



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ, ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ
ΤΗΣ ΕΚΚΡΙΤΙΚΗΣ ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΗΣ A₂ ΜΕ ΠΙΘΑΝΗ
ΔΡΑΣΗ ΚΑΤΑ ΤΗΣ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗΣ**

**ΣΟΦΙΑ ΒΑΣΙΛΑΚΑΚΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2015



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ, ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ ΕΚΚΡΙΤΙΚΗΣ
ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΗΣ A₂ ΜΕ ΠΙΘΑΝΗ ΔΡΑΣΗ ΚΑΤΑ ΤΗΣ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗΣ

ΣΟΦΙΑ ΒΑΣΙΛΑΚΑΚΗ

A.M.: 001015

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

ΚΟΚΟΤΟΣ Γ., Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

ΚΟΚΟΤΟΣ Γ., Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΜΑΥΡΟΜΟΥΣΤΑΚΟΣ Θ., Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ Μ., Ερευνητής Α'

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κόκοτος Γεώργιος,
Καθηγητής ΕΚΠΑ

Μαυρομούστακος Θωμάς,
Καθηγητής ΕΚΠΑ

Παπαδόπουλος Μάνθος,
Ερευνητής Α' ΕΙΕ

Μικρός Εμμανουήλ,
Καθηγητής ΕΚΠΑ

Μουτεβελή-Μηνακάκη Παναγιώτα,
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Μαγκριώτη Βικτώρια,
Επίκουρη Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Βασιλείου Σταματία,
Λέκτορας ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 30/10/2015

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι εκκριτικές φωσφολιπάσες (sPLA₂) είναι μία οικογένεια ενζύμων τα οποία έχουν ως κύριο ρόλο την υδρόλυση των φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης στην θέση *sn*-2. Τα προϊόντα της καταλυτικής τους δράσης είναι ακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία μέσω διαφόρων βιολογικών οδών παράγουν βιολογικά ενδιάμεσα που σχετίζονται με την εμφάνιση φλεγμονωδών νοσημάτων. Μεταξύ των μελών της οικογένειας, η ομάδα IIA (GIIA sPLA₂) παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς έχει συσχετισθεί με τη δημιουργία της φλεγμονής από τότε που ταυτοποιήθηκε (1989). Εμφανίζεται σε μεγάλη συγκέντρωση στα αρθρικά κύτταρα καθώς και στο πλάσμα των ασθενών με στεφανιαία νόσο. Για το λόγο αυτό, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέσο για την πρόβλεψη τέτοιων ασθενειών.

Στο εργαστήριο του καθηγητή Γ. Κόκοτου έχει συντεθεί μια σειρά ενώσεων που φέρουν την χαρακτηριστική 2-οξοαμιδική ομάδα και έχουν δράση έναντι διαφόρων μελών των φωσφολιπασών A₂. Πρόσφατα, ένα 2-οξοαμιδικό παράγωγο της (S)-λευκίνης GK126 έδειξε ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι της GIIA sPLA₂. Στην παρούσα εργασία, η δομή αυτής της ένωσης χρησιμοποιήθηκε για τον σχεδιασμό νέων ενώσεων με πιθανή ανασταλτική δράση έναντι του ενζύμου. Πειράματα προσομοίωσης της μοριακής πρόσδεσης αυτών των ενώσεων, πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος GOLD 5.2. Το πρόγραμμα GOLD επιλέχθηκε ως καταλληλότερο για αυτές τις ενώσεις εφόσον είχαν προηγηθεί συγκριτικά πειράματα προσομοίωσης γνωστών αναστολέων με τα προγράμματα MAESTRO και Sybyl. Οι ενώσεις που είχαν ευνοϊκά αποτελέσματα στα *in silico* πειράματα, συντέθηκαν και η δράση τους αξιολογήθηκε *in vitro*. Το 2-οξοαμιδικό παράγωγο της (S)-βαλίνης είχε ισχυρή και εκλεκτική ανασταλτική δράση έναντι της GIIA sPLA₂. Για το λόγο αυτό, ο τρόπος πρόσδεσης της ένωσης μελετήθηκε σε πειράματα προσομοίωσης της μοριακής δυναμικής με τη βοήθεια του προγράμματος AMBER12.

Επίσης, στα πλαίσια της παρούσης εργασίας μελετήθηκε η πιθανή ανασταλτική δράση των παραγώγων της κουμαρίνης και της κινολιόνης. Τα παράγωγα αυτά σχεδιάστηκαν με βάση τη δομή γνωστών ινδολικών

αναστολέων της GIIA sPLA₂. Πειράματα προσομοίωσης της μοριακής πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου πραγματοποιήθηκαν με τις δομές των νέων υποψήφιων αναστολέων. Τα πειράματα αυτά έγιναν με την βοήθεια του προγράμματος GOLD. Από τα αποτελέσματα προέκυψαν ενώσεις, οι οποίες μπορεί να αποτελέσουν νέους συνθετικούς στόχους.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Ορθολογικός σχεδιασμός και σύνθεση αναστολέων ενζύμων.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: αναστολείς, εκκρινικές φωσφολιπάσες A₂, μοριακή πρόσδεση, μοριακή δυναμική, 2-οξοαμιδικά, AMBER, GOLD, GIIA sPLA₂.

ABSTRACT

Secreted phospholipase A₂ (sPLA₂) is a family of enzymes that catalyze the hydrolysis of membrane phospholipids at the *sn*-2 position. The products of this reaction are unsaturated fatty acids, which amplify the production of pre-inflammatory mediators. Group IIA sPLA₂ has long been an important target for medicinal chemists as it has been related with inflammation since it was identified in 1989. GIIA sPLA₂ is highly expressed in synovial cells, while its concentration increases in the plasma of patients who suffer from coronary artery disease, making it a useful tool for prognostic purposes.

Kokotos group has developed novel 2-oxoamides inhibitors against various PLA₂s. Recently, a 2-oxoamide derivative based on (*S*)-leucine GK126 has shown potent inhibitory activity against GIIA sPLA₂. Herein, the design of new potent inhibitors using GK126 as lead is described. Molecular docking simulations of the new compounds performed using the docking program GOLD 5.2. According to additional docking experiments with MAESTRO and SYBYL docking programs, GOLD was found to be the most suitable to run the simulations of these compounds. The derivatives presenting the most promising docking results were synthesized and their inhibitory activity was evaluated by *in vitro* studies. The 2-oxoamide derivative of (*S*)-valine showed a potent and selective inhibitory activity. Thus, molecular dynamic simulations using AMBER12 were also performed to further study its binding mode.

In addition, new coumarin and quinolinone derivatives were designed starting from the structure of known indole inhibitors of GIIA sPLA₂. Molecular docking simulations of these derivatives in GOLD showed that some of them could bind effectively on the active side of the enzyme and they represent new synthetic targets.

SUBJECT AREA: Rational design and synthesis of enzyme inhibitors.

KEYWORDS: AMBER, dynamics simulations, GIIA sPLA₂, GOLD, inhibitors, molecular docking, 2-oxoamides.

**Στα αδέρφια μου
Μαριάννα και Μιχάλη**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

Θερμές ευχαριστίες στον επιβλέποντα καθηγητή μου Γεώργιο Κόκοτο, για την ανάθεση του θέματος της διατριβής, την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετάσχω στην ερευνητική του ομάδα και την άριστη συνεργασία μαζί του.

Ευχαριστώ πολύ τον καθηγητή Θωμά Μαυρομούστακο για το αμείωτο ενδιαφέρον του και την συνεχή βοήθεια του στα υπολογιστικά πειράματα.

Ευχαριστώ τον Ερευνητή Α΄ Μάνθο Παπαδόπουλο για την βοήθειά του και την παροχή πόρων για την υλοποίηση μέρους των υπολογιστικών πειραμάτων.

Επίσης, θερμές ευχαριστίες στους μεταδιδάκτορες Ευφροσύνη Μπαρμπαγιάννη και Γεώργιο Λεώνη για την εκπαίδευση και την βοήθεια που μου παρείχαν.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	26
1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	
ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ A₂	31
1.1 Γενικά για τις φωσφολιπάσες A ₂	31
1.2 Εκκριτικές φωσφολιπάσες A ₂ (sPLA ₂)	34
1.2.1 Βιολογικός ρόλος των sPLA ₂	35
1.2.2 Ασθένειες και sPLA ₂	37
1.2.3 Συνδυαστικός ρόλος	43
1.3 Εκκριτική φωσφολιπάση GIIA sPLA ₂	44
1.3.1 Αναστολείς της εκκριτικής φωσφολιπάσης	46
1.3.2 2-Οξοαμιδικά παράγωγα	48
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	
α-ΚΕΤΟ ΑΜΙΔΙΑ	49
2.1 Γενικά	49
2.2 α-Κετοαμιδικά παράγωγα ως ενώσεις με φαρμακολογική δράση	52
2.2.1 Αναστολείς της αμινοπεπτιδάσης	52
2.2.2 α-Κετοαμίδια με αντικαρκινική δράση	54
2.2.3 Αναστολείς των πρωτεασών της κυστεΐνης	56
2.2.4 Αναστολείς της κινάσης (MAP) p38	65
2.2.5 Αναστολείς του πεπτιδικού πρωτεασώματος	65
2.2.6 Αναστολείς των πρωτεασών της σερίνης	66
2.2.7 Αναστολείς των φωσφολιπασών A ₂	73
3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	
In silico ΘΕΩΡΗΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ	77
3.1 Γενικά για τις υπολογιστικές τεχνικές	77
3.2 Το πρόγραμμα προσομοίωσης της μοριακής πρόσδεσης GOLD	79
3.2.1 Ο γενετικός αλγόριθμος	79
3.2.2 Χαρακτηριστικά του προγράμματος	80
3.2.3 Λειτουργία του αλγόριθμου GOLD	82
3.2.4 Εξίσωση βαθμονόμησης ChemScore	83

3.3	Το πρόγραμμα προσομοίωσης της μοριακής δυναμικής AMBER	84
3.3.1	Υπολογιστική χημεία	84
3.3.2	Κβαντική / στατιστική μηχανική	85
3.3.3	Μοριακή μηχανική	86
3.3.4	Η γέννηση της υπολογιστικής βιολογίας	88
3.3.5	Το πρόγραμμα AMBER	89
3.3.6	Δομή του AMBER	92
4.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	
	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	97
5.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	
	ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΝΕΩΝ 2-ΟΞΟΑΜΙΔΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ	99
5.1	Σύγκριση κρυσταλλογραφικών μελετών της GIIA sPLA ₂	99
5.2	Προετοιμασία για τη διεξαγωγή των πειραμάτων προσομοίωσης της μοριακής πρόσδεσης	105
5.2.1	Σχεδιασμός και προετοιμασία των δομών των υποψηφίων αναστολέων	105
5.2.2	Προετοιμασία της πρωτεΐνης και παραμετροποίηση των υπολογιστικών προγραμμάτων προσομοίωσης	106
5.3	Επιλογή του κατάλληλου υπολογιστικού προγράμματος	108
5.4	Επιλογή της εξίσωσης βαθμονόμησης στο GOLD	111
5.5	Σχεδίαση νέων υποψηφίων αναστολέων της GIIA sPLA ₂ με βάση τη δομή του αναστολέα GK126	112
5.6	<i>In vitro</i> βιολογική αποτίμηση των 2-οξοαμιδικών παραγώγων	119
5.7	Σχεδιασμός νέων υποψηφίων αναστολέων με βάση τη δομή του αναστολέα GK241	120
5.8	<i>In vitro</i> βιολογική αποτίμηση των 2-οξοαμιδικών παραγώγων της ένωσης GK241	122
6.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6	
	ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟΨΗΦΙΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ	125
6.1	Συνθετική πορεία των ενώσεων που σχεδιάστηκαν με βάση τη δομή του αναστολέα GK126	125

6.1.1	Σύνθεση 2-οξοαμιδικών παραγώγων των α-αμινοξέων _____	125
6.1.2	Σύνθεση του (S)-5-αιθοξυ-5-οξο-4-(2-οξοδεκαεξαναμιδο) πεντανοϊκού οξέος _____	127
6.1.3	Σύνθεση 2-οξοαμιδικών παραγώγων των διπεπτιδίων _____	128
6.2	Συνθετική πορεία των παραγώγων του αναστολέα GK241 _____	133
6.2.1	Σύνθεση των 2-οξοαμιδικών αναλόγων του GK241 με αρωματικά συστήματα _____	133
6.2.2	Σύνθεση του (S)-3-μεθυλο-2-(2-(ναφθαλεν-2-υλ)-2-οξοακεταμιδο) βουτανοϊκού οξέος 67 _____	136
7. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7		
ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΤΗΣ ΚΟΥΜΑΡΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΙΝΟΛΙΝΟΝΗΣ ΩΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ		
ΤΗΣ GIIA sPLA₂ _____ 139		
7.1	Σχεδιασμός παραγώγων της κουμαρίνης και της κινολινόνης _____	139
7.2	Πειράματα προσομοίωσης της μοριακής πρόσδεσης ινδολικών παραγώγων με γνωστή ανασταλτική δράση έναντι της GIIA sPLA ₂ _____	140
7.3	Πειράματα προσομοίωσης της μοριακής πρόσδεσης των παραγώγων της κουμαρίνης και της κινολινόνης _____	143
7.4	Πειράματα προσομοίωσης της μοριακής πρόσδεσης 2-οξοαμιδικών παραγώγων της κουμαρίνης και της κινολινόνης _____	149
8. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8		
ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ _____ 151		
8.1	Μοριακή δυναμική _____	151
8.1.1	Μέθοδος _____	151
8.1.2	Αποτελέσματα _____	152
8.1.3	Συμπεράσματα _____	159
9. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9		
ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ PGE₂ ex vivo _____ 161		
10. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10 _____ 165		
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΠΟΡΕΙΕΣ ΚΑΙ ΔΕΔΟΜΕΝΑ _____ 165		
10.1	Μέθοδοι και υλικά _____	165
10.2	Συνθετικές πορείες _____	167
10.2.1	Γενική μέθοδος σύζευξης _____	167

