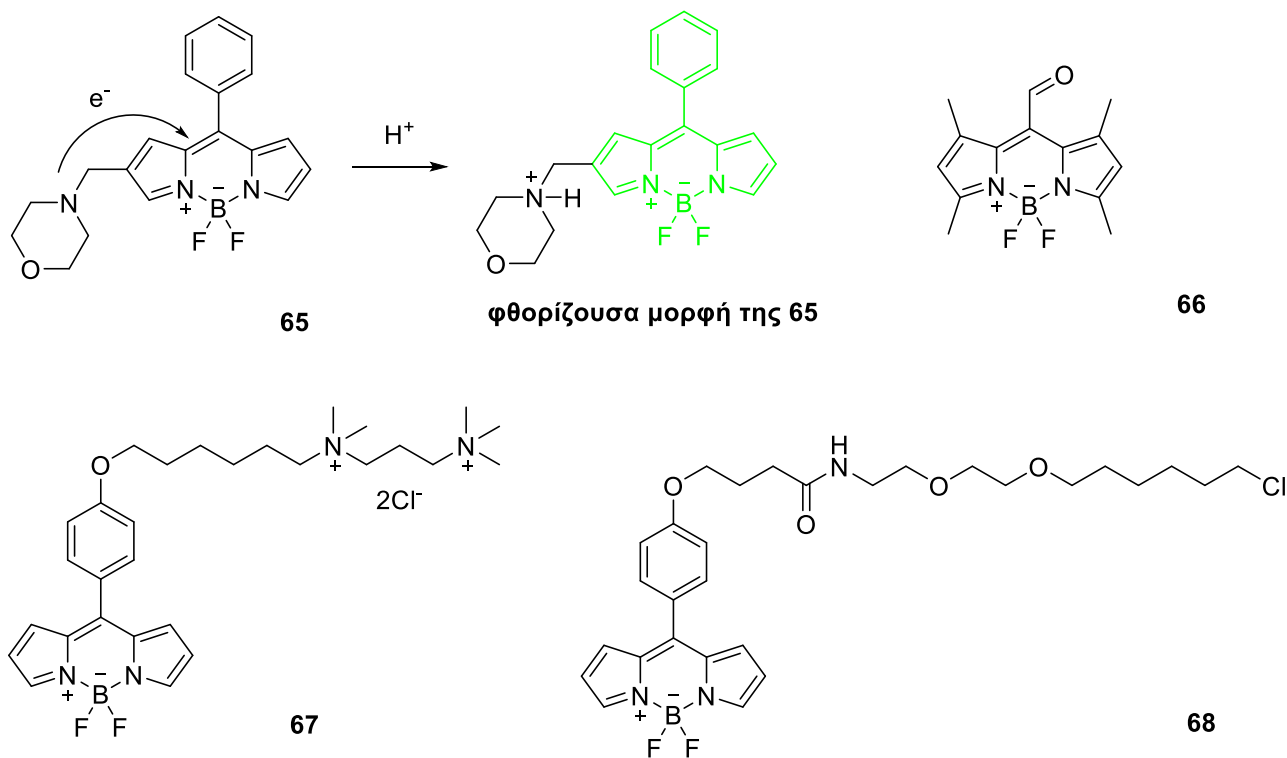
Σχήμα 30: AX που φέρουν BODIPY ως χρωμοφόρα με ιδιότητες ΜΣ.

Οι ΜΣ τύπου BODIPY είναι και για έναν ακόμα λόγο χρήσιμοι σε μετρήσεις όπου χρειάζεται να απαλειφθεί ο παράγοντας συγκέντρωσης της χρωστικής. Η μέτρηση του χρόνου ζωής φθορισμού, ενός εγγενούς και ανεξάρτητου από τη συγκέντρωση της χρωστικής, μεγέθους είναι αρκετά δημοφιλής μέθοδος στην ιξωδομετρία. Οι ΜΣ που έχουν παρουσιαστεί ως τώρα συνήθως έχουν χρόνους ζωής φθορισμού της τάξης των ps επομένως απαιτούν αρκετά ευαίσθητα όργανα για την μελέτη τους. Αντιθέτως, όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι στροφείς τύπου BODIPY έχουν αρκετά μεγαλύτερους χρόνους ζωής και έχουν αποδειχθεί πολύ καλύτεροι για τον προσδιορισμό ενδοκυτταρικού ιξώδους. Η ομάδα των Kuimova και Yahioglu συνέθεσε τους στροφείς που φαίνονται στο **Σχήμα 31** (**63**, **64**) οι οποίοι φέρουν υδρόφοβες αλυσίδες που τους καθιστούν μεμβρανοδιαλυτούς.^{100,101} Τα μόρια αυτά εντοπίζονται ενδοκυτταρικά στις μεμβράνες των διαφόρων οργανιδίων και με χρήση της FLIM παρατηρούνται ενδοκυτταρικά και επιτρέπουν τον υπολογισμό τιμών ιξώδους των μεμβρανών διαφόρων οργανιδίων.



Σχήμα 31: ΜΣ τύπου BODIPY με λιπόφιλες αλυσίδες.

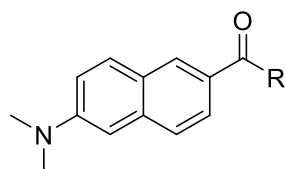
Οι στροφείς αυτού του τύπου έχουν μελετηθεί αρκετά ώστε να βρεθούν τρόποι εκλεκτικής στόχευσης κυτταρικών διαμερισμάτων. Ειδικότερα, η ομάδα του Χiao και συνεργατών παρασκεύασε ένα ανάλογο του βασικού σκελετού των BODIPY το οποίο στοχεύει εκλεκτικά το εσωτερικό των λυσοσωμάτων.¹⁰² Όπως φαίνεται στη δομή του μορίου (**65**, **Σχήμα 32**) η μορφολίνη προκαλεί απόσβεση του φθορισμού μέσω φωτοεπαγόμενης μεταφοράς ηλεκτρονίων (Photoinduced Electron Transfer-PET). Στο περιβάλλον των λυσοσωμάτων το pH είναι τόσο όξινο όσο χρειάζεται ώστε να πρωτονιωθεί το άτομο αζώτου της μορφολίνης και να επανέλθουν οι ιδιότητες του στροφέα. Σε μία άλλη δημοσίευση της ομάδας της Kuimova, η διπλά θετικά φορτισμένη λιπόφιλη αλυσίδα του στροφέα **67** (**Σχήμα 32**), επιτρέπει τον εκλεκτικό εντοπισμό του στην πλασματική μεμβράνη.¹⁰³ Η ίδια ομάδα συνέθεσε και ένα παράγωγο της γενικής δομής των BODIPY (**68**, **Σχήμα 32**) το οποίο μπορεί να λειτουργήσει ως φθορίζουσα «ετικέτα» πεπτιδίων τα οποία θα αποτελέσουν σημείο αναγνώρισης από πρωτεΐνες σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα.¹⁰⁴ Η σύνδεση πραγματοποιείται με την χλωρομεθυλομάδα στη λιπόφιλη αλυσίδα του μορίου. Τέλος, ο διαφορετικός ως προς την υποκατάσταση στη θέση 8 στροφέας **66** (**Σχήμα 32**) της ομάδας του Fan και συνεργατών εντοπίζεται αποκλειστικά στο κυτόπλασμα και οι φωτοχημικές του ιδιότητες προκύπτουν από την περιστροφή της meso-φορμυλομάδας.¹⁰⁵



Σχήμα 32: Δομικά ανάλογα ΜΣ τύπου BODIPY.

Οι ΜΣ έχουν χρησιμοποιηθεί και στην παρακολούθηση της διαδικασίας ανάπτυξης πολυμερών, είτε συνθετικών είτε φυσικών. Όσον αφορά την μελέτη ανάπτυξης συνθετικών πολυμερών, οι ΜΣ αρχικά είχαν χρησιμοποιηθεί από τον Loutfy και συνεργάτες ως ανιχνευτές των στατικών και δυναμικών αλλαγών του ελεύθερου όγκου μιας αντίδρασης πολυμερισμού.^{106,107} Παράμετροι που επηρεάζουν τον ελεύθερο όγκο είναι το μοριακό βάρος ή η αρχιτεκτονική γνωστών πολυμερών όπως το πολυστυρένιο ή ο πολυμεθακρυλικός μεθυλεστέρας. Για παράδειγμα, μελετήθηκε πως κατά την ανάπτυξη του πολυμερούς παρακολουθώντας την αύξηση του μοριακού βάρους ή την αλλαγή της τακτικότητάς του σε συνάρτηση με την κβαντική απόδοση του στροφέα, η τελευταία παρουσιάζει μια απότομη αύξηση που μπορεί να αποδοθεί στην αύξηση του βαθμού διακλάδωσης και τη δραστική μείωση του ελεύθερου όγκου.¹⁰⁸ Δύο από τα φυσικά πολυμερή που παρουσιάζουν ενδιαφέρον είναι τα βασικά συστατικά του κυτοσκελετού, τα ινίδια ακτίνης και οι μικροσωληνίσκοι. Είναι στην ουσία τα θεμέλια της κυτταρικής δομής και επηρεάζουν άμεσα τις λειτουργίες στο κυτόπλασμα και τη μεμβράνη. Η σύνδεση της G-ακτίνης με ATP οδηγεί σε συσσωμάτωση και εν τέλει στην παραγωγή F-ακτίνης που είναι το βασικό στοιχείο των ινιδίων ενώ οι μικροσωληνίσκοι αποτελούνται από τον πολυμερισμό των δυο υπομονάδων τουμπουλίνης, α και β . Και οι δύο φυσικές διαδικασίες έχουν παρακολουθηθεί με ΜΣ από τις ομάδες των Kung και Reed και του Takahashi και συνεργατών.^{109–111}

Οι ΜΣ λόγω σχηματισμού της κατάστασης TICT, είναι ευαίσθητοι και στις αλλαγές πολικότητας του περιβάλλοντός τους. Το χρωμοφόρο του PRODAN (**44**) είναι γνωστό από το 1979 όταν συντέθηκε από τους Weber και Farris στις διάφορες κετονικές μορφές του (**70**, **71**, **Σχήμα 33**) για την μελέτη των φασματοσκοπικών ιδιοτήτων τους.¹¹² Λόγω της ευαισθησίας τους στο ιξώδες και την πολικότητα του περιβάλλοντος, ειδικά τα πιο λιπόφιλα **44** και **71** αξιοποιήθηκαν στη μελέτη λιπιδικών διπλοστιβάδων.^{113,114} Αν και το LAURDAN (2-dodecanoyl-6-N,N-dimethyl naphthylamine) καθιερώθηκε σε αυτό τον τομέα, το PRODAN βρήκε και άλλες εφαρμογές. Σε μία εξ αυτών το 1986 ο MacGregor σε συνεργασία με τον Weber άλλαξαν την ομάδα R του καρβονυλίου σε 4-καρβοξυλο κυκλοξέυλο ώστε να μελετήσουν την πολικότητα του περιβάλλοντος του σημείου πρόσδεσης της αίμης στην μυοσφαιρίνη.¹¹⁵



R: -H = DAN (**69β**)

R: -Me = ACEDAN (**70**)

R: -Et = PRODAN (**44**)

R: $-(\text{CH}_2)_{10}\text{Me}$ = LAURDAN (**71**)

Σχήμα 33: Παράγωγα του ναφθαλενικού σκελετού DAN.

Από εκεί και πλέον πολλές ερευνητικές ομάδες ασχολήθηκαν με την αξιοποίηση των ιδιοτήτων αυτού του χρωμοφόρου το οποίο έγινε ιδιαίτερως δημοφιλές σε παράγωγα νουκλεοζιτών του DNA/RNA ως εργαλείο μελέτης της πολικότητας στο εσωτερικό και το γύρω περιβάλλον του γενετικού υλικού. Ειδικότερα, το χρωμοφόρο έχει δοκιμαστεί να συνδεθεί στη θέση 2' του σακχαρικού τμήματος, στις εξωκυκλικές αμινομάδες N^4 και N^2 της κυτοσίνης και γουανίνης αντίστοιχα, στην C^5 θέση της ουρακίλης αλλά και σε άλλες θέσεις με δεσμό C-C και στην O^8 θέση της γουανίνης. Οι πρώτοι που το αναφέρουν είναι η ομάδα του Yamana και συνεργατών οι οποίοι μελέτησαν το κατά πόσο μπορεί να συνδεθεί το χρωμοφόρο στη θέση του σακχάρου και το αν μπορούν να σχηματιστούν ολιγονουκλεοτίδια.¹¹⁶ Σε αυτή την εφαρμογή, το χρωμοφόρο της αλδεΐδης χρησιμοποιείται ως ο δότης ενέργειας σε ζεύγος FRET (δέκτες αποτελούν μόρια φλουορεσκεΐνης) ώστε να μπορούν να εκτιμηθούν τα δομικά χαρακτηριστικά ενός ολιγονουκλεοτιδίου σε αποστάσεις έως και 100 Å.¹¹⁷ Η ομάδα του Majima και συνεργατών συνέδεσε το χρωμοφόρο στις εξωκυκλικές αμινομάδες πουρινών και πυριμιδινών με στόχο να μελετηθεί η πολικότητα εντός των αλυσίδων του DNA στις διαμορφώσεις B και Z.^{118,119} Σε δημοσιεύσεις των Okamoto και Tainaka, το χρωμοφόρο της αλδεΐδης συνδέεται στο σκελετό της πουρίνης/πυριμιδίνης μέσω δεσμού C-C, κυρίως στη θέση 5' της ουρακίλης.¹²⁰⁻¹²² Από τα παράγωγα που προκύπτουν συντίθενται ολιγονουκλεοτίδια τα οποία χρησιμοποιούνται για τη μελέτη του μικροπεριβάλλοντος γύρω από το γενετικό υλικό. Σε μία ενδιαφέρουσα εργασία της ίδιας ερευνητικής ομάδας, με τη σύνθεση ενός τροποποιημένου νουκλεοζίτη που φθορίζει υπό συνθήκες μπορεί να εντοπιστεί στο DNA η ύπαρξη μέθυλο-κυτοσίνης, μιας σημαντικής μετάλλαξης που σηματοδοτεί παθολογική κατάσταση.¹²³

Στο κομμάτι ανίχνευσης πρωτεϊνικών δομών, οι ΜΣ έχουν αξιοποιηθεί σε μεγάλο βαθμό στον εντοπισμό συσσωματωμάτων. Εξωγενείς στρεσογόνοι παράγοντες επηρεάζουν την ομοιόσταση των πρωτεϊνών και οδηγούν σε κακή αναδίπλωση όπως και σε συσσωμάτωσή τους. Αυτές οι διαδικασίες προηγούνται αρκετών παθογενετικών

πορειών όπως καρδιαγγειακών παθήσεων, μεταβολικών συνδρόμων, νευροεκφυλιστικών ασθενειών αλλά και καρκίνου.^{124,125} Μία γενική μέθοδος αναπτύχθηκε από την ομάδα του Zhang και συνεργατών όπου με στόχο τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό συσσωματωμάτων χρησιμοποίησαν τη μέθοδο της φθορίζουσας σήμανσης συνδέοντας την DCVJ με ένα τμήμα πρωτεΐνης. Ο σκοπός είναι αυτό το τμήμα να αναγνωριστεί από συσσωματώματα που θα εντοπιστούν σε μια κατάσταση στρες και να ενσωματωθεί σε αυτά ώστε το φθορισμοφόρο να βρεθεί σε περιβάλλον χαμηλού ελεύθερου όγκου και να παραγάγει φως.¹²⁶

Ιδιαίτερο βάρος έχει δοθεί στην μελέτη διάφορων πτυχών της νόσου Alzheimer όπου οι ΜΣ έχουν βρει σημαντική εφαρμογή και συγκεκριμένα η ThT, η οποία είναι ο στροφέας που χρησιμοποιείται κατεξοχήν για αυτό το σκοπό. Η τελευταία έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση των Αβ πεπτιδίων που εναποτίθενται και σχηματίζουν αδιάλυτα ινώδη συσσωματώματα. Έχει υψηλή συγγένεια πρόσδεσης για τα ολιγομερή που σχηματίζουν τα Αβ πεπτιδία όταν λαμβάνουν διαμόρφωση β-φύλλου. Αρχικά περιοριζόταν μόνο για την ανίχνευση όμως στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε και για την ποσοτικοποίησή τους παρουσία πρόδρομων πρωτεϊνών.⁴⁹ Αν και η συνεισφορά της είναι κρίσιμη, δεν έχει την ικανότητα να ξεχωρίσει ποια πεπτιδία ευθύνονται για την νόσο Alzheimer και ποια για άλλες συναφείς νόσους ώστε να βελτιστοποιηθεί η στόχευσή τους ενώ μπορεί να ανιχνεύσει τα συσσωματώματα μόνο εφόσον έχουν αναπτυχθεί αρκετά. Κοντά στη λύση αυτών των προβλημάτων ήρθε η ομάδα του Θεοδωράκη όπου ανέπτυξε μόρια με ιδιότητες ΜΣ, με υψηλή συγγένεια για τα ολιγομερή, τα οποία ανήκουν στην οικογένειας ΜΣ των DBMN. Έχοντας συνθέσει παράγωγα του χρωμοφόρου DAN (**69β**), στη δημοσίευσή τους το 2012 αξιοποίησαν τους εστέρες αυτών των στροφέν με ομάδες πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG) ώστε να εντοπίσουν τα συσσωματώματα.¹²⁷ Η επιτυχία τους έγκειται στην διαμόρφωση μίας μεθόδου ώστε να μπορούν να διαχωριστούν τα αμυλοειδή πεπτιδία που σχετίζονται με τη νόσο του Alzheimer από αυτά που σχετίζονται με άλλες νόσους. Καθότι δεν υπάρχει η πολυτέλεια αναμονής για ανάπτυξη μεγάλων σε όγκο συσσωματωμάτων, το 2015 η ίδια ομάδα χρησιμοποιώντας αντίστοιχους δομικά ΜΣ και με χρήση της φασματοσκοπίας συσχέτισης φθορισμού ή (Fluorescence Correlation Spectroscopy-FCS), κατάφερε να αναπτύξει μέθοδο ανίχνευσης ολιγομερών σε πρώιμο στάδιο με υψηλότερη ευαισθησία από αυτή που παρέχει η μέθοδος με την ThT.¹²⁸ Στην τελευταία δημοσίευσή τους, πρόσθεσαν έναν ακόμα λίθο στον τομέα μελέτης των αμυλοειδών πεπτιδίων με χρήση ΜΣ. Μελετώντας το εσωτερικό των πεπτιδίων, υπολόγισαν

προσεγγιστικά τη λιποφιλικότητά του ώστε να σχεδιάσουν ανιχνευτές που θα έχουν τη βέλτιστη ικανότητα πρόσδεσης. Ως αποτέλεσμα, παρουσίασαν μια βελτιωμένη σειρά ΜΣ με υψηλότερη συγγένεια πρόσδεσης και ισχυρότερες ιδιότητες φθορισμού.¹²⁹

Γενικά, τα περισσότερα παραδείγματα στόχευσης και παρατήρησης πρωτεϊνικών δομών που έχουν αναφερθεί, αξιοποιούν τις ιδιότητες ανιχνευτών που ενεργοποιούνται μέσω διακοπής του μηχανισμού μεταφοράς ενέργειας (π.χ. FRET, PET) συνήθως με ενζυμική διάσπαση του σκελετού που συνδέει τα χρωμοφόρα. Αυτό όμως περιορίζει τις δυνατότητες απεικόνισης πρωτεϊνικών υποστρωμάτων σε αυτά που μπορούν να δράσουν κατ' αυτό τον τρόπο. Οι ΜΣ είναι ανώτερης φύσης πρωτεϊνικοί ανιχνευτές διότι με απλή δέσμευση, όχι μόνο μπορούν να υποδείξουν την ύπαρξη μιας πρωτεΐνης, όπως άλλωστε κάνουν και οι φθορίζουσες ανοσολογικές τεχνικές, αλλά μπορούν να σκιαγραφήσουν και το περιβάλλον της, επιτρέποντας τη μελέτη της δομής και της συναρμογής της. Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί λίγα παραδείγματα ΜΣ ως ανιχνευτές πρωτεϊνών και ενζύμων. Συγκεκριμένα η ομάδα του Tan και συνεργατών έχει συνεισφέρει σημαντικά σε αυτόν τον τομέα, έχοντας χρησιμοποιήσει το μεθυλεστέρα της CCVJ ώστε να προσδιορίσουν την ποσότητα ανθρώπινης αλβουμίνης ορού (HSA) στα ούρα.¹³⁰ Έδειξαν πως η σύνδεση του ΜΣ στην πρωτεΐνη γίνεται εκλεκτικά και επιφέρει δραματική αύξηση της έντασης του φθορισμού έως και 400 φορές. Η εκλεκτικότητα και η θέση πρόσδεσης μελετήθηκαν μέσω αντικατάστασης του ΜΣ από γνωστές φαρμακευτικές ενώσεις με παρακολούθηση της μείωσης του φθορισμού. Σε μια άλλη εργασία για στόχευση του ενζύμου MGMT (Ο⁶-μεθυλιωμένη μεθυλοτρανσφεράση της γουανίνης), ακολουθήθηκε η στρατηγική της φθορίζουσας σήμανσης με σύνδεση γνωστού υποστρώματος του ενζύμου με τη CCVJ.¹³¹ Το αποτέλεσμα ήταν πως κατά την πρόσδεση του μορίου στο καταλυτικό κέντρο, λόγω περιορισμένου περιβάλλοντος, περιορίζεται η ελεύθερη περιστροφή του στροφέα και παράγεται φθορισμός. Αυτή η ιδιότητα χρησιμοποιήθηκε για την παρατήρηση του ενζύμου σε ζωντανά κύτταρα όπως και για τη μελέτη μείωσης φθορισμού είτε κατά την αντικατάσταση του ιχνηθέτη από γνωστό αναστολέα είτε κατά την αποσύνθεση του ενζύμου στο κύτταρο. Η ίδια ομάδα χρησιμοποιώντας ως ΜΣ δομικά ανάλογα της ThT, στόχευσε και την ανθρώπινη καρβονική ανυδράση (hCAII) η οποία παρατηρήθηκε και ενδοκυτταρικά.¹³²

Σε μια πολύ ενδιαφέρουσα εργασία, οι Teo, Ghadessy και συνεργάτες συνέθεσαν επισημασμένα με φθορίζουσα «ετικέτα» πεπτιδία με τη CCVJ, τα οποία αποτελούν υπόστρωμα μιας πρωτεΐνης (Mdm2). Εν συνεχεία, αφού σχηματιστεί κορεσμένο, από άποψη πρόσδεσης, σύμπλοκο πρωτεΐνης-στροφέα, προσδιορίζουν τη σταθερά

πρόσδεσης μορίων παρουσία του συμπλόκου που παράγει το μέγιστο φθορισμό, παρακολουθώντας τη μείωσή του ανάλογα με την ισχύ του εν δυνάμει αναστολέα.¹³³

1.5 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως μοριακός στόχος

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (**GP**) μαζί με την συνθάση του γλυκογόνου (**GS**) είναι τα δύο πιο σημαντικά ρυθμιστικά ένζυμα που ελέγχουν την ομοιόσταση της γλυκόζης και το μεταβολισμό του γλυκογόνου γενικότερα. Η πρώτη παίζει καταλυτικό ρόλο στην διάσπαση του αποθηκευμένου στον οργανισμό γλυκογόνου, το οποίο αποτελεί τη βασικότερη αποθήκη ενέργειας μετά τον λιπώδη ιστό. Η **GP** είναι ένα ομοδιμερές ένζυμο με υπομονάδες μοριακού βάρους περίπου 97 kDa το οποίο συναντάται σε 3 ισομορφές, την ηπατική, τη μυϊκή και την εγκεφαλική και καταλύει την αντίδραση απόσπασης ενός μορίου γλυκόζης από την αλυσίδα του γλυκογόνου και τη μετατροπή της σε 1'-φωσφορυλιωμένη γλυκόζη. Όσον αφορά το λειτουργικό της κομμάτι, μπορεί να υπάρξει σε μια φωσφορυλιωμένη ενεργή και μια μη-φωσφορυλιωμένη ανενεργή κατάσταση (**GPa** και **GPb** αντίστοιχα), καθεμιά από τις οποίες μπορεί να βρίσκεται σε μια διαμόρφωση υψηλής συγγένειας για το υπόστρωμα (R: relaxed) ή σε μια χαμηλής συγγένειας (T: tense).¹³⁴

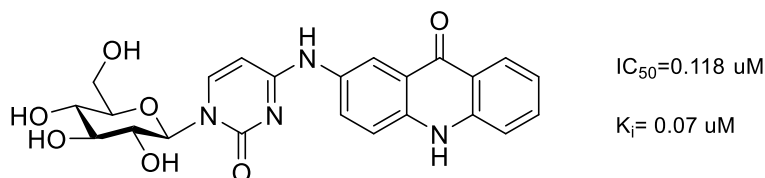
Αυτό το ένζυμο έχει καθιερωθεί πλέον ως μοριακός στόχος για την καταπολέμηση ασθενειών με τις οποίες σχετίζεται άμεσα, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (ΣΔΤ2) ή ακόμα και ορισμένες μορφές καρκίνου (δερματικός, καρκίνος του μαστού).¹³⁵ Ο ΣΔΤ2 χαρακτηρίζεται από μειωμένη απόκριση του οργανισμού στην ινσουλίνη με επακόλουθο ιδιαιτέρως αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα και διαταραχή ρύθμισης της λειτουργίας της **GP**. Συμπτωματολογικά, ο ΣΔΤ2 μπορεί μακροπρόθεσμα να οδηγήσει σε παθήσεις των οφθαλμών, των νεφρών ακόμα και της καρδιάς (4πλάσια πιθανότητα πρόκλησης εμφράγματος σε πάσχοντα από ΣΔΤ2 ασθενή), υποβαθμίζοντας σημαντικά την ποιότητα ζωής των ασθενών. Οι ως τώρα θεραπείες, αν και αποτελεσματικές, συνοδεύονται από παρενέργειες όπως υπερινσουλιναμία ή υπογλυκαιμία αλλά και από το γεγονός ότι δεν έχουν καθορισμένο μοριακό στόχο, κάτι που θα βοηθούσε εμφανώς στο να σχεδιαστούν αποτελεσματικότερες φαρμακευτικές ενώσεις.¹³⁶ Με το 9% του παγκόσμιου πληθυσμού να νοσεί από ΣΔΤ2 και να σημειώνονται τουλάχιστον 1.5 εκατομμύριο θάνατοι ετησίως, μια εναλλακτική προσέγγιση στην αντιμετώπιση της νόσου είναι αναγκαία.¹³⁷ Η αναστολή της **GP** μπορεί να συμβάλει στη μείωση της ενδογενώς παραγόμενης γλυκόζης, γεγονός που μπορεί να «ανακουφίσει» τον οργανισμό από τις υψηλές συγκεντρώσεις της και να επιτρέψει

την επαναφορά της ισορροπίας. Πράγματι, έχουν πραγματοποιηθεί οι πρώτες κλινικές δοκιμές για αναστολέα της **GP** με στόχο τη θεραπεία του ΣΔΤ2.¹³⁸

Η μείωση δραστηριότητας της **GP** και η παράλληλη συσσώρευση του γλυκογόνου σε καρκινικούς ιστούς, έχουν φανεί να είναι αποτελεσματικά για τη μείωση του πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων.¹³⁹ Πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως ορισμένες καρκινικές σειρές εκφράζουν την εγκεφαλική ισομορφή της **GP** παρά το γεγονός ότι ο μητρικός ιστός δεν το κάνει. Επιπρόσθετα, έχειδειχθεί πως τα καρκινικά κύτταρα, στο περιβάλλον ενός όγκου, βιώνουν συνθήκες υποξίας οι οποίες τα στρεσάρουν και τα αναγκάζουν να εκφράσουν ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό του γλυκογόνου, μεταξύ αυτών και τη **GP**. Ο λόγος έκφρασης τέτοιων ενζύμων είναι διότι απαιτούνται για την επιβίωση των κυττάρων καθώς, καταβολίζουν το γλυκογόνο και τροφοδοτούν το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών, τη βιοσύνθεση νουκλεοτιδίων και την προστασία από δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) που παράγονται από συμβατικές θεραπείες.¹⁴⁰ Αυτός ο επαναπρογραμματισμός του μεταβολισμού υποδεικνύει μια γενικότητα για έκφραση και αξιοποίηση ενζύμων όπως της **GP**. Μέχρι στιγμής έχουν συντεθεί και είναι πλέον εμπορικά διαθέσιμοι αναστολείς της **GP**, με κάποιους εξ αυτών να έχουν δοκιμαστεί σε καρκινικές σειρές και να έχουν δείξει πως προκαλούν μείωση πολλαπλασιασμού του αριθμού των κυττάρων.^{141,142}

Έχει γίνει σαφές ως τώρα πως η αναστολή της **GP** αποτελεί έναν πολλά υποσχόμενο τομέα και ένα σημαντικό θετικό χαρακτηριστικό είναι η ύπαρξη πολλών σημείων στη δομή του αλλοστερικού αυτού ενζύμου που μπορούν να αξιοποιηθούν ως στόχοι. Συγκεκριμένα, τα κέντρα πρόσδεσης που υπάρχουν είναι το καταλυτικό, το αλλοστερικό ή θέση πρόσδεσης της AMP, το κέντρο αποθήκευσης γλυκογόνου, το καφεϊνικό κέντρο και το κέντρο ινδολίων.¹⁴³ Η σύνθεση ισχυρών αναστολέων έχει σημειώσει σημαντική πρόοδο εδώ και περίπου 30 χρόνια κατά τη διάρκεια των οποίων μελετάται, με αποκορύφωμα τόσο τους αναστολείς οι οποίοι είναι πλέον εμπορικά διαθέσιμοι όσο και αυτούς που βρίσκονται στη φάση κλινικών δοκιμών. Το εργαστήριό μας γνωρίζει πολύ καλά τη σύνθεση αναστολέων του καταλυτικού κέντρου με βάση τον ορθολογικό σχεδιασμό φαρμάκων^{144,145} με κυριότερο επίτευγμα τη σύνθεση του πρώτου ισχυρού και φθορίζοντος αναστολέα που κατευθύνεται στο καταλυτικό κέντρο (**GLAC**, **72**, **Σχήμα 34**).¹⁴⁶

GLAC



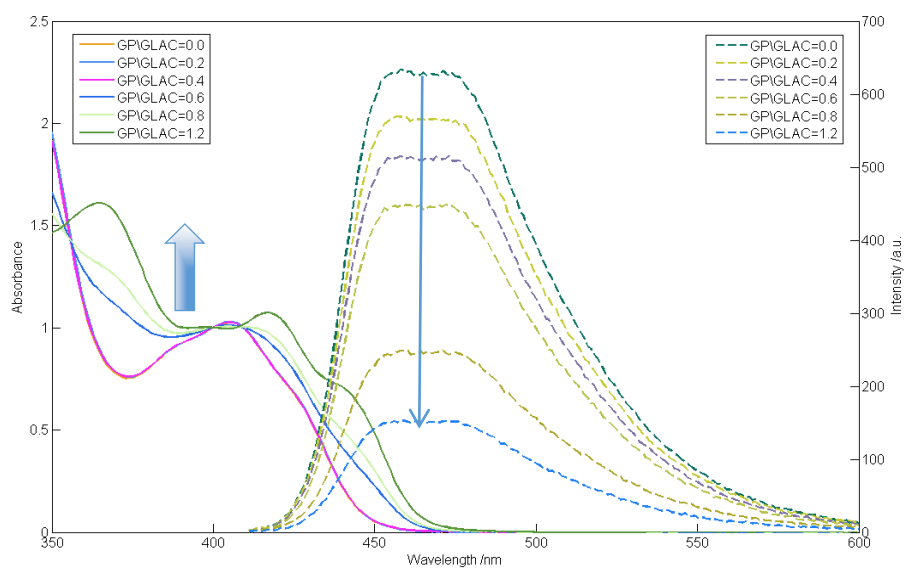
72

Σχήμα 34: Ο ισχυρότερος και φθορίζων αναστολέας που έχει συνθέσει το εργαστήριό μας.

Όπως έχει αναλυθεί σε προηγούμενες παραγράφους, η χρήση ιχνηθετών στην κυτταρική βιολογία είναι σημαντική για την μελέτη βιομορίων με στόχο την καλύτερη κατανόηση της λειτουργίας τους και ο ιδανικός τρόπος για να γίνει αυτό είναι μέσω φθορισμομετρικών τεχνικών. Η επιτυχία του αναστολέα **GLAC** έγκειται στο γεγονός πως η μελέτη των φασμάτων απορρόφησης του **GLAC** σε διαλύματα μεταβαλλόμενου pH και η σύγκρισή τους με τα αντίστοιχα φάσματα του συμπλόκου **GP:GLAC** αποκάλυψε νέα στοιχεία συμπεριφοράς του μορίου αλλά και ένα νέο, άγνωστο ως τώρα, χαρακτηριστικό του ενζύμου και συγκεκριμένα τη συμπεριφορά του καταλυτικού κέντρου ως ένα υψηλά αλκαλικό περιβάλλον.^{146,147} Θεωρητικά ο αναστολέας **GLAC** θα μπορούσε να λειτουργήσει και φθορισμομετρικά ως μόριο-ιχνηθέτης του καταλυτικού κέντρου της **GP** και να επιτρέψει την *in vitro* επισκόπησή της σε πραγματικό χρόνο. Αν και ο **GLAC** πληροί πολλές από τις προϋποθέσεις για να αξιοποιηθεί κατά αυτόν τον τρόπο, παρατηρήθηκε πως η εισαγωγή του στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου οδηγεί σε απόσβεση του φθορισμού του όπως φαίνεται στην **Εικόνα 11**.

Ένας ιδανικός φθορίζων αναστολέας της **GP**, θα εμφάνιζε φθορισμό μόνο αν προσδενόταν στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου, δηλαδή θα είχε τις ιδιότητες ενός μοριακού στροφέα, όπως αυτές αναλύθηκαν παραπάνω. Η εμπειρία του εργαστηρίου μας στη σύνθεση ισχυρών αναστολέων του καταλυτικού κέντρου, και μια μεγάλη βιβλιοθήκη συνθετικών ενώσεων με ποικίλες τιμές σταθεράς αναστολής, που έχουμε στη διάθεσή μας, έχει υποδείξει τα απαραίτητα δομικά χαρακτηριστικά που απαιτούνται από έναν αναστολέα του καταλυτικού κέντρου ώστε να εμφανίζει μεγάλη συγγένεια για το ένζυμο. Εάν αυτά συνδυαστούν σε ένα μόριο το οποίο συγχρόνως θα εμφανίζει ιδιότητες ΜΣ, το αποτέλεσμα θα είναι ένας φθορίζων αναστολέας, ιχνηθέτης της *in vitro* λειτουργίας της **GP** σε κυτταρικό επίπεδο. Αυτό μπορεί να αξιοποιηθεί στην παρατήρηση του ενζύμου σε ενδοκυτταρικό περιβάλλον, στη διαφοροποίηση ενός υγιούς από έναν καρκινικό ιστό αλλά και στην ανάπτυξη μιας φθορισμομετρικής

μεθόδου προσδιορισμού ισχυρότερων αναστολέων. Οι προσπάθειες στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας προς αυτό το σκοπό θα αναλυθούν στα επόμενα κεφάλαια.

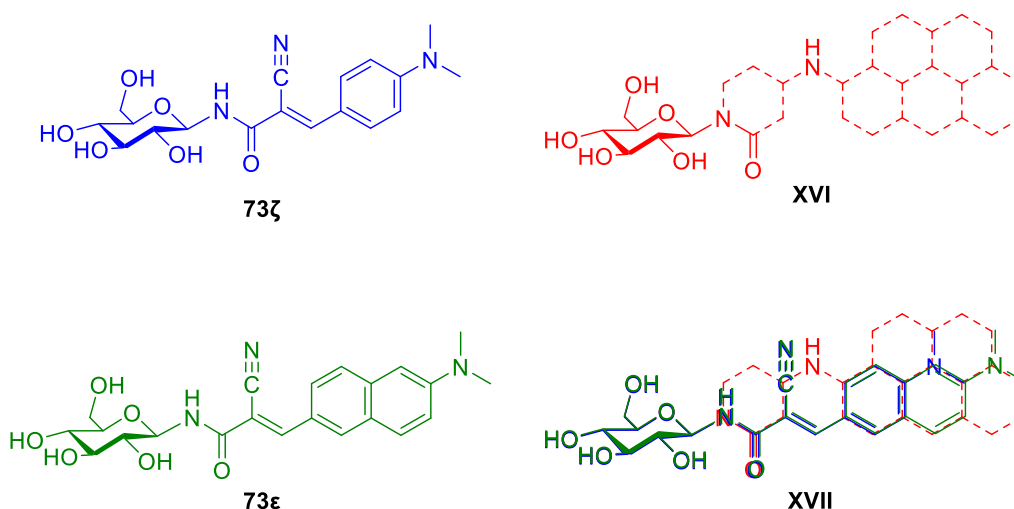


Εικόνα 11: Μεταβολή του φθορισμού του αναστολέα GLAC σε περιβάλλον αυξανόμενης συγκέντρωσης GP (τα βέλη υποδεικνύουν την αύξηση συγκέντρωσης του ενζύμου).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ-ΘΕΩΡΙΑ ΤΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ

2.1 Σκοπός της Εργασίας

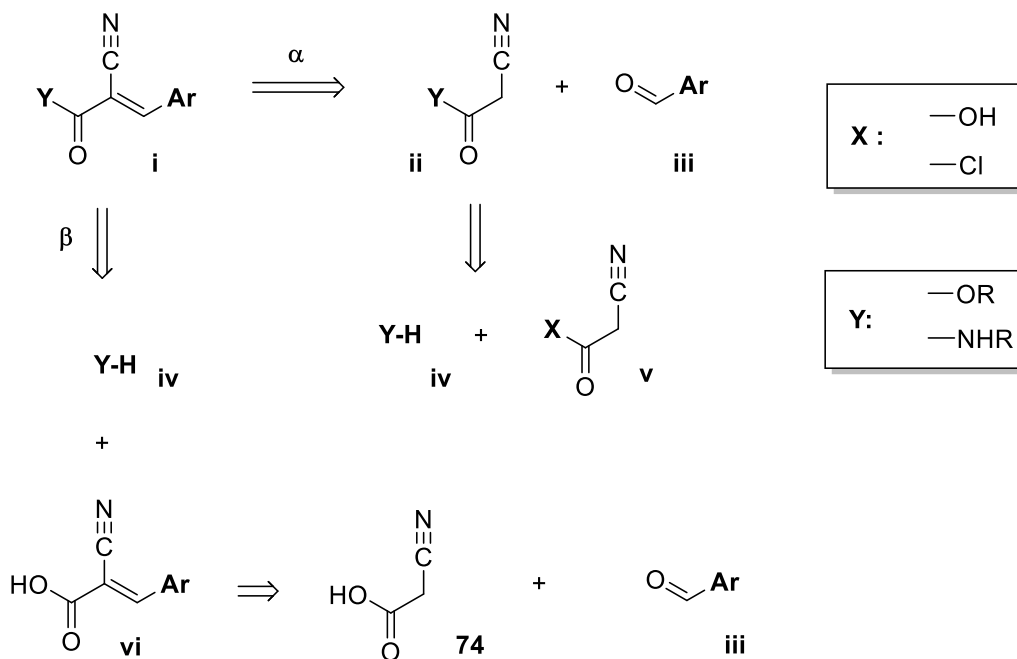
Με βάση όσα αναφέρθηκαν στις προηγούμενες παραγράφους, στόχοι της παρούσας εργασίας ήταν η σύνθεση αναστολέων του καταλυτικού κέντρου της **GP** οι οποίοι έχουν και ιδιότητες μοριακών στροφένων και η μελέτη των φωτοχημικών ιδιοτήτων τους. Βασικό δομικό στοιχείο για τη δέσμευση τέτοιου είδους αναστολέων στο καταλυτικό κέντρο είναι ο σκελετός της β -D-γλυκοπυρανόζης, ο οποίος αναγνωρίζεται από το ένζυμο. Είναι επίσης γνωστό πως στην κατεύθυνση του β -ανωμερικού κέντρου της γλυκόζης, εκτείνεται στο καταλυτικό κέντρο το β -κανάλι με διαστάσεις $15 \times 10 \times 5$ Å (μήκος*ύψος*πλάτος) το οποίο παρουσιάζει ιδιαίτερη συγγένεια για επίπεδα αρωματικά συστήματα. Σε προηγούμενη διδακτορική διατριβή του εργαστηρίου, μετά από σύνθεση μίας μεγάλης οικογένειας συναφών ενώσεων βρέθηκε, με βάση τα κινητικά και κρυσταλλογραφικά αποτελέσματα, ότι οι ισχυροί αναστολείς καταλαμβάνουν το χώρο που εμπίπτει στην γενική δομή **XVI** (**Σχήμα 35**).¹⁴⁸ Τα μόρια που συντέθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας (δομές **73ζ**, **73ε**, **Σχήμα 35**) φέρουν τα απαραίτητα χαρακτηριστικά που αναφέρθηκαν. Συγκεκριμένα, πρόκειται για αρωματικά αμίδια της 1- β -D-γλυκοπυρανοζυλαμίνης, όπου το αρωματικό τμήμα ανήκει στην κατηγορία των (*E*)-2-κυανο-3-αρυλακρυλικών οξέων, γνωστών χρωμοφώρων με ιδιότητες μοριακών στροφένων (**Σχήμα 22**, **Παρ.1.4.1**). Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 35**, οι προτεινόμενες δομές ταιριάζουν χωρικά στη γενική δομή **XVII**.



Σχήμα 35: Ενώσεις στόχοι (δομές **73ζ**, **73ε**) και υπέρθεση (**XVII**) με τη χωρική δομή **XVI** (οι στικτές γραμμές συμβολίζουν αρωματικά συστήματα).

2.2 Θεωρία της Σύνθεσης

Στη βιβλιογραφία είναι γνωστά αρκετά παράγωγα της παραπάνω οικογένειας των (*E*)-2-κυανο-3-αρυλακρυλικών οξέων. Η σύνθεση τέτοιων μορίων είναι αρκετά απλή και ο σχεδιασμός της συνοψίζεται στο παρακάτω ρετροσυνθετικό σχήμα (**Σχήμα 36**):

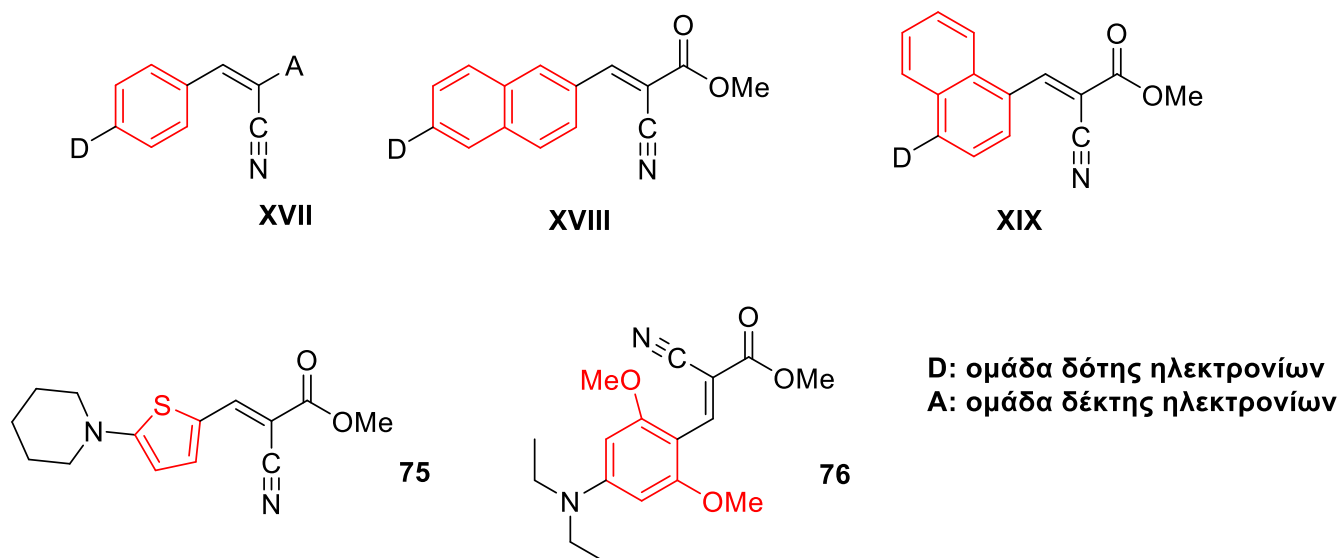


Σχήμα 36: Ρετροσυνθετικό σχήμα για τη σύνθεση παραγώγων (*E*)-2-κυανο-3-αρυλακρυλικών οξέων.

Η γενική δομή **i** των παραγώγων μπορεί να προκύψει από δύο συνθετικά παρόμοια μονοπάτια (**α** ή **β**, **Σχήμα 36**) τα οποία διαφέρουν στο πότε σχηματίζεται το α,β-ακόρεστο σύστημα. Η πορεία που ακολουθείται κατά κόρον στη βιβλιογραφία είναι η σύζευξη μίας αρυλαλδεΐδης (**iii**) με υποκατεστημένα αμίδια ή εστέρες (**ii**) του κυανοξικού οξέος (**74**) μέσω μίας αντίδρασης καρβονυλικής συμπύκνωσης Knoevenagel. Οι ενώσεις **ii** μπορούν να προκύψουν από αντίδραση των αντίστοιχων αμινών ή αλκοολών **iv** είτε με το ίδιο το κυανοξικό οξύ σε συνθήκες σύζευξης είτε με το χλωρίδιό του (γενική δομή **v**). Σε μία λίγο διαφορετική προσέγγιση, πρώτο βήμα αποτελεί η σύνθεση των (*E*)-2-κυανο-3-αρυλακρυλικών οξέων **vi** τα οποία έχουν ως πρώτες ύλες το **74** και την αντίστοιχη αρυλαλδεΐδη **iii** και πάλι με αντίδραση Knoevenagel. Στη συνέχεια τα νέα αρωματικά οξέα που προκύπτουν αντιδρούν με τις αμίνες ή αλκοόλες **iv** για την παρασκευή των τελικών προϊόντων. Είναι φανερό πως σημαντικό ρόλο στη παραπάνω σύνθεση παίζει η αντίδραση Knoevenagel, χάρη στην

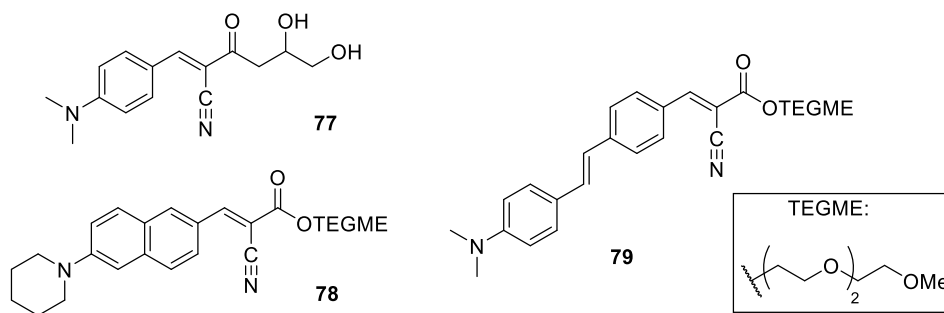
οποία δημιουργείται το ακόρεστο σύστημα με συγκεκριμένη στεreoχημεία. Η αντίδραση αυτή θα αναλυθεί εκτενώς στις παρακάτω παραγράφους.