10.2.2	Γενική μέθοδος οξείδωσης υδροξυαμιδίων σε οξοαμίδια _____	180
10.2.3	Γενική μέθοδος αποπροστασίας της καρβοξυλικής ομάδας _____	191
10.2.4	Γενική μέθοδος σαπωνοποίησης μεθυλεστέρων _____	200
10.2.5	Μέθοδος επιμήκυνσης της ανθρακικής αλυσίδας - αντίδραση ολεφίνοποίησης Horner-Wadsworth-Emmons. _____	204
10.2.6	Γενική μέθοδος καταλυτικής υδρογόνωσης _____	205
10.2.7	Γενική μέθοδος αναγωγής εστέρων σε πρωτοταγείς αλκοόλες _____	206
10.2.8	Γενική μέθοδος οξείδωσης πρωτοταγών αλκοολών σε αλδεΐδες και ακολούθως σε κυανυδρίνες _____	208
10.2.9	Μέθοδος υδρόλυσης των υδροξυ-νιτριλίων σε υδροξυ-οξέα _____	211
11.	ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ _____	215
12.	Συντιμήσεις – Αρκτικόλεξα – Ακρωνύμια _____	217
13.	ΑΝΑΦΟΡΕΣ _____	219

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1: Μερικές από τις ενώσεις με ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι των εκκριτικών φωσφολιπασών A ₂	46
Σχήμα 2.1: Η δομή της ποστατίνης.	50
Σχήμα 2.2: Η δομή της ευριστατίνης A και B.	50
Σχήμα 2.3: Δομή των ενώσεων Complestatin (10α) και Chloropectin I (10β).51	
Σχήμα 2.4: Δομή της νεματοφίνης (Nematophin).	52
Σχήμα 2.5: Δομή της Bestatin.	53
Σχήμα 2.6: Ανάλογα των α-κετοαμιδικών ενώσεων.	53
Σχήμα 2.7: α-Κετοαμιδικό παράγωγο που αναστέλλει τη δράση της υδρολάσης των λευκοτριένιων A ₄ με IC ₅₀ = 0,5 μM.	53
Σχήμα 2.8: Η ένωση Scleritodermin A και τα ανάλογα με την καλύτερη βιολογική δράση.....	55
Σχήμα 2.9: Δομή της Indibulin D-24851.	56
Σχήμα 2.10: Προτεινόμενος τρόπος πρόσδεσης διπεπτιδικών α-κετοαμιδικών παραγώγων στο ενεργό κέντρο της καλπαΐνης.....	58
Σχήμα 2.11: Οι δύο βασικές κατηγορίες α-κετοαμιδικών παραγώγων που βελτιστοποιήθηκε η διαλυτότητα τους στο νερό.	61
Σχήμα 2.12: Προτεινόμενος τρόπος πρόσδεσης των ενώσεων που συντέθηκαν από τους Onat <i>et al.</i>	62
Σχήμα 2.13: Παραδείγματα α-κετοαμιδικών ενώσεων που έχουν δοκιμαστεί για την ανασταλτική τους δράση.	63
Σχήμα 2.14: Προτεινόμενος τρόπος πρόσδεσης των α-κετοαμιδικών παραγώγων σε αλλοστερικό κέντρο της p38 MAP κινάσης.	65
Σχήμα 2.15: Δομή της TMC-95 A-D.	66
Σχήμα 2.16: Οι αλληλεπιδράσεις CtA – θρομβίνης όπως περιγράφηκαν στην κρυσταλλογραφική μελέτη.....	67

Σχήμα 2.17: Ομάδες ενώσεων που έχουν δοκιμαστεί για τη δράση τους έναντι της πρωτεάσης της ηπατίτιδας C.....	68
Σχήμα 2.18: Τρόπος πρόσδεσης ενός α-κετοαμιδικού παραγώγου στο ενεργό κέντρο της πρωτεάσης της HCV NS3/4A.....	69
Σχήμα 2.19: Δομή του Telaprevir.....	70
Σχήμα 2.20: Αλληλεπιδράσεις που σχηματίζονται κατά την πρόσδεση του Telaprevir στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.....	70
Σχήμα 2.21: Δομή και χαρακτηριστικά του Victrelis (Bocicprevir).....	71
Σχήμα 2.22: Σχηματική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων που δημιουργούνται μεταξύ του Bocicprevir και του ενεργού κέντρου της NS3 πρωτεάσης κατά την πρόσδεση.....	71
Σχήμα 2.23: Δομή και χαρακτηριστικά του Narlaprevir.....	72
Σχήμα 2.24: Ενώσεις που σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν από τους Hagishita <i>et al.</i>	74
Σχήμα 2.25: Δομή των 2-οξοαμιδικών αναστολέων της GIVA cPLA ₂	75
Σχήμα 3.1: Λειτουργία του γενετικού αλγόριθμου.....	80
Σχήμα 3.2: Πορεία εργασίας στο AMBER.....	93
Σχήμα 3.3: Η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης ενός συστήματος είναι το άθροισμα των πολικών και μη πολικών αλληλεπιδράσεων.....	95
Σχήμα 5.1: Πορεία εργασίας για τον σχεδιασμό νέων υποψήφιων αναστολέων.....	113
Σχήμα 5.2: Τρόπος πρόσδεσης των 2-οξοαμιδικών παραγώγων όπως υπολογίστηκαν με χρήση του λογισμικού GOLD.....	115
Σχήμα 5.3: Τρόπος πρόσδεσης των 2-οξοαμιδικών παραγώγων της (S)-tert-λευκίνης (αριστερά) και του 2-αμινοϊσοβουτυρικού οξέος (δεξιά) όπως υπολογίστηκαν στο GOLD.....	117
Σχήμα 5.4: Τρόπος πρόσδεσης των 2-υδροξυαμιδικών παραγώγων των ενώσεων 39, 33α και 33β στο ενεργό κέντρο της GIIA sPLA ₂	119

Σχήμα 5.5: Υπολογιστικά αποτελέσματα της πρόσδεσης των ενώσεων Α. 61γ, Β. 61α, Γ. 67 και Δ. 61β στο ενεργό κέντρο της GIIA sPLA ₂	122
Σχήμα 6.1: Μηχανισμός της αντίδρασης σύζευξης με το αντιδραστήριο WSCI·HCl παρουσία HOBt.....	125
Σχήμα 6.2: Πορεία για τη σύνθεση των 2-οξοαμιδικών παραγώγων με πρώτη ύλη μεθυλεστέρες αμινοξέων.	126
Σχήμα 6.3: Οξειδωση δευτεροταγούς αλκοόλης από το αντιδραστήριο Dess-Martin.....	126
Σχήμα 6.4: Πορεία για τη σύνθεση των 2-οξοαμιδικών παραγώγων με πρώτη ύλη <i>tert</i> -βουτυλεστέρες αμινοξέων.	127
Σχήμα 6.5: Πορεία για τη σύνθεση της ένωσης 43.....	127
Σχήμα 6.6: Πορεία για τη σύνθεση των 2-οξοαμιδικών παραγώγων των διπεπτιδίων.	129
Σχήμα 6.7: Φάσμα ¹ H-NMR της ένωσης GK241 σε CDCl ₃	130
Σχήμα 6.8: Φάσμα ¹³ C-NMR της ένωσης GK241 σε CDCl ₃	131
Σχήμα 6.9: Φάσμα ¹ H-NMR της ένωσης 39 σε CDCl ₃	132
Σχήμα 6.10: Φάσμα ¹³ C-NMR της ένωσης 39 σε CDCl ₃	133
Σχήμα 6.11: Πορεία για τη σύνθεση των ενώσεων 61α-γ.	134
Σχήμα 6.12: Μηχανισμός ολεφινοποίησης Wadsworth-Emmons.....	135
Σχήμα 6.13: Πορεία για την σύνθεση της ένωσης 67.....	136
Σχήμα 6.14: Φάσμα ¹ H-NMR της ένωσης 61γ σε CDCl ₃	137
Σχήμα 6.15: Φάσμα ¹³ C-NMR της ένωσης 61γ σε CDCl ₃	138
Σχήμα 7.1: Ο τρόπος πρόσδεσης της ένωσης 81 όπως προέκυψε από τη χρήση του προγράμματος GOLD.....	150
Σχήμα 8.1: Τιμή RMSD για τα άτομα Ca, C και N των δύο συμπλόκων κατά τη διάρκεια της δυναμικής.	153

Σχήμα 8.2: Διακύμανση της τιμής RMSD για τα άτομα της ομάδας της βαλίνης και της 2-οξοαμιδική ομάδας των ενώσεων GK241 και 61γ κατά τη διάρκεια της δυναμικής.	154
Σχήμα 9.1: Επίδραση των ενώσεων GK241 και GK286, σε διάφορες συγκεντρώσεις (μM), στην παραγωγή PGE ₂ από τα κύτταρα.....	163

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1: Πορεία της δημιουργίας και συσσώρευσης αφρωδών κυττάρων εξαιτίας της δράσης των sPLA ₂	38
Εικόνα 1.2: Η δομή της εκκριτικής φωσφολιπάσης II A.....	45
Εικόνα 2.1: Πόζα όπου φαίνεται ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου μεταξύ της καλπαΐνης I και ενός αναστολέα, όπως παράχθηκε με χρήση του λογισμικού GOLD 2.1.....	61
Εικόνα 2.2: Πόζα στην οποία εμφανίζεται η πρόσδεση ενός α-κετοαμιδικού παραγώγου στο ενεργό κέντρο της μ-καλπαΐνης (Y. J. Yoo <i>et al.</i>).	63
Εικόνα 2.3: Κρυσταλλογραφική μελέτη του α-κετοαμιδικού αναστολέα στο ενεργό κέντρο της καθεψίνης K με ανάλυση 2,2 Å.....	64
Εικόνα 2.4: Κρυσταλλογραφική μελέτη της καθεψίνης K με ένα α-κετοαμιδικό αναστολέα στο ενεργό κέντρο (PDB: 2BDL).	64
Εικόνα 2.5: Πιθανός τρόπος πρόσδεσης 2-οξοαμιδικών αναστολέων στο ενεργό κέντρο του πεπτιδικού πρωτεασώματος.	66
Εικόνα 2.6: Μοριακή μοντελοποίηση μιας α-κετοαμιδικής ένωσης (ροζ) στο ενεργό κέντρο του fXa (πράσινο).	68
Εικόνα 2.7: Αποτελέσματα της κρυσταλλογραφικής μελέτης του συμπλέγματος Bocserpinir - NS3 πρωτεάσης.	72
Εικόνα 2.8: Κρυσταλλογραφική μελέτη του συμπλέγματος Nalraprevir - NS3/4A πρωτεάσης.	73
Εικόνα 3.1: Peter Kollman και Thomas Cheatham.....	90
Εικόνα 5.1: Υπέρθωση των αναστολέων με τους οποίους έχει συγκρυσταλλωθεί η GIIA sPLA ₂	100
Εικόνα 5.2: Υπέρθωση των αναστολέων από τις κρυσταλλογραφικές μελέτες 1KQU (μωβ) και 1AYP (κίτρινο) στο ενεργό κέντρο.	101
Εικόνα 5.3: Υπέρθωση 1AYP, 1KQU, 3U8B (χωρίς αναστολέα) όπου απεικονίζονται μόνο τα κρίσιμα αμινοξέα του ενεργού κέντρου. Η 3U8B δεν	

έχει αναστολέα στο ενεργό της κέντρο με αποτέλεσμα κατά την υπέρθεση η HIS6 να εφάπτεται στον αναστολέα της 1AYP.....	102
Εικόνα 5.4: Υπέρθεση 1POD (χωρίς αναστολέα), 1J1A, 1KQU. Η HIS6 προσανατολίζεται προς το εσωτερικό του ενεργού κέντρου όταν δεν υπάρχει αναστολέας και προς τα έξω παρουσία αναστολέα.	102
Εικόνα 5.5: Υπέρθεση των αναστολέων 3U8D (κόκκινο) και 1DCY (πράσινο). Φαίνεται μόνο το ενεργό κέντρο με τους δύο αναστολείς. Οι κουκίδες είναι μόρια νερού.	103
Εικόνα 5.6: Μερικοί από τους αναστολείς που έχουν συγκρυσταλλωθεί με το ένζυμο GIIA sPLA ₂	104
Εικόνα 8.1: Η διαμόρφωση της GK241 στο ενεργό κέντρο της GIIA sPLA ₂ στην αρχή της προσομοίωσης.	154
Εικόνα 8.2: Η διαμόρφωση της GK241 στο ενεργό κέντρο της GIIA sPLA ₂ στο τέλος της προσομοίωσης.	155
Εικόνα 8.3: Η διαμόρφωση της 61γ στο ενεργό κέντρο της GIIA sPLA ₂ στην αρχή της προσομοίωσης.	155
Εικόνα 8.4: Η διαμόρφωση της 61γ στο ενεργό κέντρο της GIIA sPLA ₂ στο τέλος της προσομοίωσης.	156

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1: Τα μέλη της υπερ-οικογένειας των φωσφολιπασών.....	32
Πίνακας 2.2.1: Παραλλαγές της τελικής σουλφοναμιδικής ομάδας α-κετοαμιδικών παραγώγων ως αναστολείς της καλπαΐνης.....	59
Πίνακας 2.2.2: Ανασταλτική δράση ενώσεων α-κετοαμιδικών παραγώγων έναντι της καλπαΐνης I.....	60
Πίνακας 3.1: Η εξέλιξη του προγράμματος AMBER.....	91
Πίνακας 3.2: Βελτίωση της επίδοσης του AMBER στην ταχύτητα παραγωγής χρόνου προσομοίωσης της μοριακής δυναμικής. ²⁸³	95
Πίνακας 5.1: Κρυσταλλογραφικές μελέτες της ανθρώπινης εκκριτικής φωσφολιπάσης IIΑ.....	99
Πίνακας 5.2: Δεσμοί υδρογόνου που παρατηρούνται στις κρυσταλλογραφικές μελέτες της GIIA sPLA ₂	105
Πίνακας 5.3: Αποτελέσματα από τη μοριακή πρόσδεση δύο γνωστών αναστολέων με τη βοήθεια τριών διαφορετικών προγραμμάτων προσομοίωσης.....	110
Πίνακας 5.4: Πειράματα προσομοίωσης για την επιλογή της καταλληλότερης εξίσωσης βαθμονόμησης.....	112
Πίνακας 5.5: Οι κύριες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των 2-οξοαμιδικών παραγώγων και του ενεργού κέντρου της GIIA sPLA ₂ όπως υπολογίστηκαν με χρήση του λογισμικού GOLD.	115
Πίνακας 5.6: Ενεργειακοί υπολογισμοί για τις διαμορφώσεις των 2-οξοαμιδικών παραγώγων κατά την πρόσδεση, όπως υπολογίστηκαν από το GOLD.....	116
Πίνακας 5.7: Ενεργειακοί υπολογισμοί για τις διαμορφώσεις των ενώσεων 34γ και 34δ κατά την πρόσδεση, όπως υπολογίστηκαν στο GOLD.....	118
Πίνακας 5.8: IC ₅₀ τιμές των ενώσεων GK241 και GK126 έναντι των εκκριτικών hGIIA, hGV και mGIIA.....	120