Η ομάδα του Θεοδωράκη, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο **α**, έχει παρουσιάσει ένα εύρος συνθετικών παραγώγων που ανήκουν στην κατηγορία των μοριακών στροφών.^{149–151} Στη δημοσίευσή τους το 2010¹⁴⁹ περιέχεται ένα πλήθος ενώσεων, οι οποίες έχουν ως σημαντική διαφορά το αρωματικό σύστημα που μεσολαβεί μεταξύ των ομάδων δότη και δέκτη ηλεκτρονίων. Ειδικότερα, στο παρακάτω **Σχήμα 37** φαίνονται οι τρεις γενικές δομές στόχοι (**XVII**, **XVIII**, **XIX**) και δύο συγκεκριμένα παραδείγματα (**75**, **76**) όπου κόκκινα χρωματισμένο είναι το αρωματικό σύστημα:



Σχήμα 37: Ομάδες μοριακών στροφών.¹⁴⁹

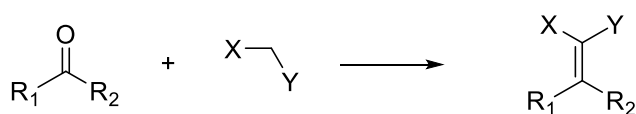
Οι ομάδες δότες ηλεκτρονίων είναι συνήθως *N,N*-διαλκυλαμινο-ομάδες όπως διμεθυλάμινο ή διαιθυλάμινο αλλά και κυκλικές όπως πιπεριδίνυλο ενώ οι ομάδες δέκτες συνήθως είναι εστέρες όπως στις ενώσεις **75** και **76** ή σουλφονικές ομάδες.¹⁴⁹ Σε μία άλλη δημοσίευση του 2010¹⁵⁰ η οικογένεια των γνωστών μοριακών στροφών εμπλουτίστηκε με παράγωγα τα οποία φέρουν υδρόφιλες ομάδες όπως διόλες ή τριαιθυλενογλυκόλη. Στο παρακάτω **Σχήμα 38** φαίνονται αντιπροσωπευτικά παραδείγματα τέτοιων ενώσεων (**77-79**, **Σχήμα 38**).



Σχήμα 38: Υδροφιλα παράγωγα μοριακών στροφένων.¹⁵⁰

Τέλος, η ίδια ερευνητική ομάδα σε δημοσίευση του 2011 εστίασε τη σύνθεσή της σε ναφθαλενικά παράγωγα τα οποία έχουν αναφερθεί σε προηγούμενη ενότητα (**Παρ. 1.4.2**) και στοχεύουν αμυλοειδή πεπτίδια.¹⁵¹ Συνθετικά, δοκίμασαν διαφορετικές ομάδες δότες μεταξύ αυτών πιπεριδίνη, πιπεραζίνη και μορφολίνη όπως επίσης και διαφορετικές εστερικές ομάδες οι οποίες προσδίδουν την απαραίτητη συγγένεια των ενώσεων με τα πεπτίδια Αβ. Το κοινό σημείο όλων αυτών των συνθετικών εγχειρημάτων είναι πως βήμα-κλειδί αποτελεί η σύζευξη του αρωματικού συστήματος με το παράγωγο του κυανοξικού οξέος με αντίδραση Knoevenagel.

Η γενική εικόνα της αντίδρασης Knoevenagel φαίνεται στο παρακάτω **Σχήμα 39** και αποτελεί τη σύζευξη καρβονυλικών ενώσεων, κυρίως αλδεϋδών αλλά και κετονών, με μόρια άκυκλα ή κυκλικά, συμμετρικά ή μη, που φέρουν στο σκελετό τους ενεργή μεθυλενική ομάδα προς σχηματισμό ακόρεστων προϊόντων.¹⁵² Γύρω από το μεθυλένιο μπορεί να βρίσκονται ηλεκτρονιοελκτικές ομάδες όπως καρβονύλια εστέρων, αμιδίων ή κετονών, νιτρίλια, σουλφονικές ή σουλφοναμιδικές ομάδες, φωσφονικοί εστέρες ακόμα και νίτρο-ομάδες.



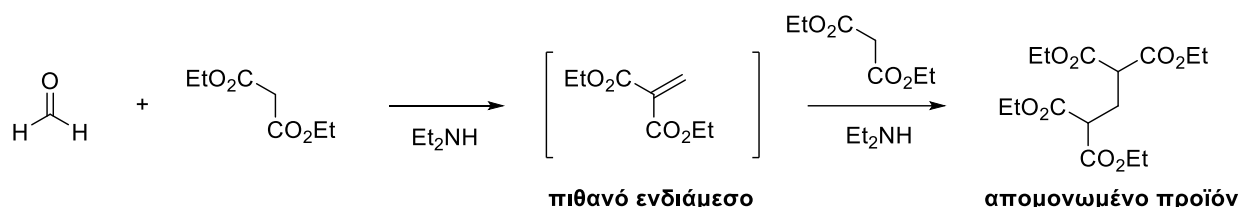
R_2 : -H, -R or -Ar

X, Y: -COR, -CO₂H, -CO₂R, -CONHR, -CONRR',
-CN, -SO₂R, -SONHR, -SONRR'

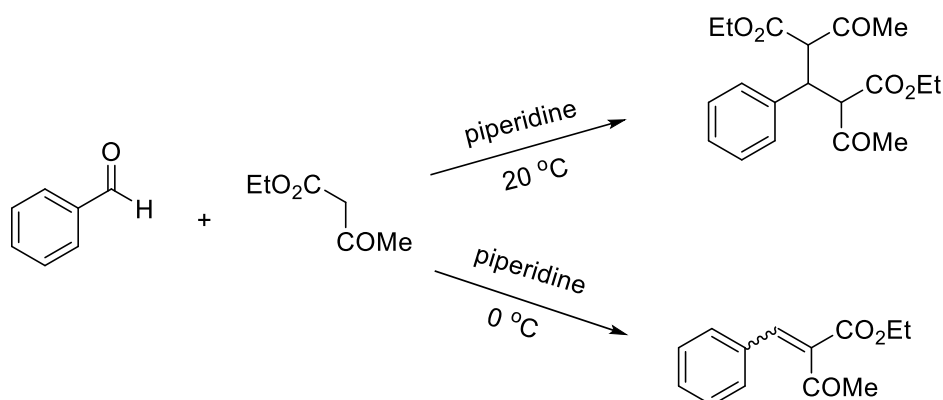
Σχήμα 39: Γενική εικόνα της αντίδρασης Knoevenagel.

Η αντίδραση Knoevenagel αποτελεί ένα από τα παλαιότερα παραδείγματα αλδολικής συμπύκνωσης και εισήχθη στη βιβλιογραφία από τον Emil Knoevenagel το 1894 με την, καταλυόμενη από διαιθυλαμίνη, σύζευξη της φορμαλδεΐδης με μελονικό

διαιθυλεστέρα (**Σχήμα 40**).¹⁵³ Ως τελικό προϊόν δεν κατάφερε να απομονωθεί το ακόρεστο σύστημα αλλά το προϊόν της προσθήκης Michael. Μετά από λίγα χρόνια επιτεύχθηκε από τον ίδιο και η απομόνωση του ακόρεστου προϊόντος με αλλαγή της θερμοκρασίας της αντίδρασης και με καταλύτη την πιπεριδίνη (**Σχήμα 41**).¹⁵⁴ Με την πορεία των χρόνων, δοκιμάστηκε η αντίδραση σε διαφορετικά υποστρώματα και με διαφορετικό καταλύτη.¹⁵⁵



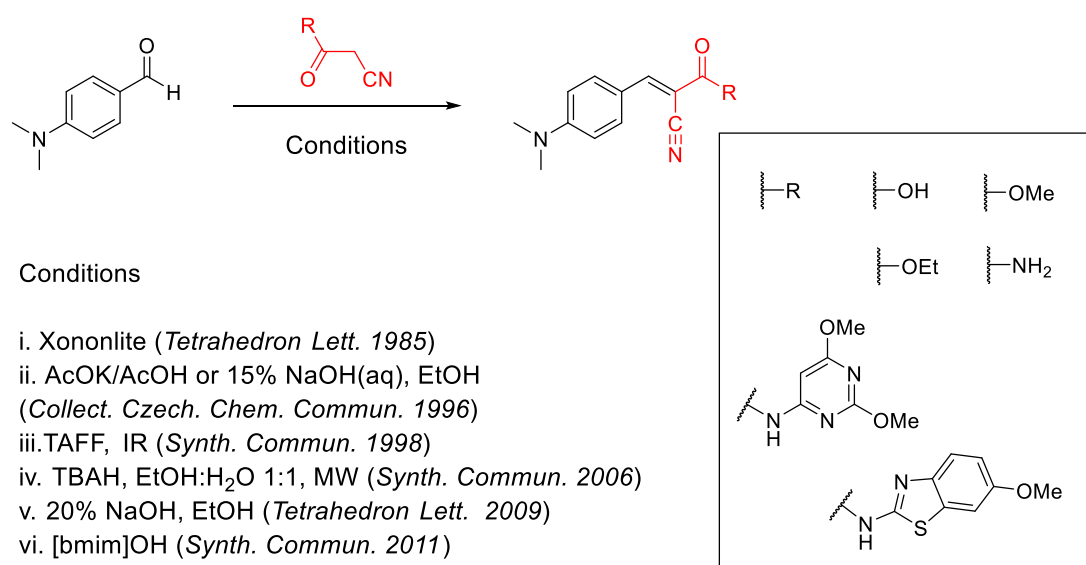
Σχήμα 40: Πρώτη συνθετική απόπειρα της αντίδρασης Knoevenagel.¹⁵²



Σχήμα 41: Πρώτη επιτυχημένη απομόνωση του ακόρεστου προϊόντος της Knoevenagel.¹⁵²

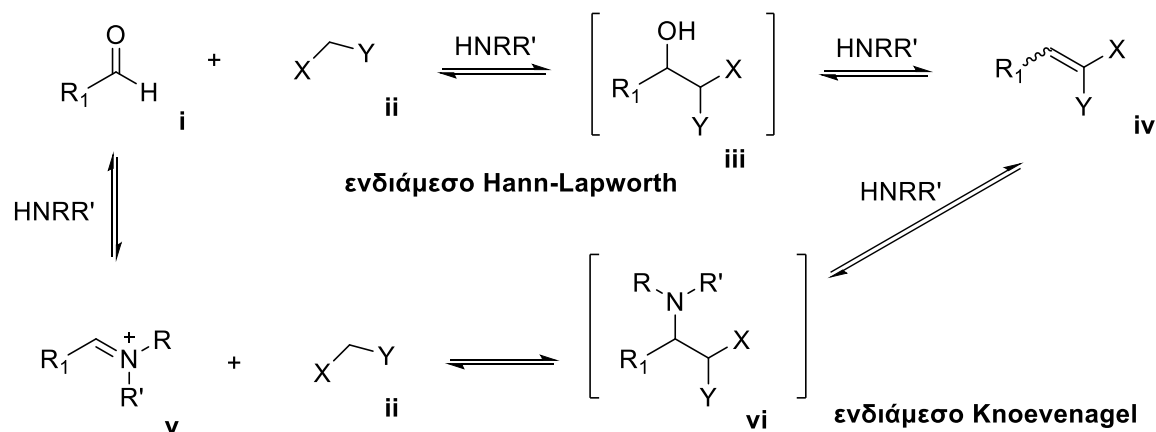
Αυτός ο μετασχηματισμός παραδοσιακά καταλύεται από οργανικής φύσης βάσεις ενώ έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία πληθώρα παραδειγμάτων τόσο ομογενούς όσο και ετερογενούς κατάλυσης. Η Knoevenagel είναι μια αρκετά ευέλικτη, ως προς την επιλογή διαλύτη, αντίδραση καθότι έχουν αναφερθεί παραδείγματα σε αλκοολικούς διαλύτες, σε υδατικές συνθήκες, σε αιθερικούς διαλύτες, σε πολικούς απρωτικούς όπως DMF ή ακετονιτρίλιο, σε οξικό οξύ αλλά και σε άπολους διαλύτες όπως βενζόλιο ή τολουόλιο.¹⁵² Στο κομμάτι που αφορά τον καταλύτη, εκτός της πιπεριδίνης που αποτελεί την πιο κοινή οργανική βάση έχουν χρησιμοποιηθεί πυριδίνη, *N*-μέθυλο πιπεραζίνη, μορφολίνη, DBU, DABCO και τριαιθυλαμίνη ή τριμεθυλαμίνη.¹⁵² Η αντίδραση έχει δοκιμαστεί και παρουσία υδατικής φύσης καταλύτη όπως αλκαλικού υδατικού διαλύματος (π.χ. 20% NaOH ή KOH), βασικών αλάτων όπως οξικό κάλιο ή όξινο φωσφορικό αμμώνιο¹⁵⁶ και άλλων αλκαλικής φύσης καταλυτών όπως TBAH (υδροξείδιο του τέτρα-*N*-βουτυλαμμωνίου)¹⁵⁷ ή ιοντικών υγρών.¹⁵⁸ Έχει φανεί τόσο από

μεμονωμένες δημοσιεύσεις όπου συγκρίνεται η καταλυτική δράση διαφόρων συστημάτων όσο και από πλήθος εργασιών που εφαρμόζουν τις συνθήκες, πως ο συνδυασμός αιθανόλης/πιπεριδίνης δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα.^{159,160} Στη βιβλιογραφία υπάρχουν και περιπτώσεις όπου δοκιμάστηκαν πιο «φιλικές προς το περιβάλλον» συνθήκες όπως απουσία διαλύτη. Συγκεκριμένα, ο McCluskey και συνεργάτες συνέκριναν την έκβαση της αντίδρασης στις κλασικές συνθήκες βρασμού σε αιθανόλη, σε υδατικές συνθήκες ή με λειοτρίβιση απουσία διαλύτη, λαμβάνοντας αρκετά ενθαρρυντικά αποτελέσματα για όλες τις περιπτώσεις.¹⁶¹ Μάλιστα, υποστρώματα νίτρο-βενζαλδεϋδών που δεν έδιναν προϊόν κάτω από τις κλασικές συνθήκες, αντέδρασαν απουσία διαλύτη. Επιπρόσθετα, η ομάδα του Kaupp και συνεργατών επέλεξαν να μελετήσουν αντιδράσεις όπου τα αντιδρώντα είναι είτε σε μορφή τήγματος είτε λειοτριβημένα και η χρήση βασικού καταλύτη είναι προαιρετική.¹⁶² Οι αποδόσεις που αναφέρονται είναι εντυπωσιακά υψηλές δείχνοντας έτσι πως υπάρχει προοπτική σε ένα τέτοιο εγχείρημα. Τέλος, κάποια από τα πολλά παραδείγματα ετερογενούς κατάλυσης περιλαμβάνουν τη χρήση βασικής φύσης ορυκτών, όπως Xonotlite,¹⁶³ ενός είδους εμπορικά διαθέσιμου μπεντονίτη (TAFF)¹⁶⁴ αλλά και νανοσωματιδίων ανθρακικού νατρίου-silica.¹⁶⁵ Όλα τα παραπάνω αποτελούν τα βασικότερα παραδείγματα διαφορετικών τρόπων κατάλυσης της αντίδρασης Knoevenagel και είναι αρκετά θετικό το γεγονός πως η αντίδραση δίνει καλά αποτελέσματα σε οποιεσδήποτε από αυτές τις συνθήκες (**Σχήμα 42**).

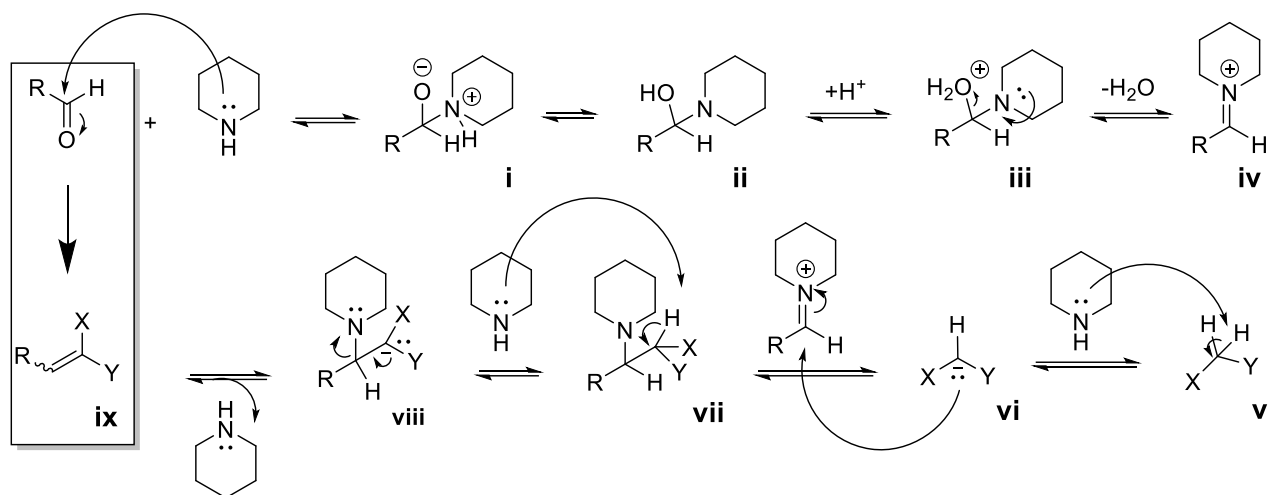


Σχήμα 42: Παραδείγματα αντίδρασης Knoevenagel σε διαφορετικά υποστρώματα και με διαφορετικές συνθήκες κατάλυσης.

Όσον αφορά το μηχανισμό της αντίδρασης υπάρχουν δύο διαφορετικές εκδοχές, των Hann-Lapworth και του Knoevenagel (**Σχήμα 43**) όπου η ειδοποιός διαφορά είναι το ενδιάμεσο προϊόν του μηχανισμού. Συγκεκριμένα, οι μεν πρώτοι υποστήριξαν πως η βάση συμμετέχει αποκλειστικά στην αποπρωτονίωση του ενεργού μεθυλενίου **ii**, με το καρβανιόν που προκύπτει να προσβάλει την καρβονυλική ένωση **i** σχηματίζοντας τελικά το β-υδρόξυ ενδιάμεσο **iii**.¹⁶⁶ Ο Knoevenagel υποστήριξε πως η βάση εκτός από το καρβανιόν που σχηματίζει, συμμετέχει και στο σχηματισμό μιας ιμίνης ή ενός ιμινιακού κατιόντος **v** με την καρβονυλική ένωση **ii** το οποίο δρα ως ισχυρότερο ηλεκτρονιόφιλο και προσβάλλεται από το ίδιο καρβανιόν που προαναφέρθηκε, σχηματίζοντας το διαφορετικό ενδιάμεσο **vi**.¹⁶⁷ Συμπερασματικά, ο μηχανισμός της αντίδρασης φαίνεται να επηρεάζεται από την φύση του καταλύτη διότι με χρήση τριτοταγών αμινών (π.χ. πυριδίνης) το ενδιάμεσο που σχηματίζεται είναι αυτό που πρότειναν οι Hann και Lapworth ενώ με χρήση πρωτοταγών και δευτεροταγών αμινών υπάρχει ανταγωνισμός μεταξύ των δύο διαφορετικών ενδιάμεσων που εξαρτάται από την φύση της αμίνης και της καρβονυλικής ένωσης.^{152,168} Δεδομένου ότι έχει καθιερωθεί η κατάλυση της αντίδρασης από οργανικής φύσης βάση και συγκεκριμένα πιπεριδίνη, αυτός ο μετασχηματισμός αποτελεί μια από τις παλαιότερες μορφές οργανοκαταλυόμενης αντίδρασης όπως φαίνεται χαρακτηριστικά στο παρακάτω **Σχήμα 44**.¹⁶⁹

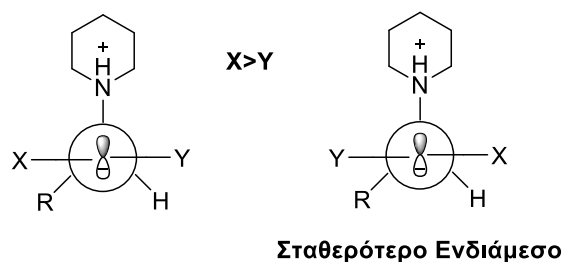


Σχήμα 43: Γενική εικόνα του μηχανισμού της αντίδρασης Knoevenagel (χάριν ευκολίας παρουσιάζεται να καταλύεται από δευτεροταγή βάση).



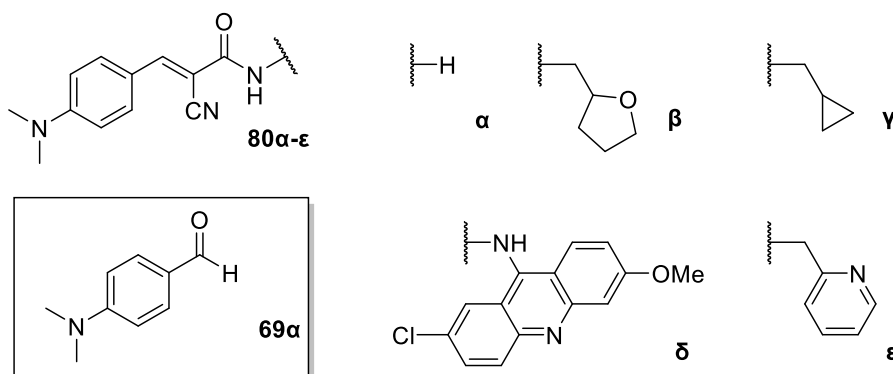
Σχήμα 44: Αναλυτικός μηχανισμός της αντίδρασης καταλυόμενης από πιπεριδίνη.

Το στεreoχημικό αποτέλεσμα του τελικού ακόρεστου προϊόντος **ix** ποικίλλει ανάλογα με το υπόστρωμα και τη βάση που χρησιμοποιείται, όμως κατά κύριο λόγο λαμβάνονται μοναδικά προϊόντα κατά στερεοεκλεκτικό τρόπο. Μετά την προσβολή του πυρηνόφιλου **vi** στο ιμινιακό κατιόν **iv**, ένα νέο μόριο της βάσης αποσπά ένα άτομο υδρογόνου σχηματίζοντας έτσι ένα σταθεροποιημένο καρβανιόν **viii**.¹⁷⁰ Ακολουθεί απόσπαση του μορίου της βάσης και δημιουργία του διπλού δεσμού. Το αρνητικό φορτίο είναι εντοπισμένο σε ένα p-τροχιακό το οποίο είναι κάθετο στο επίπεδο που σχηματίζουν οι υπόλοιποι τρεις υποκαταστάτες (**Σχήμα 45**). Το μόριο εκεί είναι ευαίσθητο σε στερεοχημικής φύσης φαινόμενα και οι δύο υποκαταστάτες **X**, **Y** λαμβάνουν τέτοια διαμόρφωση στο χώρο ώστε ο πιο ογκώδης να βρίσκεται μακρύτερα από την ομάδα **R**, της καρβονυλικής ένωσης. Στην περίπτωση που οι δύο ηλεκτρονιοελκτικές ομάδες του ενολικού ανιόντος διαφέρουν σε μέγεθος (π.χ. κυανομάδα με καρβοξυλική ή σουλφόνυλο-ομάδα) το τελικό προϊόν έχει στερεοχημεία *E* στο διπλό δεσμό, όπου είναι και το συνηθέστερο αποτέλεσμα.¹⁷¹ Αν βέβαια οι υποκαταστάτες έχουν παρόμοιο μέγεθος, λαμβάνεται μίγμα διαστερομερών προϊόντων.¹⁷⁰ Υπάρχει φυσικά και περίπτωση σε παράγωγα φωσφονικών εστέρων, όπου παρουσία τρισσοπρόξυ χλωριούχου τιτανίου έχει ληφθεί εκλεκτικά η αντίθετη (*Z*) στερεοχημεία.¹⁷²



Σχήμα 45: Δυνατές στεreoχημικές καταστάσεις στο βήμα σχηματισμού του καρβανιόντος (η δεξιά είναι η προτιμητέα ενεργειακά).

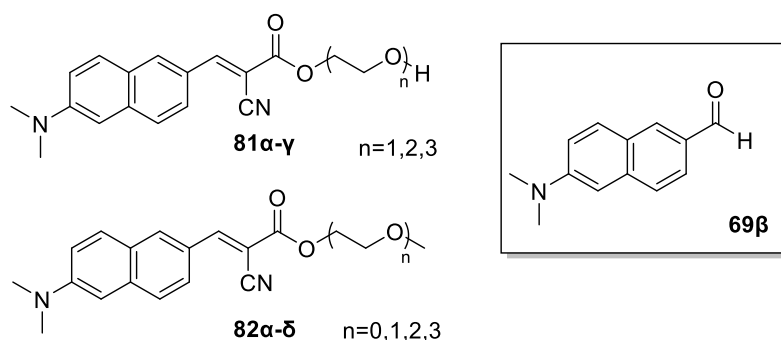
Το χρωμοφόρο του συνθετικού στόχου **73ζ** είναι γνωστό με τη μορφή του οξέος του από το 1989 και των απλών εστέρων του από το 1990, όταν αυτά συντέθηκαν από τις ομάδες των Katz και Schilling και Matsuoka *et al.* για να αξιοποιηθούν στον τομέα των μη γραμμικών οπτικών πολυμερών.^{173,174} Ανάμεσα στα πολλά παραδείγματα σύνθεσης παραγώγων του, ξεχωρίζουν τα *N*-υποκατεστημένα αμίδια που συντέθηκαν από τον Klein και συνεργάτες αλλά και ένα υδραζίνυλο παράγωγο από την ομάδα της Vieira-Sobral και συνεργατών. Τα αμιδικά και υδραζινικά παράγωγα (**80α-ε**, **Σχήμα 46**) παρασκευάστηκαν με σκοπό να χρησιμοποιηθούν ως φαρμακευτικές ενώσεις.^{175,176} Η σύνθεσή τους βασίζεται στη σύζευξη του κατάλληλου παραγώγου του κυανοξικού οξέος (**74**) με την εμπορικά διαθέσιμη π-(*N,N*-διμεθυλαμινο)βενζαλδεΐδη (**69α**, **Σχήμα 46**) παρουσία αλκαλικής φύσης καταλύτη.



Σχήμα 46: Παράγωγα του χρωμοφόρου της τελικής ένωσης **73ζ**.

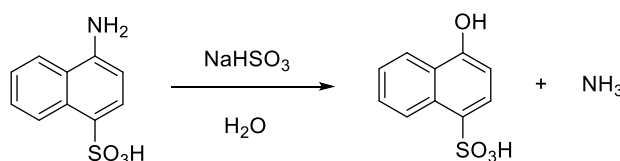
Όσον αφορά το χρωμοφόρο της τελικής ένωσης **73ε** είναι γνωστό μόνο με τη μορφή των εστέρων του, είτε μεθυλεστέρα είτε εστέρων με πολυαιθυλενογλυκόλες (**81α-γ** και **82α-δ**, **Σχήμα 47**). Αναφέρθηκε για πρώτη φορά στην εργασία του Park και συνεργατών όπου συντέθηκε μέσα σε πλήθος χρωμοφώρων με στόχο να χρησιμοποιηθεί ως φθορισμοφόρο στην TPM.¹⁷⁷ Ο κυριότερος τρόπος σύνθεσής του

είναι με πρώτη ύλη τη 6-(*N,N*-διμεθυλαμινο)-2-ναφθυλαλδεΰδη (**69β**) μέσω συμπύκνωσής της με αντίδραση Knoevenagel με εστέρες του **74**. Η χρησιμότητα αυτών των ανιχνευτών τύπου NIR επεκτάθηκε στην ανάπτυξη ενώσεων που στοχεύουν τα αμυλοειδή πεπτίδια Αβ με τη σύνθεση των εστέρων που φέρουν πολυαιθυλενογλυκόλες.¹⁷⁸ Η σύνθεση της 6-(*N,N*-διμεθυλαμινο)-2-ναφθυλαλδεΰδης βασίζεται στη μετατροπή της υδροξυλομάδας σε διμεθυλαμινομάδα μέσω μετασχηματισμού Bucherer, μιας σημαντικής αντίδρασης η οποία θα σχολιαστεί παρακάτω.



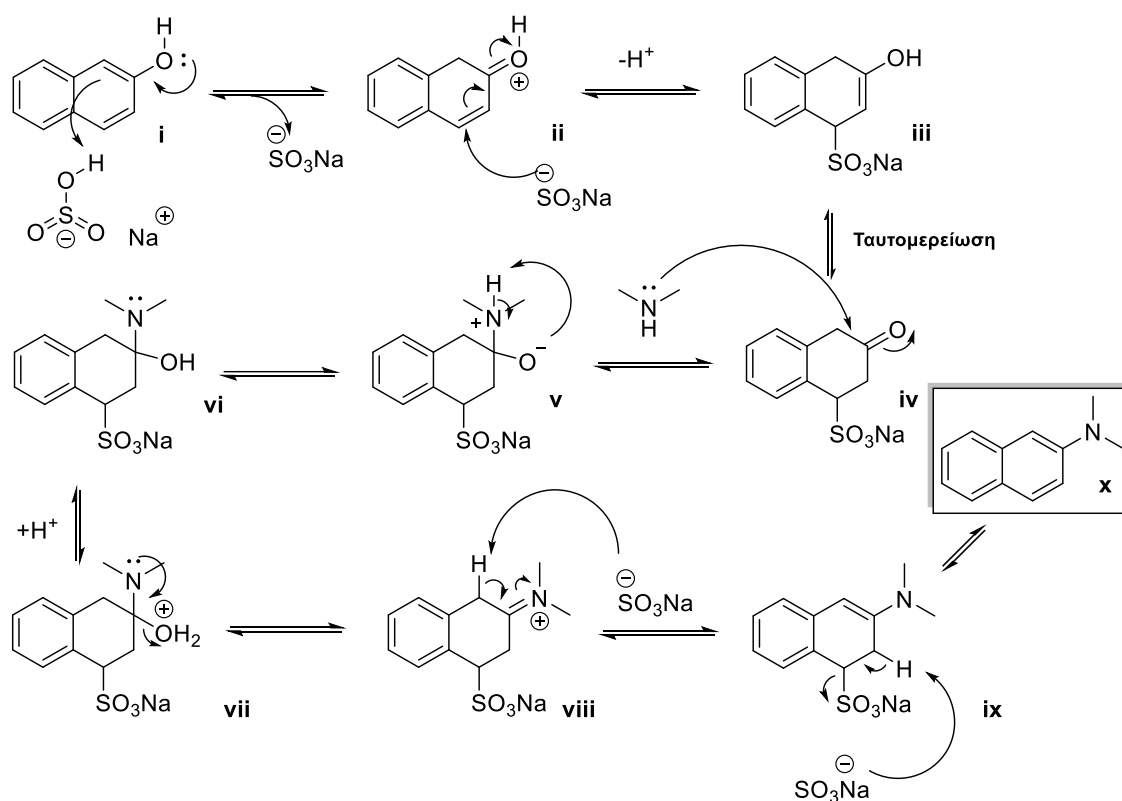
Σχήμα 47: Εστερικά παράγωγα του χρωμοφόρου της τελικής ένωσης 73ε.

Η αντίδραση Bucherer, παρότι ιστορικά της έχει αποδοθεί μόνο αυτό το όνομα, κανονικά ονομάζεται Bucherer-Lepetit καθότι ο δεύτερος την ανακάλυψε το 1896 για πρώτη φορά πραγματοποιώντας την μετατροπή της 4-σουλφο-1-ναφθυλαμίνης σε 4-σουλφο-1-ναφθόλη (**Σχήμα 48**).¹⁷⁹ Παρόλα αυτά ο Bucherer, ο οποίος ανακάλυψε ανεξάρτητα την αντίδραση, ήταν εκείνος ο οποίος αναγνώρισε τη χρησιμότητά της και έδειξε την αντιστρεπτότητά της. Η αντίδραση βρήκε τεράστιες εφαρμογές στη σύνθεση διάζο-ενώσεων ως βαφές αλλά και χρωστικές γενικότερης χρήσης όπου οι αμίνες παράγωγα του ναφθαλενίου αποτελούσαν πρόδρομες ενώσεις.¹⁸⁰ Παρότι αυτή ήταν και η κύρια χρησιμότητά της, χρησιμοποιήθηκε μετά τη δεκαετία του 1980 για σύνθεση αγροχημικών και φαρμακευτικών ουσιών.¹⁸⁰ Πλέον έχουν επεκταθεί οι δυνατότητες της και στη ασύμμετρη σύνθεση μορίων παραγώγων του ναφθαλενίου με τρόπο πιο εύκολο, αποδοτικό και εκλεκτικό.¹⁸¹



Σχήμα 48: Πρώτη βιβλιογραφικά γνωστή εφαρμογή της Bucherer.¹⁷⁹

Η αντίδραση Bucherer αποτελεί αντίδραση αλλαγής λειτουργικής ομάδας, μετατρέποντας μία υδροξυλομάδα σε αμινομάδα ή αντίστροφα. Πρόκειται για αντιστρεπτή διαδικασία που λαμβάνει χώρα σε υδατικό περιβάλλον παρουσία κάποιου άλατος του θείου (π.χ. NH_4HSO_3 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, NaHSO_3 ή $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) και της αντίστοιχης αμίνης, αν πρόκειται για μετατροπή υδροξυλομάδας σε αμινομάδα. Ο μηχανισμός της φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (**Σχήμα 49**) και απαρτίζεται από ένα σύνολο αμφίδρομων μετατροπών. Συνοπτικά, το αρωματικό σύστημα **i** ενεργοποιείται μέσω σουλφονυλίωσης, η αμίνη προσβάλλει το καρβονύλιο της ένωσης **iv** το οποίο έχει προέλθει από ταυτομερείωση της **iii** και με αποχώρηση της υδροξυλομάδας, μέσω επαναρωματοποίησης της **viii**, λαμβάνεται το τελικό προϊόν **x**.



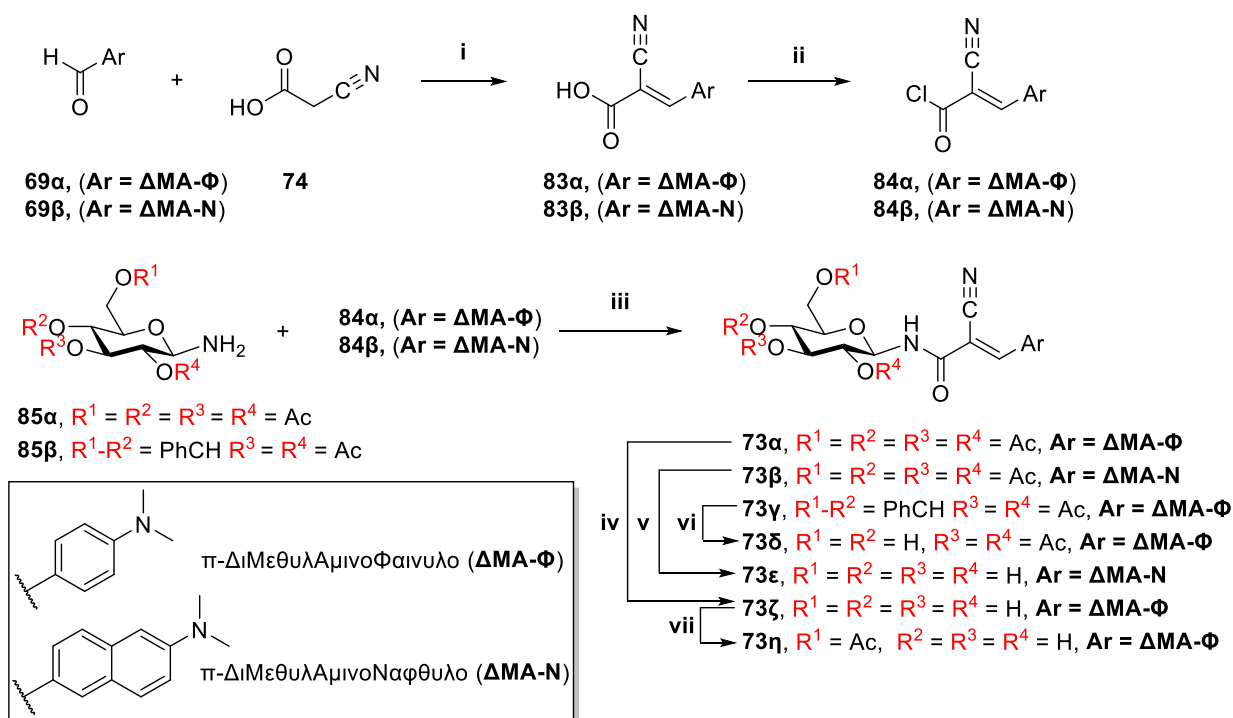
Σχήμα 49: Αναλυτικός μηχανισμός της αντίδρασης Bucherer.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

3.1 Συνθετικό Μέρος

3.1.1 Μεθοδολογία της σύνθεσης (*E*)-2-κυανο-3-αρυλακρυλικών παραγώγων

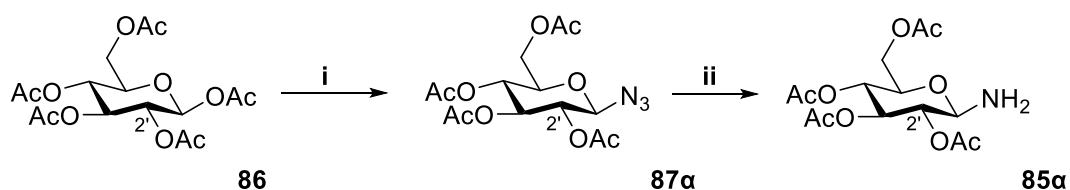
Όπως αναφέρθηκε, στόχος της παρούσας εργασίας, ήταν η σύνθεση μοριακών στροφένων της οικογένειας των (*E*)-2-κυανο-3-αρυλακρυλικών παραγώγων. Πιο συγκεκριμένα και για λόγους που θα γίνουν εμφανείς στην Παρ. 3.3, συνθετικοί στόχοι ήταν τα αμίδια **73α-η** (Σχήμα 50). Συνοπτικά, οι ενώσεις **73** μπορούν να προκύψουν από το σχηματισμό ενός πεπτιδικού δεσμού μεταξύ των κατάλληλα προστατευμένων γλυκοκυτανοζυλαμινών **85α,β** και των χλωριδίων οξέων **84α,β**. Τα χλωρίδια με τη σειρά τους μπορούν να προκύψουν από την αντίδραση Knoevenagel μεταξύ κυανοξικού οξέος (**74**) και των αντίστοιχων αρωματικών αλδεϋδών **69α,β** ακολουθούμενη από χλωρίωση των παραγόμενων ακρυλικών οξέων **83α,β**. Πρόκειται για τη γενική συνθετική πορεία **β** που έχει αναφερθεί στη θεωρία της σύνθεσης (Σχήμα 36, Παρ. 2.2).



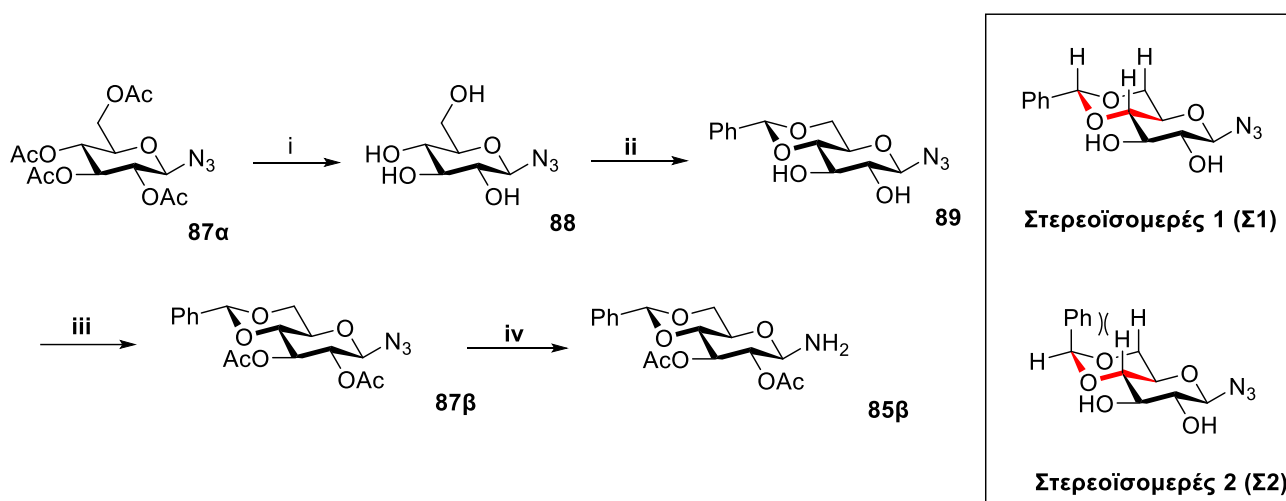
Σχήμα 50: i) Πιπεριδίνη, MeCN, θέρμανση, overnight, ii) SOCl₂, τολουόλιο, αναρροή, 4 ώρες ή (COCl)₂, διχλωρομεθάνιο, DMF (καταλυτικό), 0 °C σε rt, 2 ώρες, iii) Πυριδίνη, 0 °C σε rt, 1 ώρα, iv, v) 7 N NH₃ σε MeOH, overnight, vi) AcOH 60%, θέρμανση, 2 ώρες, vii) AcOCl, διχλωρομεθάνιο, πυριδίνη, -80 °C, 3 ώρες.

3.1.2 Σύνθεση των γλυκοπυρανοζυλαμινών 85α,β

Αρχικά παρασκευάστηκαν οι απαραίτητες γλυκοπυρανοζυλαμίνες **85α,β** με γνωστές στη βιβλιογραφία συνθετικές πορείες.^{182–184} Το 2,3,4,6-τετρα-O-ακετυλο παράγωγο **85α** (Σχήμα 51) συντίθεται με πρώτη ύλη την πεντακετυλιωμένη β-D-γλυκοπυρανόζη **86**. Αζιδίωση υπό συνθήκες Vorbrüggen παρουσία SnCl_4 ως οξέος Lewis, παράγει το ενδιάμεσο **87α**.¹⁸² Η αντίδραση είναι στερεοεκλεκτική λόγω γειτονικής υποβοήθησης από την ακετυλομάδα της 2'-θέσης και το προϊόν παραλαμβάνεται με καταβύθιση σε υψηλή απόδοση.¹⁸⁵ Καταλυτική υδρογόνωση παρουσία προσροφημένου σε άνθρακα παλλαδίου οδηγεί μέσα σε 15' στον σχηματισμό του προϊόντος **85α**¹⁸³ ποσοτικά, το οποίο λαμβάνεται καθαρό με ιζηματοποίηση (trituration). Για τη σύνθεση της 4,6-βενζυλιδενο-2,3-δι-O-ακετυλο γλυκοπυρανοζυλαμίνης **85β** χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη το τετρακετυλιωμένο αζίδιο **87α**. Στο πρώτο βήμα αυτής της συνθετικής πορείας (Σχήμα 52), απομάκρυνση των ακετυλομάδων κάτω από συνθήκες Zemplén¹⁸⁴ παρουσία καταλυτικής ποσότητας MeONa σε μεθανόλη οδηγεί ποσοτικά στο προϊόν **88**, το οποίο χρησιμοποιείται στο επόμενο βήμα χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Εκλεκτική προστασία των υδροξυλομάδων στις θέσεις 4 και 6 επιτυγχάνεται μέσω σχηματισμού της ακετάλης της βενζαλδεΐδης.¹⁸⁴ Η αντίδραση δίνει στερεοεκλεκτικά το ενδιάμεσο **89** λόγω του σχηματισμού ενός trans-δεκαλινικού τύπου δικυκλικού συστήματος στο οποίο η φαινυλομάδα «προτιμά» την ισημερινή θέση, λόγω ελαχιστοποίησης των 1,3-διαξονικών αλληλεπιδράσεων (Σχήμα 52, από τα πιθανά στερεοϊσομερή **Σ1** και **Σ2** σχηματίζεται αποκλειστικά το πρώτο). Το απαραίτητο αντιδραστήριο, διμεθυλο-ακετάλη της βενζαλδεΐδης, παρασκευάστηκε¹⁸⁶ από βενζαλδεΐδη παρουσία διμεθοξυπροπανίου και καταλυτικής ποσότητας PTSA αλλά το προϊόν που απομονώθηκε ήταν μίγμα βενζαλδεΐδης και της ακετάλης της και χρησιμοποιήθηκε ως είχε. Πιθανά για αυτό το λόγο η απόδοση σχηματισμού του προϊόντος **89** ήταν μέτρια (52%) αλλά το προϊόν μπορούσε εύκολα να διαχωριστεί από το υδατοδιαλυτό αντιδρών και να απομονωθεί σε καθαρή μορφή. Στο επόμενο βήμα, ακετυλίωση των ελεύθερων υδροξυλομάδων με οξικό ανυδρίτη, πραγματοποιήθηκε σε υψηλή απόδοση (75%) και το προϊόν **87β**¹⁸⁷ παραλήφθηκε σε κρυσταλλική μορφή μετά από καταβύθιση.

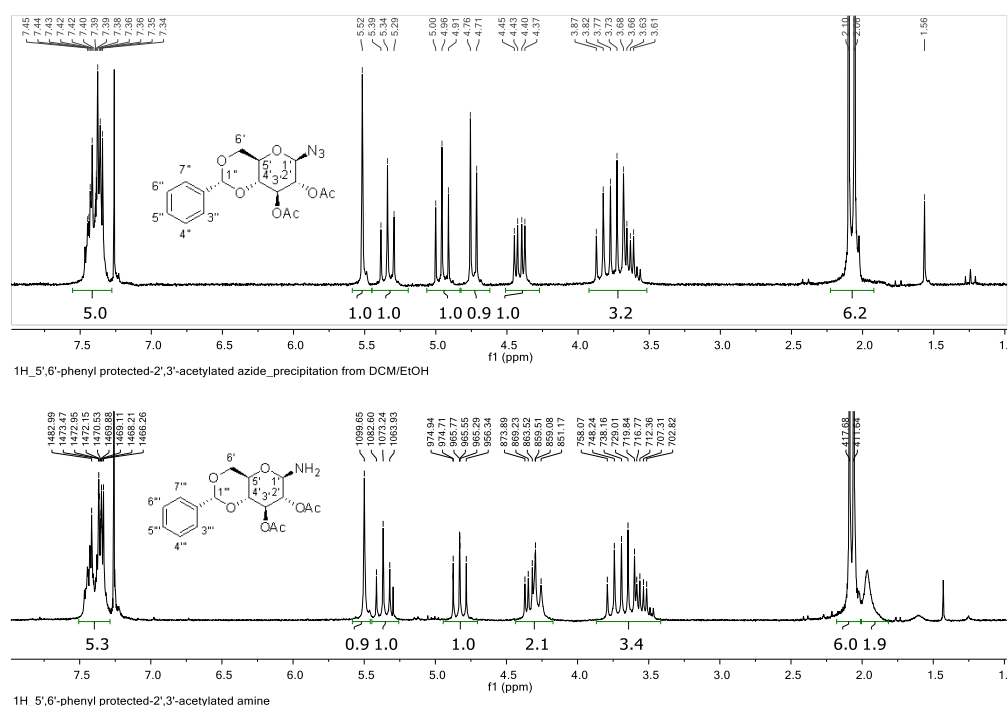


Σχήμα 51: i) TMS-N₃, SnCl₄, διχλωρομεθάνιο, 2.5 ώρες, 0 °C σε rt (92%), ii) H₂, Pd/C, THF, 15', rt (ποσοτικά)



Σχήμα 52: i) MeONa/MeOH (καταλυτικό), MeOH, rt, 10' (ποσοτικά), ii) PhCH₂(OMe)₂, PTSA (καταλυτικό), DMF, rt σε 60 °C, overnight, (52%) iii) Ac₂O, πυριδίνη, 0 °C σε rt, 2 ώρες, (75%) iv) H₂, Pd/C, THF, 15', rt (ποσοτικά)

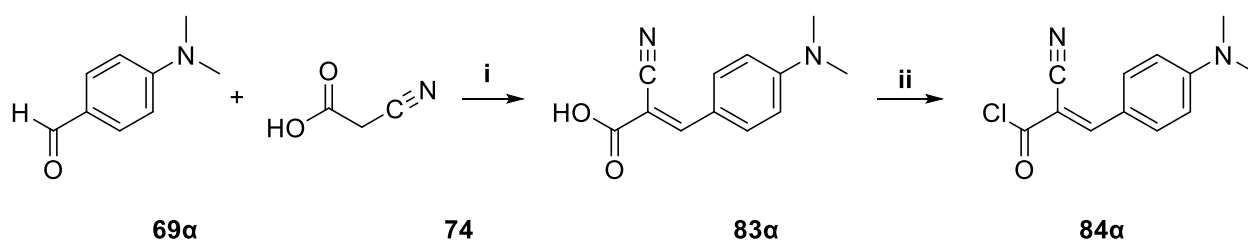
Τελευταίο στάδιο και σε αυτή τη συνθετική πορεία ήταν η αναγωγή της αζιδομάδας με σύντομη καταλυτική υδρογόνωση σε πίεση 1 atm, μέσω της οποίας παραλήφθηκε ποσοτικά η αμίνη **85β**. Όπως φάνηκε στη σύγκριση των φασμάτων ¹H-NMR του προϊόντος **85β** με την πρόδρομη ένωση του **87β** (**Εικόνα 12**), η βενζυλακετάλη παραμένει σταθερή αν και είναι γνωστό ότι, όπως και οι βενζυλομάδες, είναι ευαίσθητη κάτω από αυτές τις συνθήκες, αλλά η απομάκρυνσή της απαιτεί υψηλότερη πίεση υδρογόνου και μεγαλύτερους χρόνους αντίδρασης.