Πίνακας 5.9: Η δράση της ένωσης GK241 σε άλλες sPLA ₂	120
Πίνακας 5.10: Αποτελέσματα από τα πειράματα προσομοίωσης παραγώγων της ένωσης GK241.	121
Πίνακας 5.11: Δράση των ενώσεων 61α, 61β, 61γ και 67 έναντι της εκκριτικής φωσφολιπάσης A ₂	123
Πίνακας 7.1: Αποτελέσματα της προσομοίωσης της μοριακής πρόσδεσης των γνωστών αναστολέων της GIIA sPLA ₂ με τη χρήση του προγράμματος GOLD.....	140
Πίνακας 7.2: Οι αλληλεπιδράσεις γνωστών ινδολικών αναστολέων με το ενεργό κέντρο της GIIA sPLA ₂ , όπως υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα GOLD.....	141
Πίνακας 7.3: Υπολογιστικά αποτελέσματα για τα παράγωγα της κουμαρίνης, όπως αυτά υπολογίστηκαν με τη βοήθεια των προγραμμάτων GOLD και QikProp.....	143
Πίνακας 7.4: Τρόπος πρόσδεσης των κουμαρινικών παραγώγων στο ενεργό κέντρο της GIIA sPLA ₂ όπως προέκυψε από τα πειράματα προσομοίωσης με το πρόγραμμα GOLD.....	144
Πίνακας 7.5: Υπολογιστικά αποτελέσματα για τα παράγωγα της κινολιμόνης, όπως αυτά υπολογίστηκαν με τη βοήθεια των προγραμμάτων GOLD και QikProp.....	146
Πίνακας 7.6: Τρόπος πρόσδεσης των παραγώγων της κινολιμόνης στο ενεργό κέντρο της GIIA sPLA ₂ όπως προέκυψε από τα πειράματα προσομοίωσης με το πρόγραμμα GOLD.....	147
Πίνακας 7.7: Υπολογιστικά αποτελέσματα 2-οξοαμιδικών παραγώγων της κουμαρίνης.....	149
Πίνακας 7.8: Υπολογιστικά αποτελέσματα 2-οξοαμιδικών παραγώγων της κινολιμόνης.....	150
Πίνακας 8.1: Μέση απόσταση των αναστολέων από το μέταλλο.....	156

Πίνακας 8.2: Δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των αμινοξέων του ενεργού κέντρου και των ενώσεων GK241 και 61γ. Τα μήκη των δεσμών εκφράζονται σε Å και η διάρκειά τους εκφράζεται ως το ποσοστό επί του συνόλου του χρόνου προσομοίωσης.	157
Πίνακας 8.3: Συνεισφορές στην ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης (ΔGπρόσδεσης) για τα σύμπλοκα της GIIA sPLA ₂ με τις ενώσεις GK241 και 61γ, όπως υπολογίστηκαν με τη μέθοδο MM-PBSA.....	158
Πίνακας 11.1: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων.	215

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τα πειράματα προσομοίωσης της μοριακής πρόσδεσης έλαβαν χώρα στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Τα πειράματα προσομοίωσης της μοριακής δυναμικής πραγματοποιήθηκαν: i) στα υπερ-υπολογιστικά συστήματα της αρχής HellasGrid (CPU) ii) στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών.

Η σύνθεση των ενώσεων έλαβε χώρα στο εργαστήριο του καθηγητή Γ. Κόκοτου, Εργαστήριο Οργανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Οι *in vitro* μελέτες των ενώσεων έλαβαν χώρα στο εργαστήριο του καθηγητή Michael H. Gelb, Department of Chemistry and Biochemistry, University of Washington, Seattle, USA.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ A₂

1.1 Γενικά για τις φωσφολιπάσες A₂

Οι πρωτεΐνες που ανήκουν στην υπεροικογένεια των φωσφολιπασών A₂ είναι εστεράσες με κοινό χαρακτηριστικό ρόλο τη δυνατότητα υδρόλυσης του εστερικού δεσμού των γλυκεροφωσφολιπιδίων στη θέση *sn*-2.^{1,2} Χωρίζονται σε έξι μεγάλες ομάδες (Πίνακας 1.1) ανάλογα με: τη δομή τους, την απαίτηση σε ασβέστιο για τη δράση τους, τον καταλυτικό μηχανισμό και την εξελικτική τους πορεία. Οι ομάδες αυτές είναι: οι κυτοσολικές φωσφολιπάσες (cPLA₂), οι ανεξάρτητες ασβεστίου φωσφολιπάσες (iPLA₂), οι εκκριτικές φωσφολιπάσες (sPLA₂), οι λυσοσωμικές φωσφολιπάσες (LyPLA₂), οι υδρολάσες του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF-AH) και πρωτεΐνες που έχουν παρόμοια λειτουργία με τις φωσφολιπάσες και βρίσκονται στο λιπώδη ιστό PLA₂ (AdPLA₂).¹

Η κυτοσολικές φωσφολιπάσες (cPLA₂) αποτελούνται από έξι μέλη (IVA-F), βάρους 60 - 85 kDa και συνήθως βρίσκονται στο κυτοσόλιο. Η ενεργοποίηση αυτών των πρωτεϊνών γίνεται παρουσία ιόντων ασβεστίου, συγκέντρωσης της τάξεως των μΜ. Δύο ιόντα ασβεστίου προσδένονται στο *N*-τερματικό άκρο της πρωτεΐνης με δομή C₂, ενώ αυτό δεν παρατηρείται για την περίπτωση της cPLA_{2γ} από την οποία αυτή η δομή λείπει. Η καταλυτική δυάδα στο ενεργό κέντρο των ενζύμων αυτών αποτελείται από τα αμινοξέα σερίνη και ασπαρτικό οξύ.¹

Οι iPLA₂ περιέχουν έξι μέλη (VIA-F) και το βάρος τους κυμαίνεται από 55 μέχρι 146 kDa. Η λειτουργικότητά τους είναι ανεξάρτητη της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου. Το καταλυτικό τους κέντρο είναι παρόμοιο με των κυτοσολικών φωσφολιπασών και βρίσκονται στο κυτοσόλιο, στην εσωτερική πλευρά του κυτταρικού τοιχώματος και στο ενδοπλασματικό δίκτυο.³ Επίσης, συμμετέχουν στην αναδιαμόρφωση των λιπιδίων και στον κύκλο του Land.¹

Πίνακας 1.1: Τα μέλη της υπερ-οικογένειας των φωσφολιπασών.

Όνομα	Αριθμός Μελών	Χαρακτηριστικά/Λειτουργία
cPLA₂ Κυτοσολικές PLA ₂	6	συνήθως μια C2 δομή κοντά στο N-τελικό άκρο όπου προσδένονται δύο ιόντα Ca ²⁺
iPLA₂ Ca ²⁺ -ανεξάρτητες PLA ₂	9	ανεξάρτητες από τη συγκέντρωση Ca ²⁺
PAF-AH Υδρολύουν τον παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων	4	εξειδίκευση για το υπόστρωμα PAF και τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια
sPLA₂ Εκκριτικές PLA ₂	11	καταλυτική δυάδα His/Asp εξάρτηση της δράσης τους από τη συγκέντρωση Ca ²⁺ (mM) 6-8 δισουλφιδικοί δεσμοί βρίσκονται στο εξωκυττάριο μέρος της κυτταρικής μεμβράνης.
LyPLA₂ Λυσοσωμικές PLA ₂	2	βρίσκονται στο λυσόσωμα, προτιμούν όξινο pH για τον καταλυτικό τους ρόλο
AdPLA₂ PLA ₂ του λιπώδους ιστού	1	προτίμηση σε PC και PE υποστρώματα ανεξάρτητη της συγκέντρωσης Ca ²⁺

Η ομάδα των υδρολασών (PAF-AH) που υδρολύουν τον παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF) είναι πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους με τέσσερις ισομορφές (VIIA, VIIB, VIIB, VIIB). Όλα τα μέλη της

οικογένειας αυτής των υδρολασών έχουν μια σερίνη στο καταλυτικό τους κέντρο και αποτέλεσμα της καταλυτικής τους δράσης είναι είτε η απελευθέρωση ιόντων οξικού οξέος από την *sn*-2 θέση της PAF είτε η απελευθέρωση οξειδωμένων ακυλο-ομάδων από την *sn*-2 θέση της φωσφατιδυλοχολίνης (PC) ή της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης (PE).^{1,8} Ένα από τα μέλη της οικογένειας, η PAF-AH ή ομάδα VIIA PLA₂, είναι εκκριτική και γι' αυτό έχει αποτελέσει θεραπευτικό στόχο για τη αθηροσκλήρωση.^{4,5}

Η ομάδα των λυσοσωμικών φωσφολιπασών (LyPLA₂) απαριθμεί ένα μόνο μέλος, μια γλυκοπρωτεΐνη, η οποία υπάρχει στο λυσόσωμα και καταλύει αντιδράσεις σε ελαφρώς όξινο περιβάλλον, με υποστρώματα κυρίως PC και PE. Αυτή η πρωτεΐνη εκφράζεται σε υψηλό βαθμό στα κυψελιδικά μακροφάγα και παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό του επιφανειοδραστικού παράγοντα και κυρίως στην καταβολική ομοιόσταση του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων.⁶

Η AdPLA₂ (XVI), βρίσκεται σε μεγάλη συγκέντρωση στο λευκό λιπώδη ιστό και είναι υπεύθυνη για την παροχή αραχιδονικού οξέος προκειμένου να χρησιμοποιηθεί στη σύνθεση της προσταγλανδίνης (PGE₂) μέσα στον ιστό.⁷ Επίσης, η πρωτεΐνη αυτή συμμετέχει στην κατάλυση των αποθηκευμένων τριγλυκεριδίων για την παραγωγή λιπαρών οξέων καθώς και στην υδρόλυση των γλυκεροφωσφολιπιδίων στη θέση *sn*-1.¹

Η εκκριτική φωσφολιπάση sPLA₂ αποτελείται από 11 ισομορφές (ομάδες I-III, V και IX-XIV) με μικρό μοριακό βάρος σε σχέση με τις υπόλοιπες φωσφολιπάσες (κυμαίνεται μεταξύ 14-19 kDa με εξαίρεση την GIII sPLA₂ η οποία έχει μοριακό βάρος 55 kDa). Η λειτουργία τους εξαρτάται από τη συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου (mM) και δρουν στην εξωκυττάρια πλευρά του κυττάρου.⁸ Έντεκα από τις ισομορφές της ομάδας αυτής (IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X, XIIA και XIIB) εκφράζονται στα κύτταρα των θηλαστικών και έχει παρατηρηθεί ότι εκτός από την ενζυμική τους δράση, έχουν την ικανότητα να προσδένονται σε ειδικούς υποδοχείς επιφέροντας έτσι αλλαγές στη λειτουργία του κυττάρου.⁹ Η διατήρηση της ομοιόστασης αυτών των ενζύμων είναι σημαντική γιατί η υπερέκφρασή τους συνδέεται με παθολογικές καταστάσεις όπως η αθηροσκλήρωση, η κακή λειτουργία του ανοσοποιητικού

συστήματος και η εμφάνιση του καρκίνου. Η θέση τους στην εξωτερική πλευρά του κυττάρου τις κάνει προσιτές ως στόχο για θεραπευτικούς σκοπούς.¹⁰

1.2 Εκκρινόμενες φωσφολιπιδάσες A₂ (sPLA₂)

Οι 11 ισομορφές sPLA₂ χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες. Η πρώτη (I/II/V/X) περιλαμβάνει τις ομάδες με κοινά χαρακτηριστικά το βάρος τους (14 -19 kDa), το ενεργό κέντρο γύρω από το ιόν ασβεστίου και την καταλυτική δυάδα HIS-ASP. Επιπρόσθετα, έχουν όλες έξι δισουλφιδικούς δεσμούς και επιπλέον έναν ή δύο που είναι χαρακτηριστικοί και συμβάλλουν στον υψηλό βαθμό της δομικής σταθερότητας αυτών των ενζύμων. Οι άλλες δύο ομάδες III και XIIA/XIIB αποτελούνται από ένζυμα τα οποία χαρακτηρίζονται από χαμηλή ομολογία σε σχέση με την πρώτη ομάδα, ενώ διατηρούν την καταλυτική δυάδα στο ενεργό κέντρο τους και το ιόν του ασβεστίου μέσα σε αυτό.¹¹