Εικόνα 12: Φάσματα ¹H-NMR των ενώσεων **89β** και **87β**. Από την απορρόφηση στα 7.4 ppm είναι φανερό πως η βενζυλακετάλη είναι άθικτη μετά την υδρογόνωση.

3.1.3 Σύζευξη του οξέος 83α με τις γλυκοπυρανοζυλαμίνες 85α,β και σύνθεση των τελικών αμιδίων 73δ,ζ,η

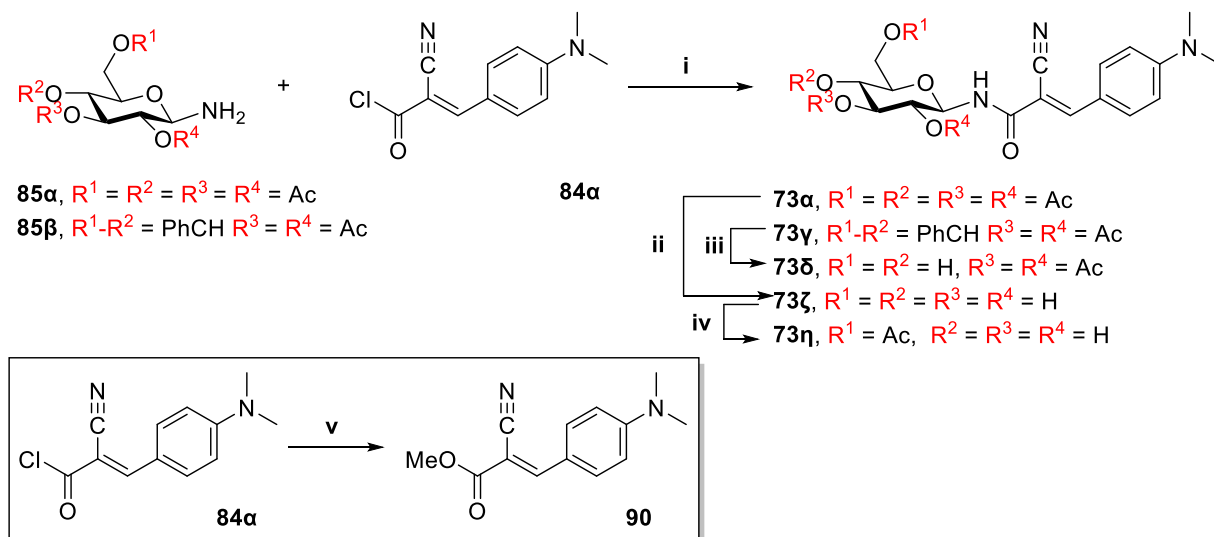
Η σύνθεση των τελικών αμιδίων **73δ,ζ,η** πραγματοποιείται με απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των αμιδίων **73α,γ** τα οποία μπορούν να προκύψουν από συμπύκνωση των αμινών **85α,β** με το ενεργοποιημένο χλωρίδιο **84α** (Σχήμα 50). Η σύνθεση του τελευταίου, όπως περιγράφεται στο Σχήμα 53, ξεκινάει με τη συμπύκνωση Knoevenagel μεταξύ της π-(N,N-διμεθυλαμινο)βενζαλδεΐδης (**69α**) και του κυανοξικού οξέος (**74**) σε διαλύτη ακετονιτρίλιο, παρουσία πιπεριδίνης.



Σχήμα 53: i) Πιπεριδίνη, MeCN, θέρμανση, overnight (90%), ii) SOCl₂, τολουόλιο, αναρροή, 4 ώρες ή (COCl)₂, διχλωρομεθάνιο, DMF (καταλυτικό), 0 °C σε rt (ποσοτικά).

Η παρασκευή του οξέος έγινε με βάση τη μεθοδολογία που αναφέρεται στην εργασία των Mereddy και Drewes.¹⁸⁸ Αν και αρχικά η αντίδραση σύνθεσης του οξέος δοκιμάστηκε σε αιθανόλη με καταλυτική ποσότητα πιπεριδίνης, δεν απομονώθηκε προϊόν (η μελέτη των συνθηκών πραγματοποιήθηκε από τον υποψήφιο διδάκτορα Κ. Μαυρέα). Στοιχειομετρική ποσότητα πιπεριδίνης σε διαλύτη ακετονιτρίλιο και ανάδευση για μια νύχτα, αποδείχθηκε ιδανικός συνδυασμός και η απόδοση του οξέος **83α** ήταν αρκετά υψηλή (90%). Για την παραγοντοποίηση του οξέος **83α** στα αμίδια **73α,γ** αυτό μετατράπηκε στην πιο δραστική μορφή του, δηλαδή στο αντίστοιχο χλωρίδιο **84α**. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε εύκολα με χρήση θειόνυλο χλωριδίου σε τολουόλιο¹⁸⁹ ή οξάλυλο χλωριδίου παρουσία καταλυτικής ποσότητας DMF (ώστε να σχηματιστεί το αντιδραστήριο Vilsmeier),¹⁹⁰ σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο. Οι χλωριώσεις θεωρήθηκαν ποσοτικές καθώς δεν υπήρχαν παραπροϊόντα σύμφωνα με το TLC ούτε απώλειες ουσίας και τα προϊόντα χρησιμοποιήθηκαν στο επόμενο βήμα χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Σε αυτό το στάδιο, μεθανόλυση του χλωριδίου **84α** παρήγαγε ποσοτικά το μεθυλεστέρα **90** (Σχήμα 54) ο οποίος απομονώθηκε καθαρός και σε κρυσταλλική μορφή με απλή απομάκρυνση του διαλύτη.

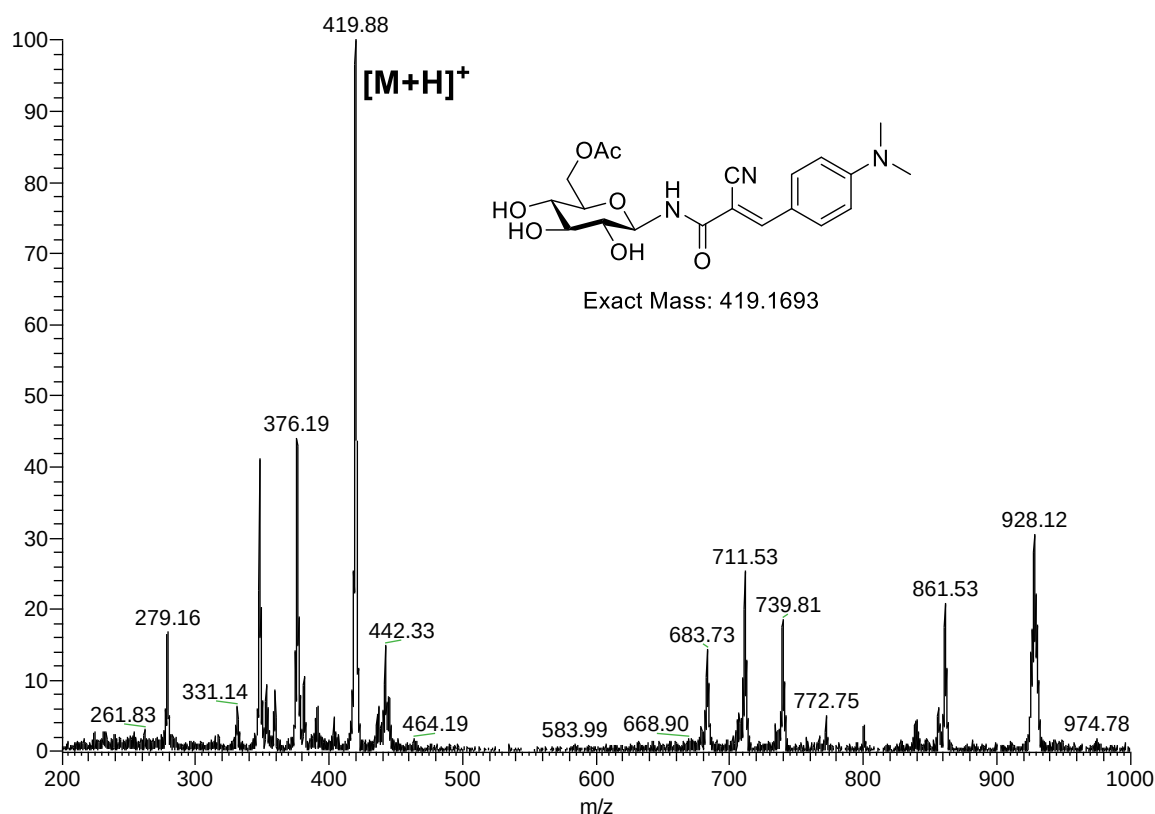
Η σύζευξη του χλωριδίου **84α** με τις αμίνες **85α,β** για την παρασκευή των αμιδίων **73α,γ**, αντίστοιχα, πραγματοποιήθηκε παρουσία πυριδίνης. Οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα σε θερμοκρασία δωματίου και ολοκληρώθηκαν σε 1 ώρα. Η ένωση **73α** χρειάστηκε χρωματογραφικό καθαρισμό για να παραληφθεί καθαρή σε αρκετά καλή απόδοση (80%) ενώ η **73γ** καταβυθίστηκε εύκολα από μίγμα διχλωρομεθανίου-μεθανόλης, αν και σε μέτρια απόδοση (47%).



Σχήμα 54: i) Πυριδίνη, 0 °C σε rt, 1 ώρα, ii) 7 N NH₃ σε MeOH, overnight (46%), iii) AcOH 60%, θέρμανση, 2 ώρες (75%), iv) AcOCl, διχλωρομεθάνιο, πυριδίνη, -80 °C, 3 ώρες (11%), v) MeOH, rt (ποσοτικά)

Η απομάκρυνση των ακετυλομάδων της **73α** πραγματοποιήθηκε παρουσία μεθανολικού διαλύματος αμμωνίας σε θερμοκρασία δωματίου και ανάδευση για όλη τη νύχτα. Παρατηρήθηκε καταβύθιση του προϊόντος **73ζ** το οποίο συλλέχθηκε εύκολα μέσω διήθησης και απομονώθηκε σε καθαρή μορφή και μέτρια απόδοση (46%). Η χαμηλή απόδοση είναι πιθανό να οφείλεται στην ευαισθησία του α,β-ακόρεστου κυανοακρυλικού συστήματος, το οποίο αναμένεται να αποτελεί καλό υπόστρωμα σε αντιδράσεις πυρηνόφιλης προσθήκης. Αυτό καθίσταται εμφανές από την εικόνα του TLC της αντίδρασης, όπου εμφανίζονται έγχρωμες και φθορίζουσες κηλίδες παραπροϊόντων. Η απομάκρυνση της βενζυλιδενομάδας του αμιδίου **73γ** πραγματοποιήθηκε κάτω από ελαφρώς όξινες συνθήκες, με θέρμανση παρουσία υδατικού διαλύματος οξικού οξέος. Η αντίδραση ολοκληρώνεται μέσα σε 2 ώρες και το πέρας της συμπίπτει με διαύγαση του αρχικού αιωρήματος. Το τελικό διακετυλιωμένο προϊόν **73δ** απαιτεί χρωματογραφικό καθαρισμό λόγω της πληθώρας έγχρωμων προϊόντων, όμως παραλαμβάνεται σε κρυσταλλική μορφή και αρκετά καλή απόδοση

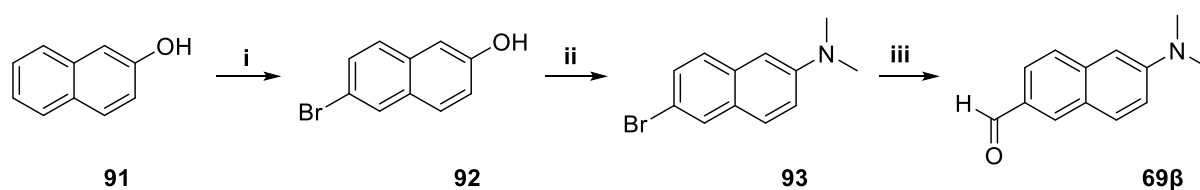
(75%). Για τη σύνθεση του μονοακετυλιωμένου αμιδίου **73η** χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη η **73ζ** η οποία αντέδρασε παρουσία ακετυλοχλωριδίου και πυριδίνης σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο και σε θερμοκρασία -80 °C για 3 ώρες.¹⁹¹ Κάτω από αυτές τις συνθήκες απομονώθηκε το προϊόν **73η** σε χαμηλή απόδοση (11%) με σχεδόν πλήρη ανάκτηση του αρχικού αντιδρώντος. Η ύπαρξη του προϊόντος **73η** πιστοποιήθηκε με φασματομετρία μάζας ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI-MS) όπως φαίνεται στην **Εικόνα 13**:



Εικόνα 13: Φάσμα ESI-MS του προϊόντος **73η**.

3.1.4 Σύνθεση της 6-(*N,N*-διμεθυλαμινο)-2-ναφθαλδεΐδης (**69β**)

Η αλδεΐδη **69β** δεν ήταν εμπορικά διαθέσιμη και συντέθηκε μέσω της πορείας που αναφέρεται στη δημοσίευση των Ahn & Kim (**Σχήμα 55**).¹⁹²



Σχήμα 55: i) 1) Br₂, AcOH, 2) Sn, HBr, θέρμανση, 3 ώρες (78%), ii) Na₂S₂O₅, Me₂NH, H₂O, 140 °C, 5 μέρες (66%), iii) 1) n-BuLi, THF, -80 °C 2) DMF, 2 ώρες (64%)

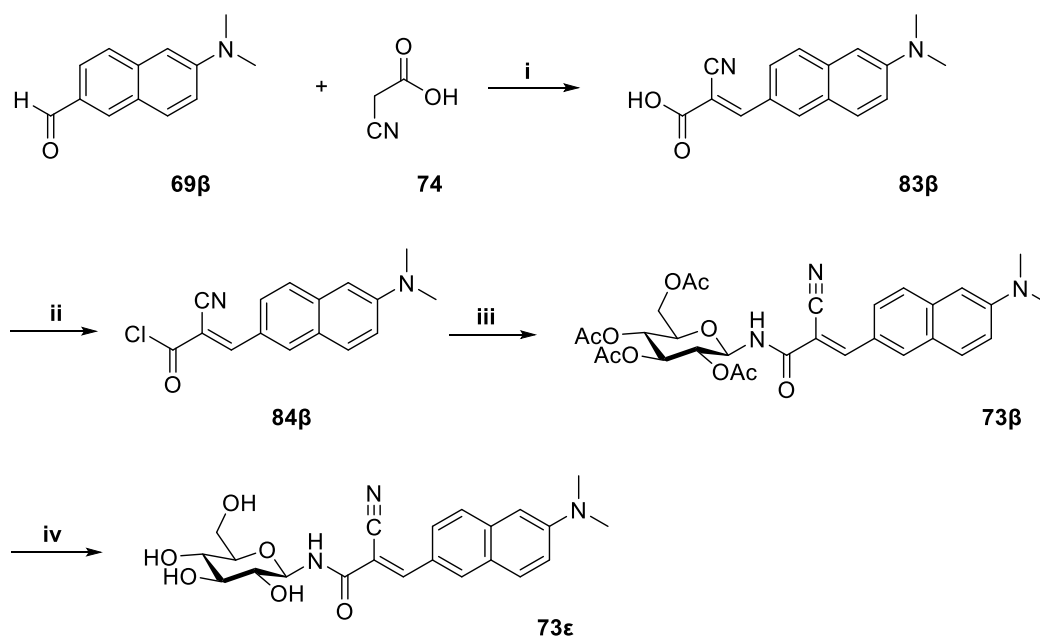
Αρχικά, η β-ναφθόλη (**91**) μετατράπηκε στο 6-βρωμο παράγωγο της **92** με εκλεκτική βρωμίωση παρουσία στοιχειακού βρωμίου. Αρχικά, παρήχθη το 1,6-διβρώμο παράγωγο το οποίο στη συνέχεια, παρουσία μεταλλικού κασσιτέρου σε όξινο περιβάλλον που δημιουργεί το, παραγόμενο από την αντίδραση, υδροβρώμιο, ανάχθηκε στο επιθυμητό 6-βρωμο παράγωγο **92** το οποίο λαμβάνεται σε αρκετά καλή απόδοση (78%), μετά από απόσταξη σε συσκευή Kugelrohr. Στη συνέχεια το φαινολικό υδροξύλιο μετατράπηκε στη *N,N*-διμεθυλαμινομάδα μέσω ενός μετασχηματισμού Bucherer (**Παρ. 2.2**). Η αντίδραση έλαβε χώρα σε αυτόκλειστο σκεύος και αφέθηκε να αναδεύεται για αρκετές μέρες. Η 6-βρωμο-2-ναφθυλαμίνη **93** λήφθηκε σε καλή απόδοση (66%) μετά από τον απαιτούμενο χρωματογραφικό καθαρισμό. Πειραματικά ήταν δύσκολη η παρακολούθηση της αντίδρασης στο αυτόκλειστο και φάνηκε πως ο χρόνος παίζει σημαντικό ρόλο στην απόδοση καθώς όταν η διάρκεια αυξήθηκε από 42 σε 54 και εν τέλει σε 120 ώρες, η συλλογή καθαρού προϊόντος μεταβλήθηκε από 45 σε 54 και τέλος σε 66%. Ακόμα όμως και μετά από 120 ώρες, παρατηρήθηκε μη αντιδρούσα βρωμοναφθόλη στο μίγμα της αντίδρασης. Τελευταίο βήμα αυτής της σύνθεσης αποτέλεσε η εισαγωγή της φορμυλομάδας. Μετά από λιθίωση του 6-βρωμο παραγώγου **93**, παρουσία *n*-BuLi, σε χαμηλή θερμοκρασία (-80 °C), προστέθηκε στο μίγμα της αντίδρασης το ηλεκτρονιόφιλο DMF και τελικά λήφθηκε η αλδεΐδη **69β** σε καλή απόδοση (64%) μετά από χρωματογραφικό καθαρισμό.

3.1.5 Σύνθεση των (*E*)-2-κυανο-3-ναφθυλακρυλικών παραγώγων **73β,ε**

Αρχικά, το άγνωστο στη βιβλιογραφία ναφθυλακρυλικό οξύ **83β** συντέθηκε όπως και το **83α**, δηλαδή με συμπύκνωση Knoevenagel της αλδεΐδης **69β** και του κυανοξικού οξέος **74** (**Σχήμα 56**). Το προϊόν παραλήφθηκε σε καθαρή μορφή, μέσω διήθησης, ενώ φάνηκε πως μεταβολή των ισοδυνάμων της πιπεριδίνης από 1 σε 1.1, οδήγησε σε μικρή αύξηση της απόδοσης (από 83 σε 90%).

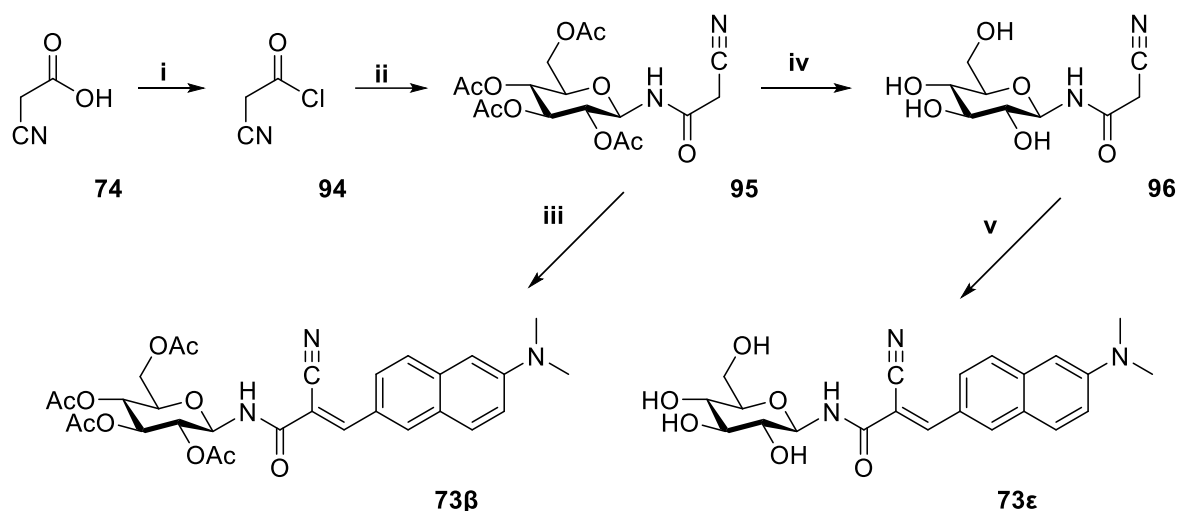
Για τη σύνθεση του αμιδίου **73β** ακολουθήθηκε αρχικά η ίδια μεθοδολογία όπως και για τα φαινυλακρυλικά παράγωγα με τη σύζευξη του χλωριδίου του οξέος **84β** με την αμίνη **85α**. Το οξύ **83β** αποδείχτηκε προβληματικό στο στάδιο της χλωρίωσης καθώς, παρουσία θειόνυλο χλωριδίου φάνηκε να μην είναι διαλυτό στο διαλύτη της αντίδρασης (τολουόλιο), με αποτέλεσμα η αντίδραση να μην προχωράει. Η λύση που βρέθηκε ήταν να πραγματοποιηθεί η χλωρίωση παρουσία οξάλυλο χλωριδίου σε διχλωρομεθάνιο. Σε αυτή την περίπτωση, λήφθηκε το χλωρίδιο **84β** ως μοναδικό και καθαρό προϊόν και χρησιμοποιήθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Τόσο η σύνθεση του δυσδιάλυτου αμιδίου **73β** όσο και ο χρωματογραφικός καθαρισμός του, εμφάνισαν προβλήματα. Η

δυσκολία κατεργασίας του ακάθαρτου προϊόντος μέσω εκχυλίσεων και το πλήθος έγχρωμων και φθοριζόντων παραπροϊόντων ακριβώς κοντά στην κηλίδα του προϊόντος στο πλακίδιο TLC, κατέστησαν αυτά τα βήματα προβληματικά. Ακόμα και μετά από δύο προσπάθειες καθαρισμού με χρωματογραφία, το προϊόν είχε σημαντική ποσότητα παραπροϊόντων όπως φάνηκε στο φάσμα ^1H NMR. Παρόλα αυτά, το ακάθαρτο τετρακετυλιωμένο αμίδιο **73β** αποπροστατεύτηκε παρουσία μεθανολικού διαλύματος αμμωνίας και το τελικό προϊόν **73ε** καταβυθίστηκε από το μίγμα της αντίδρασης και συλλέχθηκε καθαρό με διήθηση (**Σχήμα 56**).



Σχήμα 56: i) Πιπεριδίνη, MeCN, θέρμανση, overnight (90%), ii) $(\text{COCl})_2$, διχλωρομεθάνιο, DMF (καταλυτικό), 0 °C σε rt, 2 ώρες (ποσοτικά), iii) Πυριδίνη, 0 °C σε rt, 1 ώρα (30% w/w σε ακάθαρτο προϊόν), iv) 7 N NH_3 σε MeOH, overnight, 11% απόδοση 3 σταδίων (**83β**→**73ε**).

Η αρκετά χαμηλή διαλυτότητα του **73ε** στη μεθανόλη και η δυσκολία στην απομόνωση των αμιδίων **73β,ε**, αποτέλεσαν εφελτήριο για τη δοκιμή της εναλλακτικής βιβλιογραφικά γνωστής πορείας **α** (**Παρ. 2.2**) στη σύνθεση (*E*)-2-κυανο-3-αρυλακρυλικών οξέων. Σύμφωνα με αυτή την πορεία, το τελικό στάδιο της σύνθεσης είναι μία αντίδραση Knoevenagel μεταξύ κατάλληλων συνθονίων. Για μία τέτοια πορεία θα απαιτούνταν τα νέα αμιδικά παράγωγα όπως το **95** ή καλύτερα το **96** (**Σχήμα 57**) τα οποία δεν έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία. Αυτά προέκυψαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται παρακάτω.

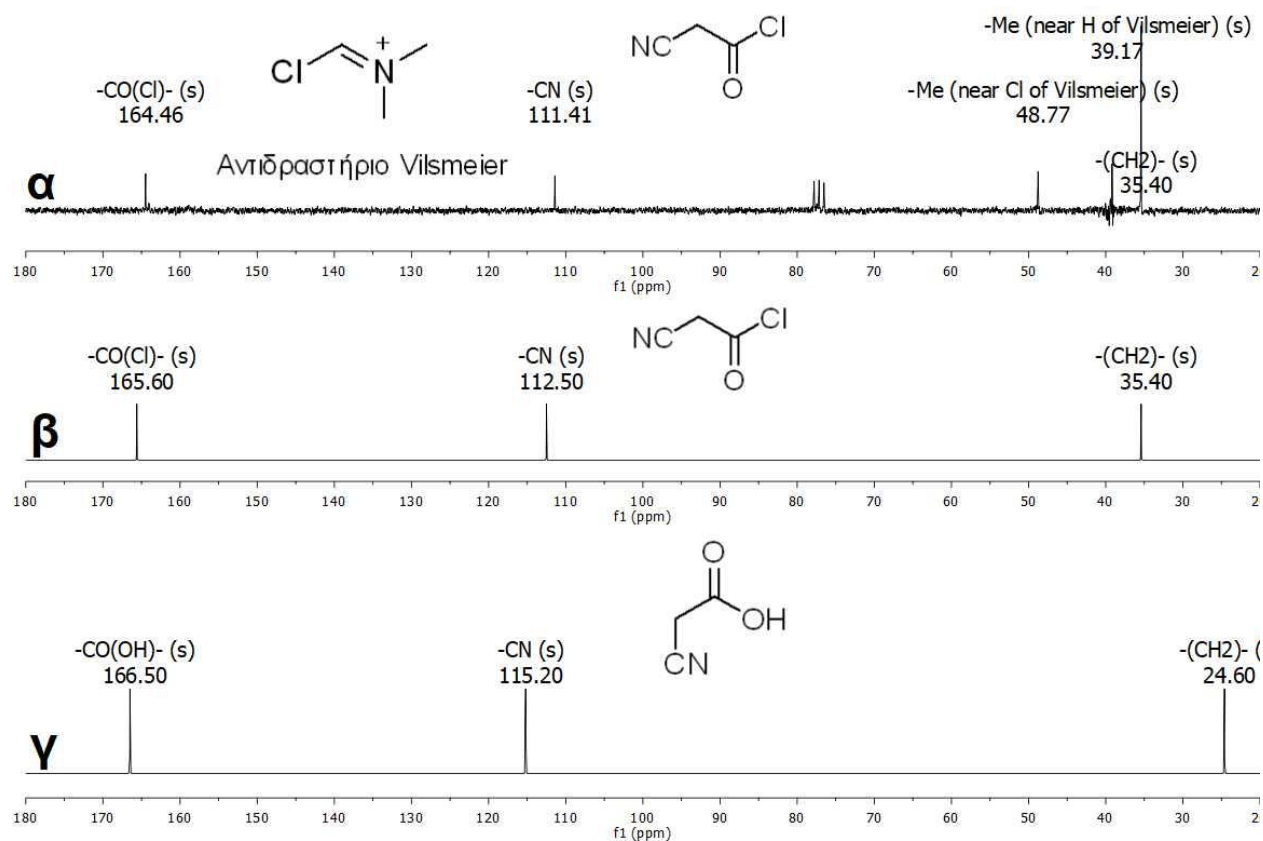


Σχήμα 57: i) $(\text{COCl})_2$, διχλωρομεθάνιο, DMF (καταλυτικό), 0 °C σε rt, 30' (ποσοτικά), ii) 85α, διχλωρομεθάνιο, 0 °C σε rt, 30' (60%), iii) 69β, πιπεριδίνη, MeCN, θέρμανση, overnight (36%), iv) 7 N NH_3 σε MeOH, overnight (ποσοτικά), v) 69β, πιπεριδίνη, MeOH, θέρμανση, overnight (68%)

Συγκεκριμένα, χλωρίωση του κυανοξικού οξέος (**74**), παρουσία οξάλυλο χλωριδίου, ολοκληρώνεται όταν το αρχικά άχρωμο αιώρημά του σε διχλωρομεθάνιο, μετατραπεί σε ελαφρώς κίτρινο διαυγές διάλυμα. Επιβεβαίωση της ύπαρξης του χλωριδίου **94** και της κατανάλωσης του αντιδρώντος οξέος, έγινε με φάσμα ^{13}C NMR και σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα¹⁹³ (**Εικόνα 14**). Το τετρακετυλιωμένο αμίδιο **95** προέκυψε από τη σύζευξη της γλυκοπυρανοζυλαμίνης **85α** με το χλωρίδιο **94**, σύμφωνα με τη μεθοδολογία των Kobayashi και Harayama.¹⁹⁴ Το νέο προϊόν απομονώθηκε καθαρό μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης σε καλή απόδοση (60%). Το επίσης νέο ελεύθερο αμίδιο **96** συντέθηκε εύκολα με αποπροστασία του **95** υπό συνθήκες μεθανολικής αμμωνίας και απομονώθηκε καθαρό σε ποσοτική απόδοση.

Αντίδραση Knoevenagel μεταξύ του αμιδίου **95** και της αλδεΐδης **69β**, κάτω από τις προηγούμενες συνθήκες συμπύκνωσης (πιπεριδίνη, ακετονιτρίλιο, θέρμανση) οδήγησε στη σύνθεση του τετρακετυλιωμένου αμιδίου **73β** σε χαμηλή απόδοση (36%). Συγκρίνοντας τη μεθοδολογία του **Σχήματος 56** με αυτή του **Σχήματος 57** για τη σύνθεση του αμιδίου **73β**, είναι σημαντικό να σημειώσουμε ότι στη δεύτερη περίπτωση το προϊόν απομονώνεται εύκολα σε καθαρή μορφή, μετά από χρωματογραφία στήλης. Για τη αντίδραση του γλυκοπυρανοζυλαμιδίου **96** με την αλδεΐδη **69β** για την απευθείας σύνθεση του επιθυμητού απροστάτευτου ακρυλαμιδίου **73ε**, επιλέχθηκε η μεθανόλη ως διαλύτης επειδή είναι γνωστό ότι η αντίδραση Knoevenagel μπορεί να πραγματοποιηθεί

με επιτυχία σε ένα μεγάλο εύρος διαλυτών. Η υψηλή διαλυτότητα των αντιδρώντων σε συνδυασμό με τη χαμηλή διαλυτότητα του προϊόντος **73ε** στη μεθανόλη, οδήγησε στην καταβύθισή του κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και απομόνωση σε καθαρή μορφή απευθείας από το μίγμα της αντίδρασης, σε 68% απόδοση.

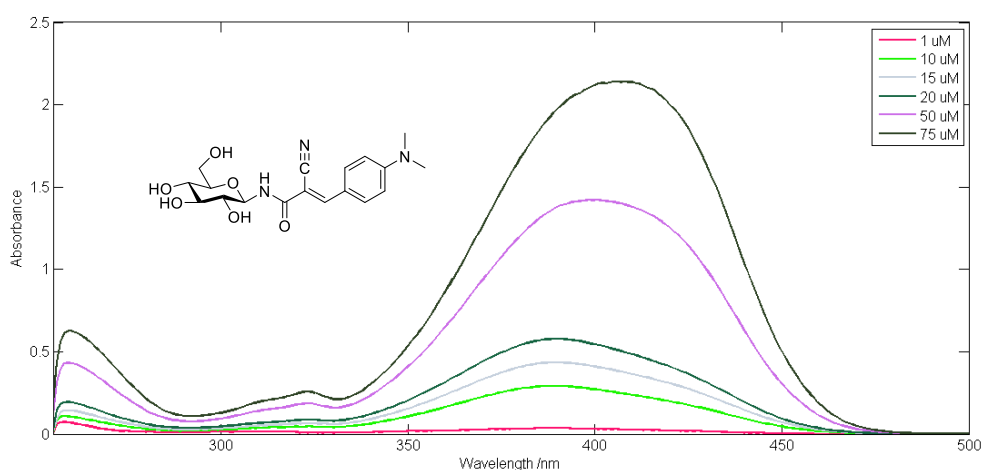


Εικόνα 14: Φάσμα ^{13}C NMR σε CDCl_3 (α) της αντίδρασης παρουσία $(\text{COCl})_2$ και DMF και σύγκριση με αυτά των (β) χλωριδίου 96 και (γ) οξέος 76.¹⁹³

3.2 Φασματοσκοπική μελέτη των εν δυνάμει μοριακών στροφών 73ζ και 73ε

3.2.1 Μελέτη του RotA (73ζ)

Οι νέες ενώσεις **73ζ** και **73ε**, οι οποίες από εδώ και στο εξής θα ονομάζονται **RotA** και **RotB** αντίστοιχα, μελετήθηκαν φασματοσκοπικά ώστε να επιβεβαιωθεί η ικανότητά τους να δρουν ως μοριακοί στροφείς. Για αυτό το σκοπό, ελήφθησαν τα φάσματα απορρόφησης και φθορισμού τους σε περιβάλλον αυξανόμενου ιξώδους αλλά και παρουσία της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Στην **Εικόνα 15** παρουσιάζεται το φάσμα απορρόφησης του **RotA** σε διαλύτη DMSO, σε συγκεντρώσεις 1-75 μM . Παρατηρείται πως το μόριο απορροφά έντονα στην περιοχή 385-410 nm, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις εντοπίζεται μία μικρή μετατόπιση του λ_{max} προς το ερυθρό ($\Delta\lambda = 25 \text{ nm}$).

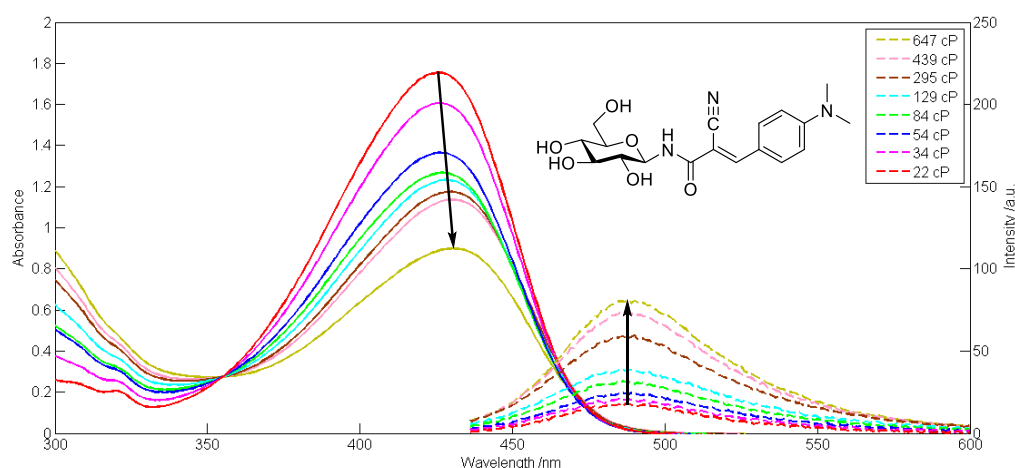


Εικόνα 15: Φάσμα απορρόφησης του RotA σε συγκεντρώσεις 1-75 μM και διαλύτη DMSO.

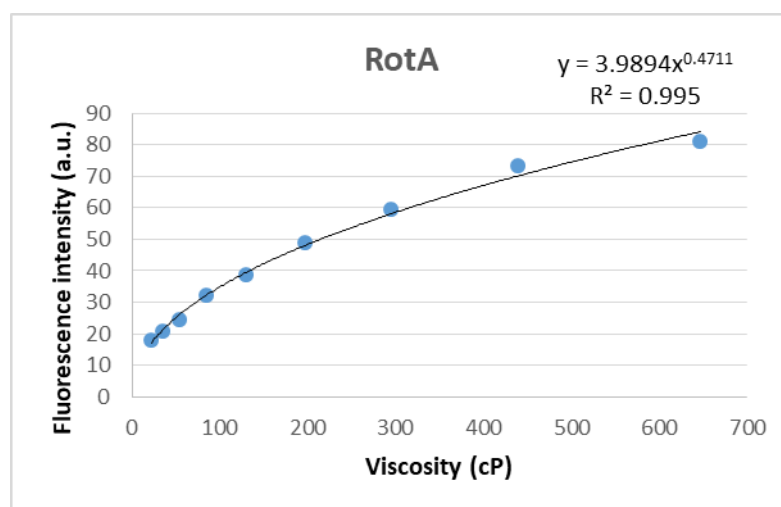
Για να μελετηθεί η σχέση φθορισμού-ιξώδους, χρησιμοποιήθηκαν μίγματα καθαρής αιθυλενογλυκόλης και γλυκερόλης σε διαφορετικές αναλογίες. Οι τιμές ιξώδους των συστατικών όπως και η μέθοδος υπολογισμού του ιξώδους του μίγματος (**Εξίσωση 5**, όπου η_{mix} είναι το ιξώδες του μίγματος, η_i είναι το ιξώδες του κάθε συστατικού και w_i το ποσοστό κατά βάρος επί του συνολικού μίγματος του κάθε συστατικού), ελήφθησαν από βιβλιογραφικές πηγές.^{195,196} Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 16**, όλα τα διαλύματα εμφανίζουν φθορισμό με περίπου 60 nm μετατόπιση Stokes (διαφορά μεταξύ λ_{max} απορρόφησης και φθορισμού). Συγχρόνως, αύξηση του ιξώδους κατά ~30 φορές (από 22 έως 647 cP), οδηγεί σε ~5 φορές αύξηση της έντασης φθορισμού. Όπως φαίνεται στο γράφημα του **Σχήματος 58**, η αύξηση της έντασης φθορισμού ακολουθεί

συνάρτηση δύναμης του ιξώδους, σύμφωνα με την **Εξίσωση 4** (Παρ. 1.4.1, σελ. 51). Αντίστοιχα αποτελέσματα με παρόμοια μετατόπιση Stokes και αύξηση έντασης φθορισμού παρατηρήθηκαν και στα φάσματα του ακετυλιωμένου παραγώγου **73a** (**AcRotA**, **Εικόνα 17** και **Σχήμα 59**). Από τα γραφήματα των **σχημάτων 58** και **59** εξήχθη ο συντελεστής x της **Εξίσωσης 4** ο οποίος λαμβάνει τις τιμές 0.47 και 0.51 για τους **RotA** και **AcRotA** αντίστοιχα, οι οποίες συμφωνούν με τη βιβλιογραφική τιμή 0.47 του εστέρα CCVJ-TEG (**57**, **Σχήμα 28**).⁶¹ Στα φάσματα απορρόφησης παρατηρείται και μία μικρή μεταβολή του $\lambda_{\max}$ κατά 5 nm με την αύξηση του ιξώδους. Από τα παραπάνω στοιχεία, συμπεραίνουμε ότι οι **RotA** και **AcRotA** εμφανίζουν ιδιότητες ΜΣ, όπως αυτές αναπτύχθηκαν στο θεωρητικό μέρος.

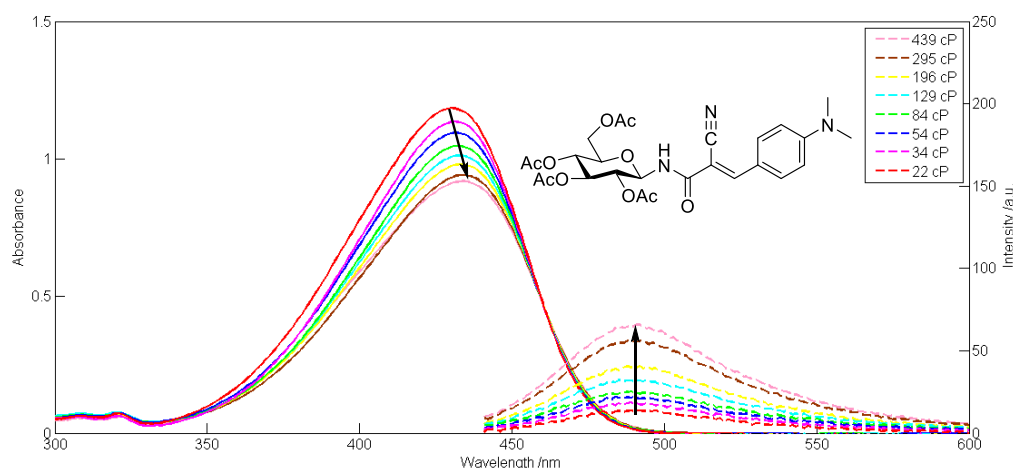
$$\ln \eta_{\text{mix}} = \sum_{i=1}^2 w_i * \ln \eta_i \quad (5)$$



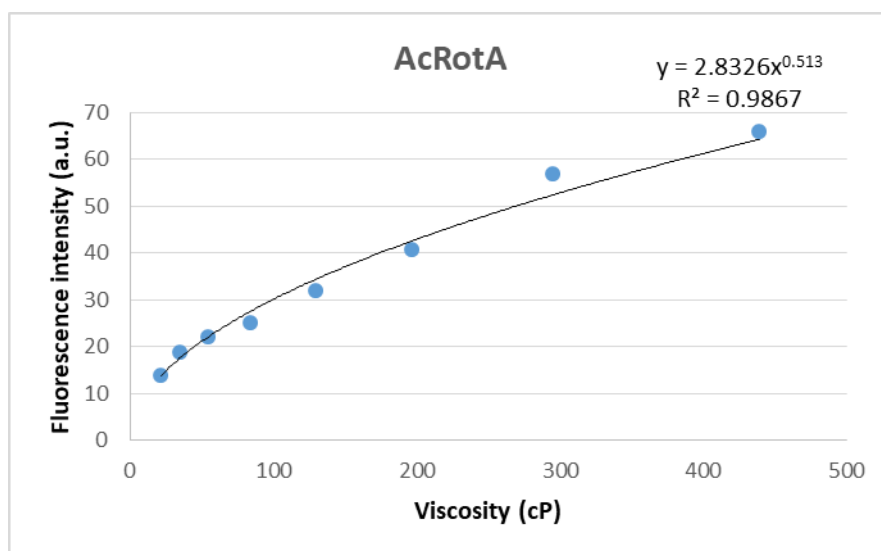
Εικόνα 16: Φάσματα απορρόφησης/φθορισμού ($\lambda_{\text{exc}}=425$ nm) του στροφέα **RotA** (τα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση αύξησης του ιξώδους).



Σχήμα 58: Γράφημα αύξησης φθορισμού του στροφέα **RotA** συναρτήσει του ιξώδους.



Εικόνα 17: Φάσματα απορρόφησης/φθορισμού ($\lambda_{\text{exc}}=430$ nm) του στροφέα AcRotA (τα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση αύξησης του ιξώδους).

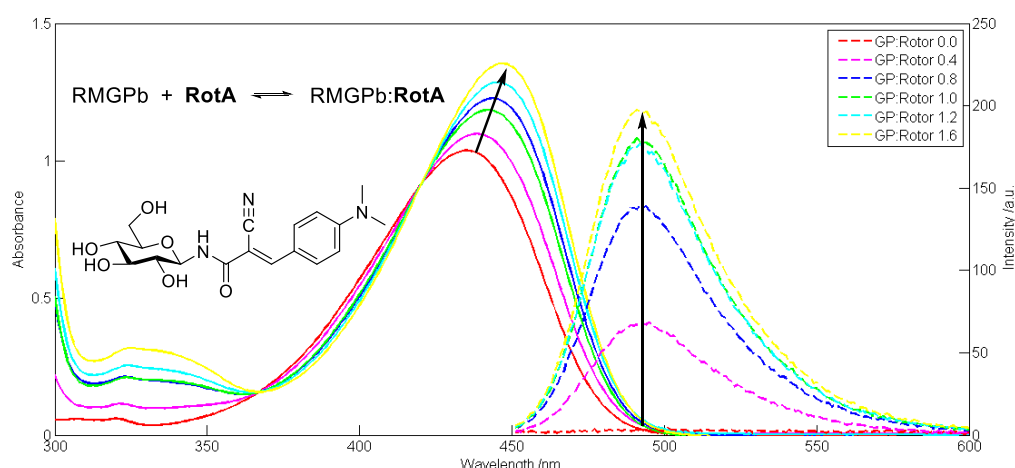


Σχήμα 59: Γράφημα αύξησης φθορισμού του στροφέα AcRotA συναρτήσει του ιξώδους.

Αφού πιστοποιήθηκε πως ο **RotA** παρουσιάζει ιδιότητες ΜΣ, δοκιμάστηκαν να ληφθούν φάσματα παρουσία του ενζύμου στόχου, δηλαδή της RMGPb (Rabbit Muscle GPb). Για το πείραμα παρασκευάστηκαν διαλύματα διάφορων αναλογιών [RMGPb]:[**RotA**] μεταξύ 0 και 1.6 και ελήφθησαν τα φάσματα απορρόφησης και φθορισμού τους. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα φυσιολογικού pH (6.8) με αυτό που πραγματοποιούνται και τα κινητικά πειράματα προσδιορισμού σταθεράς αναστολής (Assay Buffer, AB). Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 18**, αύξηση της [RMGPb] οδηγεί σε μια βαθυχρωμική μετατόπιση του λ_{max} (~10 nm) του **RotA** στο φάσμα απορρόφησης. Η κορυφή στα 330 nm που παρουσιάζει αύξηση

αφορά στην απορρόφηση στο $\lambda_{\max}$ του ενζύμου και συμβαδίζει με την αύξηση της συγκέντρωσής του.

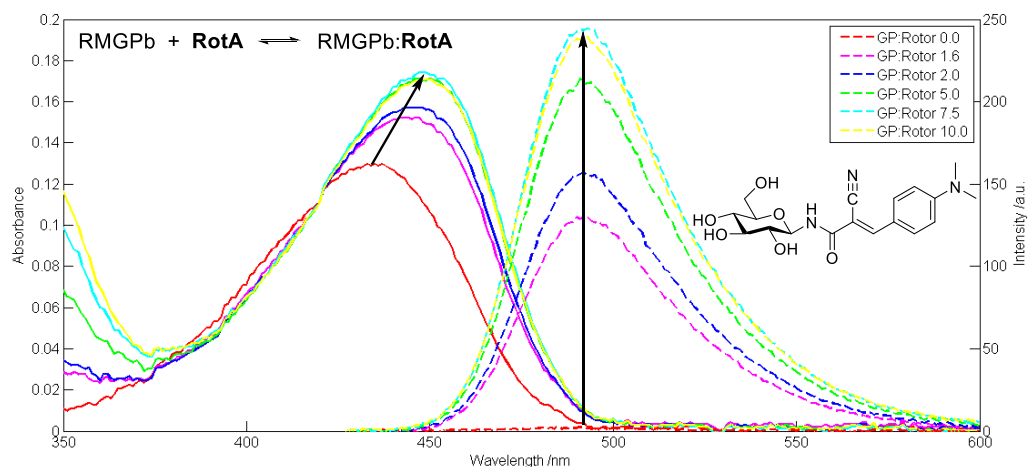
Απουσία ενζύμου, ο φθορισμός του **RotA** στο AB είναι αμελητέος ενώ, παρουσία ενζύμου, εμφανίζεται κορυφή με ~ 50 nm μετατόπιση Stokes (**Εικόνα 18**). Επιπλέον, όσο αυξάνεται η ποσότητα του ενζύμου τόσο αυξάνεται και η ένταση του φθορισμού με αποτέλεσμα να ληφθεί μέχρι και 47 φορές ισχυρότερο σήμα ($I_{\text{emm}} [\text{RMGPb:RotA} = 1.6] / I_{\text{emm}} [\text{RMGPb:RotA} = 0] = 47$). Αυτή η αύξηση του φθορισμού μπορεί να εξηγηθεί εάν θεωρήσουμε ότι η προσθήκη της RMGPb ωθεί την ισορροπία (6) προς τα δεξιά και η δέσμευση του **RotA** μέσα στον περιορισμένο χώρο του καταλυτικού κέντρου της RMGPb (**Παρ. 2.1**), εξαναγκάζει το χρωμοφόρο του στροφέα να παραμείνει στην επίπεδη διαμόρφωση και να φθορίζει έντονα.



Εικόνα 18: Φάσματα απορρόφησης/φθορισμού ($\lambda_{\text{exc}}=440$ nm) του **RotA** σε διαλύματα **RMGPb:RotA** = 0 – 1.6 (τα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση αύξησης της αναλογίας).

Με σκοπό τον προσδιορισμό της ελάχιστης αναλογίας **[RMGPb:RotA]** που απαιτείται για την πλήρη δέσμευση του στροφέα στο καταλυτικό κέντρο, παρασκευάστηκαν διαλύματα αναλογιών **[RMGPb]:[RotA]** μεταξύ 1.6 και 10 και ελήφθησαν τα φάσματα απορρόφησης και φθορισμού τους. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 19**, τα φάσματα απορρόφησης και φθορισμού στις αναλογίες 7.5:1 και 10:1 εμφανίζουν από μηδενική έως ελάχιστη μεταβολή, κάτι το οποίο είναι ισχυρή ένδειξη ότι ο στροφέας βρίσκεται κατά κύριο λόγο δεσμευμένος στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Η συνολική αύξηση της έντασης φθορισμού που παρατηρείται ($I_{\text{emm}} [\text{RMGPb:RotA}$

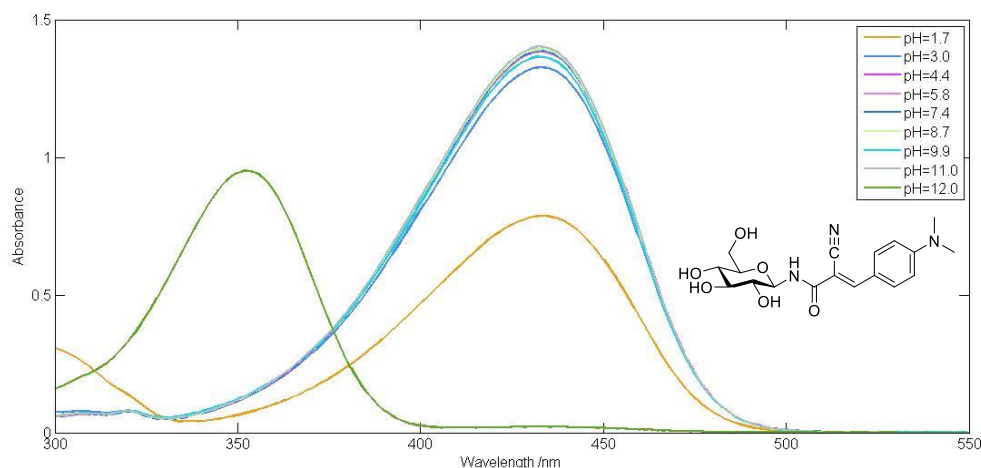
= 10] / I_{emm} [RMGPb:RotA = 0] = 80) είναι σχεδόν διπλάσια αυτής στην αναλογία 1.6, γεγονός που υποδεικνύει ότι στην τελευταία ~50% του στροφέα βρίσκεται ελεύθερο στο διάλυμα.



Εικόνα 19: Φάσματα απορρόφησης/φθορισμού ($\lambda_{\text{exc}} = 416 \text{ nm}$) του RotA σε διαλύματα RMGPb:RotA = 1.6 - 10 (τα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση αύξησης της αναλογίας).

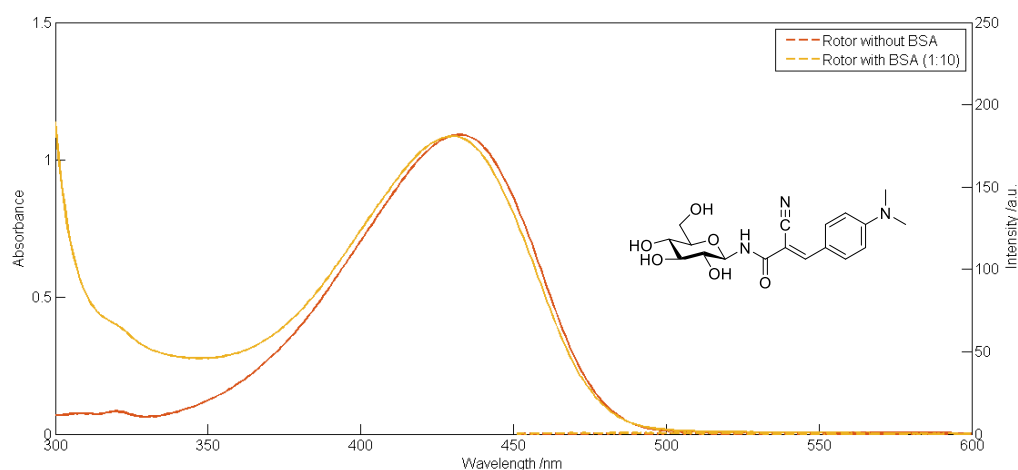
3.2.2 Επιβεβαίωση με τυφλά πειράματα

Με σκοπό την επιβεβαίωση της παραπάνω εξήγησης των αποτελεσμάτων, μελετήθηκε αρχικά η συμπεριφορά του στροφέα **RotA** σε ένα μεγάλο εύρος pH (1.7-12.0) με στόχο να αποκλειστεί η πιθανότητα ότι η αύξηση του φθορισμού οφείλεται στη συμπεριφορά του καταλυτικού κέντρου ως ένα ισχυρά βασικό περιβάλλον.¹⁴⁶ Χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα BRB¹⁹⁷ (λεπτομέρειες στην **Παρ. 4.3.5**). Κατά τη μετάβαση από pH=1.7 σε pH=3.0, υπήρξε μια σημαντική αλλαγή της έντασης απορρόφησης χωρίς αλλαγή στο λ_{max} (**Εικόνα 20**). Στην περιοχή pH 3.0 - 11.0 η ένωση παραμένει σταθερή ενώ σε pH=12.0, το διάλυμα αποχρωματίζεται ακαριαία, η χαρακτηριστική κορυφή στα 434 nm εξαφανίζεται και εμφανίζεται μία νέα κορυφή στα 359 nm, γεγονός που υποδεικνύει αποικοδόμηση του χρωμοφόρου. Σε όλα τα pH η ένταση φθορισμού είναι μηδενική γεγονός που αποκλείει την πιθανότητα εξάρτησης του φθορισμού από το pH.

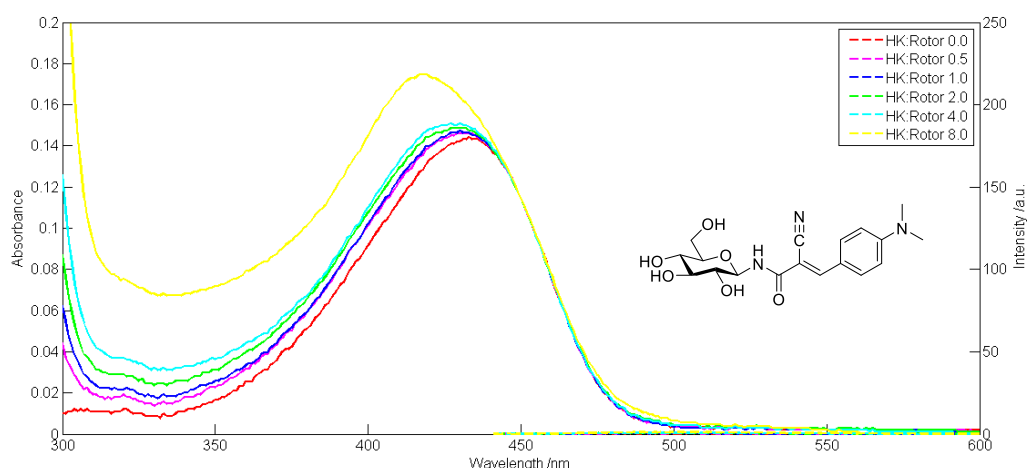


Εικόνα 20: Φάσματα απορρόφησης του RotA σε υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα με pH = 1.7 – 12.0.

Επίσης, μελετήθηκε η πιθανότητα μη-ειδικής δέσμευσης του **RotA**, με αντίστοιχη αύξηση του φθορισμού, σε πρωτεϊνικούς στόχους, όπως η βόεια αλβουμίνη ορού (BSA) και η εξοκινάση τύπου 3 (HK-III). Η πρώτη χρησιμοποιήθηκε επειδή είναι η πιο κοινή πρωτεΐνη στον ορό ενώ η δεύτερη επειδή είναι γνωστό ότι έχει ισχυρή συγγένεια για παράγωγα της γλυκόζης. Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση ήταν το HBS χωρίς γλυκόζη (λεπτομέρειες στην **Παρ. 4.1.3**) για την BSA και ένα ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (λεπτομέρειες στην **Παρ. 4.1.3**) για την HK-III, αντίστοιχα. Τόσο στο φάσμα φθορισμού παρουσία HK-III όσο και παρουσία BSA, παρατηρήθηκε μηδενικό σήμα φθορισμού (τα φάσματα φθορισμού φαίνονται κάτω δεξιά σε κάθε εικόνα) σε αναλογίες μέχρι και ~10:1 (Πρωτεΐνη:RotA), γεγονός που υποστηρίζει την απουσία μη-ειδικής πρόσδεσης του συγκεκριμένου στροφέα με αυτές τις πρωτεΐνες (**Εικόνες 21, 22**).



Εικόνα 21: Φάσματα απορρόφησης του στροφέα RotA παρουσία BSA σε ισότονο διάλυμα HBS χωρίς γλυκόζη.



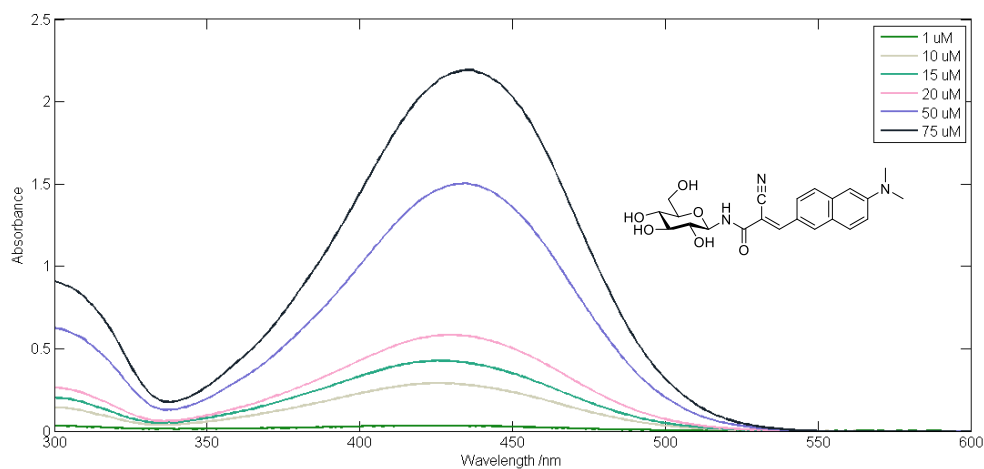
Εικόνα 22: Φάσματα απορρόφησης του στροφέα RotA παρουσία HK-III σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=7.5.

3.2.3 Μελέτη του RotB (73ε)

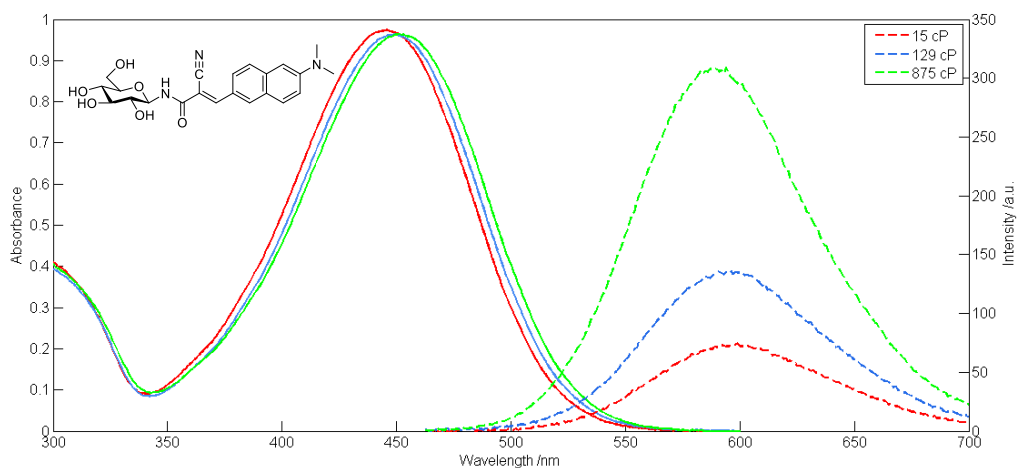
Αντίστοιχη μελέτη των φασματοσκοπικών ιδιοτήτων πραγματοποιήθηκε για το **RotB** και στην **Εικόνα 23** παρουσιάζεται το φάσμα απορρόφησής του σε διαλύτη DMSO. Όπως αναμενόταν, λόγω της εκτεταμένης συζυγίας που υπάρχει στο χρωμοφόρο της ένωσης, το φάσμα είναι μετατοπισμένο προς την περιοχή του ερυθρού. Ο **RotB** απορροφά έντονα στην περιοχή 400-475 nm ενώ το $\lambda_{\max}$, αυξανόμενης της συγκέντρωσης, παρουσιάζει μία μικρή μετατόπιση προς το ερυθρό ($\Delta\lambda = 10$ nm). Με σκοπό την επιβεβαίωση των ιδιοτήτων ΜΣ του **RotB**, μελετήθηκε η συμπεριφορά του σε διαλύματα αυξανόμενου ιξώδους. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 24**, αύξηση του ιξώδους οδηγεί σε αύξηση της έντασης φθορισμού, όπως αναμένεται για έναν ΜΣ. Ειδικότερα, αύξηση του ιξώδους κατά ~60 φορές (από 15 έως 875 cP), οδηγεί σε ~4 φορές αύξηση της έντασης φθορισμού σε σύγκριση με τον RotA όπου ~30 φορές αύξηση του ιξώδους επέφερε ~5 φορές αύξηση του φθορισμού. Η σχέση ιξώδους-φθορισμού και εδώ περιγράφεται με συνάρτηση δύναμης και ο συντελεστής x λαμβάνει την τιμή 0.35 όπως φαίνεται στο **Σχήμα 60**.

Στη συνέχεια ο στροφέας **RotB** μελετήθηκε παρουσία της RMGPb στις ίδιες συνθήκες όπως είχε μελετηθεί νωρίτερα και ο **RotA** και συγκεκριμένα σε αναλογίες ενζύμου προς στροφέα μέχρι και 7.5:1. Μη αναμενόμενα, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 25** ο **RotB** ουσιαστικά δεν απορροφά στην περιοχή 400-475 nm, έχοντας $A < 0.05$, σε αντίθεση με την RMGPb της οποίας η κορυφή υπάρχει ξεκάθαρα και αυξάνεται με αύξηση της συγκέντρωσής της. Εφόσον οι παραπάνω δραματικές αλλαγές στο φάσμα απορρόφησης του **RotB** παρατηρούνται και απουσία ενζύμου, είναι πιθανό ότι αυτές

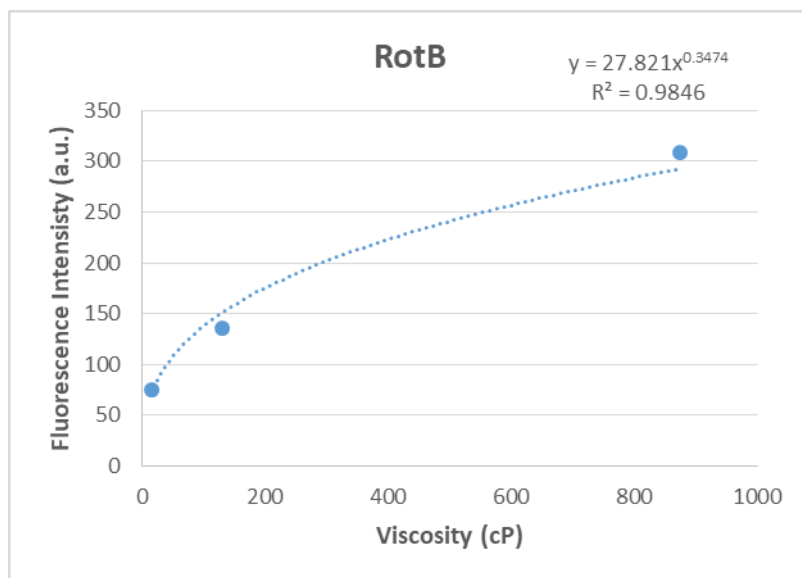
προκαλούνται από το ρυθμιστικό διάλυμα (AB) και οφείλονται είτε στο pH αυτού είτε σε κάποιο συστατικό του που αντιδρά με το **RotB**.



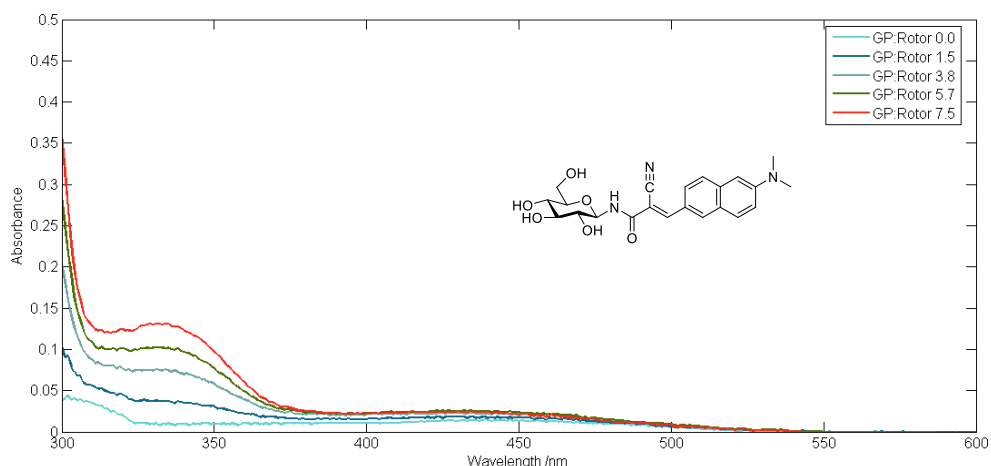
Εικόνα 23: Φάσμα απορρόφησης του RotB σε συγκεντρώσεις 1-75 μM σε διαλύτη DMSO.



Εικόνα 24: Φάσματα απορρόφησης/φθορισμού του RotB σε ιξώδη διαλύματα ($\lambda_{\text{exc}} = 451$ nm).

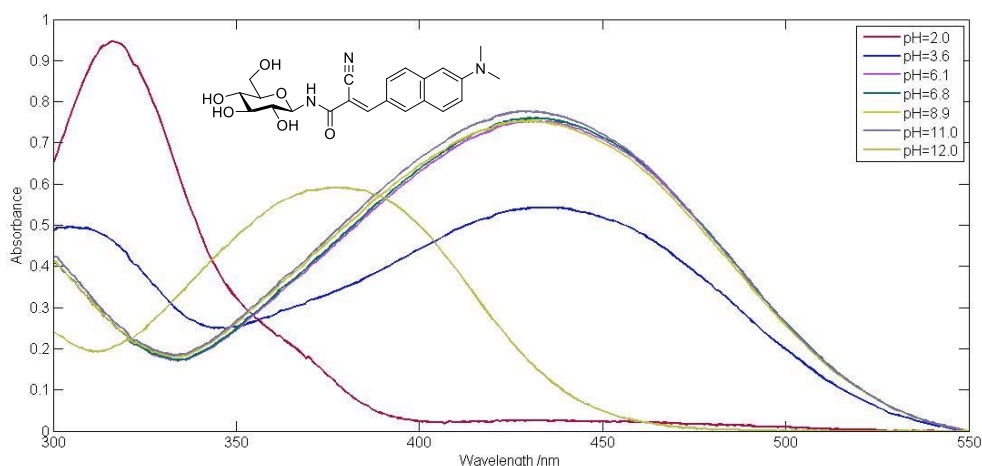


Σχήμα 60: Γράφημα αύξησης φθορισμού του στροφέα RotB συναρτήσεως του ιξώδους.

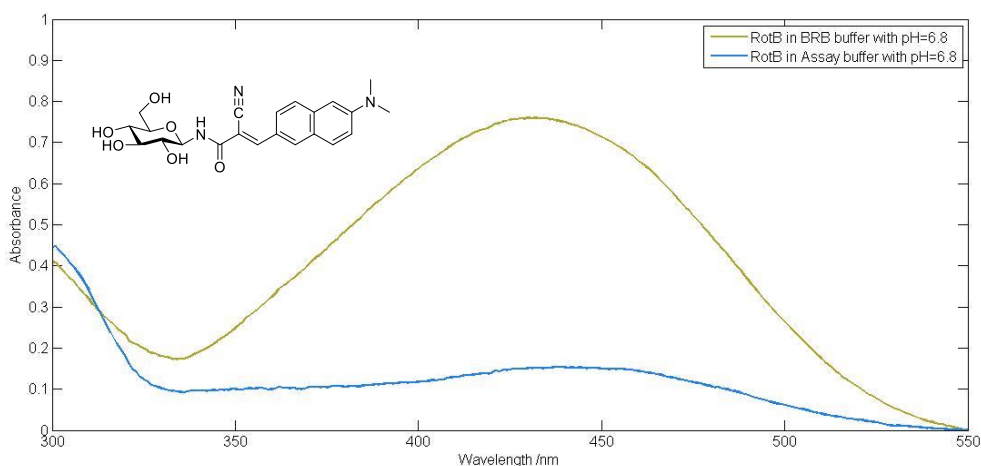


Εικόνα 25: Φάσματα απορρόφησης του συμπλόκου RMGPb-RotB όπου παρατηρείται απώλεια της κορυφής του στροφέα.

Για τον προσδιορισμό της επίδρασης του pH στα φάσματα απορρόφησης του **RotB**, χρησιμοποιήθηκε και σε αυτή την περίπτωση το ρυθμιστικό διάλυμα BRB¹⁹⁷ σε ένα μεγάλο εύρος pH (2.0-12.0). Τα φάσματα φαίνονται στην **Εικόνα 26** και παρατηρούνται οι ίδιες τρεις αλλαγές, όπως και στην περίπτωση του RotA (**Εικόνα 20**). Σε ισχυρά όξινο περιβάλλον (pH = 2.0) το φάσμα του στροφέα χαρακτηρίζεται από την έλλειψη της κορυφής στα 430 nm και την ύπαρξη μίας έντονης κορυφής στα 315 nm, που πιθανά υποδεικνύει την ύπαρξη πρωτονιωμένου **RotB** στο διάλυμα. Αύξηση του pH οδηγεί στην εμφάνιση της ουδέτερης μορφής του **RotB** η οποία παραμένει ανεπηρέαστη για τιμές pH από 6.1 μέχρι και 11.0. Η μετάβαση από την πρωτονιωμένη στην ουδέτερη μορφή του **RotB** υποδεικνύεται από την ύπαρξη ενός ισοσβεστικού σημείου στα 353 nm (**Εικόνα 26**). Τέλος, σε αντιστοιχία με το **RotA**, σε pH = 12.0 λαμβάνει χώρα αποικοδόμηση του μορίου ακολουθούμενη από ακαριαίο αποχρωματισμό του διαλύματος, εξαφάνιση της κορυφής στα 430 nm και εμφάνιση νέας κορυφής στα 375 nm. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 27**, σύγκριση των φασμάτων σε pH = 6.8, σε ρυθμιστικό διάλυμα BRB ή assay buffer, δείχνει ότι στο πρώτο εμφανίζεται κορυφή στο $\lambda_{\max}$ ενώ στο δεύτερο παρατηρείται απόσβεσή της. Αφού το ουδέτερο pH δεν επηρεάζει το $\lambda_{\max}$ του **RotB** στα 430 nm, το ενδιαφέρον στράφηκε στα συστατικά του assay buffer.



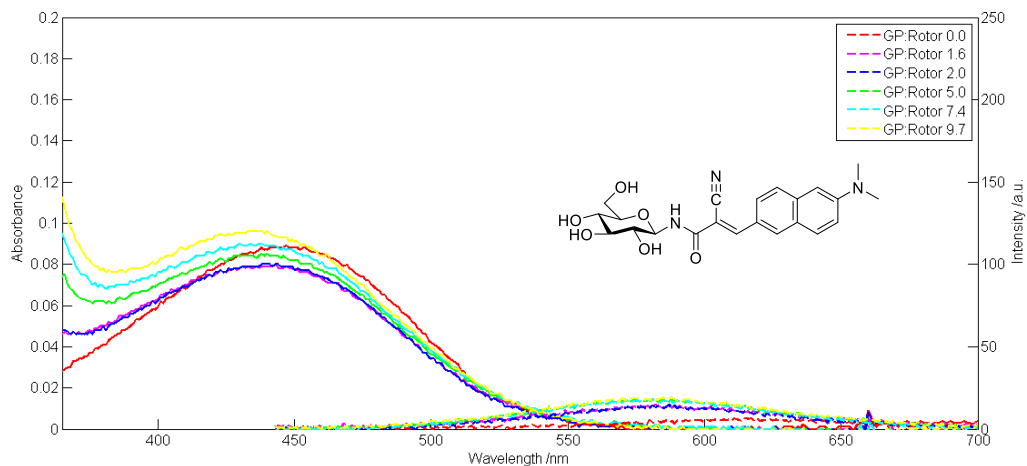
Εικόνα 26: Φάσματα απορρόφησης του στροφέα RotB σε υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα με pH = 2.0-12.0.



Εικόνα 27: Σύγκριση των φασμάτων απορρόφησης του RotB σε pH = 6.8 σε ρυθμιστικά διαλύματα BRB και assay buffer.

Έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι το α,β-ακόρεστο σύστημα (*E*)-α-κυανο-β-αρυλακρυλικών παραγώγων είναι ευαίσθητο σε αντιδράσεις 1,4-προσθήκης από θειόλες.¹⁹⁸ Το assay buffer περιέχει δύο καλά πυρηνόφιλα και συγκεκριμένα β-μερκαπτοαιθανόλη (βME) και νατραζίδιο (NaN₃). Για το λόγο αυτό, μελετήθηκαν τα φάσματα απορρόφησης/φθορισμού του **RotB** παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης RMGPb σε assay buffer, απουσία βME και NaN₃. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 28**. Όπως φαίνεται στα φάσματα η αρχική υπόθεση επιβεβαιώνεται αφού παρατηρείται ξεκάθαρα η αναμενόμενη κορυφή του **RotB** στα 430 nm. Συγχρόνως, παρατηρείται αυξανόμενης έντασης φθορισμός όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του ενζύμου αλλά σε αυτή την περίπτωση, η ένταση είναι σημαντικά μικρότερη αυτής που είχε παρατηρηθεί στην περίπτωση του **RotA**. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αύξηση της

έντασης φθορισμού κατά 3 φορές στο εύρος αναλογιών RMGPb:**RotB** = 0-10, ενώ η αντίστοιχη αύξηση στην περίπτωση του **RotA** ήταν 80 φορές. Το απροσδόκητο αυτό αποτέλεσμα αναμένεται να αξιολογηθεί μετά την κινητική και κρυσταλλογραφική μελέτη της αναστολής της δράσης της RMGPb από τον **RotB**, οι οποίες βρίσκονται εν εξελίξει.

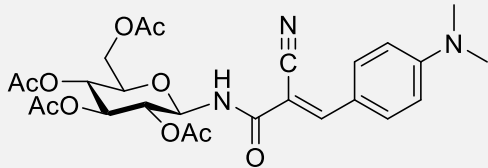
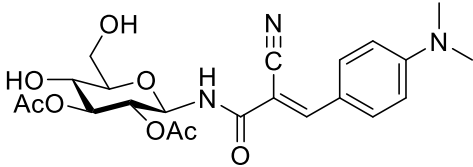
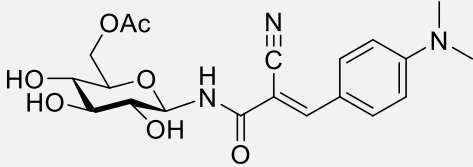
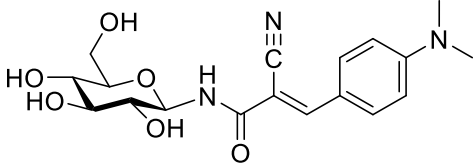
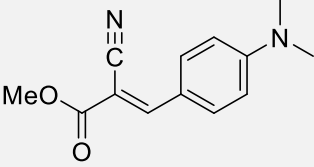


Εικόνα 28: Φάσματα απορρόφησης/φθορισμού ($\lambda_{exc} = 432 \text{ nm}$) του συμπλόκου RMGPb·RotB (σε assay buffer απουσία βME και NaN₃).

3.3 *In vitro* μελέτες με το στροφέα RotA και τα παράγωγά του

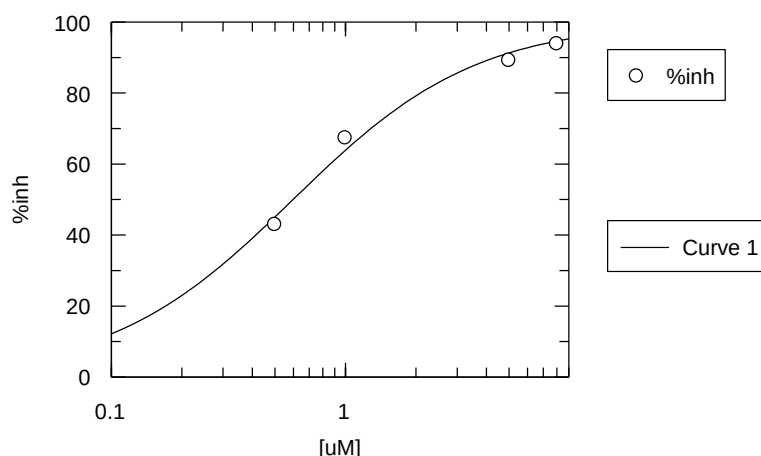
Αφού πιστοποιήθηκε ότι ο **RotA** λειτουργεί ως μοριακός στροφέας, η μελέτη συνεχίστηκε με κινητικό προσδιορισμό της σταθεράς αναστολής, κρυσταλλογραφικό προσδιορισμό της θέσης σύνδεσης και παρατήρηση των αλληλεπιδράσεών του σε περιβάλλον ζωντανών κυττάρων με μικροσκοπία φθορισμού και συνεστιακή μικροσκοπία. Στόχος ήταν η επιβεβαίωση της λειτουργίας του ως ένας φθορίζον ιχνηθέτης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Για τους σκοπούς αυτής της μελέτης αξιοποιήθηκαν εκτός του **RotA** και οι ενώσεις **73α,δ,η** καθώς και ο μεθυλεστέρας **90** οι οποίες παρουσιάζονται στον παρακάτω **Πίνακα 2** μαζί με τις κωδικές ονομασίες τους με τις οποίες θα αναφέρονται από εδώ και στο εξής.

Πίνακας 2. Μοριακοί στροφείς που χρησιμοποιήθηκαν σε κυτταρικές μελέτες.

Δομή της ένωσης	Αρίθμηση στο κείμενο	Κωδική ονομασία
	73α	AcRotA
	73δ	dAcRotA
	73η	mAcRotA
	73ζ	RotA
	90	MeRotA

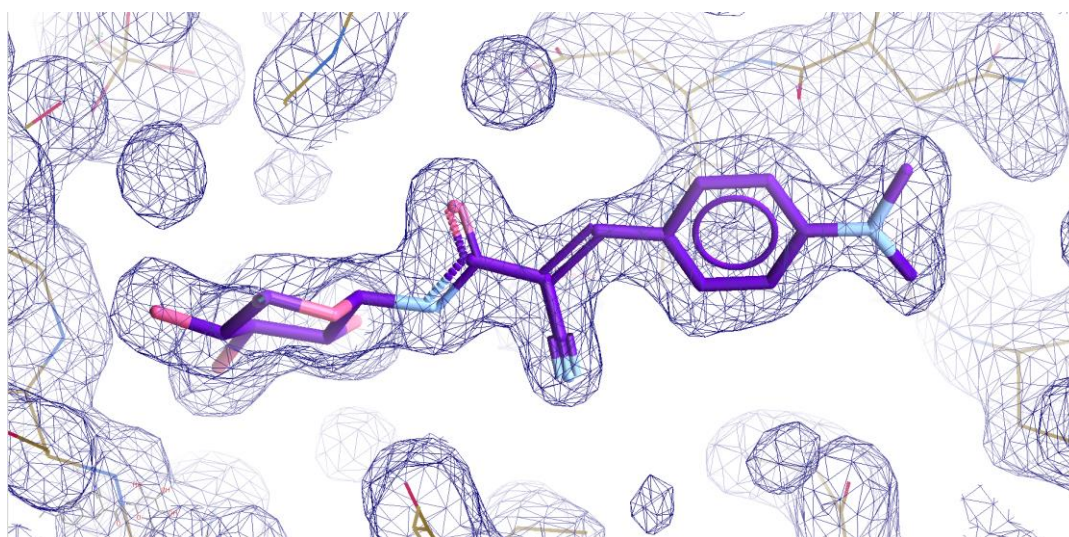
3.3.1 Κινητική και κρυσταλλογραφική μελέτη του στροφέα RotA

Η ικανότητα αναστολής της δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από τον **RotA** μετρήθηκε με *in vitro* κινητικό πείραμα και υπολογίστηκε τιμή $IC_{50} = 0,597 \pm 0,05$ μ M. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο της Δρος Ευαγγελίας Χρυσίνα στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών από την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Εμμανουήλ Ειρήνη ακολουθώντας βιβλιογραφική πορεία.⁷⁵ Παρακάτω φαίνεται το διάγραμμα του %ποσοστού αναστολής συναρτήσει της συγκέντρωσης του αναστολέα (**Σχήμα 61**). Το παραπάνω πείραμα απέδειξε ότι ο **RotA** αποτελεί ισχυρό αναστολέα της RMGPb, στην περιοχή των nM.



Σχήμα 61: Γραφική αναπαράσταση ανασταλτικής ικανότητας του **RotA**.

Ο **RotA** μελετήθηκε με τη βοήθεια κρυσταλλογραφίας ακτινών Χ ως σύμπλοκο με το ένζυμο με σκοπό την επιβεβαίωση της θέσης σύνδεσης (**Εικόνα 28**).



Εικόνα 29: Χάρτης διαφοράς ηλεκτρονικής πυκνότητας ($2F_o - F_c$) στο καταλυτικό κέντρο του συμπλόκου **RMGPb·RotA**.

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε σταθμό Synchrotron από τον προπτυχιακό φοιτητή Διονύση Νεόφυτο υπό την επίβλεψη της Δρος Ευαγγελίας Χρυσίνα στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών. Ελήφθησαν υψηλής ανάλυσης κρυσταλλογραφικά δεδομένα (1.85 Å) τα οποία έδειξαν εμφανή δέσμευση του **RotA** στο καταλυτικό κέντρο της **RMGPb**.

Έχοντας ολοκληρώσει τη φασματοσκοπική, κινητική και κρυσταλλογραφική μελέτη του **RotA**, έχει επιβεβαιωθεί ότι (α) ο **RotA** είναι ισχυρός αναστολέας της **GP** στην περιοχή των nM, (β) η ανασταλτική του δράση εκφράζεται με δέσμευσή του στο καταλυτικό κέντρο της **GP**, (γ) έχει ιδιότητες μοριακού στροφέα εμφανίζοντας μηδενικό φθορισμό μέσα σε υδατικά διαλύματα σε ένα μεγάλο εύρος pH και (δ) η στενότητα του

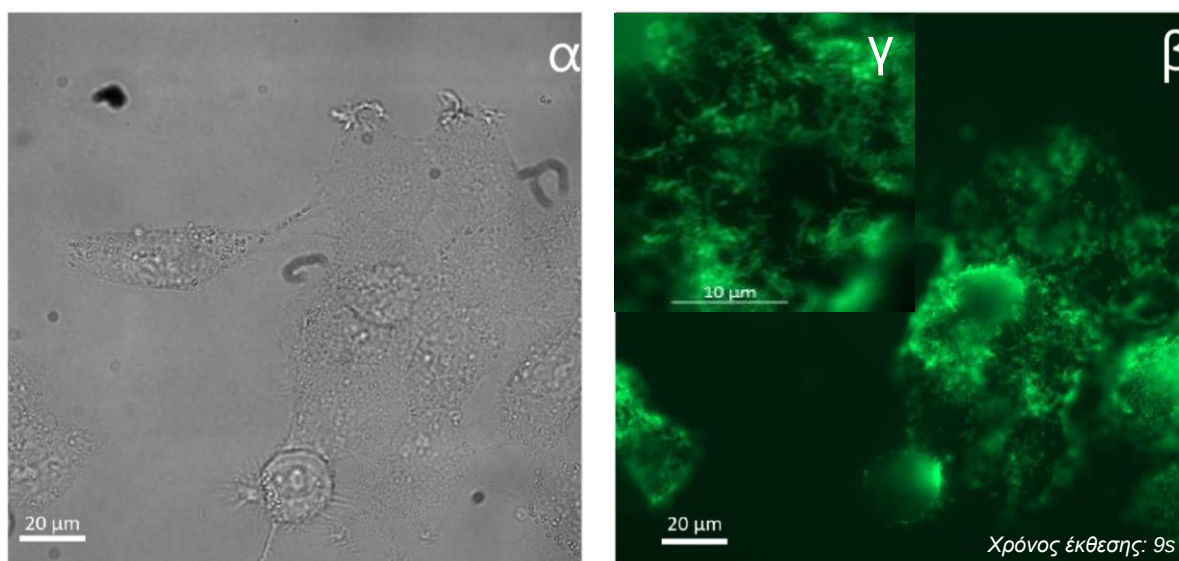
καταλυτικού κέντρου δεν επιτρέπει την περιστροφή του χρωμοφόρου και τη δημιουργία κατάστασης TICT, με αποτέλεσμα την παρατηρούμενη 80πλάσια αύξηση της έντασης φθορισμού κατά την πρόσδεση στη **GP**.

3.3.2 Κυτταρικές μελέτες με το στροφέα RotA και τα παράγωγά του

Με στόχο την επιβεβαίωση της ειδικής πρόσδεσης του **RotA** στη **GP** μέσα σε ένα κυτταρικό περιβάλλον πραγματοποιήθηκαν τα παρακάτω *in vitro* πειράματα. Για την επιτυχία της μελέτης θα έπρεπε ναδειχθεί ότι ο στροφέας **RotA** διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και δεσμεύεται στο ένζυμο στόχο αναστέλλοντας τη λειτουργία του. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές A431 (ανθρώπινο επιδερμικό καρκίνωμα)¹⁹⁹, HEPG2 (ανθρώπινος καρκίνος του ήπατος)²⁰⁰, SK-N-SH (ανθρώπινο νευροβλάστωμα)²⁰¹ και U251 (ανθρώπινο γλιοβλάστωμα)²⁰². Η παρατήρηση πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Βιολογίας του ΕΚΠΑ με χρήση μικροσκοπίου φθορισμού και συνεστιακού μικροσκοπίου (λεπτομέρειες στην **Παρ. 4.1.1**) υπό την επίβλεψη της αναπληρώτριας καθηγήτριας Παπαζαφείρη Παναγιώτας. Η επιμέλεια των κυτταροκαλλιιεργειών, οι πειραματικές πορείες και η συλλογή των φωτογραφιών του μικροσκοπίου φθορισμού πραγματοποιήθηκαν από την υποψήφια διδάκτορα Πάσχου Μαρία και τη φοιτήτρια Κογκάκη Άρτεμη. Η συλλογή των φωτογραφιών στο συνεστιακό μικροσκόπιο πραγματοποιήθηκε από την υποψήφια διδάκτορα Καταραχιά Σταματία και τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Γιαννοπούλου Κατερίνα. Παρακάτω θα αναφερθούν μόνο τα σημαντικότερα πειράματα με τη βοήθεια των οποίων καθορίστηκε και επιβεβαιώθηκε η απαραίτητη μεθοδολογία για τη μεταφορά του αναστολέα **RotA** στο ένζυμο στόχο. Περισσότερες λεπτομέρειες θα αναφερθούν στις πτυχιακές εργασίες των παραπάνω φοιτητριών.

Αρχικά, δοκιμάστηκε επώαση κυτάρων A431 παρουσία **RotA** σε τελική συγκέντρωση 30 μM (αραίωση διαλύματος του στροφέα σε DMSO με θρεπτικό υλικό). Τα δείγματα τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρο πλάκα 8 φρεατίων (8-well plate) στο μικροσκόπιο φθορισμού, διεγείρονται με φως στην περιοχή 450-490 nm και παρατηρείται ο φθορισμός τους στα 500-550 nm μέσω φίλτρου EGFP (Enhanced GFP), όπως ορίζεται από το όργανο. Οι παραπάνω περιοχές διέγερσης και εκπομπής περιέχουν ένα μέρος του αντίστοιχου φάσματος του **RotA** και, αν και δεν αντιστοιχούν στο λ_{max} , επιτρέπουν την επιτυχή παρατήρηση. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 30**

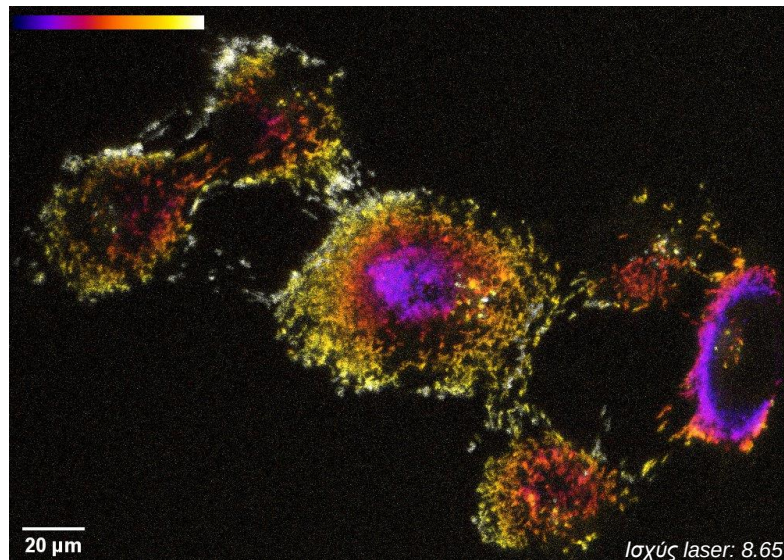
παρατηρείται έντονος φθορισμός (χρόνος έκθεσης 9 s) ενώ αξιοσημείωτη είναι η παρατήρηση νηματοειδών δομών πάχους 0.5-1 μm και μήκους 2-5 μm .



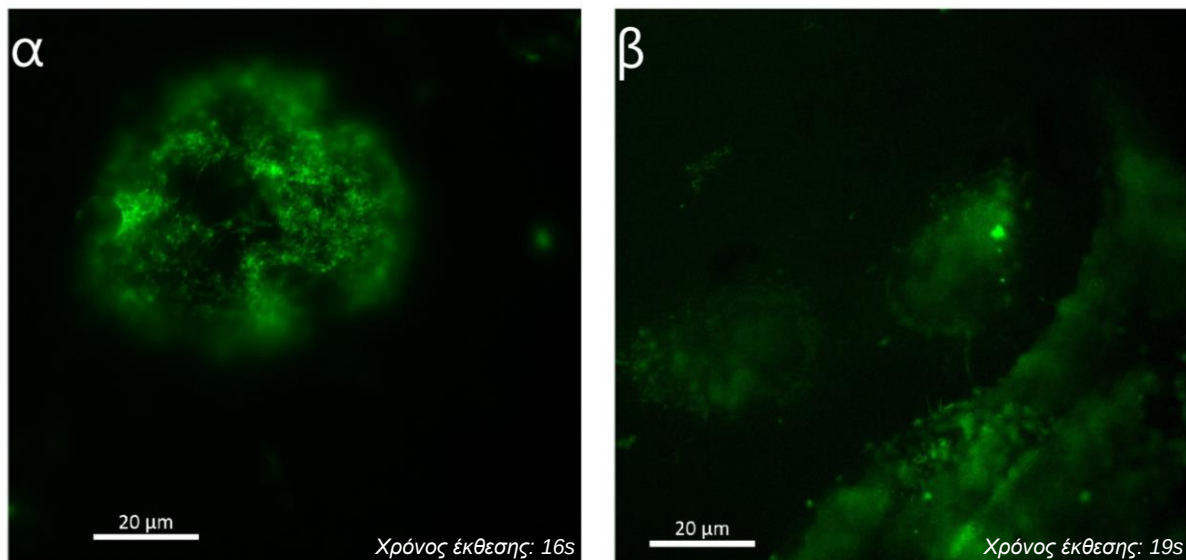
Εικόνα 30: A431 παρουσία RotA για 20 ώρες α) κάτω από λευκό φως, β) με φίλτρο EGFP και γ) ένθετη μεγέθυνση των νηματοειδών δομών.