Η δράση των sPLA₂ στην κυτταρική μεμβράνη μπορεί να είναι είτε αυτοκρινής είτε παρακρινής και ο πρωταρχικός στόχος τους είναι τα φωσφολιπίδια με αρνητικά φορτισμένες κεφαλές, τα οποία θα πρέπει να βρίσκονται στην εξωκυττάρια περιοχή, εκεί όπου βρίσκονται οι sPLA₂. Τα υποστρώματα που υδρολύουν είναι κυρίως η φωσφατιδυλοσερίνη (PS), η φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG) και η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (PE).¹² Αποτέλεσμα αυτής της καταλυτικής τους δράσης είναι η απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος καθώς επίσης και διαφόρων μονοακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, όπως τα ω-3 εικοσαπενταενοϊκό οξύ (EPA) και δοκοσαεξαενοϊκό οξύ (DHA). Μερικά από τα λιπαρά οξέα που παράγονται είναι πρόδρομοι αντιφλεγμονωδών λιπιδικών ενδιάμεσων. Επίσης, μια ακόμα κατηγορία προϊόντων που παράγονται είναι τα λυσοφωσφολιπίδια, όπως η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (LPC) και λυσοφωσφατιδικό οξύ (LPA), όπου και αυτά έχουν ποικίλες βιολογικές δράσεις. Τα ένζυμα V και X καταλύουν την υδρόλυση των φωσφολιπιδίων πιο συστηματικά από τα υπόλοιπα, ενώ τα ένζυμα IB, III και X δρουν ως προ-ένζυμα και χρειάζεται η υδρόλυση του N-τελικού άκρου για την πλήρη ενεργοποίησή τους.^{10,13}

1.2.1 Βιολογικός ρόλος των sPLA₂

1.2.1.1 Παραγωγή λιπαρών οξέων

Η οικογένεια των εκκριτικών φωσφολιπασών συνδέεται με τον έλεγχο της παραγωγής λιπιδίων τα οποία είναι ενδιάμεσα διαφόρων διεργασιών, όπως αναφέρουν τα *in vivo* και *in vitro* πειραματικά δεδομένα.⁹ Οι sPLA₂ έχουν την ικανότητα να απελευθερώνουν AA από την κυτταρική μεμβράνη, με σειρά ικανότητας Χ>V>III>IIF>IIA>IB>IID>IIE>XIIA.^{14,15,16,17,18} Ως εκ τούτου, η διατάραξη της ομαλής λειτουργίας αυτών των ενζύμων επηρεάζει άλλες βιολογικές οδούς. Για παράδειγμα, η υπερέκφραση των πρωτεϊνών III και Χ συνδέεται με την αύξηση της προσταγλανδίνης E₂ (PGE₂) στο δέρμα,^{19,20} ενώ η απουσία της V προκαλεί μερική μείωση σε διεργασίες όπως η παραγωγή μακροφάγων των κυστεϊνυλικών λευκοτριενίων (cysLTs) και της PGE₂.²¹

Σε ορισμένες περιπτώσεις η αυξανόμενη δράση των sPLA₂ στις διεργασίες παραγωγής λιπιδικών ενδιάμεσων φαίνεται να εξαρτάται/συσχετίζεται με την ενεργοποίηση και άλλων PLA₂, όπως με την πρωτεΐνη cPLA₂α. Ενδεχομένως, κάποια από τα λιπίδια που συνθέτουν οι sPLA₂ να ενεργοποιούν τη cPLA₂α με αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη παραγωγή τέτοιων ενδιάμεσων.^{22,23} Συνεπώς οι sPLA₂ είναι επιφορτισμένες με έναν σύνθετο ρόλο τόσο στην ενδοκυττάρια περιοχή όσο και στην εξωκυττάρια.

Τα παραγόμενα από τη δράση των sPLA₂ βιοενεργά λιπίδια, τα οποία αποτελούν πιθανούς δείκτες φλεγμονής, μαζί με τα παράγωγα του αραχιδονικού οξέος - όπως οι προσταγλανδίνες, οι θρομβοξάνες και τα λευκοτριένια - ενεργούν σε συνεργασία με την οξειδωμένη μορφή των LDL. Το αποτέλεσμα αυτής της κοινής δράσης είναι η ενεργοποίηση των μηχανισμών που καταλήγουν στη δημιουργία της φλεγμονής στο κυτταρικό τοίχωμα πολλαπλών κυττάρων.²⁴

1.2.1.2 Κυτταρική επικοινωνία

Τα λιπαρά οξέα τα οποία παράγονται από την καταλυτική δράση των sPLA₂, όπως είναι το AA ή λυσοφωσφολιπίδια (LP), συμμετέχουν σε μια διαδικασία επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων. Ένα από τα αποτελέσματα της κυτταρικής επικοινωνίας είναι η σύνθεση εικοσανοειδών.²⁵ Πιο συγκεκριμένα, το AA μέσω

δύο οδών (COX και LOX) μπορεί να μεταβολιστεί και να παραχθούν προσταγλαδίνες (PG) και λευκοτριένια (LTs) που είναι παράγοντες ενεργοποίησης της σύνθεσης φλεγμονωδών κυτοκινών.^{26,27} Οι κυτοκίνες μπορούν να αυξήσουν την έκφραση των sPLA₂²⁸ οδηγώντας στον πολλαπλασιασμό της επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων και στην επιδείνωση της φλεγμονής. Ταυτόχρονα, τα λυσοφωσφιλιπίδια μπορούν να μεταβολιστούν (από τη λυσοφωσφολιπάση D, LysoPLD) και να παραχθεί λυσοφωσφατιδικό οξύ (LPA) το οποίο ενεργοποιεί τους υποδοχείς της γ-πρωτεΐνης και στη συνέχεια τον πυρηνικό παράγοντα NF-κB που αποτελεί παράγοντα μεταγραφής της IIA.²⁷ Αυτό σε συνδυασμό με το γεγονός ότι οι υποδοχείς LPA συμβάλλουν στη μετανάστευση και διαφοροποίηση των φλεγμονωδών κυττάρων, συμβάλει στη διατήρηση και επιδείνωση της φλεγμονής.

Δυστυχώς, οι προσπάθειες που έγιναν για την αναστολή των ενζυμικών διεργασιών που ακολουθούν τη δράση των sPLA₂ προκάλεσαν παρενέργειες. Συνεπώς η αναστολή της sPLA₂ θεωρείται πλέον η ασφαλέστερη οδός για την αντιμετώπιση της φλεγμονής.¹⁰

Πέρα από την καταλυτική τους δράση, οι sPLA₂ συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις με μεμβρανικούς υποδοχείς²⁹ και ανιοντικές γλυκοζαμινογλυκάνες.³⁰ Για παράδειγμα, οι IIA και V παρουσιάζουν μεγάλη συγγένεια πρόσδεσης με συγκεκριμένες γλυκοζαμινογλυκάνες, όπως η ηπαρίνη, λόγω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων.

Στη δημιουργία αυτών των αλληλεπιδράσεων, ρόλο παίζει η σειρά των φορτισμένων αμινοξέων στις ισομορφές των εκκριτικών φωσφολιπασών. Αυτή μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργία τους, την πρόσδεση των αρνητικά φορτισμένων λιπιδίων στο ενεργό κέντρο τους και την αλληλεπίδρασή τους με άλλες πρωτεΐνες. Για παράδειγμα, οι δομές των IIA και X παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία και διατηρούν την καταλυτική δυάδα HIS/ASP καθώς και τις περιοχές δέσμευσης των ιόντων ασβεστίου. Ωστόσο, στην ομάδα IIA υπάρχουν περισσότερα θετικά φορτισμένα αμινοξέα (λυσίνη και αργινίνη) στην επιφάνεια του ενζύμου από ότι στην ομάδα X η οποία φέρει περισσότερα αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα (γλουταμινικό οξύ και ασπαρτικό

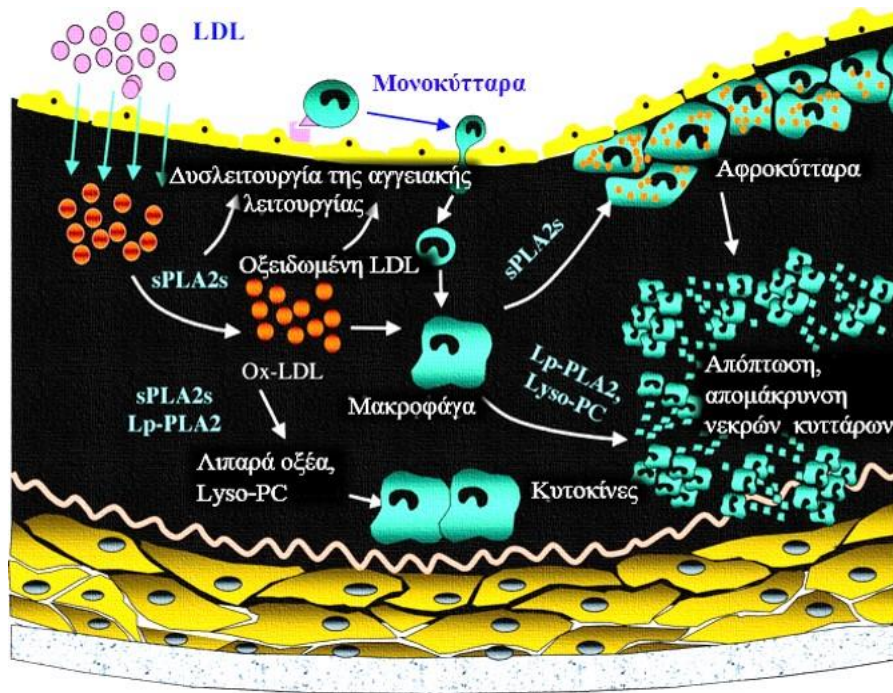
οξύ). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η επιφάνεια της ΙΙΑ να εμφανίζει συνολικά θετικό φορτίο και σύμφωνα με τους Murakami *et al.*³¹ είναι ο λόγος που έχει μεγαλύτερη συγγένεια με τις θειωμένες γλυκοζαμινογλυκάνες. Εξαιτίας αυτής της συγγένειας, ενώ έχει επιτευχθεί ο έλεγχος/αναστολή της δράσης της ΙΙΑ παρουσία κάποιας θειωμένης γλυκοζαμινογλυκάνης (π.χ. ηπαρίνη), η παρουσία γλυκοζαμινογλυκανών δεν είχε το ίδιο αποτέλεσμα και για τη δράση της Χ.³² Σε αντίθεση με τη Χ, η ομάδα V που παρουσιάζει παρόμοιο συνολικό φορτίο επιφάνειας με τη ΙΙΑ, φαίνεται να έχει όμοια λειτουργία και όμοιους καταλυτικούς στόχους με τη ΙΙΑ.

Η πρόσδεση των εκκριτικών φωσφολιπασών σε αυτές τις πρωτεΐνες-υποδοχείς, είναι ανεξάρτητη της συγκέντρωσης ασβεστίου.³³ Είναι πιθανό, η παρουσία των sPLA₂ να προκαλεί εναλλαγές στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υποδοχέων και των υποστρωμάτων τους αλλά και των υποδοχέων μεταξύ τους.

1.2.2 Ασθένειες και sPLA₂

1.2.2.1 Αθηροσκλήρωση, φλεγμονή και sPLA₂

Η επιφάνεια των λιποπρωτεϊνών περιβάλλεται από λιπαρά οξέα – κυρίως φωσφατιδυλοχολίνη - τα οποία αποτελούν εξωκυτταρικούς στόχους για την ομάδα των εκκριτικών φωσφολιπασών. Έχει παρατηρηθεί ότι η υδρόλυση των λιποπρωτεϊνών από τις sPLA αυξάνει την παραγωγή ενός τύπου μικρής πυκνότητας LDL με αυξημένο αρνητικό φορτίο, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την κινητοποίηση των μακροφάγων με συνέπεια τη συσσώρευση αφροδών κυττάρων^{34,35} και τη δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας (Εικόνα 1.1).^{36,37} Η αθηροσκλήρωση τείνει να ορίζεται ως μια κατάσταση τοπικής φλεγμονής η οποία συμβαίνει μέσα στο κυτταρικό τοίχωμα.^{38,39}



Εικόνα 1.1: Πορεία της δημιουργίας και συσσώρευσης αφρωδών κυττάρων εξαιτίας της δράσης των sPLA₂.⁴⁰

Αρκετές ομάδες της εκκριτικής φωσφολιπάσης υπερεκφράζονται κατά το σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας, τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ποντίκια.^{41,42} Για το λόγο αυτό, η αναστολή της δράσης των εκκριτικών φωσφολιπασών έχει αποτελέσει αντικείμενο έρευνας με στόχο την καταστολή της φλεγμονής.^{43,44}

Από τα *in vivo* πειράματα έχει αποδειχθεί ότι τα μέλη IIA και V συμμετέχουν στην ανάπτυξη της ασθένειας.^{45,46}

Το μέλος IIA έχει συσχετιστεί με τη φλεγμονή από τότε που ταυτοποιήθηκε (1989) κυρίως για τον ρόλο της στην παραγωγή εικοσανοειδών. Εκφράζεται σε ενεργοποιημένα φλεγμονώδη κύτταρα, όπως τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και σε ορισμένα καρκινικά και γι' αυτό η εξακρίβωση του ρόλου της έχει αποτελέσει ερευνητικό στόχο.

Πρόσφατα εξακριβώθηκε *in vivo* ο ρόλος της ως δείκτη της φλεγμονής στην αρθρίτιδα.⁴⁷ Ωστόσο, ακόμα δεν είναι γνωστός ο μηχανισμός με τον οποίο συμμετέχει σε αυτήν (μέσω της σύνθεσης των εικοσανοειδών ή κάποιου άλλο μηχανισμό που λαμβάνει χώρα στα φλεγμονώδη κύτταρα και εμπλέκει και τη

cPLA₂α). Επίσης, έχει ταυτοποιηθεί και στα χονδροκύτταρα στην επιφάνεια επαφής μεταξύ των οστών σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα.⁴⁸

Σύμφωνα με πειράματα σε ποντίκια, στα οποία εκφράσθηκε η ανθρώπινη IIA στα μακροφάγα, βρέθηκε ότι η δράση του ενζύμου υποβοηθά το σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας χωρίς να μεταβάλλεται η συγκέντρωση των λιποπρωτεϊνών στο πλάσμα.⁴⁵ Ωστόσο, η συμμετοχή του ενζύμου στην πρόοδο της ασθένειας φαίνεται να έχει σχέση με την περιοχή στην οποία εμφανίζεται ο σχηματισμός της πλάκας, δηλαδή να δρα τοπικά.