Παρατήρηση των ίδιων δομών με LSCM, επιτρέπει την τρισδιάστατη παρατήρηση των κυττάρων. Η πολυχρωματική **Εικόνα 31** απεικονίζει τη Z-σωρό (Z-stack) των τομών που ελήφθησαν από το συνεστιακό μικροσκόπιο, δηλαδή το άθροισμα των τομών αν τοποθετηθούν η μία πάνω στην άλλη κατά τον άξονα Z. Η κλίμακα του χρώματος υποδηλώνει το πόσο βαθιά (εν προκειμένω πόσο πίσω από τη σελίδα) εντοπίζεται το σήμα. Συγκεκριμένα, το μωβ χρώμα υποδηλώνει επιφανειακό σήμα και το λευκό την επιφάνεια επαφής. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 31** οι νηματοειδείς δομές εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στη μεμβράνη. Εξάιρεση αποτελούν λίγα λευκά σημεία στο κέντρο της εικόνας όπου φαίνονται να βρίσκονται εσωτερικά της επιφάνειας.

Ένα ακόμα γεγονός που συνηγορεί στην δέσμευση του RotA από δομές στην επιφάνεια του κυττάρου, είναι πως μετά από πλύσεις με διάλυμα της επιφανειοδραστικής ουσίας Triton-X μονιμοποιημένων κυττάρων που έχουν επωαστεί με το στροφέα **RotA**, το σήμα των δεσμευμένων μορίων (**Εικόνα 32**) φαίνεται να εξασθενεί ακόμα περισσότερο. Η ακριβής φύση των νηματοειδών μεμβρανικών δομών δεν έχει καθοριστεί ακόμα και βρίσκεται υπό μελέτη.



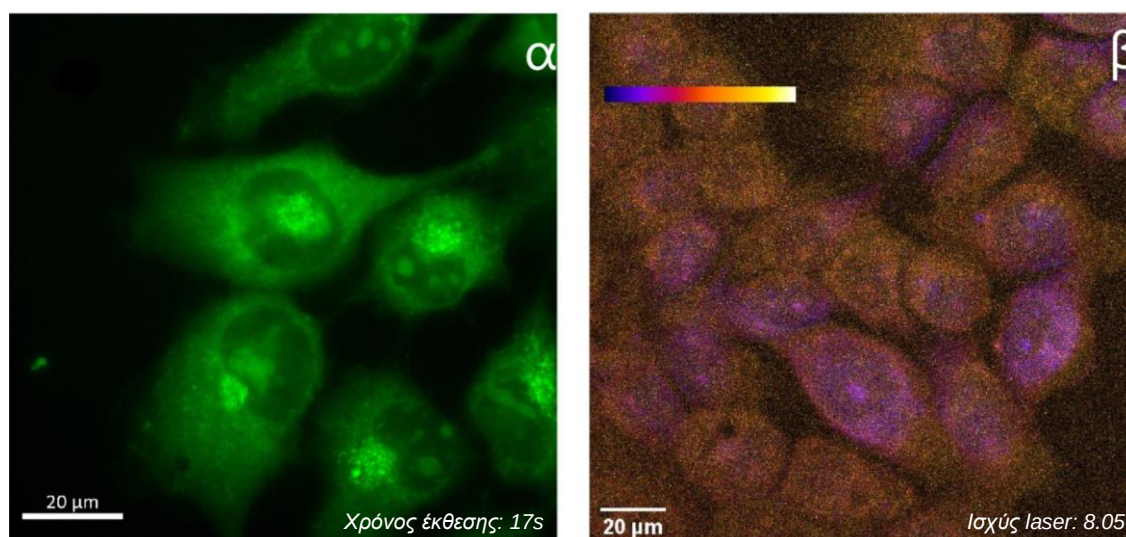
Εικόνα 31: Πολυχρωματική απεικόνιση του βάθους του σήματος του στροφέα RotA.



Εικόνα 32: A431 παρουσία RotA α) πριν και β) μετά τη μονιμοποίηση και πλύσιμο με Triton-X.

Με στόχο να υποβοηθηθεί ο **RotA** ώστε να διαπεράσει τη μεμβράνη των κυττάρων, δοκιμάστηκαν διαφορετικές συνθήκες όπως μεγαλύτεροι χρόνοι επώασης (συγκεκριμένα 48 και 72 ώρες), χρήση θρεπτικού υλικού φτωχού σε γλυκόζη αλλά και ο γνωστός λιπιδικής φύσης μεταφορέας λιποφεκταμίνη (lipofectamine) ο οποίος χρησιμοποιείται συνήθως για επιμόλυνση κυττάρων (transfection) με γενετικό υλικό.²⁰³ Οι μεγαλύτεροι χρόνοι επώασης δίνουν περισσότερο χρόνο στα μόρια εκτός των κυττάρων να έρθουν σε επαφή με τη μεμβράνη και να τη διαπεράσουν μέσω ωσμωτικών φαινομένων. Αντίστοιχα, το φτωχό σε γλυκόζη περιβάλλον ενισχύει τη διαδικασία της ενδοκυττάρωσης και συνεπάγεται μεγαλύτερη πιθανότητα των μορίων του στροφέα να εισέλθουν στο κύτταρο. Τέλος, λόγω του λιπόφιλου αρωματικού

τμήματος του **RotA**, έγινε η εικασία πως θα μπορούσε να εμφανίζει συγγένεια με λιπίδια μεταφορείς ώστε να μπορεί να δεσμευτεί σε αυτά και να τα χρησιμοποιήσει ως «όχημα» διαπίδυσης της μεμβράνης. Παρόλα αυτά, στην πράξη, καμία από αυτές τις στρατηγικές δεν παρουσίασε αξιόλογα αποτελέσματα. Η δυσκολία διαπίδυσης της μεμβράνης και η πιθανή δέσμευση του στροφέα **RotA** σε αυτή, πιθανώς να οφείλεται στην υψηλή συγγένεια κάποιου από τα δύο δομικά τμήματα που τον απαρτίζουν (σακχαρικό και αρωματικό) με τη μεμβράνη. Με στόχο να καθορίσουμε σε ποιο από τα δύο τμήματα οφείλεται η συγγένεια με τη μεμβράνη χρησιμοποιήθηκε ο μεθυλεστέρας **90 (MeRotA)**. Έχει ήδη αναφερθεί⁹¹ πως ο μεθυλεστέρας της CCVJ (**46**), ενός δομικού ανάλογου του **MeRotA**, δεν προσκολλάται στη μεμβράνη και συσσωρεύεται στο κυτόπλασμα. Πράγματι, παρατήρηση του **MeRotA** τόσο στο μικροσκόπιο φθορισμού όσο και στο συνεστιακό, έδειξε ότι ο στροφέας εντοπίζεται εντός του κυττάρου (**Εικόνα 33**).



Εικόνα 33: α) A431 παρουσία του εστέρα 90 για 24 ώρες στο μικροσκόπιο φθορισμού (φίλτρο EGFP) και β) πολυχρωματική απεικόνιση του βάθους του σήματος του εστέρα 90.

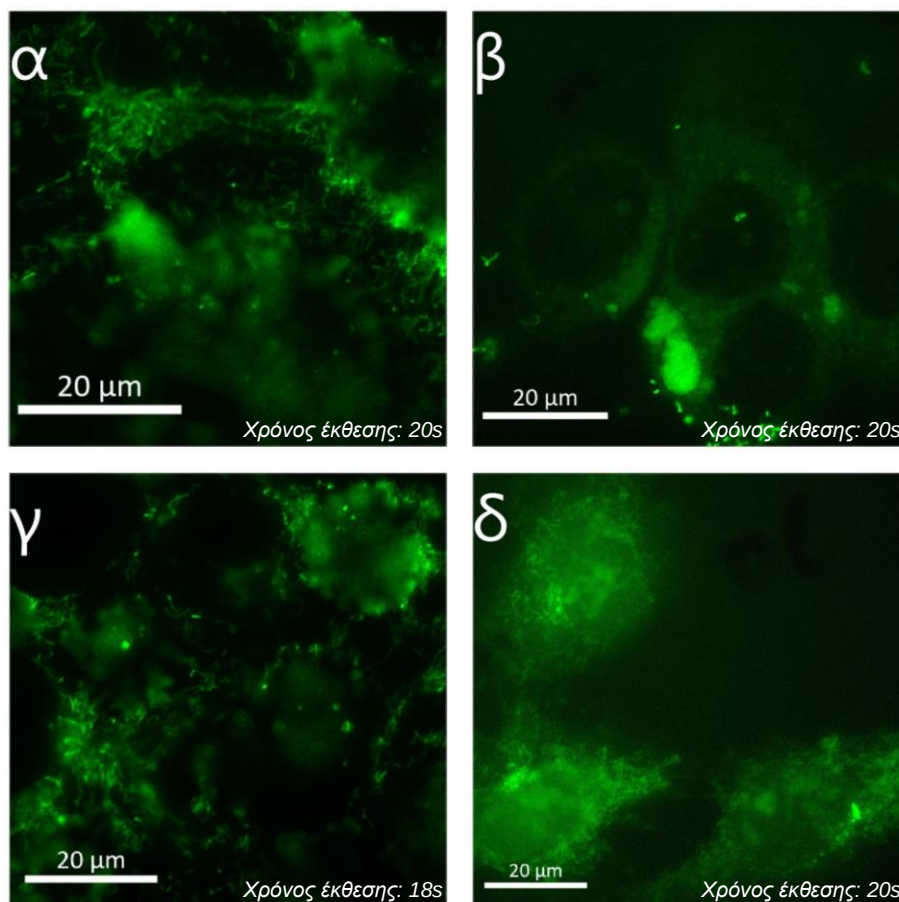
Στην πολυχρωματική απεικόνιση του **MeRotA** (**Εικόνα 33**) φαίνεται ένα συνεχές σήμα ενδιάμεσου βάθους, ομοιόμορφα κατανεμημένο. Αν και η εικόνα είναι χαμηλής έντασης, τα αποτελέσματα συμφωνούν με το μικροσκόπιο φθορισμού στον ενδοκυτταρικό εντοπισμό του χρωμοφόρου. Από τη στιγμή που η δυσκολία διαπίδυσης της μεμβράνης δεν φαίνεται να οφείλεται στο χρωμοφόρο, το ενδιαφέρον στράφηκε στο σκελετό της γλυκοπυρανόζης. Λόγω της ύπαρξής της σε πολλά βιομόρια, είναι πιθανό να δεσμεύεται σε κάποιον διαμεμβρανικό υποδοχέα ή άλλης φύσης βιομόριο. Για το λόγο αυτό ακολουθήθηκε η στρατηγική των προφαρμάκων με στόχο την προστασία των σακχαρικών υδροξυλίων. Γενικά η σύνθεση πρόδρομων φαρμακευτικών μορίων τα

οποία παρουσιάζουν περισσότερο λιπόφιλο χαρακτήρα, συμβάλλει στη βελτίωση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων τους και στην ταχύτερη διαπίδυση της κυτταρικής μεμβράνης. Μια συνηθισμένη ομάδα που χρησιμοποιείται για προστασία των ελεύθερων υδροξυλομάδων είναι αυτή των ακετυλοεστέρων καθώς μπορεί εύκολα να διασπαστεί από τις διαφόρων ειδών ενδοκυτταρικές ή/και διαμεμβρανικές εστεράσες. Υπάρχουν παραδείγματα στη βιβλιογραφία όπου με χρήση αυτής της προστατευτικής ομάδας λύθηκαν προβλήματα φαρμακοκινητικής φύσης αλλά και βιοδιαθεσιμότητας.^{204,205,206} Αυτός ήταν και ο λόγος για τον οποίο συντέθηκαν τα ακετυλιωμένα ή μερικώς ακετυλιωμένα παράγωγα του **RotA**, **AcRotA**, **dAcRotA** και **mAcRotA** (Πίνακας 2) ως πιθανά προφάρμακα.

Όλα τα ακετυλιωμένα παράγωγα δοκιμάστηκαν κάτω από διάφορες συνθήκες συγκέντρωσης και χρόνου επώασης ανάλογες με αυτές που είχαν δοκιμαστεί με το **RotA**. Τα αποτελέσματα δίνονται συγκριτικά στην **Εικόνα 34 (α-δ)**. Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρείται σήμα χαμηλής έντασης (χρόνος έκθεσης 18-20 s) στο εσωτερικό του κυττάρου και κάποια σημεία αυξημένης έντασης, που θύμιζαν τις νηματοειδείς δομές, στην επιφάνεια του κυττάρου. Πιθανά η υδρόλυση των ακετυλομάδων έλαβε χώρα κατά την εισαγωγή των ενώσεων στα κύτταρα, παράγοντας τις νηματοειδείς δομές. Συνολικά, αν και παρατηρήθηκε μεταφορά στο εσωτερικό του κυττάρου, δεν έγινε αρκετά ποσοτικά μέσα στα χρονικά πλαίσια του πειράματος ώστε να παραχθεί ο στροφέας **RotA**, ο οποίος είναι ο μόνος ικανός να συμπλεγθεί στο καταλυτικό κέντρο της **GP**.

Από τις μέχρι τώρα κυτταρικές μελέτες, κατέστη εμφανές ότι η μεταφορά του **RotA** στο εσωτερικό του κυττάρου θα απαιτούσε μια εντελώς διαφορετική προσέγγιση, πιθανά με τη χρήση ενός μορίου-φορέα. Πρόκειται για τη χρήση συστημάτων ελεγχόμενης μεταφοράς φαρμάκων (ΣΕΜΦ), μίας ιδιαιτέρως δημοφιλούς προσέγγισης στη φαρμακευτική βιομηχανία. Με αυτό τον τρόπο οι περιορισμοί των συμβατικών μεθόδων αίρονται και επιτυγχάνεται καλύτερη συσσώρευση της φαρμακευτικής ουσίας στον ιστό στόχο. Ακόμη, μειώνονται οι παρενέργειες που θα προκαλούσε το φαρμακευτικό προϊόν σε άλλους ιστούς όπως επίσης και η δόση του φαρμάκου που θα χρησιμοποιηθεί, καθώς το τελευταίο προστατεύεται από παράγοντες διάσπασης και ανεπιθύμητη απομάκρυνση από την κυκλοφορία του αίματος.²⁰⁷ Τα νανοσωματίδια αποτελούν μια ιδανική επιλογή λόγω του μικρού μεγέθους τους καθώς μπορούν να διαπεράσουν ακόμα και τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό ή να συσσωρευτούν σε καρκινικούς όγκους. Η τελευταία ιδιότητα εκμεταλλεύεται το φαινόμενο της ενισχυμένης

διαπερατότητας-κατακράτησης (Enhanced Permeability and Retention, EPR) το οποίο σχετίζεται με την ελαττωματική αγγείωση των καρκινικών κυττάρων.²⁰⁸ Αν αυτές οι ιδιότητες συνδυαστούν και με την κατασκευή των νανοσωματιδίων από κάποιο βιοδιασπώμενο και βιοσυμβατό υλικό, μπορούν να διευκολύνουν δραματικά την εξέλιξη των μοντέρνων τρόπων θεραπείας.

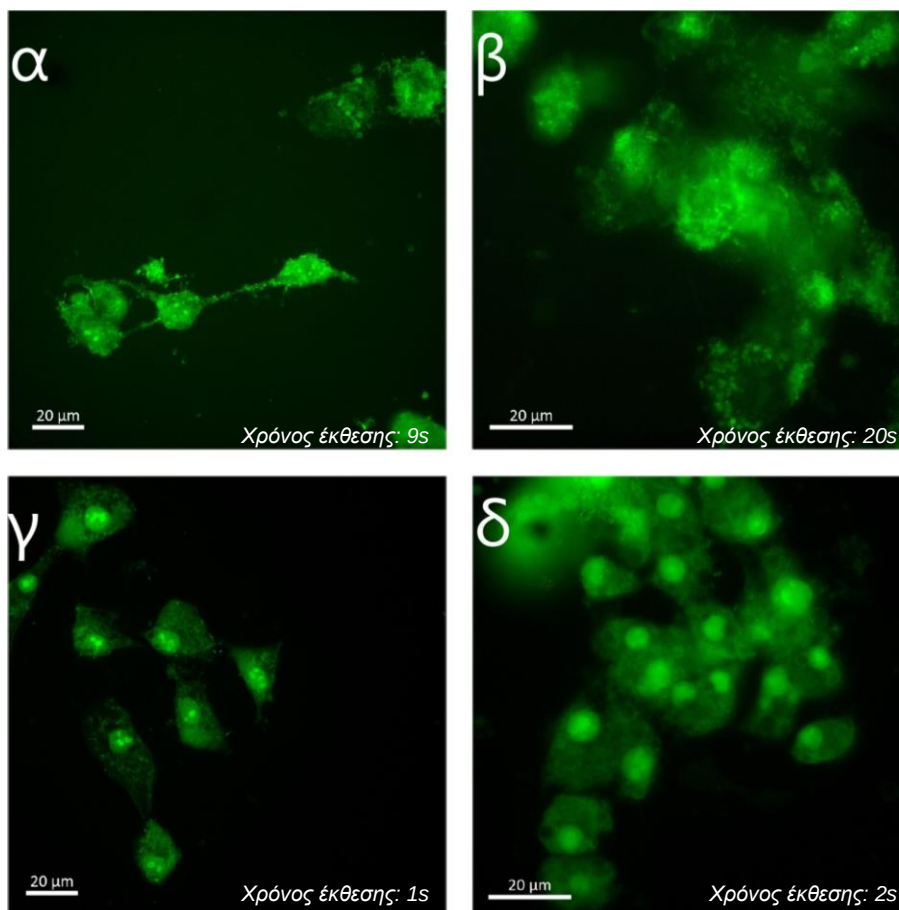


Εικόνα 34: A431 παρουσία α) RotA, β) mAcRotA, γ) dAcRotA και δ) AcRotA (επώαση 24 ώρες, φίλτρο EGFP).

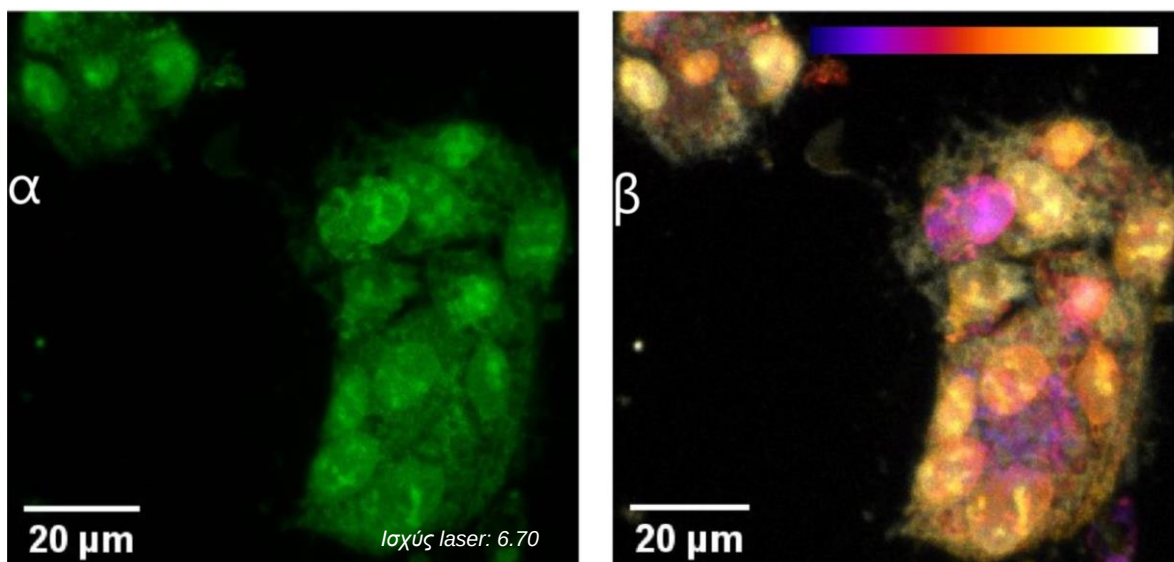
Η συνεργασία του εργαστηρίου μας με την ερευνητική ομάδα της G. Varchi του εθνικού ερευνητικού ιδρύματος στη Μπολόνια (Ινστιτούτο ISOF, CNR) έδωσε πρόσβαση σε μια νέα σχετικά εκδοχή νανοσωματιδίων (NPs) που κατασκευάζονται με βάση την κερατίνη. Τα τελευταία χρόνια, η χρήση της κερατίνης, που προέρχεται από το μαλλί, ως υλικό για την σύνθεση NPs, έχει ιδιαίτερη απήχηση στον τομέα των ΣΕΜΦ. Οι βασικότεροι λόγοι για αυτό είναι ότι αποτελεί ένα φυσικό πολυμερές με εξαιρετική βιοσυμβατότητα, το οποίο βιοαποικοδομείται άμεσα στο εσωτερικό περιβάλλον του κυττάρου, απελευθερώνοντας τα δεσμευμένα από αυτό συστατικά, ενώ μπορεί να τροποποιηθεί κατά ποικίλους τρόπους, παρέχοντας έτσι μια ευελιξία στην ενθυλάκωση

φαρμάκων.²⁰⁹ Μέχρι τώρα, ενώ έχει αξιοποιηθεί ως βάση για παρασκευή λεπτιών ταινιών,²¹⁰ ως υλικό για μηχανική ανάπλαση ιστών²¹¹ αλλά και ως επίστρωση για NPs αργύρου,²¹² λίγες εργασίες έχουν αναφερθεί στη σύνθεση NPs με βάση την ίδια την κερατίνη. Οι πρώτες αναφορές τοποθετούνται το 2013 και 2014 όπου στη μεν πρώτη²¹³ συντέθηκαν NPs κερατίνης σε συνδυασμό με χιτοζάνη (γραμμικός πολυσακχαρίτης που αποτελείται από συνδεδεμένες με β -(1-4)-γλυκοζιτικό δεσμό υπομονάδες D-γλυκοζαμίνης και D-N-ακετυλογλυκοζαμίνης) ενώ στη δεύτερη²¹⁴ συντέθηκαν NPs αποτελούμενα αμιγώς από κερατίνη μαλλιών. Τα τελευταία 5 χρόνια τα NPs κερατίνης μελετώνται ως προς την ελεγχόμενη, από τις τοπικές κυτταρικές συνθήκες, απελευθέρωση φαρμακευτικών ενώσεων όπως χλωρεξιδίνης,²¹⁵ δοξορουβικίνης²¹⁶ και δοσεταξέλης²¹⁷ ή φωτοευαισθητοποιητών²¹⁸ για φωτοδυναμική θεραπεία (PDT) καρκινικών κυττάρων.

Παρασκευάστηκαν δύο τύποι NPs από τον M. Ballestri στην ερευνητική ομάδα της G. Varchi στη Μπολόνια με εγκλωβισμένα μόρια του **RotA**, ως αιωρήματα σε φυσιολογικό ορό και συγκέντρωση 3.7 mM. Ο πρώτος τύπος θα αναφέρεται από εδώ και πέρα ως TG06 και ο δεύτερος ως TG07. Οι διαφορές τους εντοπίζονται στη διάμετρό τους (53 Å των TG06 έναντι 84 Å των TG07) και στην κατεργασία με γλουταραλδεΐδη στο δεύτερο τύπο (TG07). Η γλουταραλδεΐδη βοηθάει στην ενίσχυση της δικτύωσης (crosslinking) μέσω δημιουργίας περισσότερων σταυροδεσμών, οδηγώντας σε πιο σταθερά νανοσωματίδια. Παρακάτω φαίνονται εικόνες κυττάρων A431 και HEPG2 παρουσία των NPs TG06 και TG07 (**Εικόνα 35**). Είναι φανερό από την παρακάτω εικόνα πως τα TG07 (χρόνος έκθεσης 1-2 s) δίνουν μια πιο συμπαγή απεικόνιση και ένα πολύ καλύτερο σε σχέση με τα TG06 (χρόνος έκθεσης 9-20 s), πιθανώς ενδοκυτταρικό σήμα. Κύτταρα της σειράς HEPG2 παρατηρήθηκαν και στο συνεστιακό μικροσκόπιο (**Εικόνα 36**). Πράγματι, φαίνεται πως τα NPs TG07 εντοπίζονται ενδοκυτταρικά καθώς, ακόμα και η πολυχρωματική εικόνα δείχνει ένα συμπαγές και ομοιόμορφο σήμα. Επιπρόσθετα, για τη λήψη των εικόνων χρησιμοποιήθηκε αισθητά μικρότερη ισχύς laser σε σχέση με τα προηγούμενα πειράματα, γεγονός που αυτόματα συνεπάγεται πολύ πιο ισχυρό σήμα σε σχέση με το ελεύθερο **RotA** και τα παράγωγά του (**mAcRotA**, **dAcRotA** και **AcRotA**) αλλά και με τα TG06.



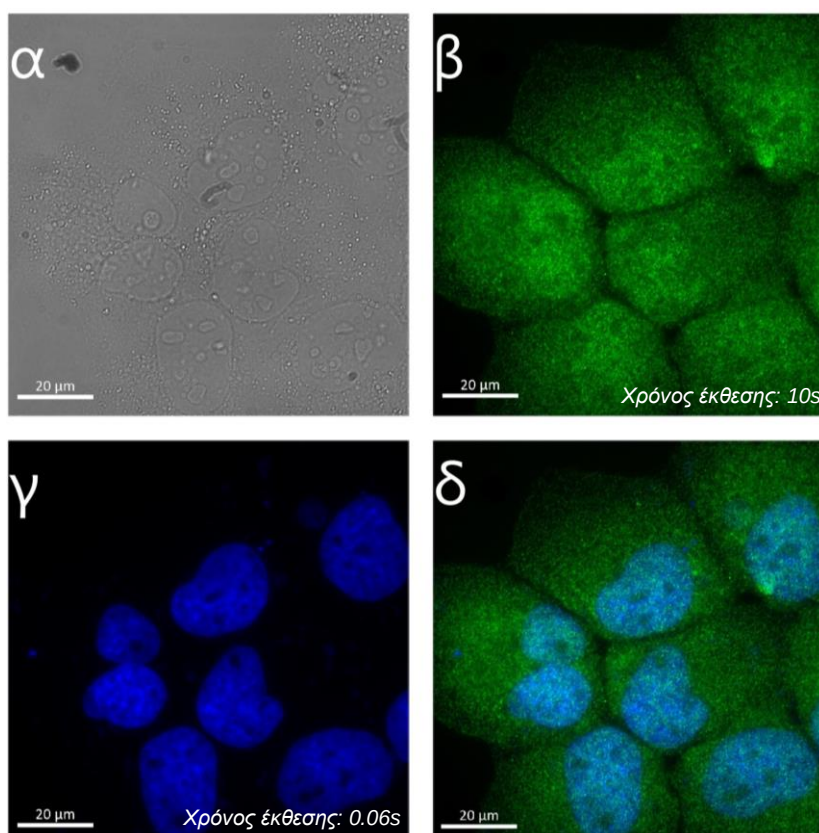
Εικόνα 35: α, γ) A431 και β, δ) HEPG2 επωασμένα 48 ώρες παρουσία TG06 και TG07 αντίστοιχα.



Εικόνα 36: Z-σωρός κυττάρων HEPG2 παρουσία TG07 για 48 ώρες α) με φίλτρο EGFP και β) πολυχρωματική απεικόνιση του βάθους του σήματος.

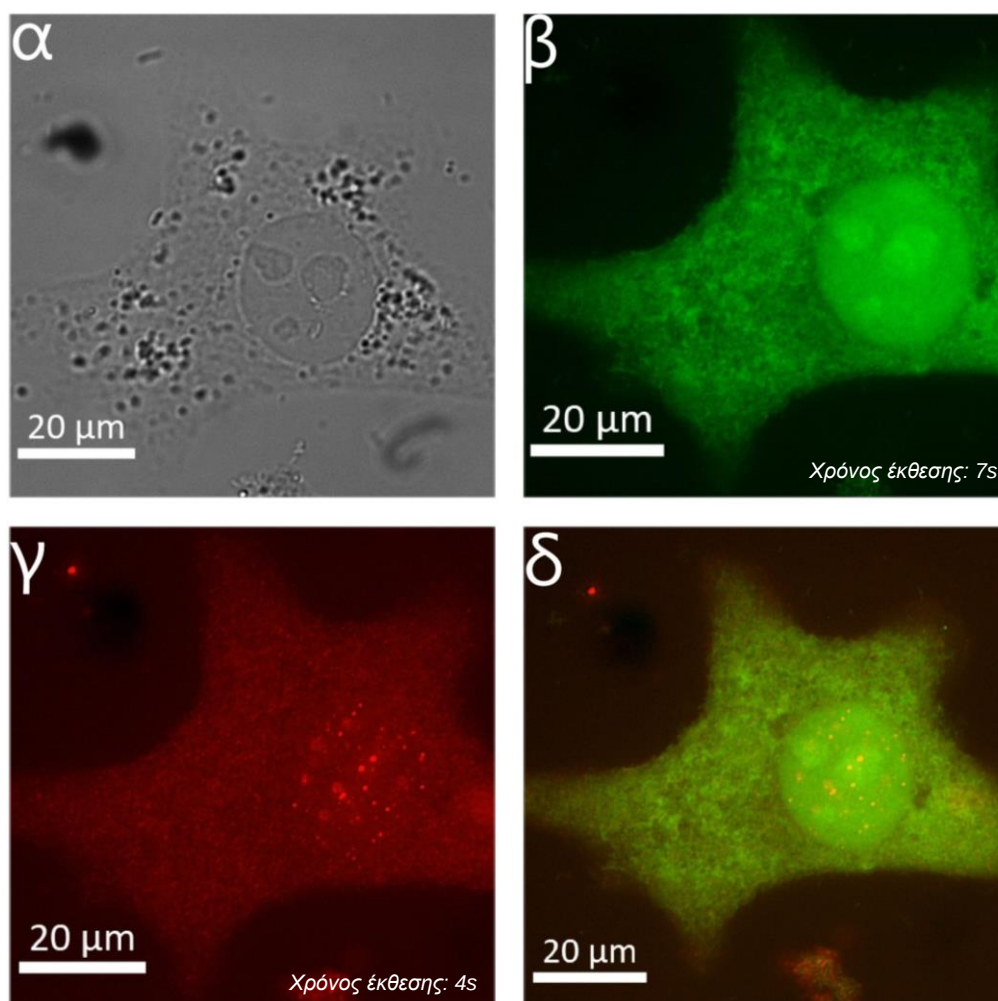
Για τη διαπίστωση του ενδοκυτταρικού συνεντοπισμού του **RotA** με τον κυτταρικό του στόχο (**GP**) χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ανοσοκυτταροχημείας

(Immunocytochemistry-ICC). Η στρατηγική χρήσης της ICC στοχεύει στο συνεντοπισμό της ένωσης που μελετάται με κάποιο ειδικό αντίσωμα το οποίο δεσμεύεται στο πρωτεϊνικό υπόστρωμα. Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε ως αντίσωμα της εγκεφαλικής ισομορφής της **GP**, το εμπορικά διαθέσιμο **pAbGPBB** (NBP2-47446, NovusBio). Ο λόγος χρήσης αντισώματος της συγκεκριμένης ισομορφής ήταν το γεγονός, όπως αναφέρθηκε στην **Παρ. 1.5**, πως οι περισσότερες καρκινικές σειρές εκφράζουν της συγκεκριμένη ισομορφή. Συνοπτικά, η μέθοδος περιλαμβάνει μονιμοποίηση των κυττάρων, πλύσεις με διάλυμα Triton-X ώστε να καταστεί διαπερατή η μεμβράνη στο αντίσωμα, πλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα που αποτρέπει τη μη-ειδική πρόσδεση του αντισώματος και επώαση για μια νύχτα με το πρωτογενές αντίσωμα. Η διαδικασία συνεχίζεται με επώαση 90 λεπτών με διάλυμα δευτερογενούς φθορίζοντος αντισώματος το οποίο αναγνωρίζει συγκεκριμένη περιοχή του πρωτογενούς. Πριν την παρατήρηση στο μικροσκόπιο, αν είναι επιθυμητό πραγματοποιείται συγχρόνως χρώση των πυρήνων με DAPI. Παρακάτω παρατίθενται εικόνες του **pAbGPBB** στο φίλτρο του πράσινου και χρώση πυρήνων με DAPI (**Εικόνα 37**). Σε αυτό το πείραμα δεν χρησιμοποιήθηκε κάποιο παράγωγο του στροφέα ή τα νανοσωματίδια που τον περιέχουν.

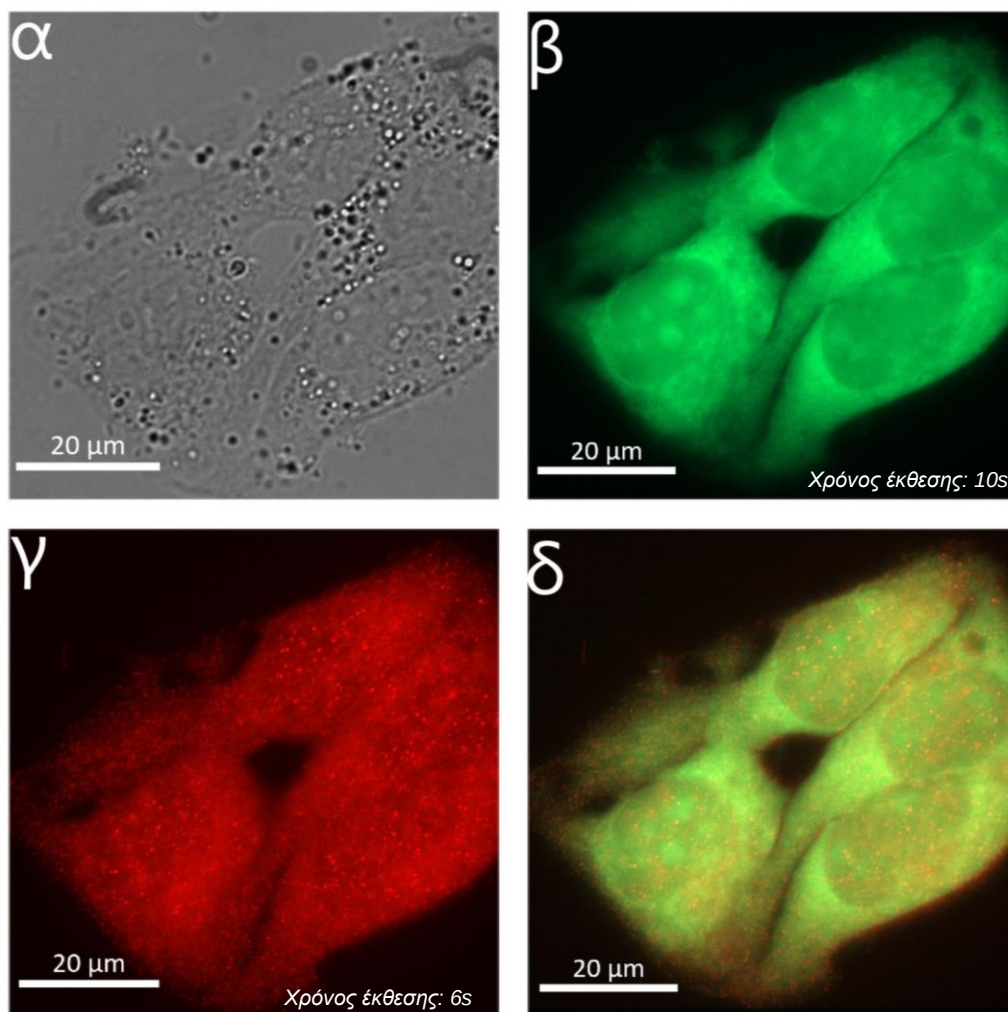


Εικόνα 37: Κύτταρα A431 α) λευκό φως, β) Φίλτρο EGFP (πράσινο: pAbGPBB), γ) Φίλτρο DAPI (μπλε: DAPI) και δ) Συγχώνευση καναλιών EGFP και DAPI.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ICC σε κύτταρα A431 και HEPG2 παρουσία των NPs TG07, τα οποία χρησιμοποιούνται σε συγκεντρώσεις 60 μM , πάντα ως προς το **RotA**. Χρησιμοποιήθηκε δευτερογενές αντίσωμα με κόκκινο φθορισμό ώστε να διαφοροποιείται από τον πράσινο φθορισμό του **RotA** που πιθανά απελευθερώνεται από τα νανοσωματίδια. Σύμφωνα με τις παραμέτρους που ορίζει το μικροσκόπιο, η διέγερση στο φίλτρο του κόκκινου «mCherry» πραγματοποιείται στην περιοχή 538-562 nm και ο φθορισμός παρατηρείται στην περιοχή 570-640 nm. Στις συνθήκες που εφαρμόστηκαν τα NPs TG07, εισήχθησαν στα κύτταρα A431 (**Εικόνα 38**) και HEPG2 (**Εικόνα 39**) απευθείας στο στάδιο της επώασης με το **pAbGPBB**.



Εικόνα 38: Κύτταρα A431 κάτω από α) λευκό φως, β) φίλτρο EGFP (πράσινο: RotA που απελευθερώνεται από τα TG07), γ) φίλτρο mCherry (κόκκινο: pAbGPBB) και δ) συγχώνευση καναλιών EGFP και mCherry.



Εικόνα 39: Κύτταρα HEPG2 κάτω από α) λευκό φως, β) φίλτρο EGFP (πράσινο: RotA που απελευθερώνεται από τα TG07), γ) φίλτρο mCherry (κόκκινο: pAbGPBB) και δ) συγχώνευση καναλιών EGFP και mCherry.

Όπως παρατηρείται στις παραπάνω εικόνες, ο κόκκινος φθορισμός στις **Εικόνες 38γ, 39γ** αποδίδεται στην εκπομπή του συμπλόκου pAbGPBB με τη **GP** μέσω του δευτερογενούς φθορίζοντος αντισώματος. Ο πράσινος φθορισμός στις **Εικόνες 38β, 39β** αποδίδεται στην εκπομπή του **RotA** μετά την απελευθέρωσή του στο εσωτερικό του κυττάρου και τη σύμπλεξή του στο καταλυτικό κέντρο της **GP**. Η επιβεβαίωση της υπόθεσης που αναπτύχθηκε προήλθε από τις **Εικόνες 38δ, 39δ** όπου το κίτρινο χρώμα που παρατηρείται αποδίδεται στις περιοχές συνεντοπισμού του πράσινου και κόκκινου φθορισμού, δηλαδή εκεί όπου η **GP** περιέχει τον «πράσινο» **RotA** στο καταλυτικό κέντρο και η ίδια δεσμεύεται από το «κόκκινο» αντίσωμα. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι υπό αυτές τις πειραματικές συνθήκες (διάνοιξη της κυτταρικής μεμβράνης για την εισαγωγή αντισώματος και NPs που ακολουθείται από πολλαπλές πλύσεις) θεωρείται ότι και τα αντισώματα και τα NPs τα οποία δεν έχουν συνδεθεί ειδικά με το μοριακό τους

στόχο, απομακρύνονται στα στάδια εκπλύσεων. Επομένως, ο έντονος φθορισμός που παραμένει στο κύτταρο πρέπει να αντιστοιχεί σε ειδική σύνδεση.

Συμπερασματικά, ο παραπάνω συνεντοπισμός υποδεικνύει ότι (α) ο **RotA** με τη βοήθεια των NPs έχει διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη, (β) έχει απελευθερωθεί με τη βοήθεια κυτταρικών πρωτεασών από την περιβάλλουσα κερατίνη και (γ) έχει συμπλεχθεί με το μοριακό του στόχο και συγκεκριμένα με τη υποδεικνυόμενη από τον κόκκινο φθορισμό **GP**.

3.4 Συμπεράσματα

Στο πλαίσιο της παρούσας ερευνητικής εργασίας σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν δύο νέοι αναστολείς της RMGPb (**RotA** και **RotB**) που ανήκουν στην οικογένεια των β-D-γλυκοκυπρανοζυλο-(E)-2-κυανο-3-αρυλακρυλαμιδίων. Το συνθετικό πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε επιτρέπει τη γρήγορη πρόσβαση σε ένα μεγάλο αριθμό αναλόγων ενώσεων. Ειδικά για τον **RotA** προσδιορίστηκε με *in vitro* κινητικά πειράματα ότι πρόκειται για έναν ισχυρό αναστολέα του ενζύμου ($IC_{50} = 597$ nM) και επιβεβαιώθηκε με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X του συμπλόκου ενζύμου : αναστολέα ότι δεσμεύεται στο καταλυτικό κέντρο της RMGPb. Συγχρόνως, φασματοσκοπική μελέτη έδειξε ότι ο νέος αυτός αναστολέας παρουσιάζει ιδιότητες μοριακού στροφέα οι οποίες εκφράζονται με 80πλάσια αύξηση της έντασης φθορισμού μετά από σύμπλεξη στο κλειστό καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Τα παραπάνω πειράματα έδειξαν αδιαμφισβήτητα ότι ο **RotA** μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μοριακός ιχνηθέτης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου στο κυτταρικό περιβάλλον. Με σκοπό την επιβεβαίωση αυτής της αρχής, προχωρήσαμε σε *in vitro* κυτταρικά πειράματα σε δύο, κυρίως, καρκινικές κυτταρικές σειρές (A431, HEPG2). Αυτά τα κυτταρικά πειράματα έδειξαν ότι ο νέος μοριακός ιχνηθέτης δεσμεύεται στη μεμβράνη του κυττάρου, όταν βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή, μεταφέρεται μη-ειδικά στο εσωτερικό του όταν βρίσκεται σε μερικώς ή ολικώς προστατευμένη μορφή και συμπλέκεται με επιτυχία με το μοριακό του στόχο στο εσωτερικό του κυττάρου, μετά από απελευθέρωσή του στο κυτόπλασμα από νανοσωματίδια κερατίνης. Συνολικά πρόκειται για ένα νέο εργαλείο που μπορεί να επιτρέψει μια εις βάθος μελέτη της δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου *in vitro* και *in vivo*.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1 Γενικά

4.1.1 Όργανα και διατάξεις

Τα φάσματα ^1H και ^{13}C -NMR ελήφθησαν σε φασματόμετρα Varian (τύπου Mercury) 200 MHz και Bruker 400 MHz. Τα φάσματα μάζας καταγράφηκαν σε φασματόμετρο ThermoFinnigan Surveyor MSQ Plus με την τεχνική ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (Electron Spray Ionization ή ESI-MS) και αναφέρονται με ακρίβεια δύο δεκαδικών (ακρίβεια μηχανήματος). Τα φάσματα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (High Resolution Mass Spectrum ή HRMS) ελήφθησαν σε όργανο Q-TOF Bruker MaXis impact HR-MS. Η μέτρηση της υγρασίας οργανικών διαλυτών πραγματοποιήθηκε με την τεχνική Karl-Fischer με χρήση του οργάνου 831 KF Coulometer της MetroOhm. Για την μέτρηση του pH χρησιμοποιήθηκε το πεχάμετρο Orion 3 Star της Thermo. Οι γωνίες στροφής καταγράφηκαν σε αυτόματο πολωσίμετρο AA65 της Optical Activity. Η στροφική ικανότητα υπολογίζεται από τον τύπο $[\alpha] = (a \cdot 100) / (l \cdot c)$ όπου a είναι η μετρούμενη γωνία στροφής σε μοίρες, l το μήκος της οπτικής διαδρομής (1 dm) και c η συγκέντρωση σε g ουσίας/100 mL διαλύτη. Τα σημεία τήξης ελήφθησαν με συσκευή Gallenkamp της Sanyo και παρουσιάζονται μη διορθωμένα. Για τα φωτομετρικά πειράματα χρησιμοποιήθηκαν δύο κυψελίδες χαλαζία διπλής διαδρομής της Starna Scientific με μήκος οπτικής διαδρομής 10 mm, εκ των οποίων η μία χρησιμοποιείται αποκλειστικά για τα τυφλά διαλύματα και η άλλη αποκλειστικά για τα άγνωστα. Τα φάσματα απορρόφησης και εκπομπής ελήφθησαν σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis-NIR 3600 (Shimadzu) και σε φθορισμόμετρο RF-5301PC της ίδιας εταιρείας. Η επεξεργασία των φασμάτων έγινε με χρήση των προγραμμάτων Excel της Microsoft και ale της FluorTools. Για την *in vitro* παρατήρηση των κυτταροκαλλιιεργειών χρησιμοποιήθηκε το μικροσκόπιο φθορισμού Axio Observer Z1 της Carl Zeiss και το συνεστιακό μικροσκόπιο Digital Eclipse C1 της Nikon. Η επεξεργασία των εικόνων έγινε με χρήση των προγραμμάτων Zen (Blue edition) και Fiji (ImageJ).

4.1.2 Αντιδραστήρια-Ένζυμα και πρωτεΐνες-Χρωματογραφία

Τα χημικά αντιδραστήρια ήταν εμπορικά προϊόντα των εταιρειών Acros Organics, Alfa Aesar, Sigma Aldrich, Merck και Ferak Berlin καθαρότητας $\geq 98\%$ και χρησιμοποιήθηκαν ως είχαν. Για την χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC), χρησιμοποιήθηκαν πλακίδια αλουμινίου με φθοριστή F_{254} της

εταιρείας Merck. Η εμφάνιση των πλακιδίων πραγματοποιήθηκε είτε με την επισκόπηση υπό λάμπα UV-254 nm/325 nm είτε με εμβάπτιση του πλακιδίου σε Hanessian's Stain (bluestain-χρώση φωσφομολυβδενικού δημητρίου) και θέρμανση. Για τον χρωματογραφικό καθαρισμό των ενώσεων χρησιμοποιήθηκε υλικό πλήρωσης silica gel 60 (40-63 μm) της εταιρείας Acros Organics. Τα πρωτεϊνικής φύσης υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι φωσφορυλάση του γλυκογόνου (RMGPb), βόεια αλβουμίνη ορού (BSA) και εξοκινάση τύπου 3 (HK-III). Η RMGPb έχει απομονωθεί από μυϊκό ιστό κουνελιού, φυλάσσεται ως διάλυμα σε 50% γλυκερόλη/50% assay buffer και παραχωρήθηκε από το εργαστήριο της Δρος Ε. Χρυσίνα, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών (ΕΙΕ). Η HK-III ήταν εμπορικά διαθέσιμη από την εταιρεία Sigma Aldrich, χρησιμοποιήθηκε σε στερεή μορφή και παραχωρήθηκε από το εργαστήριο της αναπληρώτριας καθηγήτριας Π. Παπαζαφείρη, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ. Η BSA χρησιμοποιήθηκε επίσης σε στερεή μορφή και παραχωρήθηκε από το ίδιο εργαστήριο.