Η αιτία για την έναρξη της έκφρασης της IIA κατά τη διάρκεια της αθηρωγένεσης φαίνεται να είναι η δράση του αμυλοειδούς A του ορού (serum amyloid A, SAA). Τα υψηλά επίπεδα συγκέντρωσης SAA συνδέονται με τον κίνδυνο εμφάνισης της ασθένειας. Το SAA συσσωρεύεται στην αθηρωματική πλάκα ενώ είναι πιθανόν να συντίθεται στα κύτταρα των λείων μυών της αορτής ως απόκριση στις κυτοκίνες που σχετίζονται με τη φλεγμονή των αγγείων.⁴⁹ Αυτό μπορεί να οδηγήσει στην αυξημένη έκφραση της IIA με συνέπεια την αλλαγή της ομοιόστασης των λιπιδίων τοπικά.⁵⁰

Ένας ακόμα παράγοντας που επηρεάζεται από τη δράση των sPLA₂ και έμμεσα συμβάλλει στην εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης είναι η απολιποπρωτεΐνη A-I (apoA-I) στο πλάσμα και η HDL-C. Σύμφωνα με πειράματα σε ζώα, παρατηρήθηκε ότι τα αυξημένα επίπεδα apoA-I στο πλάσμα και HDL-C μειώθηκαν παρουσία των εκκρινικών φωσφολιπασών και ο σχηματισμός της αθηρωματικής πλάκας αυξήθηκε.^{51,52,53,54} Σε πειράματα που εκτελέστηκαν παρουσία φωσφολιπασών - μεταξύ των οποίων και η IIA - για να διευκρινιστεί ο μηχανισμός δράσης τους στη νόσο, βρέθηκε ότι ο αυξανόμενος καταβολισμός της apoA-I και συνεπώς η μείωση των HDL-C στο πλάσμα φαίνεται να προέρχεται από την άμεση αλληλεπίδραση της IIA με το ελεύθερο apo A-I.⁵⁵

Έχει παρατηρηθεί ότι ασθενείς που πάσχουν από χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα, εμφανίζουν υψηλό κίνδυνο εκδήλωσης καρδιακών προβλημάτων, κάτι που επιβεβαιώνει ότι η αθηροσκλήρωση σχετίζεται με τη φλεγμονή.^{56,57}

Λόγω της δράσης της IIA στη φλεγμονή, η συγκέντρωση της μπορεί να αποτελέσει δείκτη για τον κίνδυνο της εμφάνισης τους.⁵⁸

1.2.2.2 Καρδιαγγειακά νοσήματα

Αρκετά μέλη της οικογένειας των εκκρινικών φωσφολιπασών είδαμε ότι συνδέονται με την έναρξη της αθηρωγένεσης, ωστόσο οι μετρήσεις που υπάρχουν είναι κυρίως για την IIA. Έχει βρεθεί ότι η συγκέντρωση της IIA αυξάνεται μερικές ώρες μετά την εκδήλωση του καρδιαγγειακού προβλήματος²⁴ ενώ υψηλά επίπεδα του ενζύμου σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο, μπορεί να αποτελέσει τρόπο πρόβλεψης για την επικείμενη εκδήλωση του προβλήματος.⁵⁹

Επιπρόσθετα, έρευνα που διεξήχθη σε υγιή άτομα έδειξε ότι αυξημένη συγκέντρωση του ενζύμου IIA καθώς και αυξημένη λειτουργικότητα των υπόλοιπων εκκρινικών φωσφολιπασών μπορεί να αποτελέσει μέθοδο πρόβλεψης για την εκδήλωση καρδιαγγειακών προβλημάτων γενικότερα.^{60,61}

Ωστόσο, μέχρι τώρα η αναστολή της εκκρινικής αλλά και της λιποπρωτεϊνικής φωσφολιπάσης A₂ δεν φαίνεται να μειώνει τον κίνδυνο της εμφάνισης καρδιαγγειακού προβλήματος^{62,63} και γι' αυτό ερευνούνται εναλλακτικοί τρόποι αντιμετώπισης τέτοιων ασθενειών.⁶⁴

1.2.2.3 Αντιμικροβιακή δράση

Στην επιφάνεια των βακτηρίων υπάρχουν φωσφολιπίδια και φωσφατιδυλογλυκερόλη που αποτελούν υποστρώματα για τη IIA.¹² Πιθανόν το θετικό φορτίο που υπάρχει στην επιφάνεια του ενζύμου να βοηθάει στην αντιβακτηριακή του δράση ενώ σύμφωνα με πειράματα η IIA εξοντώνει τα gram-θετικά βακτήρια *in vitro*.⁶⁵ Επίσης, υπάρχουν πειράματα σύμφωνα με τα οποία και η V φαίνεται να δρα ενάντια στους επιτιθέμενους μύκητες μέσω της διαδικασίας της φαγοκύτωσης από τα μακροφάγα.⁶⁶

1.2.2.4 Αντικαρκινική δράση

Η εμφάνιση της IIA στο γαστρικό αδενοκαρκίνωμα σχετίζεται με τη μείωση της μετάστασης του καρκίνου και της θνησιμότητας των ασθενών.⁶⁷ Ωστόσο, σύμφωνα με πειράματα σε ποντίκια, η ύπαρξη του ενζύμου στα κύτταρα του

δέρματος σχετίζεται με την αύξηση της καρκινογένεσης που οφείλεται σε χημικούς παράγοντες.⁶⁸ Επιπρόσθετα, οι *in vivo* και *in vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι η IIA υποβοηθεί τον καρκίνο του πνεύμονα, του προστάτη και του παγκρέατος.^{69,70} Ως εκ τούτου, η εκδήλωση της αντικαρκινικής δράσης της IIA φαίνεται να εξαρτάται από το είδος των κυττάρων στα οποία εκδηλώνεται η καρκινογένεση.

1.2.2.5 Αναπαραγωγή

Έχει παρατηρηθεί υψηλή συγκέντρωση της IIA στο ανθρώπινο σπερματικό πλάσμα,⁷¹ όπου το ένζυμο παράγεται από τα επιθήλια του προστάτη, και πιθανώς να συμμετέχει στην αντιμικροβιακή προστασία τόσο του οργάνου όσο και των σπερματοζωαρίων. Επίσης, έχει μελετηθεί η δράση των X και III στη διαδικασία της παραγωγής ώριμων σπερματοζωαρίων. Η X βρίσκεται στη κεφαλή του ώριμου σπερματοζωαρίου και η III κυρίως στα κύτταρα που βοηθούν στη σπερματογένεση (testicular sertoli cells).⁷² Η δράση τους φαίνεται να είναι αλληλένδετη στα δύο βασικά στάδια της ανδρικής γονιμότητας.⁷³ Επιπλέον, η X παράγεται και από τα ενδοθήλια του ενδομητρίου και ο ρόλος της εκεί φαίνεται να είναι η πρόωρη υποβοήθηση της ακροσωμικής αντίδρασης (acrosome reaction) στον πληθυσμό των σπερματοζωαρίων τα οποία φέρουν λανθασμένα φωσφολιπίδια στη μεμβράνη τους, εμποδίζοντας τη συμμετοχή τους στη γονιμοποίηση.

1.2.2.6 Επιδερμίδα

Ο ρόλος του εξωτερικού στρώματος της επιδερμίδας (κεράτινη στιβάδα - stratum corneum) είναι τόσο προστατευτικός όσο και αμυντικός, προλαμβάνοντας την είσοδο βακτηρίων, μικροβίων και τοξινών. Επίσης, η στιβάδα αυτή ελέγχει και ρυθμίζει την απορρόφηση και διαδερμική απώλεια νερού και ιόντων καθώς και τη ρύθμιση του pH. Η ρύθμιση της οξύτητας της κεράτινης στιβάδας είναι σημαντική καθώς επηρεάζει την εμφάνιση της φλεγμονής μέσω διαφόρων μηχανισμών. Έχει βρεθεί ότι οι sPLA₂ παίζουν ένα ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της οξύτητας και στη σωστή εγκαθίδρυση του επιδερμικού φραγμού στις πρώτες εβδομάδες μετά τη γέννηση. Φαρμακευτική αναστολή της δράσης των sPLA₂ οδηγεί στην

καθυστέρηση της ρύθμισης της οξύτητας της κεράτινης στιβάδας, καθιστώντας έτσι το ρόλο τους αναγκαίο για τη σωστή λειτουργία της.⁷⁴ Η έκφραση των μελών IIA και IIF οι οποίες βρίσκονται στην περιοχή μεταξύ της κοκκώδους και της κεράτινης στιβάδας, έχει αποδειχτεί πειραματικά ότι αυξάνεται όταν συμβαίνουν διαταραχές στην περιοχή ενώ επηρεάζουν και το pH της κεράτινης στιβάδας.⁷⁵

Επίσης, η υπερέκφραση της IIA προκαλεί υπερπλασία και τριχόπτωση⁷⁶ ενώ κατά την εμφάνιση της ψωρίασης παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης της συγκέντρωσής της αλλά και της συγκέντρωσης των IID και IB.⁷⁷ Η υπερέκφραση της X συνοδεύεται από την εμφάνιση ανάλογων συμπτωμάτων αλλά δεν παρατηρείται δημιουργία φλεγμονής.²⁰

1.2.2.7 Καρκίνος του πνεύμονα και παθήσεις του αναπνευστικού

Το μέλος V εκφράζεται στα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα και στα κυψελιδικά μακροφάγα (alveolar macrophage) και η συγκέντρωση του αυξάνεται σε ασθενείς με άσθμα ή καλπάζουσα πνευμονία^{78,79} ενώ και το μέλος X εκφράζεται σε επιθηλιακά κύτταρα της αναπνευστικής οδού.⁸⁰ Οι δυο αυτές πρωτεΐνες έχουν σχετιστεί με παθολογικές καταστάσεις του αναπνευστικού συστήματος μέσω της υδρόλυσης λιπιδίων και φωσφολιπιδίων τα οποία πιθανώς να ανήκουν στον επιφανειοδραστικό παράγοντα των πνευμόνων (Pulmonary Surfactant).^{81,82}

Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι για τη IIA σημειώνεται υπερέκφρασή της από τα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα και η συγκέντρωσή της αυξάνεται στο πλάσμα αυτών των ασθενών.⁸³ Ένας λόγος που συμβαίνει αυτό είναι η αυξημένη ενεργοποίηση των οδών HER/HER2, PI3K-Akt, NF-κB που έχει ως αποτέλεσμα την υπερέκφραση της IIA. Η IIA δρα ως υπόστρωμα για την οικογένεια των υποδοχέων EGFR⁸⁴ (υποδοχέας του επιδερμοειδούς αυξητικού παράγοντα - epidermal growth factor receptor) και ενεργοποιεί την κυτταρική απόκριση μέσω της οδού HER/HER2. Επίσης, ενισχύει την ενεργοποίηση του παράγοντα NF-κB⁸⁵ ενώ οι αναστολείς της IIA μπορούν να καταστείλουν τη δράση του σε σημαντικό βαθμό.⁸⁶

Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί ότι τα εικοσανοειδή όπως οι προσταγλαδίνες, συμμετέχουν στην παθογένεση του καρκίνου του πνεύμονα.⁸⁷

Σύμφωνα με πειραματικά δεδομένα, η απενεργοποίηση και η χημική παρεμπόδιση της IIA μειώνει σημαντικά τη δημιουργία του νεοπλασματος από τα καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα, αποδεικνύοντας τον ρόλο που παίζει το ένζυμο στην εξέλιξη της ασθένειας.⁸⁸

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η IIA που υπάρχει στο πλάσμα των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα θα μπορούσε να αποτελέσει αντικείμενο για την πρόγνωση και τη θεραπεία της ασθένειας.

1.2.2.8 Νευρικό σύστημα

Όπως είδαμε, εκτός από την ενζυματική τους δράση, οι εκκριτικές φωσφολιπάσες μπορούν να δράσουν και με άλλους τρόπους, όπως μέσω της πρόσδεσής τους σε κατάλληλους υποδοχείς. Μέσω αυτού του ρόλου τους, έχει βρεθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία νευροδιαβίβασης του κεντρικού νευρικού συστήματος και της νευρωνικής ανάπτυξης του περιφερικού νευρικού συστήματος.^{89,90,91} Οι εκκριτικές φωσφολιπάσες έχει βρεθεί ότι υπερ-εκφράζονται σε παθολογικές καταστάσεις όπως η νόσος Alzheimer. Ανάμεσα σε αυτές, οι IB και IIA άγουν τη νευρωνική απόπτωση στους νευρώνες του φλοιού των αρουραίων.^{92,93} Ο μηχανισμός της δράσης τους έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της κυτοσολικής φωσφολιπάσης (καθώς και άλλων φωσφολιπασών και λιπασών) η οποία με τη σειρά της παράγει αραχιδονικό οξύ.⁹⁴

1.2.3 Συνδυαστικός ρόλος

Έχει δειχθεί ότι χορήγηση συνθετικής V σε ποντίκια με αυτοάνοση αρθρίτιδα, αυξάνει τη ανοσοποιητική απόκριση μέσω μακροφάγων που διευκολύνουν τη φαγοκύτωση.²⁸ Γι' αυτό και η χρήση αναστολέων που δρουν σε όλες τις sPLA₂ δεν έφερε κάποιο αποτέλεσμα στην αντιμετώπιση της ασθένειας.⁹⁵

Η V φαίνεται να δρα ως αντιφλεγμονώδες²⁸ αλλά και ως δείκτης της δημιουργίας φλεγμονής^{96,19} αναλόγως με την ασθένεια. Η V εκφράζεται πολύ περισσότερο στα καρδιακά κύτταρα από ότι στα άλλα είδη κυττάρων⁹⁷ και

αυξάνεται η έκφρασή της σε ασθενείς με έμφραγμα.⁹⁸ Από πειράματα σε ποντίκια έχει αποδειχθεί ότι απουσία της V συνοδεύεται από μείωση της έκτασης του εμφράγματος του μυοκαρδίου, με τη μείωση των αντιστοίχων εικοσανοειδών LTB₄ και TXA₂.⁹⁹ Ακόμα, συνοδεύεται από μείωση της παραγωγής αραχιδονικού οξέως, το οποίο αυξάνεται σε τέτοιου είδους βλάβες.

Εφόσον οι sPLA₂ παράγουν ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, έχει εξεταστεί ο ρόλος που πιθανόν να έχουν και ως αντιφλεγμονώδη. Έχει βρεθεί ότι τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα τα οποία παράγονται από τις sPLA₂ (snake venom) μπορούν να ενεργοποιήσουν τους υποδοχείς PPAR δ ¹⁰⁰ με αποτέλεσμα την έναρξη της αντιφλεγμονώδους διαδικασίας στα ενδοθηλιακά κύτταρα.¹⁰¹

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η δράση των εκκριτικών φωσφολιπασών μπορεί να είναι ανεξάρτητη από την καταλυτική τους δράση. Απόδειξη αυτού είναι η υπερ-έκφραση της ανενεργής ομάδας XII σε πολλά είδη κυττάρων, η ενεργοποίηση των φλεγμονωδών κυττάρων από την καταλυτικά ανενεργή IIa¹⁰² και η αντιφλεγμονώδη δράση της καταλυτικά ανενεργής IID σε ποντίκια.¹⁰³

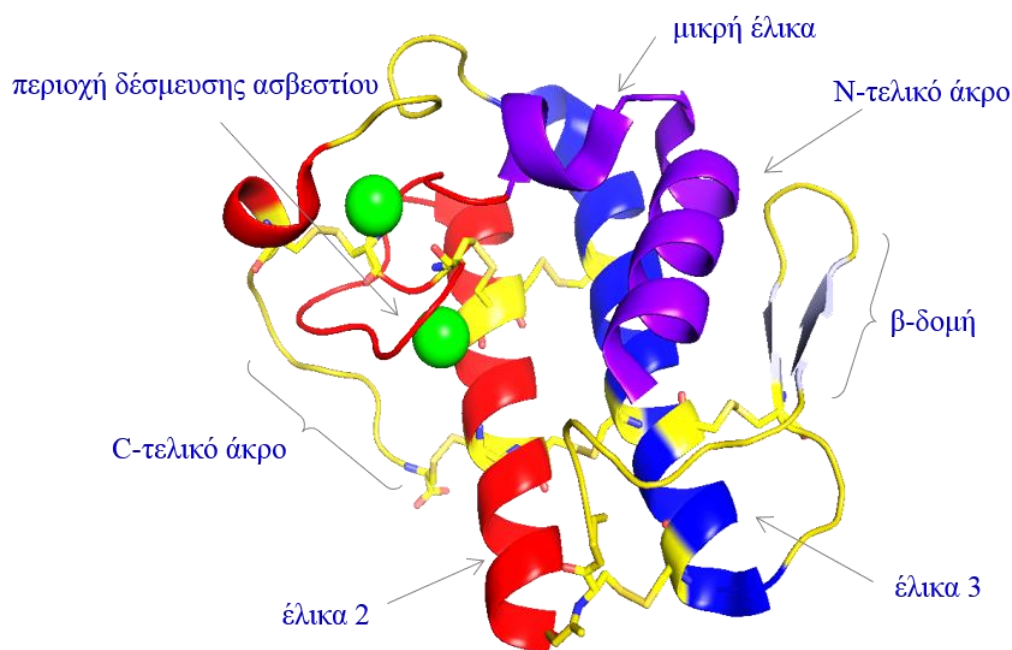
Με βάση αυτά τα δεδομένα, φαίνεται ότι οι sPLA₂ δρουν συνήθως με αλληλεπικαλυπτόμενες δράσεις. Συνεπώς, είναι επιτακτική η ανάγκη της σύνθεσης εκλεκτικών αναστολέων με σκοπό την εκλεκτική αναστολή δύο ή περισσότερων ομάδων εκκριτικών φωσφολιπασών. Αυτό θα βοηθήσει στην ταυτοποίηση του ρόλου τους στις βιολογικές πορείες και στην αποτελεσματική αντιμετώπιση της εκάστοτε σχετιζόμενης ασθένειας.

1.3 Εκκριτική φωσφολιπάση GIIa sPLA₂

Σήμερα, υπάρχουν 13 κρυσταλλογραφικές μελέτες της εκκριτικής φωσφολιπάσης IIa με την πρωτεΐνη σε ελεύθερη και δεσμευμένη μορφή.¹⁰⁴ Η δομή της αποτελείται από 124 αμινοξέα και επτά δισουλφιδικούς δεσμούς (Εικόνα 1.2). Ο ένας από αυτούς σχηματίζεται μεταξύ της CYS50 και της τελικής κυστεΐνης στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης και είναι χαρακτηριστικός για την οικογένεια των εκκριτικών φωσφολιπασών.¹⁰⁵ Επίσης, δύο ιόντα

ασβεστίου είναι προσδεμένα στο ένζυμο, εκ των οποίων το ένα βρίσκεται στο ενεργό κέντρο και παίζει ρόλο στην πρόσδεση του υποστρώματος ή του αναστολέα.

Η επιφάνεια του ενζύμου είναι κατιοντική και γι' αυτό μπορεί να προσδένεται σε άλλες πρωτεΐνες μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, ενεργοποιώντας βιολογικές αντιδράσεις στο εσωτερικό των κυττάρων.⁶⁵ Τα καταλληλότερα υποστρώματα για την IIA είναι η φωσφατιδυλοχολίνη (PC), η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη και η φωσφατιδυλογλυκερόλη PG.

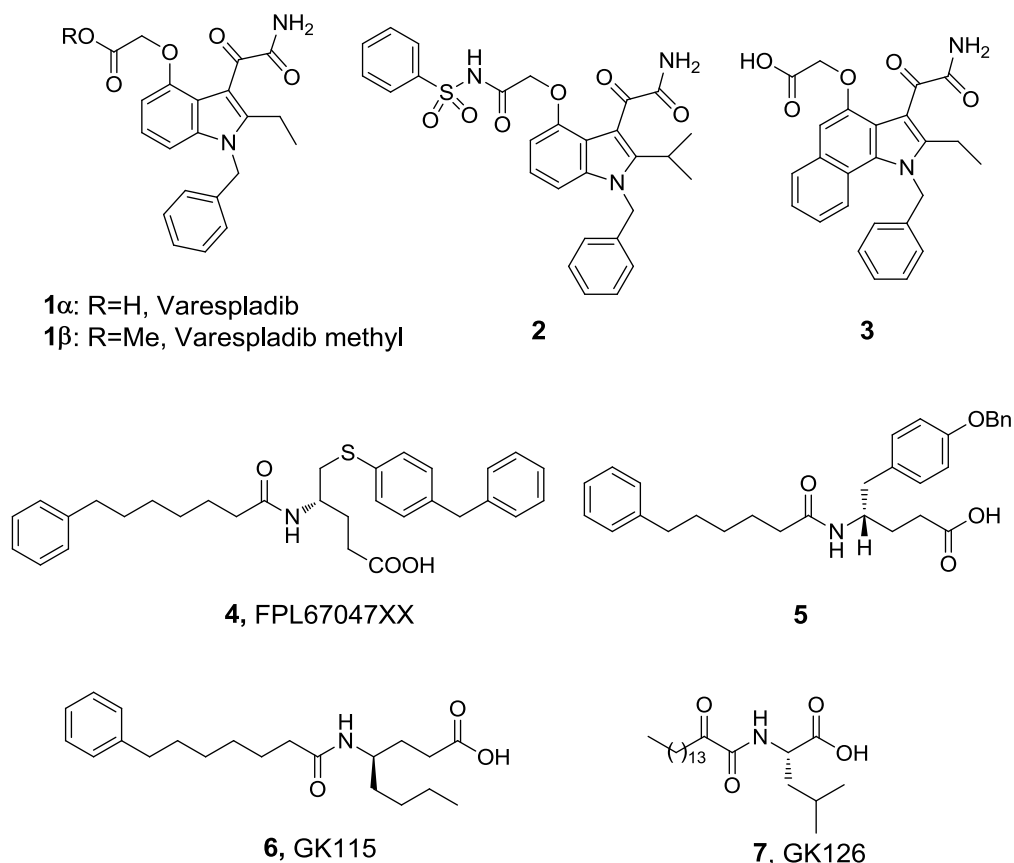


Εικόνα 1.2: Η δομή της εκκριτικής φωσφολιπάσης IIA.

Το ενεργό κέντρο του ενζύμου αποτελείται κυρίως από λιπόφιλα αμινοξέα όπως VAL2, PHE5, HIS6, LEU19, GLY22, PHE23, GLY29, VAL30, GLY31. Επίσης, στην καταλυτική του δράση εμπλέκονται τα αμινοξέα HIS47 και ASP91 τα οποία παίζουν ρόλο τόσο στην πρόσδεση του υποστρώματος όσο και στη σταθεροποίηση του ενδιάμεσου προϊόντος. Υπάρχουν δύο προτεινόμενοι μηχανισμοί για την καταλυτική δράση του ενζύμου, ωστόσο κανείς από αυτούς δεν είναι ο επικρατέστερος.^{106,107} Κοινό χαρακτηριστικό και των δύο μηχανισμών είναι η αποπρωτονίωση ενός μορίου νερού από την καταλυτική ιστιδίνη, οπότε και παράγεται ένα ιόν υδροξυλίου το οποίο στη συνέχεια προσβάλλει το καρβονύλιο του αναστολέα.

1.3.1 Αναστολείς της εκκριντικής φωσφολιπάσης

Η έρευνα για την εύρεση ενώσεων οι οποίες θα μπορούν να αναστείλουν ισχυρά και εκλεκτικά τη ΙΙΑ έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλών μελετών.^{1,43,44} Στο Σχήμα 1.1 φαίνονται οι σημαντικότερες ενώσεις που έχουν συντεθεί και έχει μελετηθεί η δράση τους έναντι των εκκριντικών φωσφολιπασών A₂.



Σχήμα 1.1: Μερικές από τις ενώσεις με ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι των εκκριντικών φωσφολιπασών A₂.

Η ένωση **1α** (Varespladib, Σχήμα 1.1), ένας ισχυρός αναστολέας της ΙΙΑ,¹⁰⁸ μελετήθηκε σε κλινικές έρευνες ως ενδοφλέβια χορηγούμενη ένωση για τη θεραπεία του συνδρόμου συστημικής φλεγμονώδους απόκρισης (SIRS). Παρόλο που φάνηκε να έχει ικανοποιητικά και ασφαλή αποτελέσματα σε ασθενείς με σήψη, η έρευνα τερματίστηκε στο στάδιο ΙΙ των κλινικών ερευνών καθώς τα αποτελέσματα δεν ήταν τα αναμενόμενα. Η ένωση **1β** (Varespladib methyl, Σχήμα 1.1), δρα ως προφάρμακο και μετατρέπεται γρήγορα *in vivo* σε Varespladib. Τις δύο ενώσεις τις πρότεινε η Anthera Pharmaceuticals ως φάρμακα για καρδιαγγειακές παθήσεις, ωστόσο το 2012 η έρευνα για τη

χρήση τους τερματίστηκε στο στάδιο III των κλινικών δοκιμών λόγω της ανεπαρκούς αποτελεσματικότητάς τους.

Η έκφραση ορισμένων μελών της εκκριτικής φωσφολιπάσης (I, II, V, X, και XII από άνθρωπο και ποντίκι) σε κύτταρα εντόμων και του *Escherichia coli* και η απομόνωσή τους σε καθαρή μορφή, έδωσε τη δυνατότητα για τη διεξαγωγή αξιόπιστων βιολογικών πειραμάτων.¹²

Οι μελέτες που έχουν γίνει σε ενώσεις παράγωγα ινδολών, 6,7-βενζοϊνδολών και ινδολιζινών^{109,110} ανέδειξαν τα παράγωγα **2** και **3** (Σχήμα 1.1) ως αναστολείς των εκκριτικών φωσφολιπασών. Πιο συγκεκριμένα, η ένωση **2** βρέθηκε ότι αναστέλλει εκλεκτικά τη hGX, ενώ η ένωση **3** μπορούσε να αναστείλει σχεδόν όλες τις εκκριτικές φωσφολιπάσες (από άνθρωπο και από ποντίκι) σε χαμηλή συγκέντρωση της τάξης των nM.