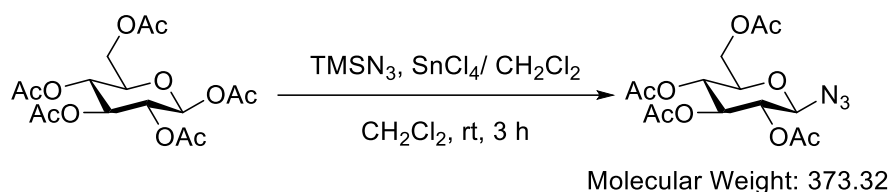
4.1.3 Διαλύτες-Ρυθμιστικά διαλύματα

Οι διαλύτες ήταν των εταιρειών Fischer Scientific, Carlo Erba, Honeywell και JT Baker και χρησιμοποιήθηκαν ως είχαν. Οι άνυδροι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της Acros Organics, φυλάσσονται υπεράνω μοριακών κοσκίνων και πριν τη χρήση τους τιτλοδοτούνταν με τη μέθοδο Karl-Fischer. Οι δευτεριωμένοι διαλύτες ήταν της εταιρείας Eurisotop και φυλάσσονται σε ξηραντήρα CaCl_2 . Για την παρασκευή δειγμάτων MS και HRMS χρησιμοποιήθηκαν MeOH και MeCN GC/MS-grade ενώ για τα φωτομετρικά πειράματα MeCN HPLC-grade. Για την παρασκευή των υδατικών ρυθμιστικών χρησιμοποιήθηκε υπερκαθαρό νερό που παραχωρήθηκε από το εργαστήριο του καθηγητή Ε. Δασενάκη, Τμήμα Χημείας, τομέας Χημείας Περιβάλλοντος, ΕΚΠΑ. Για τα φωτομετρικά πειράματα χρησιμοποιήθηκαν ρυθμιστικά διαλύματα όπως το assay buffer, HBS και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών. Η σύσταση του assay buffer είναι β-φωσφορική γλυκερόλη, β-μερκαπτοαιθανόλη (προστατευτικό οξείδωσης της RMGPb) και αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (ethylenediaminetetracetic acid-EDTA) σε αναλογία 50:50:1 mM και 0.01% νατραζίδιο ως συντηρητικό. Η τιμή του pH σε αυτό το ρυθμιστικό είναι 6.8. Σημειώνεται πως το συγκεκριμένο ρυθμιστικό χρησιμοποιήθηκε και σε μία εκδοχή χωρίς β-μερκαπτοαιθανόλη και νατραζίδιο. Αυτά τα ρυθμιστικά παραχωρήθηκαν από το εργαστήριο της Δρος Ε. Χρυσίνα. Το HBS περιέχει χλωριούχο νάτριο, ρυθμιστικό HEPES, χλωριούχο κάλιο, χλωριούχο ασβέστιο και χλωριούχο μαγνήσιο σε αναλογία 112:10:5:1:1 και παραχωρήθηκε από το εργαστήριο της αναπληρώτριας καθηγήτριας Π. Παπαζαφείρη. Τέλος, το ρυθμιστικό φωσφορικών

παρασκευάστηκε από ανάμιξη διαλυμάτων μονόξινου και δισόξινου φωσφορικού νατρίου με βάση βιβλιογραφική πορεία.²¹⁹

4.2 Σύνθεση

4.2.1 1-Αζιδο-1-δεοξυ-2,3,4,6-τετρα-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοκυρανόζη (87α)¹⁸²



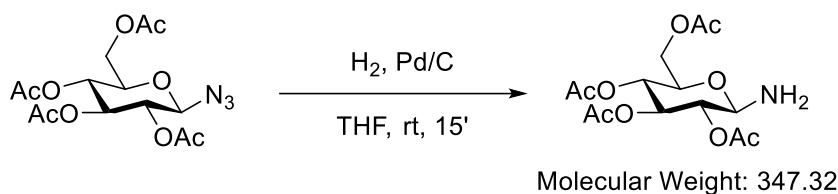
Σε ξηρή σφαιρική φιάλη που περιέχει 1,2,3,4,6-πεντα-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοκυρανόζη (7.82 g, 20.0 mmol), σε άνυδρο DCM (80 mL), προστίθεται στους 0 °C TMSN₃ (4.2 mL, 31.9 mmol, 1.6 equiv.) και 15' αργότερα προστίθεται σε δόσεις επί 15' SnCl₄ (διάλυμα 1 M σε DCM, 6.0 mL, 6 mmol, 0.3 equiv.). Το λουτρό πάγου αφαιρείται και το μίγμα αναδεύεται σε r.t για 3 ώρες. Η αντίδραση παρακολουθείται με TLC (σύστημα ανάπτυξης = 40% EtOAc/60% PE) και παρατηρείται διαύγαση του αρχικά μπεζ αιωρήματος σε 30'. Στη συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης μεταφέρεται με DCM σε χοάνη και πλένεται με διάλυμα κορεσμένου NaHCO₃ (2 x 25 mL) και με απιοντισμένο νερό (1 x 30 mL), συλλέγεται η οργανική φάση, ξηραίνεται υπεράνω Na₂SO₄ και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το προϊόν διαλύεται στην ελάχιστη ποσότητα DCM, καταβυθίζεται με PE, διηθείται από γυάλινο πορώδες χωνί και συλλέγεται ως άμορφο λευκό στερεό (6.87 g, 18.4 mmol). Τα δεδομένα του NMR συμφωνούν με τα βιβλιογραφικώς γνωστά.¹⁸²

Απόδοση αντίδρασης 92%

R_f 0.53 (40% EtOAc/60% PE)

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃)¹⁸² δ 5.23 (apparent t, *J* = 9.3 Hz, 1H), 5.11 (apparent t, *J* = 9.5 Hz, 1H), 4.96 (apparent t, *J* = 9.0 Hz, 1H), 4.65 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.28 (dd, *J* = 12.5, 4.7 Hz, 1H), 4.16 (dd, *J* = 12.5, 2.4 Hz, 1H), 3.80 (ddd, *J* = 9.7, 4.7, 2.4 Hz, 1H), 2.11 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.01 (s, 3H).

4.2.2 1-Αμινο-1-δεοξυ-2,3,4,6-τετρα-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοκυρανόζη (85α)¹⁸³



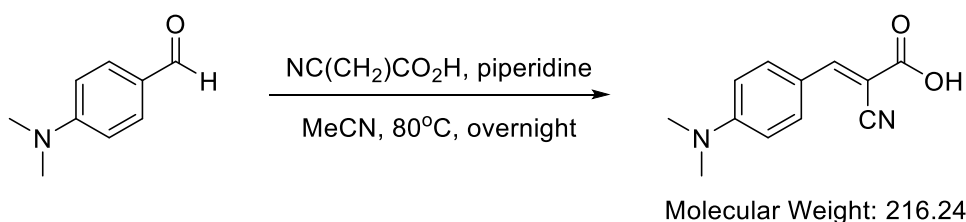
Σε σφαιρική φιάλη φέρονται το αζίδιο **87α** (1.52 g, 4.07 mmol), καταλύτης 10% Pd/C (249 mg, 0.23 mmol, 0.06 equiv.) και άνυδρο THF (32 mL). Προσαρμόζεται συσκευή για διοχέτευση αερίων H₂-Ar και αφού απαερωθεί 3 φορές το μίγμα της αντίδρασης, πραγματοποιούνται 3 κύκλοι κενού-H₂ για ανταλλαγή της ατμόσφαιρας με H₂. Η αντίδραση παρακολουθείται με TLC (σύστημα ανάπτυξης = 40% EtOAc/60% PE) και το μίγμα της αναδεύεται σε r.t για 15'. Η ατμόσφαιρα ανταλλάσσεται με Ar, ο καταλύτης διηθείται από κελίτη και ο ηθμός πλένεται με DCM. Το γκρίζο προϊόν ιζηματοποιείται με Et₂O, αναδεύεται για 2 ώρες, διηθείται από γυάλινο πορώδες χωνί και συλλέγεται ως άμορφο υπόλευκο στερεό (1.40 g, 4.03 mmol). Τα δεδομένα του NMR συμφωνούν με τα βιβλιογραφικώς γνωστά.¹⁸²

Απόδοση αντίδρασης Ποσοτική

R_f 0.14 (40% EtOAc/60% PE)

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃)¹⁸² δ 5.24 (apparent t, *J* = 9.5 Hz, 1H), 5.03 (apparent t, *J* = 9.7 Hz, 1H), 4.83 (apparent t, *J* = 9.3 Hz, 1H), 4.23 (dd, *J* = 12.3, 4.7 Hz, 1H), 4.20 (apparent d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 4.09 (dd, *J* = 12.3, 2.4 Hz, 1H), 3.68 (ddd, *J* = 10.0, 4.8, 2.4 Hz, 1H), 2.09 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.94 (s, 2H).

4.2.3 (E)-2-Κυανο-3-(4-(N,N-διμεθυλαμινο)φαινυλο)ακρυλικό οξύ (83α)¹⁸⁸



Σε ξηρή σφαιρική φέρονται π-(N,N-διμεθυλαμινο)βενζαλδεΐδη (1.55 g, 10.4 mmol), κυανοξικό οξύ (1.33 g, 15.6 mmol, 1.5 equiv.), άνυδρο MeCN (20 mL) και πιπεριδίνη (1 mL, 10.1 mmol, 0.97 equiv.). Το μελί μίγμα αναδεύεται για όλη τη νύχτα στους 80 °C υπό ατμόσφαιρα Ar (παρατηρείται καταβύθιση κίτρινου στερεού). Η αντίδραση ελέγχεται με TLC (σύστημα ανάπτυξης = 40% EtOAc/60% PE) και εν συνεχεία, το μίγμα

της αποχύνεται σε ποτήρι που περιέχει μίγμα πάγου-διαλύματος 1 N HCl σε αναλογία 1:1. Καταβυθίζεται σκούρο πορτοκαλί στερεό το οποίο διηθείται από γυάλινο πορώδες χωνί και πλένεται στον ηθμό 3 φορές με απιοντισμένο νερό. Ξηραίνεται όλη τη νύχτα στον ηθμό και συλλέγεται το προϊόν ως άμορφο σκούρο πορτοκαλί στερεό (2.02 g, 9.36 mmoles), καθαρό στο NMR. Τα δεδομένα του NMR συμφωνούν απόλυτα με τα βιβλιογραφικώς γνωστά.²²⁰

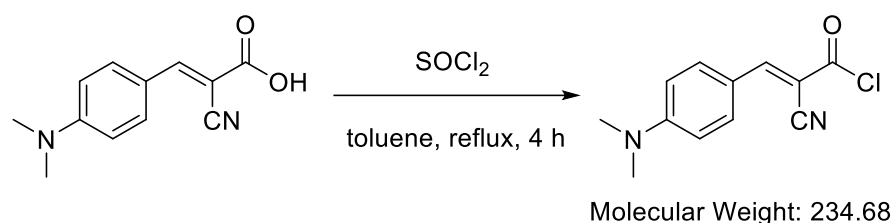
Απόδοση αντίδρασης 90%

R_f 0.45 (15% MeOH/85% DCM)

¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆)²²⁰ δ 8.06 (s, 1H), 7.93 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.81 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 3.06 (s, 6H).

4.2.4 (E)-2-Κυανο-3-(4-(*N,N*-διμεθυλαμινο)φαινυλο)ακρυλοχλωρίδιο (84α)

4.2.4.1 1^{ος} τρόπος¹³⁸

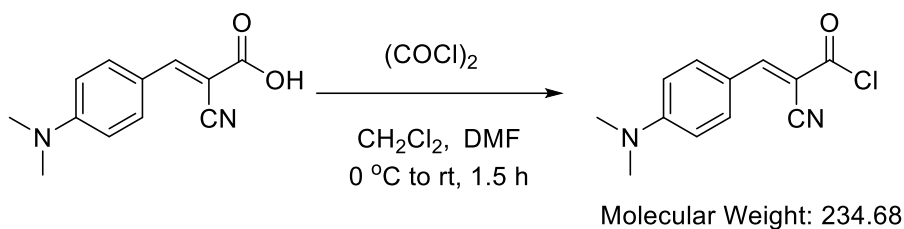


Σε σφαιρική φιάλη που περιέχει το οξύ **83α** (229 mg, 1.06 mmoles), προστίθενται τολουόλιο (3.5 mL) και SOCl₂ (230 μL, 3.16 mmoles, 3 equiv.). Το μίγμα θερμαίνεται σε αναρροή για 4 ώρες και η αντίδραση παρακολουθείται με TLC (σε μικρό όγκο αντίδρασης προστίθεται MeOH και ο σχηματιζόμενος μεθυλεστέρας αναπτύσσεται με σύστημα ανάπτυξης = 50% EtOAc/50% PE). Η περίσσεια του χλωριωτικού και του τολουολίου αποστάζουν με μικροαποστακτική συσκευή, προστίθενται ~2-3 mL τολουολίου και η διαδικασία επαναλαμβάνεται για ακόμα 3 φορές. Το προϊόν παραλαμβάνεται ως καστανέρυθρο έλαιο (που στερεοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου) και χρησιμοποιείται απευθείας στο επόμενο βήμα.

Απόδοση αντίδρασης Ποσοτική

R_f (μεθυλεστέρας) 0.6 (50% EtOAc/50%PE)

4.2.4.2 2^{ος} τρόπος

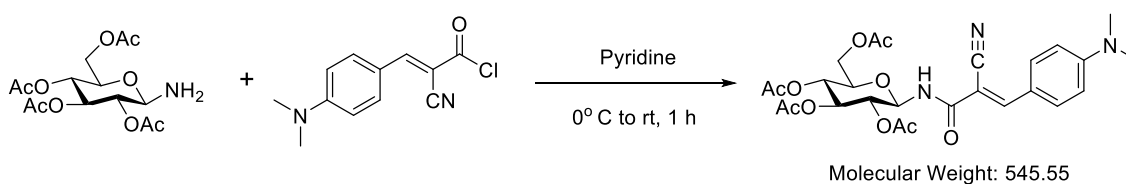


Σε ξηρή σφαιρική που περιέχει το οξύ **83α** (217 mg, 1.0 mmol), προστίθενται άνυδρο DCM (2 mL) και μία σταγόνα DMF ως καταλύτη. Στη συνέχεια, στο πορτοκαλί αιώρημα, προστίθεται σε δόσεις το (COCl)₂ (170 μL, 2.0 mmoles, 2.0 equiv.) στους 0 °C για 10'. Το σκούρο διάλυμα αφήνεται να έρθει σε r.t, η αντίδραση παρακολουθείται με TLC (σε μικρό όγκο αντίδρασης προστίθεται μεθανόλη και ο σχηματιζόμενος μεθυλεστέρας αναπτύσσεται με σύστημα ανάπτυξης = 50% EtOAc/50% PE) και αναδεύεται για 1.5 ώρα. Η περίσσεια χλωριωτικού και ο διαλύτης αποστάζουν σε περιστροφικό συμπυκνωτή και το προϊόν παραλαμβάνεται ως καστανέρυθρο έλαιο (που στερεοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου) το οποίο χρησιμοποιείται απευθείας στο επόμενο βήμα.

Απόδοση αντίδρασης Ποσοτική

R_f (μεθυλεστέρας) 0.6 (50% EtOAc/50% PE)

4.2.5 (E)-2-Κυανο-3-(4-(N,N-διμεθυλαμινο)φαινυλο)-N-(2,3,4,6-τετρα-O-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)ακρυλαμίδιο (**73α**)



Στη σφαιρική φιάλη που περιέχεται το χλωρίδιο **84α** (552 mg, 2.35 mmoles, 1.47 equiv.) προστίθεται στους 0 °C άνυδρη πυριδίνη (4 mL) υπό ατμόσφαιρα Ar. Η αμίνη **85α** (557 mg, 1.6 mmoles) διαλύεται στον ίδιο όγκο πυριδίνης και προστίθεται σταδιακά στο μίγμα της αντίδρασης. Το μίγμα αφήνεται να έρθει σε r.t και η αντίδραση παρακολουθείται με TLC με εξουδετέρωση μικρού όγκου αντίδρασης με διάλυμα 5% NaOH και στη συνέχεια προσθήκη EtOAc (σύστημα ανάπτυξης = 80% EtOAc/20% PE). Το καστανέρυθρο διάλυμα αναδεύεται για 1 ώρα και στη συνέχεια, αφού απομακρυνθεί η πυριδίνη με συμπύκνωση, μεταφέρεται με DCM σε χοάνη και πλένεται με 5% Na₂CO₃ (1 x 15 mL)

και με απιοντισμένο νερό (1 x 15 mL). Η οργανική στιβάδα συλλέγεται, ξηραίνεται υπεράνω Na₂SO₄, συμπυκνώνεται και το προϊόν καθαρίζεται χρωματογραφικώς με σύστημα έκλουσης που διαμορφώνεται από 40% EtOAc/60% PE σε 60% EtOAc/40% PE. Απομονώνεται ανοιχτό άμορφο πορτοκαλί στερεό (700 mg, 1.28 mmoles) καθαρό στο NMR.

Απόδοση αντίδρασης 80%

R_f 0.3 (50% EtOAc/50% PE)

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 8.12 (s, 1H), 7.89 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.02 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 6.68 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 5.36 (apparent t, *J* = 9.2 Hz, 1H), 5.35 (apparent t, *J* = 9.4 Hz, 1H), 5.11 (apparent t, *J* = 9.7 Hz, 1H), 5.04 (apparent t, *J* = 9.5 Hz, 1H), 4.31 (dd, *J* = 12.5, 4.0 Hz, 1H), 4.10 (dd, *J* = 12.5, 2.1 Hz, 1H), 3.86 (ddd, *J* = 9.9, 3.9, 1.9 Hz, 1H), 3.10 (s, 6H), 2.09 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.03 (s, 6H).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 170.5, 170.4, 169.9, 169.4, 162.7, 153.6, 153.4, 133.8 (2C), 119.1, 117.8, 111.4 (2C), 93.9, 78.8, 73.4, 72.7, 70.3, 68.0, 61.6, 39.9 (2C), 20.65, 20.54 (3C)

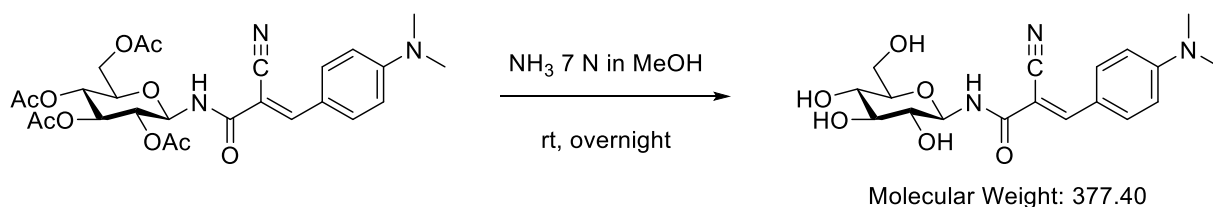
ESI MS C₂₆H₃₁N₃O₁₀ (+) 545.86 [M+H]⁺ 568.30 [M+Na]⁺ (-) 544.29 [M-H]

HRMS [M+Na]⁺ Calculated for C₂₆H₃₁N₃O₁₀: 568.1907 Found: 568.1909

[α] -59.8 ° (c 0.97, CH₂Cl₂)

Σημείο τήξης 164-167 °C (μετά από συμπύκνωση με CHCl₃)

4.2.6 (*E*)-2-Κυανο-3-(4-(*N,N*-διμεθυλαμινο)φαινυλο)-*N*-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο) ακρυλαμίδιο (**73ζ**)



Σε ξηρή σφαιρική φιάλη φέρεται το αμίδιο **73α** (159 mg, 0.29 mmol) και προστίθεται διάλυμα NH₃ σε MeOH 7 N (3 mL, 21.0 mmoles, 72 equiv.). Η σφαιρική σφραγίζεται και το μίγμα αφήνεται να αναδεύεται σε r.t όλη τη νύχτα. Σταδιακά, το πορτοκαλί αιώρημα που προκύπτει διαυγάζει και στη συνέχεια παρατηρείται καταβύθιση κίτρινου στερεού. Η αντίδραση ελέγχεται με TLC (σύστημα ανάπτυξης = 15% MeOH/85% DCM) και στη

συνέχεια το κίτρινο στερεό διηθείται από γυάλινο πορώδες χωνί και πλένεται στον ηθμό με κρύα MeOH. Το προϊόν συλλέγεται ως άμορφο κίτρινο στερεό (50 mg, 0.13 mmol) καθαρό στο NMR.

Απόδοση αντίδρασης 46%

R_f 0.51 (15% MeOH/85% DCM)

¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 8.54 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.86 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.84 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 5.06 – 4.97 (m, 2H), 4.93 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 4.83 (apparent t, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.53 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 3.66 (dd, *J* = 11.7, 5.6 Hz, 1H), 3.41 (dd, *J* = 11.7, 5.9 Hz, 1H), 3.29 – 3.10 (m, 4H), 3.06 (s, 6H).

¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d₆) δ 163.2, 153.1, 150.3, 132.8 (2C), 118.6, 118.0, 111.7 (2C), 97.4, 80.5, 78.8, 77.3, 72.0, 69.9, 61.0, 39.6 (2C).

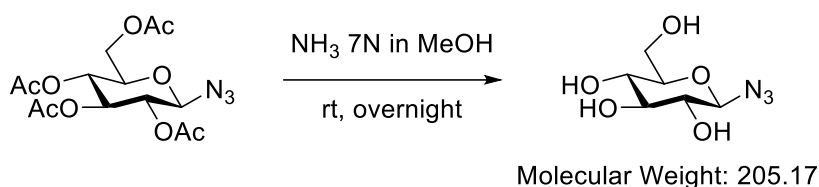
ESI MS C₁₈H₂₃N₃O₆ (+) 378.28 [M+H]⁺ 400.13 [M+Na]⁺ (-) 375.58 [M-H]

HRMS [M+Na]⁺ Calculated for C₁₈H₂₃N₃O₆: 400.1485 Found: 400.1472

[α] +57.1 ° (c 0.98, DMSO)

Σημείο αποσύνθεσης 224 °C

4.2.7 1-Αζιδο-1-δεοξυ-β-D-γλυκοκυρανόζη (88)¹⁸⁴



Σε ξηρή σφαιρική που περιέχει το αζίδιο **87a** (3.19 g, 8.53 mmol) προστίθενται άνυδρη MeOH (15 mL) και καταλυτική ποσότητα τιτλοδοτημένου διαλύματος MeONa σε MeOH συγκέντρωσης 4.5 M (0.2 mL, 0.9 mmol, 0.1 equiv.). Η αντίδραση ελέγχεται με TLC (σύστημα ανάπτυξης = 40% EtOAc/60% PE για το **87a** και 30% MeOH/70% DCM για το **88**) και παρατηρείται διαύγαση του αρχικά λευκού αιωρήματος σε 10'. Μετά από ανάδευση σε r.t. όλη τη νύχτα, προστίθεται ρητίνη Amberlite-IR 120 για την εξουδετέρωση της βάσης. Στη συνέχεια η ρητίνη διηθείται από πτυχωτό ηθμό, πραγματοποιούνται πλύσεις με μεθανόλη και ο διαλύτης αποστάζει σε περιστροφικό συμπυκνωτή. Το προϊόν ξηραίνεται στο υψηλό κενό και παραλαμβάνεται ως υαλώδες

καφετί στερεό (1.66 g, 8.1 mmol) το οποίο χρησιμοποιείται χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Το ^1H και ^{13}C NMR συμφωνούν με τα βιβλιογραφικά δεδομένα.²²¹

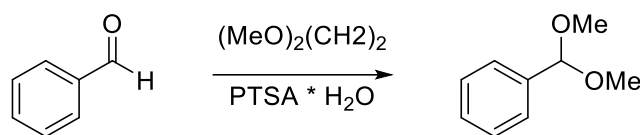
Απόδοση αντίδρασης 95%

R_f 0.58 (30% MeOH/70% DCM)

^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6)²²¹ δ 5.52 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 5.15 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 5.07 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 4.66 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 4.46 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 3.74 – 2.88 (m, 6H)

^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6)²²¹ δ 90.2, 79.2, 76.6, 73.4, 69.6, 60.8

4.2.8 1,1-Διμεθοξυτολουόλιο¹⁸⁶

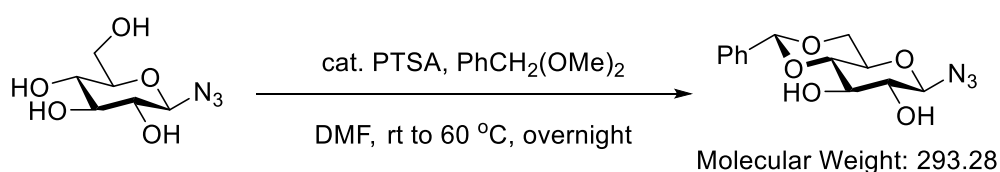


Molecular Weight: 152.19

Σε ξηρή σφαιρική φέρονται 2,2-διμεθοξυπροπάνιο (6 mL, 48.8 mmol, 4.1 ισοδύναμα), απεσταγμένη βενζαλδεΐδη (1.2 mL, 11.8 mmol) και ένας μικρός κρύσταλλος μονοϋδρίτη PTSA. Η αντίδραση αναδεύεται αρχικά για 90 λεπτά σε r.t ενώ στη συνέχεια προσαρμόζεται μικροαποστακτική συσκευή και τίθεται η θερμοκρασία στους 70 °C όπου παρατηρείται απόσταξη υγρού σε θερμοκρασία 54-57 °C. Το μίγμα της αντίδρασης μεταφέρεται με DCM σε χοάνη και πλένεται με διάλυμα κορεσμένου NaHCO_3 (1 x 15 mL) και με απιοντισμένο νερό (1 x 10 mL). Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται υπεράνω Na_2SO_4 και συμπυκνώνεται. Συλλέγονται 0.45 mL άχρωμου υγρού με χαρακτηριστική οσμή, οξύτερη αυτής της βενζαλδεΐδης, μετά από απόσταξη υπό κενό (0.1 mmHg, 34 °C).

Απόδοση αντίδρασης 25%

4.2.9 1-Αζιδο-1-δεοξυ-4,6-O-βενζυλιδενο-β-D-γλυκοκυρανόζη (89)¹⁸⁴



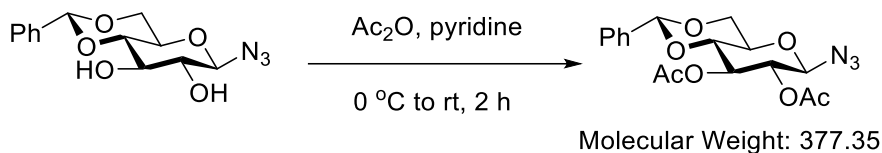
Σε ξηρή σφαιρική φέρονται το αζίδιο **88** (528 mg, 2.6 mmol), 1,1-διμεθοξυτολουόλιο (0.45 mL, 456 mg, 3 mmol, 1.16 equiv.), μονοϋδρίτης του PTSA (57 mg, 0.29 mmol, 0.1 equiv.) και άνυδρο DMF (2.5 mL). Το υποκίτρινο διάλυμα αναδεύεται αρχικά για 4 ώρες σε r.t και όλη τη νύχτα στους 60 °C. Η αντίδραση παρακολουθείται με TLC (σύστημα ανάπτυξης = 10% EtOAc/90% PE και 15% MeOH/85% DCM) και στη συνέχεια το μίγμα μεταφέρεται με EtOAc σε χοάνη και πλένεται με κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃ (1 x 10 mL), με απιοντισμένο νερό (2 x 10 mL) και με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl ή brine (1 x 10 mL). Η οργανική στιβάδα συλλέγεται, ξηραίνεται υπεράνω Na₂SO₄ και αποστάζουν οι διαλύτες σε περιστροφικό συμπυκνωτή. Το προϊόν παραλαμβάνεται μετά από συμπύκνωση από χλωροφόρμιο ως λευκοί βελονοειδείς κρύσταλλοι (396 mg, 1.35 mmol). Το NMR συμφωνεί απόλυτα με το βιβλιογραφικό.¹⁸⁴

Απόδοση αντίδρασης 52%

R_f 0.18 (40% EtOAc/60% PE)

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) ¹⁸⁴ δ 7.55 – 7.32 (m, 5H), 5.54 (s, 1H), 4.67 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 4.39 (dd, J = 10.4, 4.0 Hz, 1H), 3.91 – 3.29 (m, 2H), 3.63 – 3.34 (m, 3H), 2.85 (s, 1H), 2.70 (s, 1H).

4.2.10 1-Αζιδο-1-δεοξυ-2,3-δι-O-ακετυλο-4,6-O-βενζυλιδενο-β-D-γλυκοπυρανόζη (87β)¹⁸⁷



Σε ξηρή σφαιρική φέρεται το αζίδιο **89** (384 mg, 1.3 mmol), προστίθεται άνυδρη πυριδίνη (3 mL) και το μίγμα ψύχεται στους 0 °C. Στη συνέχεια προστίθεται σε δόσεις ο Ac₂O (500 μL, 5.3 mmol, 4 equiv.) επί 30', το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 30', αφαιρείται το λουτρό και αφήνεται να έρθει σε r.t όπου και μένει για ακόμα 90'. Η αντίδραση παρακολουθείται με TLC (σύστημα ανάπτυξης = 40% EtOAc/60% PE), διακόπτεται με προσθήκη 2 mL απιοντισμένου νερού και η υδατική φάση εκχυλίζεται με DCM (3 x 10 mL). Η οργανική φάση που συλλέγεται πλένεται με 1 N HCl (1 x 10 mL), με κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃ (1 x 10 mL) και με απιοντισμένο νερό (1 x 10 mL). Η οργανική στιβάδα συλλέγεται, ξηραίνεται υπεράνω Na₂SO₄ και ο διαλύτης αποστάζει σε περιστροφικό συμπυκνωτή. Το στερεό διαλύεται σε ελάχιστη ποσότητα DCM και

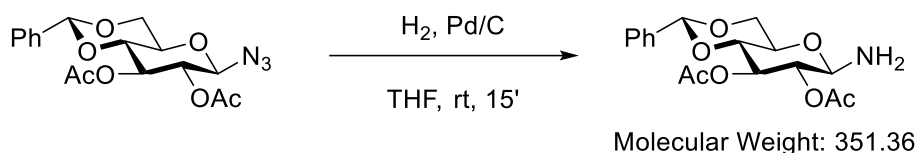
καταβυθίζεται από EtOH. Το προϊόν παραλαμβάνεται με τη μορφή λευκών κρυστάλλων (368 mg, 0.97 mmol) και καθαρό στο NMR.

Απόδοση αντίδρασης 75%

R_f 0.75 (40% EtOAc/60% PE)

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.46 – 7.31 (m, 5H), 5.52 (s, 1H), 5.34 (apparent t, *J* = 9.2 Hz, 1H), 4.96 (apparent t, *J* = 9.0 Hz, 1H), 4.74 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 4.41 (dd, *J* = 10.3, 4.5 Hz, 1H), 3.90 – 3.55 (m, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.06 (s, 3H).

4.2.11 1-Αμινο-1-δεοξυ-2,3-δι-*O*-ακετυλο-4,6-*O*-βενζυλιδενο-β-D-γλυκοπυρανόζη (85β)



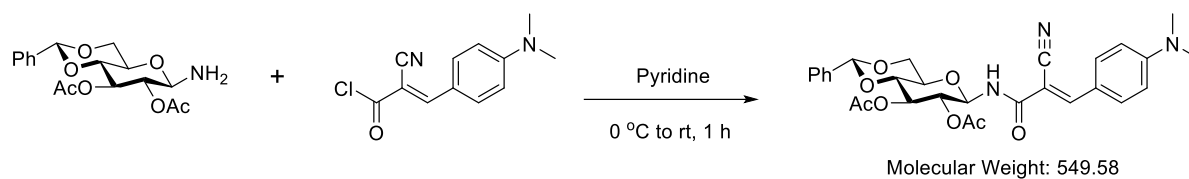
Σε σφαιρική φιάλη που περιέχει το αζίδιο **87β** (364 mg, 0.96 mmol) και καταλύτη 10% Pd/C (56 mg, 0.05 mmol, 0.05 equiv.) προστίθεται άνυδρο THF (7.5 mL). Προσαρμόζεται συσκευή για διοχέτευση αερίων H₂-Ar και αφού απαερωθεί 3 φορές το μίγμα της αντίδρασης, πραγματοποιούνται 3 κύκλοι κενού-H₂ για ανταλλαγή της ατμόσφαιρας με H₂. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε r.t για 15' και παρακολουθείται με TLC (σύστημα ανάπτυξης = 50% EtOAc/50% PE). Η ατμόσφαιρα ανταλλάσσεται με Ar, ο καταλύτης διηθείται από κελίτη και ο ηθμός πλένεται με DCM. Το γκρίζο στερεό που προκύπτει χρησιμοποιείται στο επόμενο βήμα χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

Απόδοση αντίδρασης Ποσοτική

R_f 0.16 (50% EtOAc/50% PE)

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.49 – 7.31 (m, 5H), 5.50 (s, 1H), 5.37 (apparent t, *J* = 9.3 Hz, 1H), 4.83 (apparent t, *J* = 9.3 Hz, 1H), 4.38 – 4.23 (m, 2H), 3.81 – 3.48 (m, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 1.96 (s, 2H).

4.2.12 (E)-2-Κυανο-3-(4-(N,N-διμεθυλαμινο)φαινυλο)-N-(2,3-δι-O-ακετυλο-4,6-O-βενζυλιδενο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)ακρυλαμίδιο (73γ)



Στην ίδια σφαιρική που βρίσκεται το χλωρίδιο **84α** (249 mg, 1.06 mmol, 1.16 equiv.) προστίθεται στους 0 °C υπό ατμόσφαιρα Ar άνυδρη πυριδίνη (3 mL). Στη συνέχεια προστίθεται το διάλυμα (σε 2 mL άνυδρης πυριδίνης) της αμίνης **85β** (321 mg, 0.91 mmol), αργά επί 30'. Μετά το τέλος των προσθηκών, το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 1 ώρα στους 0 °C. Η αντίδραση παρακολουθείται με TLC (μικροεκχύλιση μικρού όγκου αντίδρασης με διάλυμα NaOH 4 % w/v και προσθήκη EtOAc – σύστημα ανάπτυξης = 50% EtOAc/50% PE) και διακόπτεται με προσθήκη 2 mL απιοντισμένου νερού. Οι διαλύτες αποστάζουν σε περιστροφικό συμπυκνωτή και το στερεό που προκύπτει διαλύεται σε DCM και πλένεται με διάλυμα 5% Na₂CO₃ (1 x 10 mL), με απιοντισμένο νερό (1 x 10 mL). Η οργανική φάση συλλέγεται και ξηραίνεται υπεράνω Na₂SO₄. Το προϊόν διαλύεται σε ελάχιστη ποσότητα DCM, καταβυθίζεται από MeOH και συλλέγεται καθαρό ως άμορφη ωχροκίτρινη σκόνη (235 mg, 0.43 mmol).

Απόδοση αντίδρασης 47%

R_f 0.74 (80% EtOAc/20% PE)

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 8.14 (s, 1H), 7.87 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.50 – 7.27 (m, 5H), 7.04 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 6.64 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 5.56 – 5.34 (m, 3H), 5.09 (apparent t, *J* = 9.3 Hz, 1H), 4.44 – 4.31 (m, 1H), 3.78 – 3.58 (m, 3H), 3.06 (s, 6H), 2.07 (s, 6H).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 170.7, 169.8, 162.7, 153.8, 153.5, 136.8, 134.0 (2C), 129.1, 128.2 (2C), 126.1 (2C), 119.2, 118.0, 111.5 (2C), 101.4, 93.9, 79.5, 78.5, 71.6, 71.3, 68.4, 68.2, 40.0 (2C), 20.8, 20.7.

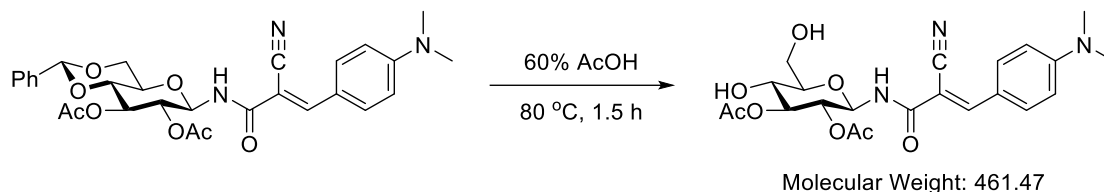
ESI MS C₂₉H₃₁N₃O₈ (+) 550.72 [M+H]⁺ 572.22 [M+Na]⁺ (-) 548.11 [M-H]

HRMS [M+Na]⁺ Calculated for C₂₉H₃₁N₃O₈: 572.2009 Found: 572.1999

[α] -55.7 ° (c 0.97, CH₂Cl₂)

Σημείο τήξης 234-236 °C (μετά από συμπύκνωση με CHCl₃)

4.2.13 (E)-2-Κυανο-3-(4-(N,N-διμεθυλαμινο)φαινυλο)-N-(2,3-δι-O-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)ακρυλαμίδιο (73δ)



Σε ξηρό δοχείο Wheaton που περιέχει το αμίδιο **73γ** (87 mg, 0.16 mmol) προστίθεται διάλυμα 60% AcOH (1 mL) και τίθεται υπό ανάδευση στους 80 °C. Η αντίδραση παρακολουθείται με TLC (σύστημα ανάπτυξης = 50% EtOAc/50% PE και 30% MeOH/70% DCM) και στη 1.5 ώρα παρατηρείται διαύγαση του αρχικά κίτρινου αιωρήματος σε πορτοκαλόχρουν διάλυμα. Οι διαλύτες αποστάζουν σε περιστροφικό συμπυκνωτή και το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφικώς με σύστημα έκλουσης 5% MeOH/95% CHCl₃ το οποίο σταδιακά διαμορφώνεται σε 10% MeOH/95% CHCl₃. Το προϊόν παραλαμβάνεται ως μικροκρυσταλλικό πορτοκαλί στερεό (55 mg, 0.12 mmol).

Απόδοση αντίδρασης 75%

R_f 0.3 (5% MeOH/95% CHCl₃)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.74 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.85 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.83 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 5.43 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 5.28 (apparent t, *J* = 9.1 Hz, 1H), 5.03 (apparent t, *J* = 9.1 Hz, 1H), 4.93 (apparent t, *J* = 9.4 Hz, 1H), 4.67 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 3.69 (dd, *J* = 11.8, 5.6 Hz, 1H), 3.50 (dd, *J* = 11.0, 4.4 Hz, 1H), 3.46 – 3.39 (m, 2H), 3.06 (s, 6H), 1.99 (s, 3H), 1.91 (s, 3H).

¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169.8, 169.4, 163.1, 153.2, 150.9, 133.0 (2C), 118.4, 117.8, 111.7 (2C), 96.4, 78.5, 77.9, 76.2, 71.2, 67.5, 60.3, 39.6 (2C), 20.8, 20.5.

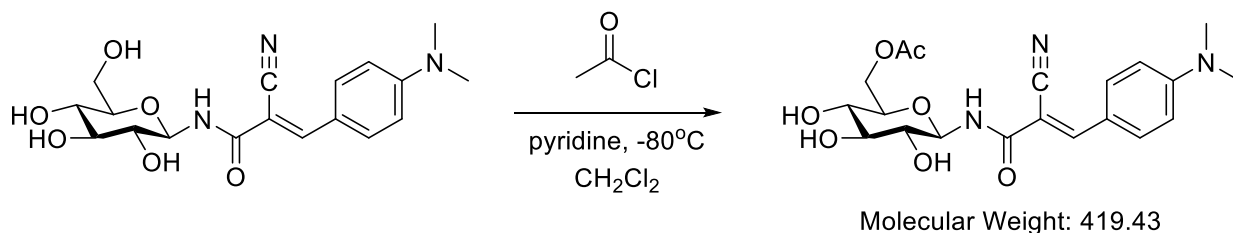
ESI MS C₂₂H₂₇N₃O₈ (+) [M+H]⁺ 462.05 [M+Na]⁺ 484.17 (-) [M-H] 460.15

HRMS [M+Na]⁺ Calculated for C₂₂H₂₇N₃O₈: 484.1696 Found: 484.1690

[α] -41.0 ° (c 0.95, DMSO)

Σημείο τήξης 188-191 °C (μετά από συμπύκνωση με MeOH)

4.2.14 (*E*)-2-Κυανο-3-(4-(*N,N*-διμεθυλαμινο)φαινυλο)-*N*-(6-*O*-ακετυλο-β-*D*-γλυκοπυρανοζυλο)ακρυλαμίδιο (**73η**)



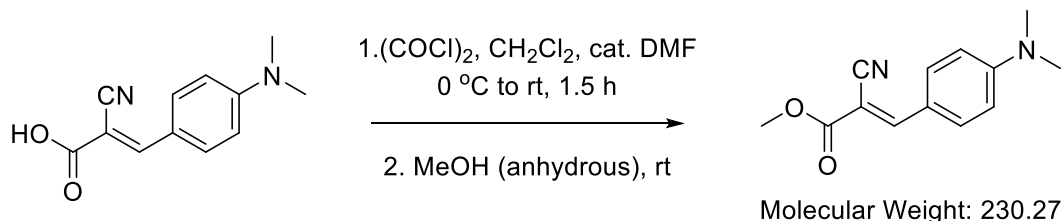
Σε ξηρή σφαιρική που περιέχει το αμίδιο **73ζ** (41 mg, 0.109 mmol) προστίθεται άνυδρο DCM (14 mL) και διάλυμα πυριδίνης σε DCM (συγκέντρωση 0.97 M, 170 μL, 0.165 mmol, 1.5 equiv.). Το κίτρινο αιώρημα ψύχεται στους -80 °C και προστίθεται σε δόσεις το διάλυμα AcCl σε DCM (συγκέντρωση 1 M, 180 μL, 0.11 mmol, 1 equiv.). Μετά το τέλος των προσθηκών, η αντίδραση παρακολουθείται με TLC (σύστημα ανάπτυξης = 10% MeOH/90% DCM) και διακόπτεται στις 3 ώρες με προσθήκη λίγων σταγόνων MeOH. Οι διαλύτες αποστάζουν σε περιστροφικό συμπυκνωτή και το προϊόν καθαρίζεται χρωματογραφικώς με σύστημα έκλουσης 1% HILIC/99% EtOAc που σταδιακά διαμορφώνεται σε 10% HILIC/90% EtOAc. Παραλαμβάνεται άμορφο κίτρινο στερεό (5 mg, 0.01 mmol) το οποίο φαίνεται με φασματομετρία μάζας ότι είναι το επιθυμητό προϊόν.

Απόδοση αντίδρασης 11%

R_f 0.33 (10% HILIC/90% EtOAc, **HILIC = 1:1:1 H₂O/MeOH/MeCN**)

ESI-MS C₂₀H₂₅N₃O₇ (+) [M+H]⁺ 419.88 2M+Na 861.53 (-) [M-H] 418.14

4.2.15 (*E*)-2-Κυανο-3-(4-(*N,N*-διμεθυλαμινο)φαινυλο)ακρυλικός μεθυλεστέρας (**90**)



Σε αιώρημα του οξέος **83α** (219 mg, 1.0 mmol) σε άνυδρο DCM (4 mL), προστίθεται στους 0 °C το (COCl)₂ (180 μL, 2.05 mmol, 2 equiv.) και το σκούρο διάλυμα που προκύπτει αφήνεται να έρθει σε r.t. Η αντίδραση παρακολουθείται με TLC (σύστημα ανάπτυξης = 50% EtOAc/50% PE) και μετά από 1.5 ώρα ανάδευσης, προστίθεται άνυδρη MeOH (5 mL) και προκύπτει διαυγές ανοιχτό πορτοκαλί διάλυμα. Αφού

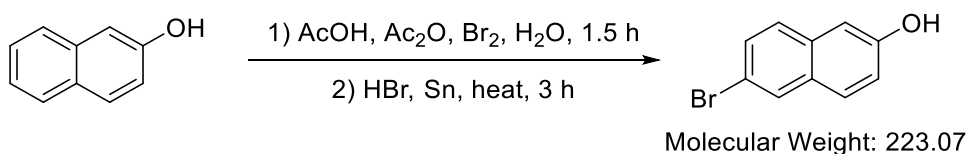
αποστάξουν οι διαλύτες σε περιστροφικό συμπυκνωτή, παραλαμβάνεται μικροκρυσταλλικό κίτρινο στερεό (228 mg, 0.99 mmol) καθαρό στο NMR και απόλυτα σύμφωνο με τα βιβλιογραφικά δεδομένα.²²²

Απόδοση αντίδρασης Ποσοτική

R_f 0.57 (50% EtOAc/50% PE)

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃)²²² δ 8.16 (s, 1H), 8.02 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.28 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.16 (s, 6H)

4.2.16 6-Βρωμο-2-ναφθόλη (92)²²³



Σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη που περιέχει λειοτριβημένη β-ναφθόλη (14.4 g, 100.2 mmol), AcOH (40 mL) και Ac₂O (2 mL) προστίθεται σταδιακά με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα Br₂ (10.3 mL, 200.2 mmol, 2 equiv.) σε AcOH (10 mL) επί 1 ώρα. Κατά τη διάρκεια των προσθηκών διαλύεται η β-ναφθόλη με ταυτόχρονη ανάπτυξη θερμότητας και έντονη παραγωγή ατμών HBr. Μετά το τέλος των προσθηκών προστίθενται επιπλέον 10 mL απιοντισμένου νερού και αφού το μίγμα ψυχθεί σε r.t., θερμαίνεται μέχρι βρασμού. Στη συνέχεια, προστίθεται σε δόσεις στους 100 °C σκόνη κασιτέρου (15 g, 126.3 mmol, 1.26 equiv.) χωρίς ανάδευση και με ήπια θέρμανση για διάλυση των στερεών. Η αντίδραση θερμαίνεται στους 140 °C για 3 ώρες και ελέγχεται με TLC (σύστημα ανάπτυξης = 40% EtOAc/60% PE). Το μίγμα ψύχεται μέχρι τους 90 °C και διηθείται εν θερμώ από γυάλινο πορώδες χωνί. Το διήθημα αποχύνεται σε ποτήρι που περιέχει 250 mL κρύο απιοντισμένο νερό και καταβυθίζεται ροζ στερεό το οποίο διηθείται από γυάλινο πορώδες χωνί και πλένεται στον ηθμό 3 φορές με νερό. Η κολλώδης ροζ μάζα ξηραίνεται όλη τη νύχτα στον ηθμό και 3 μέρες στο φούρνο στους 100 °C. Το προϊόν παραλαμβάνεται ως άμορφη λευκή σκόνη (17.4 g, 78.1 mmol) μετά από καθαρισμό με απόσταξη σε συσκευή Kugelrohr (0.1 mmHg, 180 °C).

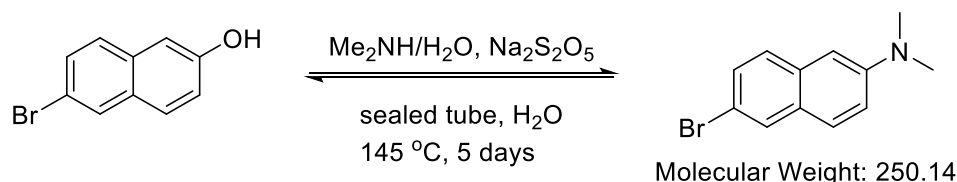
Απόδοση αντίδρασης 78%

R_f 0.68 (60% PE/40% EtOAc)

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃)²²⁴ δ 7.92 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.75 – 7.43 (m, 3H), 7.22 – 6.97 (m, 2H), 5.01 (s, 1H).

ESI MS (-) 220.92 [M-H]

4.2.17 6-Βρωμο-2-(*N,N*-διμεθυλο)ναφθυλαμίνη (93)¹⁹²



Σε αυτόκλειστο σκεύος φέρονται η 6-βρωμο-2-ναφθόλη **92** (4.19 g, 18.8 mmol), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (7.25 g, 38.2 mmol, 2 equiv.), υδατικό διάλυμα Me_2NH 40% w/w (11 mL, 97.6 mmol, 5.2 equiv.) και απιοντισμένο νερό (38 mL). Η ατμόσφαιρα αντικαθίσταται με Ar, το σκεύος σφραγίζεται και θερμαίνεται στους 145°C για 5 μέρες. Το μίγμα της αντίδρασης εκχυλίζεται με DCM, συλλέγεται η οργανική στιβάδα και αφού ξηραθεί υπεράνω Na_2SO_4 , συμπυκνώνεται υπό κενό. Ακολουθεί χρωματογραφικός καθαρισμός με σύστημα έκλουσης 1% EtOAc/99% PE που σταδιακά διαμορφώνεται σε 6% EtOAc/94% PE. Πραγματοποιείται και περαιτέρω καθαρισμός με διάλυση στον ελάχιστο EtOAc και καταβύθιση από EtOH. Παραλαμβάνεται το προϊόν ως άμορφο λευκό στερεό (3.1 g, 12.4 mmol).