Μια άλλη κατηγορία ενώσεων που έχουν ερευνηθεί για την ανασταλτική τους δράση έναντι των εκκριτικών φωσφολιπασών, είναι τα παράγωγα μη φυσικών αμινοξέων. Η ένωση **4** (FPL67047XX, Σχήμα 1.1) βρέθηκε ότι είναι ισχυρός αναστολέας της ανθρώπινης sPLA₂¹¹¹ και ο τρόπος πρόσδεσης της ένωσης στο ενεργό κέντρο της ανθρώπινης μη παγκρεατικής sPLA₂ καθορίστηκε με την τεχνική της κρυσταλλογραφίας ακτινών Χ.¹¹²

Για την ένωση **5** (Σχήμα 1.1), η οποία δομικά είναι παρόμοια με την **4**, υπάρχει κρυσταλλογραφική μελέτη της πρόσδεσής της στο ενεργό κέντρο της εκκριτικής φωσφολιπάσης IIa. Η μελέτη αυτή δείχνει ότι η ένωση αλληλεπιδρά με το ιόν του ασβεστίου μέσω του οξυγόνου της καρβοξυλομάδας και της αμιδικής ομάδας. Επιπρόσθετα, δημιουργεί ένα δεσμό υδρογόνου μεταξύ του αμιδικού NH και της HIS47, αρκετές υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με το λιπόφιλο μέρος του ενεργού κέντρου και μια CH-π αλληλεπίδραση με το δακτύλιο της HIS6.¹¹³

Όσον αφορά την ένωση **6** (GK115, Σχήμα 1.1), με βάση τα *in vitro* πειράματα, βρέθηκε ότι αναστέλλει τη δράση της εκκριτικής φωσφολιπάσης V (Χι(50) 0,003 ± 0,0004) χωρίς να επηρεάζει τη δράση των ενδοκυτταρικών GIVA cPLA₂ και GVIA iPLA₂.¹¹⁴

1.3.2 2-Οξοαμιδικά παράγωγα

Στο εργαστήριο της Οργανικής Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών, η ερευνητική ομάδα του καθ. Γεωργίου Κόκοτου ασχολείται με τη σύνθεση μιας καινοτόμου κατηγορίας ενώσεων με πιθανή ανασταλτική δράση έναντι των φωσφολιπασών. Οι ενώσεις αυτές φέρουν τη χαρακτηριστική 2-οξοαμιδική ομάδα και έχουν δείξει ότι αναστέλλουν τη δράση των κυτοσολικών φωσφολιπασών cPLA₂.^{115,116,117}

Πρόσφατα, ταυτοποιήθηκε η δράση της ένωσης **7** (GK126, Σχήμα 1.1), του 2-οξοαμιδικού παραγώγου που βασίζεται στην (S)-λευκίνη, έναντι της GIIA sPLA₂ (IC₅₀ = 0,30 μM).¹¹⁸ Με βάση τη δομή της ένωσης **7** και διατηρώντας τη 2-οξοαμιδική ομάδα, επιχειρήθηκε στην παρούσα μελέτη ο σχεδιασμός και η σύνθεση νέων παραγώγων με βελτιωμένη βιολογική δράση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

α-ΚΕΤΟ ΑΜΙΔΙΑ

2.1 Γενικά

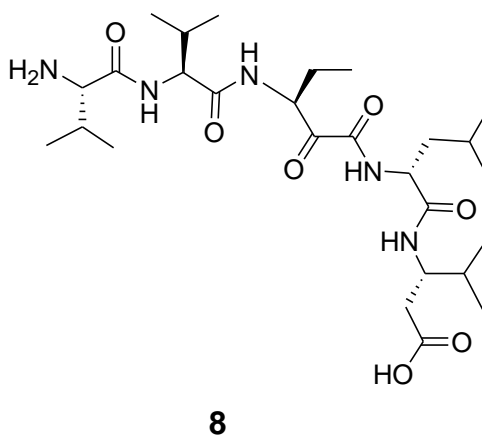
Η α-κετοαμιδική (ή 2-οξοαμιδική) ομάδα αποτελείται από ένα αμίδιο και μια ενεργοποιημένη κετο-ομάδα που γειτνιάζει με την αμιδική. Αυτό το ενεργοποιημένο καρβονύλιο είναι ηλεκτρονιόφιλο, λόγω της μετατόπισης του ηλεκτρονιακού νέφους του προς την ομάδα του αμιδίου και μπορεί να δεχθεί πυρηνόφιλη προσβολή. Εξαιτίας αυτής της χημικής τους ιδιότητας, η α-κετοαμιδική ομάδα έχει χρησιμοποιηθεί για τη σχεδίαση ενώσεων με πιθανή ανασταλτική δράση ενάντια πρωτεϊνικών στόχων.

Πιο συγκεκριμένα, στη βιβλιογραφία υπάρχει μια πληθώρα αναφορών για τη χρήση της α-κετοαμιδικής ομάδας στη σύνθεση ενώσεων που στοχεύουν στην αναστολή της δράσης κυρίως των πρωτεασών της σερίνης και της κυστεΐνης, καθώς και ενζύμων με παρόμοιο καταλυτικό μηχανισμό. Έχει βρεθεί ότι οι ενώσεις αυτές μπορούν να δράσουν ως ανάλογα του τετραεδρικού ενδιάμεσου (*gem*-διόλη ή ημικετάλη) κατά την πρόσδεσή τους στο ένζυμο. Ως εκ τούτου, έχουν χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση του καταλυτικού μηχανισμού αυτών των πρωτεϊνών.

Όσον αφορά τις πρωτεάσες της σερίνης, το α-καρβονύλιο της κετοαμιδικής ομάδας έχει χρησιμοποιηθεί ως ηλεκτρονιόφιλη παγίδα της καταλυτικής σερίνης με αποτέλεσμα την αντιμετώπιση ασθενειών όπως η ηπατίτιδα C,¹¹⁹ ο δάγκειος πυρετός,¹²⁰ ο ιός του δυτικού Νείλου και ο ιός HCMV.¹²¹ Επίσης έχει αναφερθεί ότι τα α-κετοαμιδικά παράγωγα είναι ανταγωνιστικοί αναστολείς των υδρολασών της σερίνης, συμπεριλαμβανομένης και της αμιδικής υδρολάσης των λιπαρών οξέων.^{122,123,124,125,126,127,128} Η εισαγωγή της κετοαμιδικής ομάδας έχει παρατηρηθεί ότι αυξάνει τη δραστικότητα των αναστολέων που σχετίζονται με τις υδρολάσες της σερίνης, όπως οι λιπάσες.^{129,130,131} Επίσης, έχει αναφερθεί ότι μπορεί να αναστέλλει τη δράση των πρωτεασών της κυστεΐνης, όπως την πρωτεάση του νοροϊού (3CL)¹³² και της κρουζείνης.¹³³

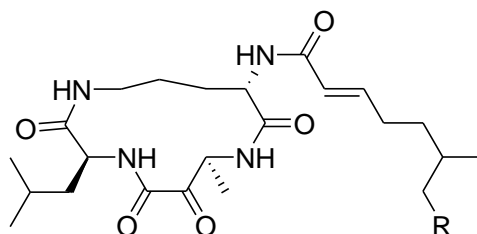
Οι ενώσεις που περιέχουν την α-κετοαμιδική ομάδα έχουν αποτελέσει αντικείμενο έρευνας για την παραγωγή φαρμακοβιομηχανικών προϊόντων, όπως θα δούμε και αναλυτικότερα παρακάτω.^{134,135,136,137}

Αρκετά φυσικά προϊόντα με την ιδιότητα του φυσικού αναστολέα, εμπεριέχουν στην χημική τους δομή την α-κετοαμιδική ομάδα. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η ποστατίνη (**8**, Σχήμα 2.1), ένα φυσικό προϊόν που απομονώνεται από τον *Streptomyces viridochromogenes*. Αποτελεί αναστολέα της προλυλ-ενδοπεπτιδάσης (prolyl endopeptidase, PEP) ενώ πειράματα με ανάλογες ενώσεις έδειξαν ότι η β-υποκατεστημένη-β-αμινο-α-οξο-οξυ ομάδα είναι καθοριστική για την ανασταλτική δράση τους.^{138,139}



Σχήμα 2.1: Η δομή της ποστατίνης.

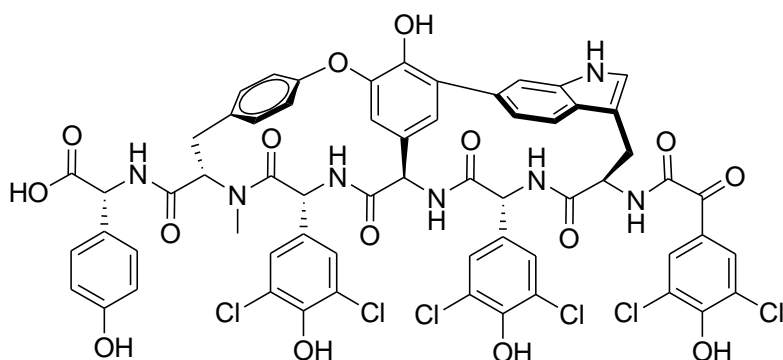
Επιπρόσθετα, η ευριστατίνη (**9α**, Σχήμα 2.2), που περιέχει και αυτή την α-κετοαμιδική ομάδα, είναι ένα φυσικό προϊόν που απομονώνεται από τον *Streptomyces eurythermus* R353-21. Στην ανασταλτική της δράση έναντι της PEP, καθοριστικό ρόλο φαίνεται να έχει το α-καρβονύλιο.¹⁴⁰



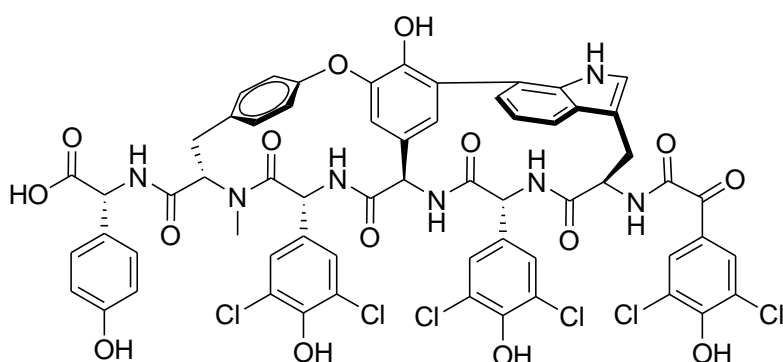
9α R = H, eurystatin A
9β R = Me, eurystatin B

Σχήμα 2.2: Η δομή της ευριστατίνης A και B.

Η ένωση Complestatin (**10α**, Σχήμα 2.3) απομονώθηκε το 1980 από το *Streptomyces avendulae* SANK 60477^{141,142} και ένα ισομερές της, η ένωση Chloropectin I (**10β**, Σχήμα 2.3), το 1994 από τον *Streptomyces sp.* WK-3419.^{143,144} Οι δύο αυτές ενώσεις έχουν σημαντική βιολογική δράση έναντι της αντιγραφής του HIV.



10α

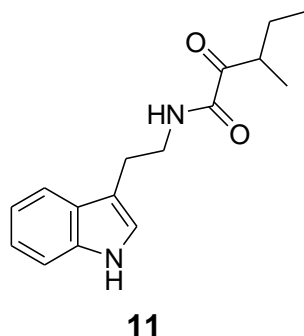


10β

Σχήμα 2.3: Δομή των ενώσεων Complestatin (10α) και Chloropectin I (10β).

Άλλα βιοενεργά φυσικά προϊόντα τα οποία αποτελούνται από την ακετοαμιδική ομάδα είναι ο FK-506 και η ραπαμυκίνη.¹⁴⁵

Η νεματοφίνη (**11**, Σχήμα 2.4) είναι ένα αντιβιοτικό το οποίο απομονώνεται από τον *Xenorhabdus nematophilus* και παρουσιάζει - όπως και τα παράγωγά του - δράση έναντι του *Staphylococcus aureus* (MRSA).¹⁴⁶ Για τη δράση αυτών των ενώσεων φαίνεται να είναι καθοριστική η παρουσία της συζευγμένης καρβονυλο - ακυλομάδας.



Σχήμα 2.4: Δομή της νεματοφίνης (Nematophin).

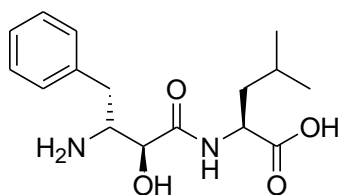
Ο λόγος για τον οποίο η α-κετοαμιδική ομάδα είναι ελκυστική για τη σύνθεση παραγώγων της, οφείλεται σε μερικά επιπλέον πλεονεκτήματα που παρουσιάζει. Είναι πιο ηλεκτρονιόφιλη σε σύγκριση με τις κετόνες και τα νιτρίλια¹⁴⁷ ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις είναι πιο σταθερή/δραστική από τις αντίστοιχες αλδεΐδες. Τα κετοαμιδικά παράγωγα παρουσιάζουν μεταβολική σταθερότητα στα *in vivo* και *in vitro* πειράματα¹⁴⁸ ενώ η χορήγησή τους μπορεί να γίνει από το στόμα.¹⁴⁹

Ωστόσο, η χρήση της α-κετοαμιδικής ομάδας σε ενώσεις πιθανούς αναστολείς, προϋποθέτει την προσεκτική επιλογή κατάλληλου διαλύματος για τα *in vivo* πειράματα. Είναι γνωστό ότι σε διάλυμα μεθανόλης σχηματίζεται η αντίστοιχη ημικετάλη του α-κετο αμιδίου,¹⁵⁰ όπως φαίνεται και σε φάσματα ¹H-NMR.¹⁵¹

2.2 α-Κετοαμιδικά παράγωγα ως ενώσεις με φαρμακολογική δράση

2.2.1 Αναστολείς της αμινοπεπτιδάσης

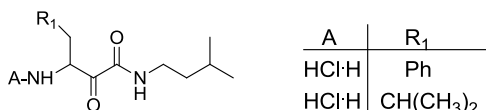
Μικρού μοριακού βάρους κετόνες σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν από την ερευνητική ομάδα του Rich *et al.* ως πιθανοί αναστολείς της αμινοπεπτιδάσης (APases).¹⁵⁰ Οι ενώσεις αυτές είναι ανάλογα της ένωσης Bestatin (**12**, Σχήμα 2.5)¹⁵² και φέρουν την α-κετοαμιδική ομάδα, η οποία είναι ηλεκτρονικά παρόμοια με τον αναστολέα.



12

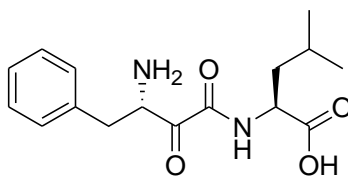
Σχήμα 2.5: Δομή της Bestatin.

Τρία ανάλογα αυτών των ενώσεων βρέθηκαν να είναι αναστολείς της αργινυλοαμινοπεπτιδάσης ($K_i = 1,5 \mu\text{M}$), της κυτοσολικής αμινοπεπτιδάσης ($K_i = 1,0 \mu\text{M}$) και της μικροσωμικής αμινοπεπτιδάσης ($K_i = 2,5 \mu\text{M}$) (Σχήμα 2.6). Από τα πειράματα βρέθηκε ότι το κετονικό καρβονύλιο της α-κετοαμιδικής ομάδας ενυδατώνεται εύκολα σε υδατικό διάλυμα DMSO, εξαιτίας της έλξης της ηλεκτρονιακής του πυκνότητας από τη γειτονική αμιδική ομάδα. Λόγω αυτού, τα ανάλογα αυτά είναι πολύ ισχυροί αναστολείς της πρωτεάσης επειδή το ενδιάμεσο στάδιο για την υδρόλυση ενός αμιδικού δεσμού είναι πιο κοντά στο sp^3 -υβριδισμό του ένυδρου (gem-diol) από ότι τον sp^2 -υβριδισμό της κετόνης. Όλα τα α-κετοαμιδικά παράγωγα είναι αναστολείς οι οποίοι προσδένονται αργά στο ενεργό κέντρο.