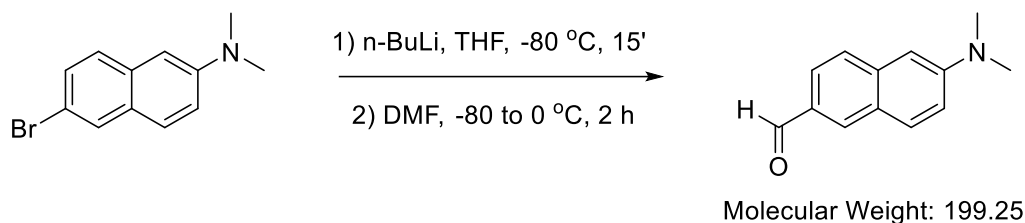
Απόδοση αντίδρασης 66%

R_f 0.8 (20% EtOAc/80% PE)

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃)¹⁹² δ 7.83 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.61 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.52 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.41 (dd, *J* = 8.8, 2.0 Hz, 1H), 7.17 (dd, *J* = 9.1, 2.6 Hz, 1H), 6.88 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 3.05 (s, 6H).

ESI MS (+) 250.45 [M+H]⁺

4.2.18 2-Φορμυλο-6-(*N,N*-διμεθυλο)ναφθυλαμίνη (69β)¹⁹²



Σε ξηρή σφαιρική που περιέχει τη ναφθυλαμίνη **93** (900 mg, 3.6 mmol) προστίθεται άνυδρο THF (9 mL) και το διάλυμα ψύχεται στους -80 °C. Στη συνέχεια προστίθεται σε δόσεις το n-BuLi (1.75 mL, 4.37 mmol, 1.2 equiv.) επί 15'. Η μεταλλείωση ολοκληρώνεται σε 15' και αμέσως προστίθεται επί 5' το DMF (350 μL, 4.52 mmol, 1.25 equiv.). Η αντίδραση παρακολουθείται με TLC (σύστημα ανάπτυξης = 12% EtOAc/88% PE) και μετά από 1 ώρα ανάδευσης στους -80 °C, το κίτρινο διαυγές διάλυμα αναδεύεται για ακόμα 1 ώρα στους 0 °C. Η αντίδραση διακόπτεται με προσθήκη διαλύματος κορεσμένου NH₄Cl μέχρι να μη σχηματίζονται πλέον άλατα. Το μίγμα συμπυκνώνεται μέχρι να μην έχει οσμή THF και στη συνέχεια εκχυλίζεται με Et₂O. Συλλέγεται η οργανική φάση, ξηραίνεται υπεράνω Na₂SO₄, συμπυκνώνεται και καθαρίζεται χρωματογραφικώς με σύστημα έκλουσης 5% EtOAc/95% PE που σταδιακά διαμορφώνεται σε 10% EtOAc/90% PE. Συλλέγεται το προϊόν ως άμορφο κίτρινο στερεό (459 mg, 2.3 mmol).

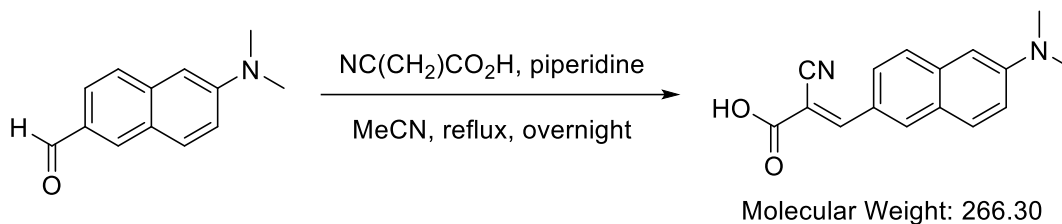
Απόδοση αντίδρασης 64%

R_f 0.32 (10% EtOAc/90% PE)

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃)¹⁹² δ 9.99 (s, 1H), 8.11 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 7.82 (dd, *J* = 8.6, 1.7 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.64 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.14 (dd, *J* = 9.1, 2.6 Hz, 1H), 6.85 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 3.09 (s, 6H).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃)¹⁹² δ 191.9, 150.6, 138.7, 134.9, 130.8, 130.6, 126.8, 125.0, 123.5, 116.2, 105.4, 40.4 (2C)

4.2.19 (E)-2-Κυανο-3-(6-(N,N-διμεθυλαμινο)-2-ναφθυλο)ακρυλικό οξύ (83β)



Σε ξηρή σφαιρική φέρονται η αλδεΐδη **69β** (409 mg, 2.05 mmol), άνυδρο MeCN (4.2 mL), κυανοξικό οξύ (266 mg, 3.1 mmol, 1.5 equiv.) και πιπεριδίνη (230 μ L, 2.3 mmol, 1.1 equiv.). Το μίγμα αναδεύεται όλη τη νύχτα σε αναρροή και η αντίδραση ελέγχεται με TLC (σύστημα ανάπτυξης = 50% EtOAc/50% PE). Στη συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης αποχύνεται σε ποτήρι που περιέχει μίγμα πάγου- διαλύματος 1 N HCl σε αναλογία περίπου 1:1. Καταβυθίζεται κεραμιδί στερεό το οποίο διηθείται από γυάλινο πορώδες χωνί και πλένεται στον ηθμό 3 φορές με απιοντισμένο νερό. Αφού ξηραθεί στον ηθμό, παραλαμβάνεται το προϊόν ως άμορφη κεραμιδί σκόνη, καθαρή στο NMR.

Απόδοση αντίδρασης 90%

R_f 0.24 (15% MeOH/85% DCM)

¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.30 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.07 (dd, *J* = 8.9, 1.8 Hz, 1H), 7.80 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.72 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.26 (dd, *J* = 9.1, 2.5 Hz, 1H), 6.94 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 3.08 (s, 6H).

¹³C NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.2, 154.4, 150.6, 137.3, 135.2, 130.7, 126.7, 124.9, 124.8, 124.4, 117.2, 116.6, 104.9, 98.8, 39.9 (2C)

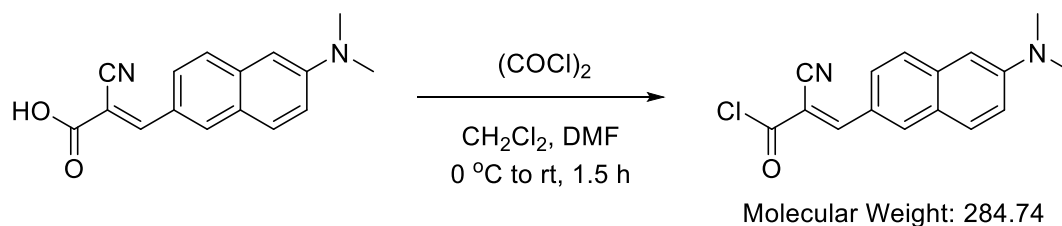
ESI MS C₁₆H₁₄N₂O₂ (+) 267.36 [M+H]⁺ 283.93 [M+NH₄]⁺ (-) 264.91 [M-H]

220.79 [M-CO₂H]

HRMS [M-H] Calculated for C₁₆H₁₄N₂O₂: 265.0977 Found: 265.0965

Σημείο τήξης/αποσύνθεσης 217-219 °C

4.2.20 (E)-2-Κυανο-3-(6-(N,N-διμεθυλαμινο)-2-ναφθυλο)ακρυλοχλωρίδιο (84β)

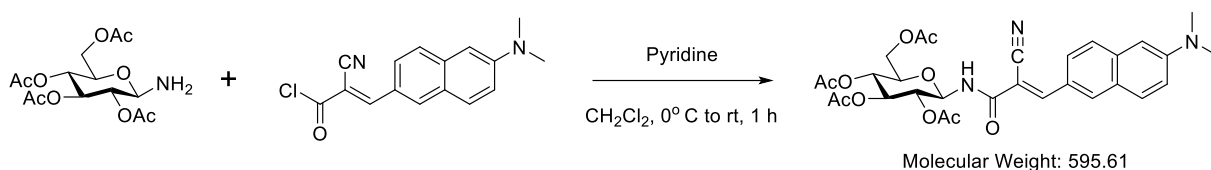


Σε ξηρή σφαιρική που περιέχει το οξύ **83β** (267 mg, 1.0 mmol), προστίθενται άνυδρο DCM (2 mL) και μία σταγόνα DMF ως καταλύτη. Το κεραμιδί αιώρημα που προκύπτει ψύχεται στους 0 °C και προστίθεται το (COCl)₂ (180 μL, 2.09 mmoles, 2.1 equiv.) σε δόσεις. Στη συνέχεια, το μπεζ αιώρημα αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου και η αντίδραση παρακολουθείται με TLC (σε μικρό όγκο αντίδρασης προστίθεται μεθανόλη και ο σχηματιζόμενος μεθυλεστέρας αναπτύσσεται σε σύστημα ανάπτυξης = 50% EtOAc/50% PE). Η περίσσεια χλωριωτικού και ο διαλύτης αποστάζουν σε περιστροφικό συμπυκνωτή, το προϊόν παραλαμβάνεται ως μπεζ πάστα και χρησιμοποιείται απευθείας στο επόμενο βήμα.

Απόδοση αντίδρασης Ποσοτική

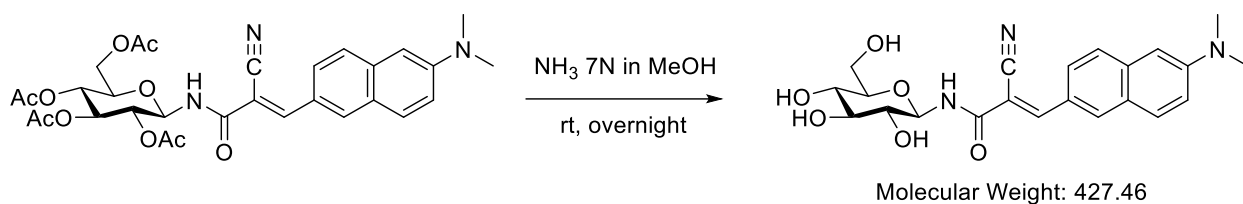
R_f (μεθυλεστέρας) 0.77 (60% EtOAc/40% PE)

4.2.21 (E)-2-Κυανο-3-(6-(N,N-διμεθυλαμινο)-2-ναφθυλο)-N-(2,3,4,6-τετρα-O-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)ακρυλαμίδιο (**73β**, μέσω αντίδρασης σύζευξης)



Σε σφαιρική φιάλη που περιέχει την αμίνη **85α** (315 mg, 0.91 mmoles) προστίθεται άνυδρη πυριδίνη (2 mL) και το διάλυμα ψύχεται στους 0 °C. Στη συνέχεια προστίθεται το χλωρίδιο **84β** (267 mg, 1 mmol, 1.1 equiv.) διαλυμένο σε 4.5 mL DCM σταδιακά επί 10' και το διάλυμα βιολετί χρώματος που προκύπτει, αφήνεται να έρθει σε r.t. Η αντίδραση παρακολουθείται με TLC (εξουδετέρωση μικρού όγκου αντίδρασης με διάλυμα 5% NaOH και στη συνέχεια προσθήκη EtOAc – σύστημα ανάπτυξης = 80% EtOAc/20% PE). Μετά από 1 ώρα ανάδευσης η αντίδραση διακόπτεται με προσθήκη 2 mL απιοντισμένου νερού και το μίγμα μεταφέρεται με EtOAc σε χοάνη. Η οργανική φάση πλένεται με 5% Na₂CO₃ (1 x 15 mL), με απιοντισμένο νερό (1 x 15 mL) και με brine (1 x 10 mL). Συλλέγεται η πορτοκαλί χρώματος οργανική φάση, συμπυκνώνεται και ξηραίνεται υπεράνω Na₂SO₄. Συλλέγονται 176 mg ακάθартου καστανέρυθρου στερεού (30% w/w) μετά από δύο προσπάθειες χρωματογραφικού καθαρισμού με σύστημα έκλουσης 20% EtOAc/80% PE το οποίο σταδιακά διαμορφώνεται σε 60% EtOAc/40% PE, τα οποία χρησιμοποιούνται στο επόμενο βήμα ως έχουν.

4.2.22 (E)-2-Κυανο-3-(6-(*N,N*-διμεθυλαμινο)-2-ναφθυλο)-*N*-(β-D-γλυκοκυρανοζυλο)-ακρυλαμίδιο (73ε, από αποπροστασία του 73β)



Σε σφαιρική φιάλη φέρεται το ακάθαρτο **73β** (176 mg), προστίθεται διάλυμα NH_3 σε MeOH συγκέντρωσης 7 N (7.5 mL), το σκεύος σφραγίζεται και αφήνεται να αναδεύεται όλη τη νύχτα σε r.t. Παρατηρούνται διαύγαση του αρχικά σκούρου πορτοκαλί αιωρήματος μετά από 30' και στη συνέχεια καταβύθιση κίτρινων στερεών. Η αντίδραση παρακολουθείται με TLC (σύστημα ανάπτυξης = 50% EtOAc/50% PE για τα ακετυλιωμένα παράγωγα και 20% MeOH/80% DCM για το **73ε**) και όταν η εικόνα του δεν παρουσιάζει άλλες αλλαγές, τα στερεά διηθούνται από γυάλινο πορώδες χωνί και πλένονται στον ηθμό με κρύα MeOH. Συλλέγονται 47 mg άμορφου ανοιχτού πορτοκαλί στερεού, καθαρού στο NMR.

Απόδοση αντίδρασης 11% (απόδοση 3 σταδίων, **83β→**84β**→**73β**→**73ε**)**

R_f 0.5 (20% MeOH/80% DCM)

^1H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.81 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.23 (s, 2H), 8.02 (dd, *J* = 8.6, 1.2 Hz, 1H), 7.85 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.76 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.29 (dd, *J* = 9.3, 2.4 Hz, 1H), 6.98 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 5.09 – 5.01 (m, 2H), 4.95 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 4.87 (apparent t, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.56 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 3.68 (dd, *J* = 11.7, 5.7 Hz, 1H), 3.46 (dd, *J* = 11.4, 5.3 Hz, 1H), 3.31 – 3.12 (m, 4H), 3.09 (s, 6H).

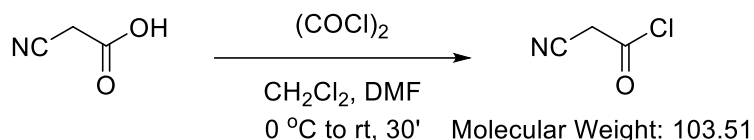
^{13}C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.0, 151.2, 150.7, 137.2, 134.0, 130.7, 126.9, 125.1 (2C), 124.8, 117.4, 116.9, 105.1, 102.2, 80.6, 78.9, 77.3, 72.1, 70.0, 61.0, 40.1 (2C).

ESI MS C₂₂H₂₅N₃O₆ (+) 428.01 [M+H]⁺ 450.11 [M+Na]⁺ (-) 425.98 [M-H]

HRMS [M+Na]⁺ Calculated for C₂₂H₂₅N₃O₆ : 450.1641 Found: 450.1637

Σημείο αποσύνθεσης 229 °C

4.2.23 Κυανοακετυλο χλωρίδιο (**94**)¹⁹⁴

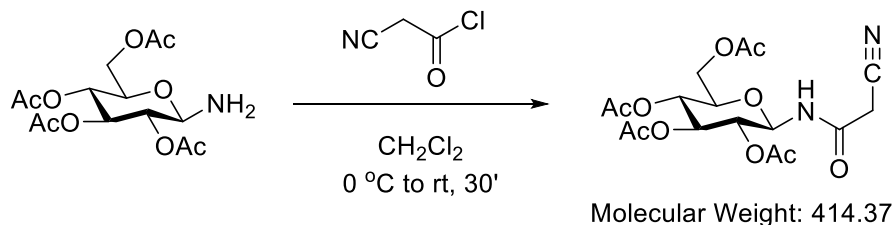


Ξηρή σφαιρική που περιέχει κυανοξικό οξύ (853 mg, 10.0 mmol), άνυδρο DCM (20.5 mL) και 10 σταγόνες DMF ως καταλύτη, ψύχεται στους 0 °C και προστίθεται σε δόσεις το (COCl)₂ (1.29 mL, 15.0 mmol, 1.5 equiv.) επί 20'. Στη συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται να έρθει σε r.t, όπου και παρατηρείται διαύγαση του αρχικά άχρωμου αιωρήματος σε απαλό κίτρινο διάλυμα μετά από 30' ανάδευσης. Η αντίδραση διακόπτεται, οι διαλύτες συμπυκνώνονται και παραλαμβάνεται το προϊόν ως κόκκινο έλαιο. Το ¹³C NMR του προϊόντος συμφωνεί με τα βιβλιογραφικά δεδομένα.¹⁹³

Απόδοση αντίδρασης Ποσοτική

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 164.5, 111.4, 48.8, 39.2, 35.4 (Οι κορυφές στα 48.8 και 39.2 ppm αντιστοιχούν στα μεθύλια του αντιδραστήριου Vilsmeier).

4.2.24 2-Κυανο-*N*-(2,3,4,6-τετρα-*O*-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)ακεταμίδιο (**95**)



Στην σφαιρική που περιέχει το χλωρίδιο **94** (1,035 g, 10.0 mmol, 1.35 equiv.) ανταλλάσσεται η ατμόσφαιρα με Ar, προστίθεται άνυδρο DCM και το διάλυμα ψύχεται στους 0 °C. Στη συνέχεια προστίθεται το διάλυμα (σε 10 mL άνυδρου DCM) της αμίνης (1.73 g, 4.97 mmol) σε δόσεις επί 15'. Η αντίδραση αφήνεται να έρθει σε r.t και παρακολουθείται με TLC (σύστημα ανάπτυξης = 80% EtOAc/20% PE) και μετά από 30' ανάδευσης, το μίγμα της αντίδρασης μεταφέρεται με DCM σε χοάνη και πλένεται με απιοντισμένο νερό (1 x 15 mL). Οι διαλύτες αποστάζουν και το προϊόν διηθείται από silica plug ώστε να κατακρατηθούν οι έγχρωμες προσμίξεις. Ο καθαρισμός του προϊόντος πραγματοποιείται χρωματογραφικώς με σύστημα έκλουσης το οποίο διαμορφώνεται από 40% EtOAc/60% PE σε 60% EtOAc/40% PE. Συλλέγεται το προϊόν ως άμορφο υπόλευκο στερεό (1.23 g, 2.98 mmol), καθαρό στο NMR.

Απόδοση αντίδρασης 60%

R_f 0.48 (80% EtOAc/20% PE)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.10 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 5.40 (apparent t, *J* = 9.2 Hz, 1H), 5.36 (apparent t, *J* = 9.5 Hz, 1H), 4.90 (apparent t, *J* = 9.7 Hz, 1H), 4.81 (apparent t, *J* = 9.4 Hz, 1H), 4.17 – 4.09 (m, 2H), 4.00 – 3.94 (m, 1H), 3.69 (s, 2H), 2.00 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.96 (s, 3H), 1.92 (s, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 170.0, 169.5, 169.3, 169.1, 163.1, 115.6, 77.0, 72.7, 72.2, 70.5, 67.7, 61.7, 25.5, 20.5, 20.35, 20.29, 20.27.

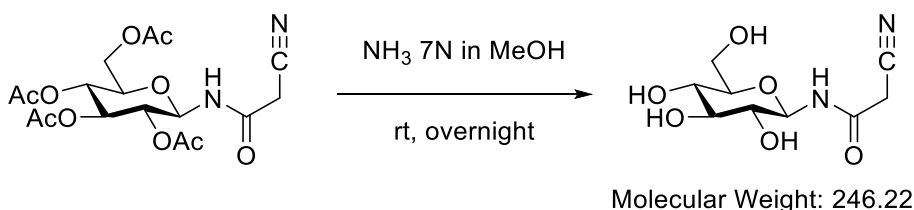
ESI MS C₁₇H₂₂N₂O₁₀ (+) 437.10 [M+Na]⁺ (-) 413.43 [M-H]

HRMS [M+Na]⁺ Calculated for C₁₇H₂₂N₂O₁₀: 437.1172 Found: 437.1172

[α] +6 ° (c 1.00, MeCN)

Σημείο τήξης 159-161 °C (μετά από συμπύκνωση με CHCl₃)

4.2.25 2-Κυανο-*N*-(β-D γλυκοκυρανοζυλο)ακεταμίδιο (**96**)



Σε ξηρή σφαιρική που περιέχει το αμίδιο **95** (420 mg, 1.01 mmoles) προστίθεται διάλυμα NH₃ σε MeOH 7 N (8.6 mL, 60.2 mmoles, 60.0 equiv.) και το σύστημα σφραγίζεται και αφήνεται να αναδεύεται όλη τη νύχτα σε r.t. Η αντίδραση ελέγχεται με TLC (σύστημα ανάπτυξης = 50% EtOAc/50% PE για το **95** και 20% MeOH/80% DCM για το **96**) ενώ παρατηρείται μεταβολή του χρώματος του διαλύματος από απαλό κίτρινο σε απαλό πορτοκαλί. Στη συνέχεια ο διαλύτης αποστάζει και το προϊόν διαλύεται στην ελάχιστη ποσότητα MeOH και καταβυθίζεται από DCM. Το προϊόν συλλέγεται ως υπόλευκος αφρός (246 mg, 0.99 mmoles).

Απόδοση αντίδρασης Ποσοτική

R_f 0.1 (20% MeOH/80% DCM)

¹H NMR (200 MHz, CD₃OD) δ 5.19 – 4.69 (m, 6H), 3.67 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 3.34 (s, 2H).

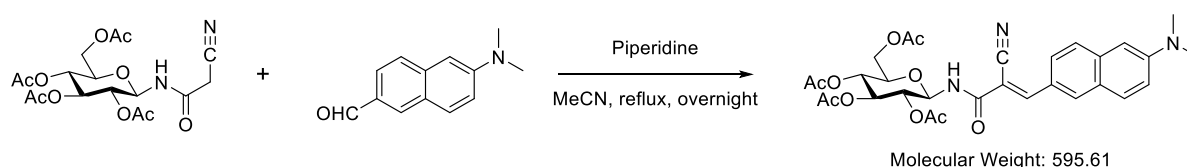
¹³C NMR (50 MHz, CD₃OD) δ 165.7, 115.8, 81.1, 79.5, 78.6, 73.8, 71.1, 62.4, 22.1.

ESI MS C₉H₁₄N₂O₆ (+) [M+NH₄]⁺ 263.93 (-) [M-H] 244.73

HRMS [M+Na]⁺ Calculated for C₉H₁₄N₂O₆: 269.0750 Found: 269.0745

[α] -3 ° (c 1.00, MeOH)

4.2.26 (E)-2-Κυανο-3-(6-(*N,N*-διμεθυλαμινο)-2-ναφθυλο)-*N*-(2,3,4,6-τετρα-*O*-ακετυλο-β-*D*-γλυκοπυρανοζυλο)ακρυλαμίδιο (73β, από σύζευξη Knoevenagel μεταξύ 95 και 69β)



Σε ξηρή σφαιρική φιάλη φέρονται το αμίδιο **95** (208 mg, 0.5 mmol), η αλδεΐδη **69β** (124 mg, 0.62 mmol, 1.24 equiv.), άνυδρο MeCN (1.1 mL) και πιπεριδίνη (56 μL, 0.57 mmol, 1.13 equiv.). Το καστανέρυθρο μίγμα αφήνεται να αναδεύεται όλη τη νύχτα σε αναρροή. Η αντίδραση ελέγχεται με TLC (σύστημα ανάπτυξης = 50% EtOAc/50% PE) και στη συνέχεια προστίθεται MeCN (2.5 mL) και το μίγμα αποχύνεται σε ποτήρι με μίγμα πάγου-νερού-1 N HCl ίσων ποσοτήτων. Το μίγμα που προκύπτει εκχυλίζεται με DCM (3 x 10 mL) και η οργανική στιβάδα πλένεται με απιοντισμένο νερό (1 x 10 mL). Το προϊόν καθαρίζεται χρωματογραφικώς με σύστημα έκλουσης 30% EtOAc/70% PE που σταδιακά διαμορφώνεται σε 50% EtOAc/50% PE. Παραλαμβάνεται άμορφο σκούρο καστανό στερεό (107 mg, 0.18 mmol).

Απόδοση αντίδρασης 36%

R_f 0.27 (50% EtOAc/50% PE)

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 8.30 (s, 1H), 8.10 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.99 (dd, *J* = 8.9, 1.9 Hz, 1H), 7.69 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.22 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.08 (dd, *J* = 9.1, 2.6 Hz, 1H), 6.77 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 5.40 (apparent t, *J* = 9.2 Hz, 1H), 5.37 (apparent t, *J* = 9.5 Hz, 1H), 5.11 (apparent t, *J* = 9.7 Hz, 1H), 5.09 (apparent t, *J* = 9.5 Hz, 1H), 4.31 (dd, *J* = 12.5, 4.1 Hz, 1H), 4.11 (dd, *J* = 12.6, 2.1 Hz, 1H), 3.88 (ddd, *J* = 10.2, 4.2, 2.2 Hz, 1H), 3.08 (s, 6H), 2.08 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.03 (s, 6H).

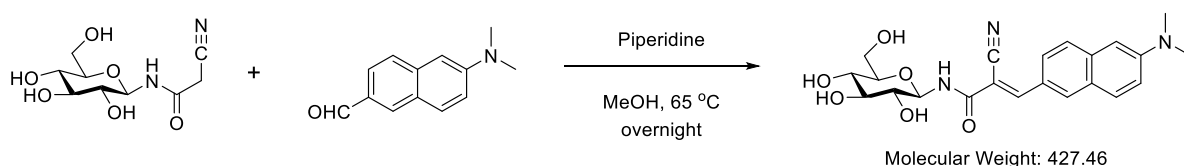
¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 170.7 (2C), 170.1, 169.6, 162.1, 154.5, 150.7, 137.8, 135.3, 130.9, 126.9, 125.8, 125.3, 124.8, 117.3, 116.2, 105.3, 98.3, 79.0, 73.6, 72.7, 70.4, 68.1, 61.6, 40.3 (2C), 20.8, 20.68 (3C).

ESI MS C₃₀H₃₃N₃O₁₀ (+) 595.63 [M+H]⁺ 618.04 [M+Na]⁺ (-) 594.16 [M-H]

HRMS [M+Na]⁺ Calculated for C₃₀H₃₃N₃O₁₀: 628.2064 Found: 618.2052

Σημείο τήξης 168-172 °C (μετά από συμπύκνωση με CHCl₃)

4.2.27 (E)-2-Κυανο-3-(6-(N,N-διμεθυλαμινο)-2-ναφθυλο)-N-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)ακρυλαμίδιο (73ε, από σύζευξη Knoevenagel μεταξύ 96 και 69β)



Σε ξηρό δοχείο Wheaton φέρεται το αμίδιο **96** (100 mg, 0.41 mmol) ως διάλυμα σε 2 mL MeOH και εν συνεχεία προστίθενται η αλδεΐδη **69β** (100 mg, 0.5 mmol, 1.22 equiv.) και η πιπεριδίνη (55 μL, 0.55 mmol, 1.1 equiv.). Το δοχείο σφραγίζεται και θερμαίνεται στους 60 °C για 5 ώρες σε ελαιόλουτρο και στη συνέχεια για όλη τη νύχτα σε κατάλληλη βάση για Wheaton στους 65 °C. Παρατηρείται καταβύθιση πορτοκαλί στερεού στο μίγμα της αντίδρασης. Η αντίδραση ελέγχεται με TLC (σύστημα ανάπτυξης = 20% EtOAc/80% PE για την **69β** και 16% MeOH/84% DCM για το **73ε**) και στη συνέχεια το μίγμα διηθείται από γυάλινο πορώδες χωνί και το πορτοκαλί στερεό πλένεται 3 φορές στον ηθμό με κρύα MeOH. Συλλέγονται 120 mg άμορφου ανοιχτού πορτοκαλί στερεού καθαρού στο NMR.

Απόδοση αντίδρασης 68%

4.3 Φωτομετρικά πειράματα

Γενικά, πριν ληφθούν φάσματα απορρόφησης απαλοίφεται το φάσμα της λάμπας μέσω της επιλογής **Baseline Correction** και πριν από κάθε μέτρηση στο φθορισμόμετρο, απαλοίφεται ο σκοτεινός θόρυβος με χρήση της επιλογής **AutoZero**. Αφού ληφθούν τα φάσματα απορρόφησης με το κατάλληλο τυφλό, αραιώνονται έτσι ώστε η απορρόφηση στο $\lambda_{\max}$ να είναι κοντά στην τιμή 0.1. Στο τελικό αραιωμένο διάλυμα λαμβάνεται το φάσμα φθορισμού. Τα φάσματα φθορισμού παρουσιάζονται ως διορθωμένα ως προς τον αριθμό των απορροφούμενων φωτονίων (κάθε τιμή διαιρείται με τον παράγοντα $1 \cdot 10^{-A_{\text{exc}}}$). Οι κυψελίδες μετά από κάθε μέτρηση ξεπλένονται δύο φορές με απιοντισμένο νερό και δύο με MeOH ενώ στη συνέχεια στεγνώνουν σε διηθητικό χαρτί, με χρήση πεπιεσμένου αέρα. Για τη ακριβή μεταφορά των διαλυμάτων χρησιμοποιούνται βιοχημικές πιπέτες Gilson των 200 και 1000 μL . Ως διάλυμα αναφοράς για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε διάλυμα του φθορίζοντος αναστολέα GLAC (**72**) σε MeCN συγκέντρωσης 213.4 μM και περιεκτικότητας 10% σε DMSO (το τελικό διάλυμα για τις μετρήσεις εκπομπής έχει περίπου 1% DMSO). Για τη λήψη φάσματος φθορισμού το διάλυμα αραιώνεται 11 φορές με MeCN, φωτοβολείται στα 410 nm (όπου η απορρόφηση είναι περίπου 0.1) και καταγράφεται ο φθορισμός στα 420-750 nm, σύμφωνα με τις παραμέτρους των υπόλοιπων πειραμάτων. Οι παράμετροι εντός των παρενθέσεων αφορούν μετρήσεις του **RotB** ενώ οι υπόλοιπες του **RotA**. Η χρήση της γρήγορης ταχύτητας σάρωσης (Fast Mode) συγκρίθηκε με την μέτρια (Medium Mode) και φάνηκε πως δεν υποβαθμίζει την ποιότητα του φάσματος απορρόφησης.

4.3.1 Εξαγωγή μοριακού συντελεστή απορροφητικότητας

4.3.1.1 Παράμετροι

Περιοχή σάρωσης: 180-600 nm, **Ταχύτητα σάρωσης:** Medium, **Διάστημα μεταξύ σαρώσεων:** 1.0 nm, **Τύπος μέτρησης:** Absorbance, **Πλάτος σχισμής:** 1.0 nm, **Ανιχνευτής:** Direct, **S/R Exchange:** Normal

4.3.1.2 Πειραματική διαδικασία

Παρασκευάστηκε αρχικά διάλυμα του στροφέα σε DMSO με συγκέντρωση 2.50 mM. Λόγω ύπαρξης μικροσωματιδίων, αδιάλυτων στο DMSO, το διάλυμα διηθήθηκε από ηθμό βαμβακιού πριν χρησιμοποιηθεί. Στη συνέχεια, με διαδοχικές αραιώσεις με DMSO παρασκευάζονται διαλύματα τελικού όγκου 1000 μL με τις εξής συγκεντρώσεις

1, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 250 μM . Ο όγκος πλήρωσης των κυψελίδων είναι 700 μL . Συμπερασματικά, εξήχθησαν οι συγκεντρώσεις στις οποίες η απορρόφηση του στροφέα στο συγκεκριμένο περιβάλλον είναι κοντά στην τιμή 1 και η τιμή του συντελεστή ϵ . Προέκυψε ότι για τον **RotA** η τιμή είναι 30 μM και το ϵ 28.600 $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ είναι ενώ για τον **RotB** είναι 34 μM και η τιμή του ϵ είναι 29.500 $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$.

4.3.2 Περιβάλλον μεταβλητού ιζώδους

4.3.2.1 Παράμετροι

4.3.2.1.1 Απορρόφησης

Περιοχή σάρωσης: 180-600 nm (220-700 nm), **Ταχύτητα σάρωσης:** Medium (Fast), **Διάστημα μεταξύ σαρώσεων:** 1.0 nm, **Τύπος μέτρησης:** Absorbance, **Πλάτος σχισμής:** 1.0 nm, **Ανιχνευτής:** Direct, **S/R Exchange:** Normal

4.3.2.1.2 Εκπομπής

Τύπος μέτρησης: Emission, **Μήκος κύματος διέγερσης:** 425 nm (420 nm), **Περιοχή σάρωσης:** 435-600 nm (430-700 nm), **Ταχύτητα σάρωσης:** Medium, **Ευαισθησία:** High, **Σχισμή διέγερσης:** 3, **Σχισμή εκπομπής:** 1.5

4.3.2.2 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, παρασκευάστηκαν διαλύματα με διαφορετικές αναλογίες (10% έως και 90% ως προς το ένα συστατικό) με ανάμιξη αντίστοιχων όγκων αιθυλενογλυκόλης και γλυκερόλης και ανάδευση μέχρις ότου να είναι απόλυτα ομοιογενή. Οι μεταφορές των υψηλού ιζώδους διαλυτών γίνονται με απλή σύριγγα μιας χρήσης και η παρασκευή των διαλυμάτων στηρίζεται στην ακρίβειά της σύριγγας. Χρησιμοποιούνται βιβλιογραφικές τιμές¹⁹⁵ για τα ιζώδη των συστατικών και το ιζώδες των μιγμάτων υπολογίζεται βάσει της εξίσωσης **5 (Παρ. 3.2.1, σελ. 93)**.¹⁹⁶ Αραιώνοντας 15 μL από πυκνό διάλυμα του στροφέα **RotA** (συγκέντρωσης 10.0 mM σε DMSO) σε ογκομετρική φιάλη σε τελικό όγκο 5 mL, παρασκευάζονται διαλύματα τελικής συγκέντρωσης 30 μM . Ο όγκος πλήρωσης των κυψελίδων είναι 650 μL . Οι τελικές συγκεντρώσεις των αραιωμένων διαλυμάτων βρίσκονται στην περιοχή 2.3-3.0 μM .

4.3.3 Δοκιμασία μη-ειδικής πρόσδεσης με BSA

4.3.3.1 Παράμετροι

4.3.3.1.1 Απορρόφησης

Περιοχή σάρωσης: 180-600 nm, **Ταχύτητα σάρωσης:** Medium, **Διάστημα μεταξύ σαρώσεων:** 1.0 nm, **Τύπος μέτρησης:** Absorbance, **Πλάτος σχισμής:** 1.0 nm, **Ανιχνευτής:** Direct, **S/R Exchange:** Normal

4.3.3.1.2 Εκπομπής

Τύπος μέτρησης: Emission, **Μήκος κύματος διέγερσης:** 440 nm, **Περιοχή σάρωσης:** 440-600 nm, **Ταχύτητα σάρωσης:** Medium, **Ευαισθησία:** High, **Σχισμή διέγερσης:** 3, **Σχισμή εκπομπής:** 1.5

4.3.3.2 Πειραματική διαδικασία

Παρασκευάστηκαν διαλύματα τελικού όγκου 850 μL με και χωρίς BSA. Σε 840 μL ισότονου διαλύματος HBS χωρίς γλυκόζη προστέθηκαν 10 μL πυκνού διαλύματος στροφέα (συγκέντρωσης 2.50 mM σε DMSO) ώστε να προκύψει νέο διάλυμα με συγκέντρωση 29.4 μM σε στροφέα. Παρασκευάστηκε και ένα αντίστοιχο διάλυμα που περιείχε 16.7 mg BSA (συγκέντρωση BSA 302.2 μM) ώστε $[\text{BSA}]/[\text{RotA}]=10.28$. Ο όγκος πλήρωσης των κυψελίδων είναι 700 μL . Το τελικό διάλυμα για τη μέτρηση φθορισμού έχει συγκέντρωση ως προς τον **RotA** $\sim 2.3 \mu\text{M}$.

4.3.4 Δοκιμασία μη-ειδικής πρόσδεσης με HK III

4.3.4.1 Παράμετροι

4.3.4.1.1 Απορρόφησης

Περιοχή σάρωσης: 180-600 nm, **Ταχύτητα σάρωσης:** Medium, **Διάστημα μεταξύ σαρώσεων:** 1.0 nm, **Τύπος μέτρησης:** Absorbance, **Πλάτος σχισμής:** 1.0 nm, **Ανιχνευτής:** Direct, **S/R Exchange:** Normal

4.3.4.1.2 Εκπομπής

Τύπος μέτρησης: Emission, **Μήκος κύματος διέγερσης:** 433 nm, **Περιοχή σάρωσης:** 443-600 nm, **Ταχύτητα σάρωσης:** Medium, **Ευαισθησία:** High, **Σχισμή διέγερσης:** 3, **Σχισμή εκπομπής:** 1.5

4.3.4.2 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, παρασκευάστηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με pH 7.5 όπως έχει αναφερθεί στην παράγραφο **4.1.3**. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκε πυκνό διάλυμα HK-III συγκέντρωσης 909 μM (100 mg σε 1 mL υπερκαθαρό H_2O) το οποίο στη συνέχεια αραιώθηκε 10 φορές με το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών για να προκύψει διάλυμα σε ρυθμιστικό φωσφορικών με τελική συγκέντρωση 91 μM . Παρασκευάστηκε διάλυμα του **RotA** σε DMSO (συγκέντρωσης 250 μM), MgCl_2 σε υπερκαθαρό νερό

(συγκέντρωσης 0.1 M) και ATP σε υπερκαθαρό νερό (συγκέντρωσης 0.005 M). Με ανάμιξη κατάλληλων όγκων των παραπάνω διαλυμάτων, παρασκευάστηκαν διαλύματα τελικού όγκου 3 mL τα οποία περιέχουν **RotA** σε συγκέντρωση 3 μM , HK-III σε συγκεντρώσεις 1.5 ως 24 μM , Mg^{2+} και ATP με σταθερό λόγο συγκεντρώσεων $[\text{Mg}^{2+}]:[\text{ATP}] = 20:1$. Ο όγκος πλήρωσης των κυψελίδων είναι 700 μL . Λαμβάνεται φάσμα φθορισμού μόνο όταν σταθεροποιηθεί το φάσμα απορρόφησης ώστε να έχει επέλθει ισορροπία.

4.3.5 Υδατικά διαλύματα διαφορετικών pH

4.3.5.1 Παράμετροι

4.3.5.1.1 Απορρόφησης

Περιοχή σάρωσης: 180-600 nm, (220-900 nm), **Ταχύτητα σάρωσης:** Medium, (Fast), **Διάστημα μεταξύ σαρώσεων:** 1.0 nm, **Τύπος μέτρησης:** Absorbance, **Πλάτος σχισμής:** 1.0 nm, **Ανιχνευτής:** Direct, **S/R Exchange:** Normal

4.3.5.1.2 Εκπομπής

Τύπος μέτρησης: Emission, **Μήκος κύματος διέγερσης:** 434 nm, (432 nm), **Περιοχή σάρωσης:** 444-600 nm, (442-700 nm), **Ταχύτητα σάρωσης:** Medium, **Ευαισθησία:** High, **Σχισμή διέγερσης:** 3, **Σχισμή εκπομπής:** 1.5

4.3.5.2 Πειραματική διαδικασία

Παρασκευάστηκαν υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα για τα οποία ακολουθήθηκαν συγκεκριμένες μεθοδολογίες για τις διαφορετικές τιμές pH. Συγκεκριμένα, διαλύματα με pH από 1.7 έως και 10.0 παρασκευάστηκαν με ανάμιξη ρυθμιστικού διαλύματος Britton-Robinson Universal Buffer (BRB) και διαλύματος NaOH συγκέντρωσης 0.2 N, σύμφωνα με τη βιβλιογραφική μέθοδο¹⁹⁷. Με βάση αυτή τη μέθοδο, ποσότητα του ρυθμιστικού BRB μεταφέρεται σε ποτήρι ζέσης και αναδεύεται με χρήση μαγνητικού αναδευτήρα ενώ παράλληλα έχει βυθιστεί στο διάλυμα το ηλεκτρόδιο του πεχάμετρου. Στη συνέχεια προστίθεται αργά το διάλυμα της βάσης και όποτε η τιμή του pH είναι η επιθυμητή, διακόπτεται η ανάδευση, αφαιρείται η επιθυμητή ποσότητα και συνεχίζεται η διαδικασία. Για τις τιμές pH πάνω από 10.0 οι παρασκευές γίνονται με συγκεκριμένο τρόπο.²²⁵ Χρησιμοποιήθηκε επίσης διάλυμα του στροφέα συγκέντρωσης 2.50 mM σε DMSO. Τα υδατικά ρυθμιστικά έμειναν όλη τη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου πριν χρησιμοποιηθούν. Όσον αφορά το **RotA**, παρασκευάστηκαν διαλύματα τελικού όγκου 1260 μL με αραιώση 15 μL του πυκνού διαλύματος με το αντίστοιχο υδατικό ρυθμιστικό (τελική συγκέντρωση 29.8 μM) ενώ για το **RotB** παρασκευάστηκαν 1000 μL με

αντίστοιχη αραίωση. Οι τελικές συγκεντρώσεις των αραιωμένων διαλυμάτων είναι ~ 2.1-3.7 μM για τον **RotA** και ~ 3.75-20.0 μM για τον **RotB**.

4.3.6 Μίγματα στροφέα RotA και RMGPb

4.3.6.1 Παράμετροι

4.3.6.1.1 Απορρόφησης

Περιοχή σάρωσης: 300-600 nm (αναλογίες 0.0-1.6), 220-800 nm (αναλογίες 1.6-10.0), **Ταχύτητα σάρωσης:** Medium (αναλογίες 0.0-1.6), Fast (αναλογίες 1.6-10.0), **Διάστημα μεταξύ σαρώσεων:** 1.0 nm, **Τύπος μέτρησης:** Absorbance, **Πλάτος σχισμής:** 1.0 nm, **Ανιχνευτής:** Direct, **S/R Exchange:** Normal

4.3.6.1.2 Εκπομπής

Τύπος μέτρησης: Emission, **Μήκος κύματος διέγερσης:** 440 nm (αναλογίες 0.0-1.6), 416 (αναλογίες 1.6-10.0), **Περιοχή σάρωσης:** 450-700 nm (αναλογίες 0.0-1.6), 426-750 (αναλογίες 1.6-10.0), **Ταχύτητα σάρωσης:** Medium, **Ευαισθησία:** High, **Σχισμή διέγερσης:** 3, **Σχισμή εκπομπής:** 1.5

4.3.6.2 Πειραματική διαδικασία

4.3.6.2.1 Αναλογίες [RMGPb]/[RotA] 0.0-1.6

Παρασκευάστηκαν διαλύματα τελικού όγκου 1680 μL που περιείχαν συγκεκριμένες ποσότητες assay buffer, AMP (υδατικό διάλυμα 50 mM), RMGPb (διάλυμα συγκέντρωσης 271 μM) και γλυκερόλης. Τα διαλύματα αυτά περιέχουν διαφορετικές και αυξανόμενες ποσότητες **GP**, γλυκερόλη τόση ώστε η % περιεκτικότητά της να παραμένει σταθερή και AMP σε συγκέντρωση ~ 6 mM ώστε να είναι ~ 200 φορές υψηλότερη από τη συγκέντρωση του **RotA**. Στη συνέχεια χωρίστηκαν σε 2 ισόποσα μέρη στα οποία προστέθηκαν στο μεν πρώτο 10 μL assay buffer, στο δε δεύτερο 10 μL πυκνού διαλύματος στροφέα συγκέντρωσης 2.50 mM. Έτσι προκύπτουν 6 διαλύματα με σταθερή συγκέντρωση στροφέα 29.4 μM και λόγους συγκεντρώσεων ενζύμου ως προς στροφέα 0, 0.4, 0.8, 1.0, 1.2 και 1.6 καθώς επίσης και 6 τυφλά διαλύματα. Ο όγκος πλήρωσης των κυψελίδων είναι 700 μL διαλύματος. Οι συγκεντρώσεις των τελικών διαλυμάτων φαίνονται αναλυτικά στον παρακάτω **Πίνακα 3**.

Πίνακας 3: Τελικές συγκεντρώσεις του ενζύμου και του RotA.

Λόγος [RMGPb]/[RotA]	0.00	0.39	0.80	1.02	1.19	1.60
-------------------------	------	------	------	------	------	------

[RotA] (μM)	29.41	29.41	29.41	29.41	29.41	29.41
[RMGPb] (μM)	0.00	11.48	23.59	29.97	35.07	47.19
[AMP] (μM)	5882.35	5882.35	5882.35	5882.35	5882.35	5882.35
DMSO (%V _V)	1.18	1.18	1.18	1.18	1.18	1.18
Γλυκερόλη (%V _V)	8.71	8.71	8.71	8.71	8.71	8.71

4.3.6.2.2 Λόγοι [RMGPb]/[RotA] 1.6-10.0

Παρασκευάστηκαν αρχικά τα εξής διαλύματα: 250 μM **RotA** σε DMSO τελικού όγκου 1000 μL, 3.125 μM **RotA** σε assay buffer (αραίωση 25 μL διαλύματος **RotA** 250 μM, διάλυμα SX) τελικού όγκου 2000 μL και DMSO σε assay buffer (αραίωση 25 μL DMSO, τυφλό SX) τελικού όγκου 2000 μL. Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν τα διαλύματα που περιέχουν το ένζυμο ξεκινώντας από αυτό με τη μεγαλύτερη αναλογία ενζύμου προς στροφέα. Το πρώτο διάλυμα (S1) περιέχει 730 μL assay buffer, 108 μL AMP (50 mM), 100 μL RMGPb (271 μM) και 11 μL **RotA** (250 μM σε DMSO) ενώ το τυφλό του S1 περιέχει 780 μL assay buffer, 108 μL AMP, 50 μL γλυκερόλη και 11 μL **RotA** 250 μM σε DMSO. Αφού μετρηθεί η απορρόφηση και η εκπομπή αυτού του διαλύματος με κατάλληλη ανάμιξη όγκων του S1 και του SX προκύπτει το S2 με μικρότερη πλέον αναλογία ενζύμου προς στροφέα αλλά πρακτικά ίδια συγκέντρωση του τελευταίου. Αντίστοιχα, συνεχίζεται η διαδικασία όπως φαίνεται στον παρακάτω **Πίνακα 4**. Ο όγκος πλήρωσης των κυψελίδων είναι 600 μL διαλύματος. Φάσματα εκπομπής λαμβάνονται με διέγερση στο κατάλληλο μήκος κύματος, μόνο όταν το φάσμα απορρόφησης έχει σταθεροποιηθεί.

Πίνακας 4: Τελικές τιμές διαλυμάτων του RotA παρουσία RMGPb.

Διάλυμα	[RotA] (μM)	[RMGPb] (μM)	RMGPb/RotA
S1	2.90	28.56	9.85
S2	2.95	21.73	7.36
S3	3.01	14.49	4.81

S4	3.08	5.88	1.91
S5	3.09	4.57	1.48

4.3.7 Μίγματα στροφέα RotB και RMGPb

4.3.7.1 Παράμετροι

4.3.7.1.1 Απορρόφησης

Περιοχή σάρωσης: 220-900 nm (1^{ος} τρόπος), 220-700 nm (2^{ος} τρόπος) **Ταχύτητα σάρωσης:** Fast, **Διάστημα μεταξύ σαρώσεων:** 1.0 nm, **Τύπος μέτρησης:** Absorbance, **Πλάτος σχισμής:** 1.0 nm, **Ανιχνευτής:** Direct, **S/R Exchange:** Normal

4.3.7.2 Εκπομπής

Τύπος μέτρησης: Emission, **Μήκος κύματος διέγερσης:** 428 nm (1^{ος} τρόπος), 432 (2^{ος} τρόπος), **Περιοχή σάρωσης:** 438-750 nm (1^{ος} τρόπος), 442-700 (2^{ος} τρόπος), **Ταχύτητα σάρωσης:** Medium, **Ευαισθησία:** High, **Σχισμή διέγερσης:** 3, **Σχισμή εκπομπής:** 1.5

4.3.7.3 Πειραματική διαδικασία

4.3.7.3.1 1^{ος} τρόπος-αναλογίες [RMGPb]/[RotB] 0.0-7.5

Παρασκευάστηκαν αρχικά τα εξής διαλύματα: 250 μM **RotB** σε DMSO τελικού όγκου 1000 μL, 3.125 μM **RotB** σε assay buffer (αραίωση 25 μL **RotB** 250 μM σε τελικό όγκο 2000 μL, διάλυμα SX) και DMSO σε assay buffer (αραίωση 25 μL DMSO σε τελικό όγκο 2000 μL, τυφλό SX). Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν τα διαλύματα που περιέχουν το ένζυμο ξεκινώντας από αυτό με τη μεγαλύτερη αναλογία ενζύμου προς στροφέα. Το πρώτο διάλυμα (S1) περιέχει 730 μL assay buffer, 83 μL AMP (50 mM), 76 μL RMGPb (271 μM) και 11 μL **RotB** (250 μM σε DMSO) ενώ το τυφλό του S1 περιέχει 768 μL assay buffer, 83 μL AMP, 38 μL γλυκερόλη και 11 μL DMSO. Ακόμη, παρασκευάζεται και το διάλυμα αναλογίας [RMGPb]:[**RotB**] = 0 το οποίο έχει την ίδια σύσταση με το τυφλό του S1 μόνο που αντί για 11 μL DMSO έχει 11 μL **RotB** 250 μM σε DMSO. Αφού μετρηθεί η απορρόφηση και η εκπομπή αυτού του διαλύματος, με κατάλληλη ανάμιξη όγκων του S1 και του SX προκύπτει το S2 με μικρότερη πλέον αναλογία ενζύμου προς στροφέα αλλά πρακτικά ίδια συγκέντρωση του τελευταίου. Η ίδια διαδικασία ακριβώς ακολουθείται και για τα τυφλά αυτών των διαλυμάτων με ανάμιξη όγκων του κάθε τυφλού S1-S4 και του SX blind. Αντίστοιχα, συνεχίζεται η διαδικασία όπως φαίνεται

στον παρακάτω **Πίνακα 5**. Ο όγκος πλήρωσης των κυψελίδων είναι 600 μL διαλύματος. Φάσματα εκπομπής λαμβάνονται με διέγερση στο κατάλληλο μήκος κύματος μόνο όταν το φάσμα απορρόφησης έχει σταθεροποιηθεί.

Πίνακας 5: Τελικές τιμές διαλυμάτων του RotB παρουσία RMGPb.

Διάλυμα	[RotB] (μM)	[RMGPb] (μM)	RMGPb/RotB
S1	3.06	22.88	7.49
S2	3.07	17.42	5.67
S3	3.09	11.61	3.76
S4	3.11	4.71	1.51

4.3.7.3.2 2^{ος} τρόπος-λόγοι [RMGPb]/[RotB] 0.0-9.7

Το συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιήθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα που δεν περιείχε β -μερκαπτοαιθανόλη και νατραζίδιο και με νέο διάλυμα RMGPb, στο νέο ρυθμιστικό, συγκέντρωσης 167.8 μM .

Παρασκευάστηκαν αρχικά τα εξής διαλύματα: 250 μM **RotB** σε DMSO τελικού όγκου 1000 μL , 3.396 μM **RotB** στο νέο assay buffer (αραίωση 27.2 μL **RotB** 250 μM σε τελικό όγκο 2002.2 μL , διάλυμα SBX) και DMSO στο νέο assay buffer (αραίωση 27.2 μL DMSO σε τελικό όγκο 2002.2 μL , τυφλό SBX). Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν τα διαλύματα που περιέχουν το ένζυμο ξεκινώντας από αυτό με τη μεγαλύτερη αναλογία ενζύμου προς στροφέα. Το S1 περιέχει 599 μL νέου assay buffer, 121 μL AMP, 180 μL RMGPb (167.8 μM) και 11 μL RotB (250 μM σε DMSO) ενώ το τυφλό του S1 περιέχει 689 μL νέου assay buffer, 121 μL AMP, 90 μL γλυκερόλη και 12.4 μL DMSO. Ακόμη, παρασκευάστηκε και το διάλυμα αναλογίας 0.0 το οποίο έχει την ίδια σύσταση με το τυφλό του S1 μόνο που αντί για 12.4 μL DMSO έχει 12.4 μL **RotB** (250 μM σε DMSO). Αφού μετρηθεί η απορρόφηση και η εκπομπή αυτού του διαλύματος, με κατάλληλη ανάμιξη όγκων του S1 και του SX προκύπτει το S2 με μικρότερη πλέον αναλογία ενζύμου προς στροφέα αλλά πρακτικά ίδια συγκέντρωση του τελευταίου. Η ίδια διαδικασία ακριβώς ακολουθείται και για τα τυφλά αυτών των διαλυμάτων με ανάμιξη όγκων του κάθε τυφλού S1-S4 και του SBX blind. Αντίστοιχα, συνεχίζεται η διαδικασία όπως φαίνεται στον παρακάτω **Πίνακα 6**.

Πίνακας 6: Τελικές τιμές διαλυμάτων του RotB παρουσία RMGPb στο νέο ρυθμιστικό.

Διάλυμα	[RotB] (μM)	[RMGPb] (μM)	RMGPb/RotB
S1	3.40	33.10	9.74
S2	3.40	25.20	7.42
S3	3.40	16.80	4.94
S4	3.40	6.81	2.01
S5	3.40	5.30	1.56

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Ακρωνύμια και ανάπτυξη τους

AB	Assay Buffer
AMP	Adenosine Monophosphate
ATP	Adenosine Triphosphate
BODIPY	4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene
BSA	Bovine Serum Albumin
CAT	Computerized Axial Tomography
CCVJ	CarboxycyanovinylJulolidine
CCVJ-TEG	CarboxycyanovinylJulolidine (Triethyleneglycol ester)
CNR	Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bologna
COX	Cyclooxygenase
CT	Computed Tomography
CV	Crystal Violet
DABCO	1,4-Διαζαδικυκλο[2.2.2]οκτάνιο
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindole
DASPMI	4-(4-(<i>N,N'</i> -dimethylamino)styryl)- <i>N</i> -methylpyridinium iodide
DBMN	Dialkylaminobenzomalononitriles
DBU	1,8-Διαζαδικυκλο[5.4.0]ενδεκ-7-ένιο
DCDHF	Dicyanodihydrofuranes
DCM	Διχλωρομεθάνιο
DCVJ	DicyanovinylJulolidine
DMABN	Dimethylaminobenzomalononitrile
DMF	<i>N,N</i> -Διμεθυλοφορμαμίδιο
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine
DSPC	Distearoylphosphatidylcholine
EB	Ethidium Bromide
EDTA	EthyleneDiamineTetraacetic Acid
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EPR	Enhanced Permeability and Retention
ESI-MS	Electron Spray Ionization-Mass Spectrum
FA	Fluorescence Anisotropy
FCS	Fluorescence Correlation Spectroscopy
FCVJ	FarnesoylcyanovinylJulolidine
FDA	Food and Drug Administration
FDG	Fluorodeoxyglucose
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FLIM	Fluorescence Lifetime Imaging
FRAP	Fluorescence Recovery after Photobleaching
FRET	Förster Resonance Energy Transfer
GFP-RFP	Green Fluorescent Protein-Red Fluorescent Protein
GGT	Gamma-Glutamyl Transferase
GP	Glycogen Phosphorylase
GS	Glycogen Synthase
H&E	Haematoxylin and Eosin
HK	Hexokinase
HRMS	High Resolution Mass Spectrum
HSA	Human Serum Albumin

IC ₅₀	Half maximal Inhibitory Concentration
ICC	Immunocytochemistry
ICG	Indocyanine Green
ISO	Insituto per la Sinthesi Organica e la Fotoreattività
K _d	Σταθερά διάστασης
LAURDAN	2-Dodecanoyl-6- <i>N,N</i> -dimethyl naphthylamine
LE	Locally Excited (State)
LSCM	Laser Scanning Confocal Microscope
MPEG	MethoxyPolyEthyleneGlycol
MRI	Magnetic Resonance Imaging
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium chloride
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide (reduced form)
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (reduced form)
NBD	4-Chloro-7-nitrobenzofurazan
NIR	Near-Infrared
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NPs	Nanoparticles
pAbGPBB	Polyclonal antibody of Brain Glycogen Phosphorylase
PDT	Photodynamic Therapy
PE	Πετρελαϊκός αιθέρας
PEG	PolyEthyleneGlycol
PET	Positron Emission Tomography/Photoinduced Electron Transfer
PI	Propidium Iodide
PI4KB	Phosphatidylinositol-4-Kinase Beta
PRODAN	2-Propionyl-6- <i>N,N</i> -dimethyl naphthylamine
PTSA	π-Τολουολοσουλφονικό οξύ
RMGPb	Rabbit Muscle Glycogen Phosphorylase b
ROS	Reactive Oxygen Species
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
SST	Somatostatin
TBAH	Υδροξείδιο του <i>N,N,N,N</i> -τετραβουτυλαμμωνίου
THF	Τετραϋδροφουράνιο
ThT	Thioflavine T
TICT	Twisted Intramolecular Charge Transfer (State)
TLC	Thin Layer Chromatography-Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας
TPM-MPM	Two Photon Microscopy/Multi Photon Microscopy
UV-Vis	Ultraviolet-Visual
AX	Αυτοβαθμονομούμενες Χρωστικές
βME	β-Μερκαπτοαιθανόλη
ΚΝΣ	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
M.A	Μοριακή Απεικόνιση
ΜΣ	Μοριακοί Στροφείς
Ο.Α	Οπτική Απεικόνιση
ΣΔΤ2	Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2
ΣΕΜΦ	Συστήματα Ελεγχόμενης Μεταφοράς Φαρμάκων
ΣΠΥ	Σήμα προς Υπόβαθρο
ΤΔ	Τοπική Διεγερμένη (Κατάσταση)
Φ.Σ	Φθορίζουσα Σήμανση

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Anderson, C. J.; Lewis, J. S. *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **2017**, 375 (2107), 1–11.
- (2) Long, N. J.; Wong, W.-T. Long, N. J., Wong, W.-T., Eds.; John Wiley & Sons: United States of America, 2015; pp 245–274.
- (3) *Contrast Agents II*, 1st ed.; Krause, W., Ed.; Topics in Current Chemistry; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2002; Vol. 222.
- (4) Rudin, M.; Weissleder, R. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, 2 (2), 123–131.
- (5) Reddy, S. A Question for Anyone Getting an MRI <https://www.wsj.com/articles/a-question-for-anyone-getting-an-mri-1505751710> (accessed Sep 14, 2019).
- (6) Vander Heiden, M. G.; Cantley, L. C.; Thompson, C. B. *Science* **2009**, 324 (5930), 1029–1033.
- (7) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer, New York, USA: Baltimore, Maryland, USA, 2006.
- (8) Luker, G. D.; Luker, K. E. *J. Nucl. Med.* **2008**, 49 (1), 1–5.
- (9) Weissleder, R. *Nat. Biotechnol.* **2001**, 19 (4), 316–317.
- (10) Denk, W.; Strickler, J.; Webb, W. *Science* **1990**, 248 (4951), 73–76.
- (11) So, P. T. In *eLS*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 2001; pp 1–5.
- (12) Ntziachristos, V. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2006**, 8 (1), 1–33.
- (13) Bremer, C.; Ntziachristos, V.; Weissleder, R. *Eur. Radiol.* **2003**, 13 (231), 231–243.
- (14) Weissleder, R.; Tung, C.-H.; Mahmood, U.; Bogdanov, A. *Nat. Biotechnol.* **1999**, 17 (4), 375–378.
- (15) Licha, K.; Olbrich, C. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, 57 (8), 1087–1108.
- (16) Hebden, J. C.; Arridge, S. R.; Delpy, D. T. *Phys. Med. Biol.* **1997**, 42 (5), 825–840.
- (17) Thomas, J. A. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44 (14), 4494–4500.
- (18) Atkinson, E. G.; Jones, S.; Ellis, B. A.; Dumonde, D. C.; Graham, E. *Eye* **1991**, 5 (4), 440–446.

- (19) Uddin, M. J.; Crews, B. C.; Ghebreselasie, K.; Marnett, L. J. *Bioconjug. Chem.* **2013**, 24 (4), 712–723.
- (20) Desvergne, A.; Cheng, Y.; Grosay-Gaudrel, S.; Maréchal, X.; Reboud-Ravaux, M.; Genin, E.; Vidal, J. *J. Med. Chem.* **2014**, 57 (21), 9211–9217.
- (21) Urano, Y.; Sakabe, M.; Kosaka, N.; Ogawa, M.; Mitsunaga, M.; Asanuma, D.; Kamiya, M.; Young R., M.; Nagano, T.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. *Cancer Imaging* **2011**, 3 (110), 110–119.
- (22) Nesterov, E. E.; Skoch, J.; Hyman, B. T.; Klunk, W. E.; Bacskai, B. J.; Swager, T. M. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2005**, 44 (34), 5452–5456.
- (23) Tietz, O.; Kaur, J.; Bhardwaj, A.; Wuest, F. R. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, 14 (30), 7250–7257.
- (24) Badarau, E.; Wang, Z.; Rathbone, D. L.; Costanzi, A.; Thibault, T.; Murdoch, C. E.; El Alaoui, S.; Bartkeviciute, M.; Griffin, M. *Chem. Biol.* **2015**, 22 (10), 1347–1361.
- (25) Luo, S.; Zhang, E.; Su, Y.; Cheng, T.; Shi, C. *Biomaterials* **2011**, 32 (29), 7127–7138.
- (26) Andrade, W.; Seabrook, T. J.; Johnston, M. G.; Hay, J. B. *J. Immunol. Methods* **1996**, 194 (2), 181–189.
- (27) Owens, S. L. *Br. J. Ophthalmol.* **1996**, 80 (3), 263–266.
- (28) Frangioni, J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, 7 (5), 626–634.
- (29) Bugaj, J. E.; Achilefu, S.; Dorshow, R. B.; Rajagopalan, R. *J. Biomed. Opt.* **2001**, 6 (2), 122–133.
- (30) Achilefu, S.; Jimenez, H. N.; Dorshow, R. B.; Bugaj, J. E.; Webb, E. G.; Wilhelm, R. R.; Rajagopalan, R.; Johler, J.; Erion, J. L. *J. Med. Chem.* **2002**, 45 (10), 2003–2015.
- (31) Folli, S.; Westermann, P.; Braichotte, D.; Pèlegri, A.; Wagnières, G.; van den Bergh, H.; Mach, J. P. *Cancer Res.* **1994**, 54 (10), 2643–2649.
- (32) Ballou, B.; Fisher, G. W.; Waggoner, A. S.; Farkas, D. L.; Reiland, J. M.; Jaffe, R.; Mujumdar, R. B.; Mujumdar, S. R.; Hakala, T. R. *Cancer Immunol. Immunother.* **1995**, 41 (4), 257–263.
- (33) Neri, D.; Carnemolla, B.; Nissim, A.; Leprini, A.; Querzè, G.; Balza, E.; Pini, A.;

- Tarli, L.; Halin, C.; Neri, P.; Zardi, L.; Winter, G. *Nat. Biotechnol.* **1997**, *15* (12), 1271–1275.
- (34) Birchler, M.; Neri, G.; Tarli, L.; Halin, C.; Viti, F.; Neri, D. *J. Immunol. Methods* **1999**, *231* (1–2), 239–248.
- (35) Tung, C. H.; Bredow, S.; Mahmood, U.; Weissleder, R. *Bioconjug. Chem.* **1999**, *10* (5), 892–896.
- (36) Escobedo, J. O.; Rusin, O.; Lim, S.; Strongin, R. M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14* (1), 64–70.
- (37) Law, K. Y. *Chem. Rev.* **1993**, *93* (1), 449–486.
- (38) Terpetschnig, E.; Szmazinski, H.; Ozinskas, A.; Lakowicz, J. R. *Anal. Biochem.* **1994**, *217* (2), 197–204.
- (39) Oswald, B.; Patsenker, L.; Duschl, J.; Szmazinski, H.; Wolfbeis, O. S.; Terpetschnig, E. *Bioconjug. Chem.* **1999**, *10* (6), 925–931.
- (40) Avirah, R. R.; Jayaram, D. T.; Adarsh, N.; Ramaiah, D. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (5), 911–920.
- (41) White, A. G.; Fu, N.; Leevy, W. M.; Lee, J. J.; Blasco, M. A.; Smith, B. D. *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21* (7), 1297–1304.
- (42) Podgorski, K.; Terpetschnig, E.; Klochko, O. P.; Obukhova, O. M.; Haas, K. *PLoS One* **2012**, *7* (12), 1–7.
- (43) Hamblin, M. R.; Newman, E. L. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1994**, *26* (2), 147–157.
- (44) Duska, L. R.; Hamblin, M. R.; Bamberg, M. P.; Hasan, T. *Br. J. Cancer* **1997**, *75* (6), 837–844.
- (45) Bisland, S. K.; Singh, D.; Gariépy, J. *Bioconjug. Chem.* **1999**, *10* (6), 982–992.
- (46) Králová, J.; Koivukorpi, J.; Kejík, Z.; Poučková, P.; Sievänen, E.; Kolehmainen, E.; Král, V. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6* (9), 1548–1552.
- (47) Kuimova, M. K.; Collins, H. A.; Balaz, M.; Dahlstedt, E.; Levitt, J. A.; Sergent, N.; Suhling, K.; Drobizhev, M.; Makarov, N. S.; Rebane, A.; Anderson, H. L.; Phillips, D. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7* (5), 889–896.
- (48) Kowada, T.; Maeda, H.; Kikuchi, K. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (14), 4953–4972.

- (49) Haidekker, M. A.; Nipper, M.; Mustafic, A.; Lichlyter, D.; Danakali, M.; Theodorakis, E. A. *Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology I*, 1st ed.; Demchenko, A. P., Ed.; Springer Series on Fluorescence; Springer Berlin Heidelberg, 2010; Vol. 8.
- (50) Haidekker, M. A.; Theodorakis, E. A. *J. Biol. Eng.* **2010**, 4 (1), 1–14.
- (51) Lee, S.-C.; Heo, J.; Woo, H. C.; Lee, J.-A.; Seo, Y. H.; Lee, C.-L.; Kim, S.; Kwon, O.-P. *Chem. - A Eur. J.* **2018**, 24 (52), 13692–13692.
- (52) Stsiapura, V. I.; Maskevich, A. A.; Kuzmitsky, V. A.; Uversky, V. N.; Kuznetsova, I. M.; Turoverov, K. K. *J. Phys. Chem. B* **2008**, 112 (49), 15893–15902.
- (53) Amdursky, N.; Erez, Y.; Huppert, D. *Acc. Chem. Res.* **2012**, 45 (9), 1548–1557.
- (54) Kee, H. L.; Kirmaier, C.; Yu, L.; Thamyongkit, P.; Youngblood, W. J.; Calder, M. E.; Ramos, L.; Noll, B. C.; Bocian, D. F.; Scheidt, W. R.; Birge, R. R.; Lindsey, J. S.; Holten, D. *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109 (43), 20433–20443.
- (55) Loutfy, R. O.; Law, K. Y. *J. Phys. Chem.* **1980**, 84 (21), 2803–2808.
- (56) Haidekker, M. A.; Theodorakis, E. A. *J. Mater. Chem. C* **2016**, 4 (14), 2707–2718.
- (57) Lippert, E.; Luder, W.; Boos, H. *Adv. Mol. Spectrosc.* **1962**, 443–457.
- (58) Rotkiewicz, K.; Grellmann, K. H.; Grabowski, Z. R. *Chem. Phys. Lett.* **1973**, 19 (3), 315–318.
- (59) Iwaki, T.; Torigoe, C.; Noji, M.; Nakanishi, M. *Biochemistry* **1993**, 32 (29), 7589–7592.
- (60) Haidekker, M. A.; L'Heureux, N.; Frangos, J. A. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **2000**, 278 (4), H1401–H1406.
- (61) Haidekker, M. A.; Brady, T. P.; Lichlyter, D.; Theodorakis, E. A. *Bioorg. Chem.* **2005**, 33 (6), 415–425.
- (62) Förster, T.; Hoffmann, G. *Zeitschrift für Phys. Chemie* **1971**, 75 (1-2), 63–76.
- (63) Loutfy, R. O.; Arnold, B. A. *J. Phys. Chem.* **1982**, 86 (21), 4205–4211.
- (64) Al-hassan, K. A.; Khanfer, M. F. *J. Fluoresc.* **1998**, 8 (2), 139–154.
- (65) Freire, S.; de Araujo, M. H.; Al-Soufi, W.; Novo, M. *Dye. Pigment.* **2014**, 110, 97–105.
- (66) Kuder, J. E.; Limburg, W. W.; Pochan, J. M.; Wychick, D. J. *Chem. Soc. Perkin*

Trans. 2 **1977**, No. 13, 1643.

- (67) Sutharsan, J.; Lichlyter, D.; Wright, N. E.; Dakanali, M.; Haidekker, M. A.; Theodorakis, E. A. *Tetrahedron* **2010**, 66 (14), 2582–2588.
- (68) Klymchenko, A. S.; Kreder, R. *Chem. Biol.* **2014**, 21 (1), 97–113.
- (69) Kuimova, M. K. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, 14 (37), 12671.
- (70) Kuimova, M. K.; Botchway, S. W.; Parker, A. W.; Balaz, M.; Collins, H. A.; Anderson, H. L.; Suhling, K.; Ogilby, P. R. *Nat. Chem.* **2009**, 1 (1), 69–73.
- (71) Kocsis, L. S.; Elbel, K. M.; Hardigree, B. A.; Brummond, K. M.; Haidekker, M. A.; Theodorakis, E. A. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13 (10), 2965–2973.
- (72) Lee, S.-C.; Heo, J.; Ryu, J.-W.; Lee, C.-L.; Kim, S.; Tae, J.-S.; Rhee, B.-O.; Kim, S.-W.; Kwon, O.-P. *Chem. Commun.* **2016**, 52 (94), 13695–13698.
- (73) Xia, T.; Wang, L.; Qu, Y.; Rui, Y.; Cao, J.; Hu, Y.; Yang, J.; Wu, J.; Xu, J. *J. Mater. Chem. C* **2016**, 4 (24), 5696–5701.
- (74) Karpenko, I. A.; Niko, Y.; Yakubovskiy, V. P.; Gerasov, A. O.; Bonnet, D.; Kovtun, Y. P.; Klymchenko, A. S. *J. Mater. Chem. C* **2016**, 4 (14), 3002–3009.
- (75) Saheki, S.; Takeda, A.; Shimazu, T. *Anal. Biochem.* **1985**, 148 (2), 277–281.
- (76) Akers, W. J.; Haidekker, M. A. *J. Biomech. Eng.* **2005**, 127 (3), 450–454.
- (77) Shinitzky, M. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1984**, 738 (4), 251–261.
- (78) Zakim, D.; Kavecansky, J.; Scarlata, S. *Biochemistry* **1992**, 31 (46), 11589–11594.
- (79) Gleason, M. M.; Medow, M. S.; Tulenko, T. N. *Circ. Res.* **1991**, 69 (1), 216–227.
- (80) Deliconstantinos, G.; Villiotou, V.; Stavrides, J. C. *Biochem. Pharmacol.* **1995**, 49 (11), 1589–1600.
- (81) Otto, C.; Ritter, M. M.; Richter, W. O.; Minkenberg, R.; Schwandt, P. *Metabolism* **2001**, 50 (2), 166–170.
- (82) Heron, D. S.; Shinitzky, M.; Hershkowitz, M.; Samuel, D. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1980**, 77 (12), 7463–7467.
- (83) Eze, M. O. *Med. Hypotheses* **1992**, 37 (4), 220–224.
- (84) Nadiv, O.; Shinitzky, M.; Manu, H.; Hecht, D.; Roberts, C. T.; LeRoith, D.; Zick, Y. *Biochem. J.* **1994**, 298 (2), 443–450.

- (85) Letcher, R. L.; Chien, S.; Pickering, T. G.; Sealey, J. E.; Laragh, J. H. *Am. J. Med.* **1981**, 70 (6), 1195–1202.
- (86) Shiraishi, K.; Matsuzaki, S.; Ishida, H.; Nakazawa, H. *Alcohol Alcohol.* **1993**, 28 (Supplement_1A), 59–64.
- (87) McMillan, D. E. *Metabolism* **1982**, 31 (3), 274–278.
- (88) Law, K. Y. *Photochem. Photobiol.* **1981**, 33 (6), 799–806.
- (89) Lukac, S. J. *Am. Chem. Soc.* **1984**, 106 (16), 4386–4392.
- (90) Kung, C. E.; Reed, J. K. *Biochemistry* **1986**, 25 (20), 6114–6121.
- (91) Haidekker, M. A.; Ling, T.; Anglo, M.; Stevens, H. Y.; Frangos, J. A.; Theodorakis, E. A. *Chem. Biol.* **2001**, 8 (2), 123–131.
- (92) Haidekker, M. A.; Brady, T.; Wen, K.; Okada, C.; Stevens, H. Y.; Snell, J. M.; Frangos, J. A.; Theodorakis, E. A. *Bioorganic Med. Chem.* **2002**, 10 (11), 3627–3636.
- (93) Haidekker, M. A.; Tsai, A. G.; Brady, T.; Stevens, H. Y.; Frangos, J. A.; Theodorakis, E.; Intaglietta, M. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **2002**, 282 (5), 1609–1614.
- (94) Haidekker, M. A.; Theodorakis, E. A. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5 (11), 1669–1678.
- (95) Luby-Phelps, K.; Mujumdar, S.; Mujumdar, R. B.; Ernst, L. A.; Galbraith, W.; Waggoner, A. S. *Biophys. J.* **1993**, 65 (1), 236–242.
- (96) Haidekker, M. A.; Brady, T. P.; Lichlyter, D.; Theodorakis, E. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128 (2), 398–399.
- (97) Dakanali, M.; Do, T. H.; Horn, A.; Chongchivivat, A.; Jarusreni, T.; Lichlyter, D.; Guizzunti, G.; Haidekker, M. A.; Theodorakis, E. A. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20 (14), 4443–4450.
- (98) Zhigang Yang; Jiangli Fan; Xiaojun Peng. In *2011 Functional Optical Imaging*; IEEE, 2011; pp 1–2.
- (99) Xochitiotzi-Flores, E.; Jiménez-Sánchez, A.; García-Ortega, H.; Sánchez-Puig, N.; Romero-Ávila, M.; Santillan, R.; Farfán, N. *New J. Chem.* **2016**, 40 (5), 4500–4512.

- (100) Kuimova, M. K.; Yahiloglu, G.; Levitt, J. A.; Suhling, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (21), 6672–6673.
- (101) Levitt, J. A.; Kuimova, M. K.; Yahiloglu, G.; Chung, P.; Suhling, K.; Phillips, D. J. *Phys. Chem. C* **2009**, *113* (27), 11634–11642.
- (102) Wang, L.; Xiao, Y.; Tian, W.; Deng, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (8), 2903–2906.
- (103) López-Duarte, I.; Vu, T. T.; Izquierdo, M. A.; Bull, J. A.; Kuimova, M. K. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (40), 5282–5284.
- (104) Chambers, J. E.; Kubánková, M.; Huber, R. G.; López-Duarte, I.; Avezov, E.; Bond, P. J.; Marciniak, S. J.; Kuimova, M. K. *ACS Nano* **2018**, *12* (5), 4398–4407.
- (105) Zhu, H.; Fan, J.; Li, M.; Cao, J.; Wang, J.; Peng, X. *Chem. - A Eur. J.* **2014**, *20* (16), 4691–4696.
- (106) Loutfy, R. O. *Macromolecules* **1983**, *16* (4), 678–680.
- (107) Loutfy, R. O. In *Photophysical and Photochemical Tools in Polymer Science*; Springer Netherlands: Dordrecht, 1986; pp 429–448.
- (108) Loutfy, R. O.; Teegarden, D. M. *Macromolecules* **1983**, *16* (3), 452–456.
- (109) Kung, C. E.; Reed, J. K. *Biochemistry* **1989**, *28* (16), 6678–6686.
- (110) Sawada, S.; Iio, T.; Hayashi, Y.; Takahashi, S. *Anal. Biochem.* **1992**, *204* (1), 110–117.
- (111) Iio, T.; Takahashi, S.; Sawada, S. *J. Biochem.* **1993**, *113* (2), 196–199.
- (112) Weber, G.; Farris, F. J. *Biochemistry* **1979**, *18* (14), 3075–3078.
- (113) Parasassi, T.; Krasnowska, E. K.; Bagatolli, L.; Gratton, E. *J. Fluoresc.* **1998**, *8* (4), 365–375.
- (114) De Veci-Suplicy, C. C.; Benatti, C. R.; Lamy, M. T. *J. Fluoresc.* **2006**, *16* (3), 431–439.
- (115) Macgregor, R. B.; Weber, G. *Nature* **1986**, *319* (6048), 70–73.
- (116) Yamana, K.; Mitsui, T.; Hayashi, H.; Nakano, H. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38* (33), 5815–5818.
- (117) Yamana, K.; Mitsui, T.; Nakano, H. *Tetrahedron* **1999**, *55* (30), 9143–9150.
- (118) Kimura, T.; Kawai, K.; Majima, T. *Org. Lett.* **2005**, *7* (26), 5829–5832.

- (119) Kimura, T.; Kawai, K.; Majima, T. *Chem. Commun.* **2006**, No. 14, 1542.
- (120) Okamoto, A.; Tainaka, K.; Saito, I. *Bioconjug. Chem.* **2005**, 16 (5), 1105–1111.
- (121) Okamoto, A.; Tainaka, K.; Unzai, T.; Saito, I. *Tetrahedron* **2007**, 63 (17), 3465–3470.
- (122) Tainaka, K.; Tanaka, K.; Ikeda, S.; Nishiza, K.; Unzai, T.; Fujiwara, Y.; Saito, I.; Okamoto, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129 (15), 4776–4784.
- (123) Tanaka, K.; Tainaka, K.; Okamoto, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15 (4), 1615–1621.
- (124) Chiti, F.; Dobson, C. M. *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, 75 (1), 333–366.
- (125) Aguzzi, A.; O'Connor, T. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, 9 (3), 237–248.
- (126) Fares, M.; Li, Y.; Liu, Y.; Miao, K.; Gao, Z.; Zhai, Y.; Zhang, X. *Bioconjug. Chem.* **2018**, 29 (1), 215–224.
- (127) Cao, K.; Farahi, M.; Dakanali, M.; Chang, W. M.; Sigurdson, C. J.; Theodorakis, E. A.; Yang, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134 (42), 17338–17341.
- (128) Guan, Y.; Cao, K. J.; Cantlon, A.; Elbel, K.; Theodorakis, E. A.; Walsh, D. M.; Yang, J.; Shah, J. V. *Chem. Neurosci.* **2015**, 6, 1503–1508.
- (129) Cao, K. J.; Elbel, K. M.; Cifelli, J. L.; Cirera, J.; Sigurdson, C. J.; Paesani, F.; Theodorakis, E. A.; Yang, J. *Sci. Rep.* **2018**, 8 (1), 6950.
- (130) Wu, Y.-Y.; Yu, W.-T.; Hou, T.-C.; Liu, T.-K.; Huang, C.-L.; Chen, I.-C.; Tan, K.-T. *Chem. Commun.* **2014**, 50 (78), 11507–11510.
- (131) Yu, W.-T.; Wu, T.-W.; Huang, C.-L.; Chen, I.-C.; Tan, K.-T. *Chem. Sci.* **2016**, 7 (1), 301–307.
- (132) Lai, H.-P.; Gao, R.-C.; Huang, C.-L.; Chen, I.-C.; Tan, K.-T. *Chem. Commun.* **2015**, 51 (90), 16197–16200.
- (133) Goh, W. L.; Lee, M. Y.; Joseph, T. L.; Quah, S. T.; Brown, C. J.; Verma, C.; Brenner, S.; Ghadessy, F. J.; Teo, Y. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136 (17), 6159–6162.
- (134) Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. *Biochemistry*, 5th ed.; W. H Freeman and Company.
- (135) Agius, L. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2007**, 21 (4), 587–605.

- (136) Moller, D. E. *Nature* **2001**, 414 (6865), 821–827.
- (137) Rines, A. K.; Sharabi, K.; Tavares, C. D. J.; Puigserver, P. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, 15 (11), 786–804.
- (138) Giddings, P. WO 2007/022934 A2. PCT/EP2006/008201 (22), 2007.
- (139) Favaro, E.; Bensaad, K.; Chong, M. G.; Tennant, D. A.; Ferguson, D. J. P.; Snell, C.; Steers, G.; Turley, H.; Li, J. L.; Günther, U. L.; Buffa, F. M.; McIntyre, A.; Harris, A. L. *Cell Metab.* **2012**, 16 (6), 751–764.
- (140) Zois, C. E.; Favaro, E.; Harris, A. L. *Biochem. Pharmacol.* **2014**, 92 (1), 3–11.
- (141) Schnier, J. B.; Nishi, K.; Monks, A.; Gorin, F. A.; Bradbury, E. M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, 309 (1), 126–134.
- (142) Martin, W. H.; Hoover, D. J.; Armento, S. J.; Stock, I. A.; Mcpherson, R. K.; Danley, D. E.; Stevenson, R. W.; Barrett, E. J.; Treadway, J. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, 95 (4), 1776–1781.
- (143) Somsak, L.; Czifrak, K.; Toth, M.; Bokor, E.; Chrysina, E.; Alexacou, K.-M.; Hayes, J.; Tiraidis, C.; Lazoura, E.; Leonidas, D.; Zographos, S.; Oikonomakos, N. *Curr. Med. Chem.* **2008**, 15 (28), 2933–2983.
- (144) Gimisis, T. *Mini-Reviews Med. Chem.* **2010**, 10 (12), 1127–1138.
- (145) Mamais, M.; Kouloumoundra, V.; Smyrli, E.; Grammatopoulos, P.; Chrysina, E. D.; Gimisis, T. *Tetrahedron Lett.* **2015**, 56 (41), 5549–5552.
- (146) Mamais, M.; Degli Esposti, A.; Kouloumoundra, V.; Gustavsson, T.; Monti, F.; Venturini, A.; Chrysina, E. D.; Markovitsi, D.; Gimisis, T. *Chem. - A Eur. J.* **2017**, 23 (37), 8800–8805.
- (147) Maffeis, V.; Mavreas, K.; Monti, F.; Mamais, M.; Gustavsson, T.; Chrysina, E. D.; Markovitsi, D.; Gimisis, T.; Venturini, A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2019**, 21 (14), 7685–7696.
- (148) Μαμάης, Μ. Σύνθεση, κινητική και κρυσταλλογραφική μελέτη εν δυνάμει αναστολέων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Διδακτορική Διατριβή, 2015.
- (149) Sutharsan, J.; Wright, N. E.; Dakanali, M.; Theodorakis, E. A.; Lichlyter, D.; Haidekker, M. A. *Tetrahedron* **2010**, 66 (14), 2582–2588.
- (150) Sutharsan, J.; Dakanali, M.; Capule, C. C.; Haidekker, M. A.; Yang, J.;

- Theodorakis, E. A. *ChemMedChem* **2010**, 5 (1), 56–60.
- (151) Chang, W. M.; Dakanali, M.; Capule, C. C.; Sigurdson, C. J.; Yang, J.; Theodorakis, E. a. *ACS Chem. Neurosci.* **2011**, 2 (5), 249–255.
- (152) Tietze, L. F.; Beifuss, U. W. E. 1991; pp 341–394.
- (153) Knoevenagel, E. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1894**, 27 (2), 2337–2345.
- (154) Knoevenagel, E. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1896**, 29 (1), 172–174.
- (155) Knoevenagel, E. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1898**, 31 (3), 2596–2619.
- (156) Balalaie, S.; Bararjanian, M.; Hekmat, S.; Salehi, P. *Synth. Commun.* **2006**, 36 (24), 3703–3711.
- (157) Balalaie, S.; Bararjanian, M. *Synth. Commun.* **2006**, 36 (4), 533–539.
- (158) Wang, D.-Y.; Xi, G.; Ma, J.; Wang, C.; Zhang, X.-C.; Wang, Q.-Q. *Synth. Commun.* **2011**, 41 (20), 3060–3065.
- (159) Popp, F. D.; Catala, A. *J. Org. Chem.* **1961**, 26 (8), 2738–2740.
- (160) Hebishy, A. M. S.; Abdelhamid, I. A.; Elwahy, A. H. M. *Arkivoc* **2018**, 2018 (5), 109–123.
- (161) McCluskey, A.; Robinson, P. J.; Hill, T.; Scott, J. L.; Edwards, J. K. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43 (17), 3117–3120.
- (162) Kaupp, G.; Reza Naimi-Jamal, M.; Schmeyers, J. *Tetrahedron* **2003**, 59 (21), 3753–3760.
- (163) Chalais, S.; Laszlo, P.; Mathy, A. *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26 (37), 4453–4454.
- (164) Obrador, E.; Castro, M.; Tamaríz, J.; Zepeda, G.; RenéMiranda; Delgado, F. *Synth. Commun.* **1998**, 28 (24), 4649–4663.
- (165) Pourshojaei, Y.; Nikzad, M.; Eskandari, K.; Darijani, M.; Hassanzadeh, A.; Faghih-mirzaei, E.; Asadipour, A. *Croat. Chem. Acta* **2018**, 91 (1), 19–28.
- (166) Hann, A. C. O.; Lapworth, A. J. *Chem. Soc., Trans.* **1904**, 85 (46), 46–56.
- (167) Knoevenagel, E. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1898**, 31 (3), 2585–2595.
- (168) Tanaka, M.; Oota, O.; Hiramatsu, H.; Fujiwara, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1988**, 61

- (7), 2473–2479.
- (169) List, B. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2010**, 49 (10), 1730–1734.
- (170) Tanikaga, R.; Konya, N.; Tamura, T.; Kaji, A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1987**, 825.
- (171) Zabicky, J. *J. Chem. Soc.* **1961**, 0 (0), 683–687.
- (172) Reetz, M. T.; von Itzstein, M. *J. Organomet. Chem.* **1987**, 334 (1–2), 85–92.
- (173) Katz, H. E.; Schilling, M. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111 (19), 7554–7557.
- (174) Matsuoka, M.; Takao, M.; Kitao, T.; Fujiwara, T.; Nakatsu, K. *Mol. Cryst. Liq. Cryst. Inc. Nonlinear Opt.* **1990**, 182 (1), 71–79.
- (175) Nitsche, C.; Steuer, C.; Klein, C. D. *Bioorganic Med. Chem.* **2011**, 19 (24), 7318–7337.
- (176) Manguiera, V. M.; Batista, T. M.; Brito, M. T.; Sousa, T. K. G. de; Cruz, R. M. D. da; Abrantes, R. A. de; Veras, R. C.; Medeiros, I. A. de; Medeiros, K. K. de P.; Pereira, A. L. da C.; Serafim, V. de L.; Moura, R. O. de; Sobral, M. V. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, 90, 253–261.
- (177) Koo, J. Y.; Heo, C. H.; Shin, Y.-H.; Kim, D.; Lim, C. S.; Cho, B. R.; Kim, H. M.; Park, S. B. *Chem. - A Eur. J.* **2016**, 22 (40), 14166–14170.
- (178) Zhou, K.; Li, Y.; Peng, Y.; Cui, X.; Dai, J.; Cui, M. *Anal. Chem.* **2018**, 90 (14), 8576–8582.
- (179) Drake, N. L. Maryland, 2011; pp 106–128.
- (180) Booth, G. *Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry*; Wiley-VCH, 2000; pp 671–723.
- (181) Dahms, B.; Franke, R.; Waldvogel, S. R. *ChemistrySelect* **2017**, 2 (21), 5860–5863.
- (182) Badáa, C.; Souard, F.; Vicent, C. *J. Org. Chem.* **2012**, 77 (23), 10870–10881.
- (183) Van Ameijde, J.; Albada, H. B.; Liskamp, R. M. J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2002**, 2 (8), 1042–1049.
- (184) Chen, A.; Okafor, I. S.; Garcia, C.; Wang, G. *Carbohydr. Res.* **2018**, 461, 60–75.
- (185) Vorbrüggen, H.; Krolikiewicz, K.; Bennua, B. *Chem. Ber.* **1981**, 114 (4), 1234–1255.

- (186) Roeschlaub, C. A.; Sammes, P. G. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2000**, No. 14, 2243–2248.
- (187) Kraft, J.; Schmollinger, D.; Maudrich, J.; Ziegler, T. *Synthesis (Stuttg)*. **2014**, 47 (02), 199–208.
- (188) Gurrapu, S.; Jonnalagadda, S. K.; Alam, M. A.; Nelson, G. L.; Sneve, M. G.; Drewes, L. R.; Mereddy, V. R. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, 6 (5), 558–561.
- (189) Buell, B. G.; Loffelman, F. F. Cationic Alpha-Cyano-p-Dimethylaminocinnamoyl Dyes and Paper Dyed Therewith. 687,492, 1997.
- (190) Su, W.; Weng, Y.; Jiang, L.; Yang, Y.; Zhao, L.; Chen, Z.; Li, Z.; Li, J. *Org. Prep. Proced. Int.* **2010**, 42 (6), 503–555.
- (191) Kaji, E.; Komori, T.; Yokoyama, M.; Kato, T.; Nishino, T.; Shirahata, T. *Tetrahedron* **2010**, 66 (23), 4089–4100.
- (192) Rao, A. S.; Kim, D.; Wang, T.; Kim, K. H.; Hwang, S.; Ahn, K. H. *Org. Lett.* **2012**, 14 (10), 2598–2601.
- (193) Althoff, W.; Fild, M.; Rieck, H.-P. *Zeitschrift für Naturforsch. B* **1976**, 31 (2), 153–157.
- (194) Kobayashi, Y.; Harayama, T. *Org. Lett.* **2009**, 11 (7), 1603–1606.
- (195) Dean, J. A. *Lange's Handbook of Chemistry*, 15th ed.; McGraw-Hill, 1997.
- (196) Perry, S.; Perry, R. H. *Perry's Chemical Engineer's Handbook*, 7th ed.; Perry, R. H., Green, D. W., Maloney, J. O., Eds.; McGraw-Hill, 1997.
- (197) Britton, H. T. S.; Robinson, R. A. *J. Chem. Soc.* **1931**, 1456–1462.
- (198) Pels, K.; Dickson, P.; An, H.; Kodadek, T. *ACS Comb. Sci.* **2018**, 20 (2), 61–69.
- (199) Giard, D. J.; Aaronson, S. A.; Todaro, G. J.; Arnstein, P.; Kersey, J. H.; Dosik, H.; Parks, W. P. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **1973**, 51 (5), 1417–1423.
- (200) Aden, D. P.; Fogel, A.; Plotkin, S.; Damjanov, I.; Knowles, B. B. *Nature* **1979**, 282 (5739), 615–616.
- (201) Biedler, J. L.; Helson, L.; Spengler, B. A. *Cancer Res.* **1973**, 33 (11), 2643–2652.
- (202) Westermark, B. *Int. J. Cancer* **1973**, 12 (2), 438–451.
- (203) Dalby, B. *Methods* **2004**, 33 (2), 95–103.
- (204) Mateos, R.; Pereira-Caro, G.; Saha, S.; Cert, R.; Redondo-Horcajo, M.; Bravo, L.;

- Kroon, P. A. *Food Chem.* **2011**, 125 (3), 865–872.
- (205) Liang, L.; Liu, X.; Wang, Q.; Cheng, S.; Zhang, S.; Zhang, M. *Phytomedicine* **2013**, 20 (6), 558–563.
- (206) Zhang, Y.; Gao, Y.; Wen, X.; Ma, H. *Asian J. Pharm. Sci.* **2014**, 9 (2), 65–74.
- (207) Wilczewska, A. Z.; Niemirowicz, K.; Markiewicz, K. H.; Car, H. *Pharmacol. Reports* **2012**, 64 (5), 1020–1037.
- (208) Fang, J.; Nakamura, H.; Maeda, H. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, 63 (3), 136–151.
- (209) Gaio, E.; Guerrini, A.; Ballestri, M.; Varchi, G.; Ferroni, C.; Martella, E.; Columbaro, M.; Moret, F.; Reddi, E. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2019**, 199, 111598.
- (210) Yamauchi, K.; Yamauchi, A.; Kusunoki, T.; Kohda, A.; Konishi, Y. *J. Biomed. Mater. Res.* **1996**, 31 (4), 439–444.
- (211) Verma, V.; Verma, P.; Ray, P.; Ray, A. R. *Biomed. Mater.* **2008**, 3 (2), 025007.
- (212) Martin, J. J.; Cardamone, J. M.; Irwin, P. L.; Brown, E. M. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2011**, 88 (1), 354–361.
- (213) Saravanan, S.; Sameera, D. K.; Moorthi, A.; Selvamurugan, N. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, 62, 481–486.
- (214) Xu, H.; Shi, Z.; Reddy, N.; Yang, Y. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, 62 (37), 9145–9150.
- (215) Zhi, X.; Wang, Y.; Li, P.; Yuan, J.; Shen, J. *RSC Adv.* **2015**, 5 (100), 82334–82341.
- (216) Aluigi, A.; Sotgiu, G.; Ferroni, C.; Duchi, S.; Lucarelli, E.; Martini, C.; Posati, T.; Guerrini, A.; Ballestri, M.; Corticelli, F.; Varchi, G. *RSC Adv.* **2016**, 6 (40), 33910–33918.
- (217) Li, Y.; Zhi, X.; Lin, J.; You, X.; Yuan, J. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, 73, 189–197.
- (218) Aluigi, A.; Ballestri, M.; Guerrini, A.; Sotgiu, G.; Ferroni, C.; Corticelli, F.; Gariboldi, M. B.; Monti, E.; Varchi, G. *Mater. Sci. Eng. C* **2018**, 90, 476–484.
- (219) Potassium Phosphate (pH 5.8 to 8.0) recipe and preparation
<https://www.aatbio.com/resources/buffer-preparations-and-recipes/potassium-phosphate-ph-5-8-to-8-0> (accessed Sep 25, 2019).

- (220) Nitsche, C.; Steuer, C.; Klein, C. D. *Bioorganic Med. Chem.* **2011**, *19* (24), 7318–7337.
- (221) Kitade, Y.; Shibata, A. Oligonucleotide Derivative, Oligonucleotide Construct Using The Same And Methods for Producing Them. 15/560,994, 2018.
- (222) Haidekker, M. A.; Brady, T. P.; Chalian, S. H.; Akers, W.; Lichlyter, D.; Theodorakis, E. A. *Bioorg. Chem.* **2004**, *32* (4), 274–289.
- (223) Koelsch, F. C. *Org. Synth.* **1940**, *20*, 18.
- (224) Vilches-Herrera, M.; Miranda-Sepúlveda, J.; Rebolledo-Fuentes, M.; Fierro, A.; Lühr, S.; Iturriaga-Vasquez, P.; Cassels, B. K.; Reyes-Parada, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17* (6), 2452–2460.
- (225) Preparation of pH buffer solutions
<http://delloyd.50megs.com/moreinfo/buffers2.html#buffer> (accessed Sep 25, 2019).