Σχήμα 2.6: Ανάλογα των α-κετοαμιδικών ενώσεων.

Παρόμοια, η δράση της υδρολάσης των λευκοτριένιων A₄ - η οποία παρουσιάζει και δράση αμινοπεπτιδάσης - έχει αναφερθεί ότι μπορεί να ανασταλεί και από παράγωγα των α-κετοαμιδίων, όπως για παράδειγμα η ένωση **13** (Σχήμα 2.7).¹⁵³

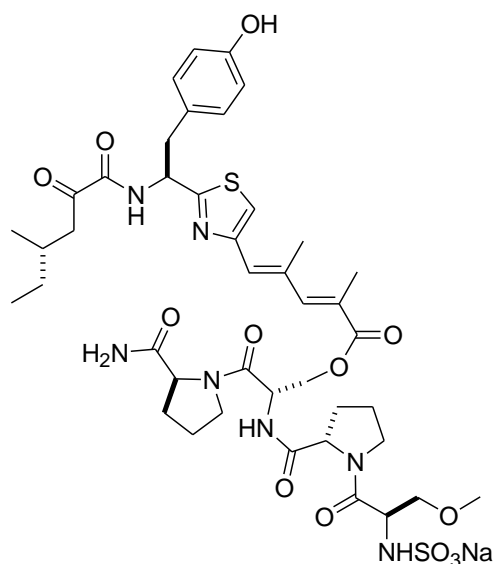


13

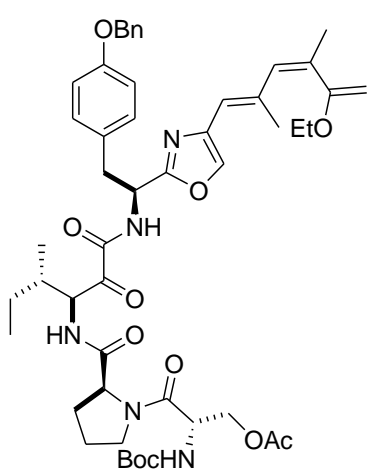
Σχήμα 2.7: α-Κετοαμιδικό παράγωγο που αναστέλλει τη δράση της υδρολάσης των λευκοτριένιων A₄ με IC₅₀ = 0,5 μM.

2.2.2 α-Κετοαμίδια με αντικαρκινική δράση

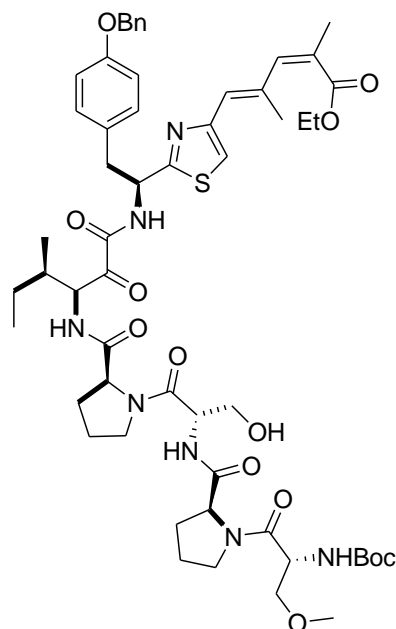
Η ένωση Scleritodermin A (**14**, Σχήμα 2.8), η οποία απομονώθηκε από την ομάδα του Schmidt από το θαλάσσιο σφουγγάρι *Scleritoderma nodosum*,¹⁵⁴ παρουσιάζει κυτταροτοξική δράση έναντι αρκετών ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων. Η δομή της ένωσης περιέχει και τη χαρακτηριστική α-κετοαμιδική ομάδα. Ανάλογα της ένωσης αυτής συντέθηκαν με σκοπό τη μελέτη της βιολογικής τους δράσης.¹⁵⁵ Από αυτά, όσα είχαν την α-κετοαμιδική ομάδα έδωσαν καλύτερα βιολογικά αποτελέσματα σε σχέση με τις άλλες ενώσεις (**15** και **16**, Σχήμα 2.8).



14, Scleritodermin A



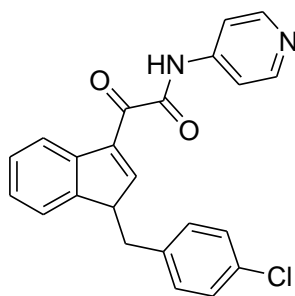
15



16

Σχήμα 2.8: Η ένωση Scleritodermin A και τα ανάλογα με την καλύτερη βιολογική δράση.

Επιπρόσθετα, η ένωση Indibulin D-24851 (**17**, Σχήμα 2.9) είναι μια ένωση μικρού μοριακού βάρους με αντικαρκινική δράση.^{156,157,158} Λόγω των χημικών της ιδιοτήτων, της δυνατότητας χορήγησης της από το στόμα και της έλλειψης νευροτοξικότητας, έχουν γίνει κλινικές έρευνες για τη χορήγησή της σε ασθενείς με όγκους,¹⁵⁹ ενώ βρίσκεται στη φάση I/II των κλινικών δοκιμών (ZIOPHARM Oncology Inc. ZIO-301).



17

Σχήμα 2.9: Δομή της Indibulin D-24851.

Επίσης, οι Dawson *et al.*¹⁶⁰ συνέθεσαν α-κετοαμιδικά παράγωγα με ισχυρή αναστολή έναντι μιας παλμιτικής θειοστεράσης (palmitoyl: protein thioesterase PPT1). Οι ενώσεις αυτές δοκιμάστηκαν και σε κυτταρικές καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων και ήταν αρκετά τοξικές.

2.2.3 Αναστολείς των πρωτεασών της κυστεΐνης

2.2.3.1 Αναστολείς της καλπαΐνης (Calpain)

Η καλπαΐνη είναι κυστεϊνική πρωτεάση, η δράση της οποίας εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ασβεστίου. Υπάρχουν δύο τύποι, ανάλογα με τη συγκέντρωση ασβεστίου που απαιτεί για τη δράση της, και έχει πολλούς βιολογικούς ρόλους όπως η ανάπτυξη τη μνήμης και η διατήρηση της πρωτεϊνικής μεμβράνης.

Η πλειοψηφία των αναστολέων που είχαν αναφερθεί μέχρι τη δεκαετία του 1990^{161,162} ήταν πεπτιδικά ανάλογα τα οποία περιείχαν μια ηλεκτρονιόφιλη καρβονυλομάδα στη θέση του πεπτιδικού δεσμού που καταλύεται από το ένζυμο. Οι περισσότεροι από αυτούς τους αναστολείς έχουν μια ηλεκτραρνητική λειτουργική ομάδα, γειτονική στο καρβονύλιο και έχουν ανασταλτική δράση έναντι των πρωτεασών της κυστεΐνης και της σερίνης. Κατά τον μηχανισμό της ενζυμικής αντίδρασης, σχηματίζεται ένα τετραεδρικό ημικεταλικό (ημιακεταλικό με αλδεΰδες) ή ημιθειοκεταλικό σύμπλεγμα ενζύμου-αναστολέα ως αποτέλεσμα της αντίδρασης της καρβονυλομάδας του αναστολέα με τη σερίνη ή την κυστεΐνη του ενεργού κέντρου, αντίστοιχα.

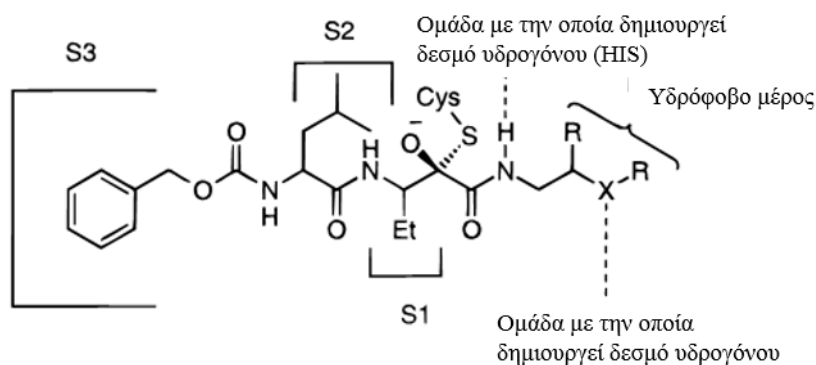
Γενικά, πεπτιδικά παράγωγα που περιέχουν ηλεκτροφιλικές καρβονυλομάδες έχουν αναφερθεί ότι αναστέλλουν τη δράση των κυστεϊνικών πρωτεασών και ιδιαίτερα της παπαΐνης (papain), της καθεψίνης Β (cathepsin) και της καλπαΐνης. Μέχρι το 1993, μόνο ένα πεπτιδικό παράγωγο α-κετοαμιδίου είχε αναφερθεί ως αναστολέας της κυστεϊνικής πρωτεάσης.¹⁶³

Το 1993 η ομάδα του Powers¹⁶⁴ δημοσίευσε τη σύνθεση μιας σειράς ενώσεων-πιθανών αναστολέων της κυστεϊνικής πρωτεάσης και τη μελέτη της δράσης τους. Ο μηχανισμός με τον οποίο δρουν τα α-κετοαμιδικά παράγωγα είναι παρόμοιος με αυτό του φυσικού υποστρώματος. Δηλαδή, η κυστεΐνη του ενεργού κέντρου αντιδρά με την α-καρβονυλομάδα του αναστολέα σχηματίζοντας μια ενδιάμεση ημιθειοκετάλη η οποία μοιάζει με το τετραεδρικό ενδιάμεσο που σχηματίζεται κατά την υδρόλυση του φυσικού υποστρώματος. Επίσης, η ιστιδίνη του ενεργού κέντρου σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την αμιδική ομάδα. Ακόμα, στην περίπτωση της καλπαΐνης, το ασβέστιο φαίνεται να αλληλεπιδρά με την -NH ομάδα των μονοϋποκατεστημένων α-κετοαμιδίων. Ο ρόλος που έχει το ασβέστιο στο μηχανισμό της κατάλυσης είναι ανάλογος με αυτόν που έχει στην περίπτωση των φωσφολιπασών A₂.¹⁶⁵

Γενικά, από τις ενώσεις που συνέθεσε η ομάδα του Powers, τα N-μονοϋποκατεστημένα α-κετοαμίδια ήταν ισχυρότεροι αναστολείς από τους αντίστοιχους α-κετοεστέρες για την καλπαΐνη I και II και την καθρεψίνη Β. Επίσης, προκειμένου να διευκρινιστεί ο ρόλος του α-καρβονυλίου, η ομάδα συνέθεσε α-υδροξυαμιδικά παράγωγα τα οποία στα *in vitro* πειράματα δεν εμφάνισαν καμία αναστολή της δράσης του ενζύμου της καλπαΐνης (Cbz-L-Leu-L-Pheψ[CH(OH)CO-NH]Et με $K_i > 350.000$ nM).¹⁶⁶ Αυτό φαίνεται να επιβεβαιώνει τον προτεινόμενο μηχανισμό σύμφωνα με τον οποίο τα α-κετοαμιδικά παράγωγα σχηματίζουν ένα τετραεδρικό ενδιάμεσο κατά την πρόσδεσή τους στο ένζυμο, το οποίο είναι αποτέλεσμα της πυρηνόφιλης προσθήκης της κυστεΐνης του ενεργού κέντρου στο ενεργοποιημένο καρβονύλιο.

Μια σειρά από διπεπτιδικά α-κετοαμιδικά παράγωγα με γενικό τύπο R₁-L-Leu-D,L-AA-CONH-R₂ συντέθηκαν επίσης από την ομάδα του Powers, με σκοπό τη 'χαρτογράφηση' της περιοχής πρόσδεσης του ενζύμου, αντικαθιστώντας

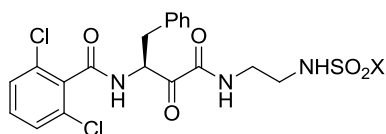
τις R₁ και R₂ ομάδες με αρωματικά συστήματα.¹⁶⁷ Την ισχυρότερη ανασταλτική δράση την παρουσίασαν ενώσεις του τύπου Z-Leu-Abu-CONH-R₂, όπου R₂ κάποιο αρωματικό σύστημα, ενώ ο προτεινόμενος τρόπος πρόσδεσης αυτών φαίνεται στο Σχήμα 2.10.



Σχήμα 2.10: Προτεινόμενος τρόπος πρόσδεσης διπεπτιδικών α-κετοαμιδικών παραγώγων στο ενεργό κέντρο της καλπαΐνης.

Όπως φαίνεται και από το σχήμα, κατά την πρόσδεση της ένωσης προτείνεται ότι σχηματίζεται η ημιθειοκετάλη, ενώ ο σχηματισμός ενός δεσμού υδρογόνου μεταξύ της -NHCOCO ομάδας της ένωσης και της ιστιδίνης του ενεργού κέντρου, σταθεροποιεί την πρόσδεση. Εξαιτίας αυτού του δεσμού, η ένωση έχει την κατάλληλη διαμόρφωση για να αλληλεπιδράσει με τη γειτονική υδρόφοβη περιοχή της κοιλότητας συμβάλλοντας στην πρόσδεση. Έτσι, όταν η γειτονική ομάδα του α-κετοαμιδίου είναι κατάλληλη ώστε να δημιουργήσει αλληλεπιδράσεις με αυτή την υδρόφοβη περιοχή, η ανασταλτική δράση των ενώσεων αυξάνεται. Για παράδειγμα, ανάλογα με εκτεταμένα ετεροκυκλικά συστήματα δίπλα από το α-κετοαμίδιο είχαν ισχυρή δράση έναντι της λειτουργίας του ενζύμου (Πίνακας 2.1).¹⁶⁸

Πίνακας 2.2.1: Παραλλαγές της τελικής σουλφοναμιδικής ομάδας α-κετοαμιδικών παραγώγων ως αναστολείς της καλπαΐνης.

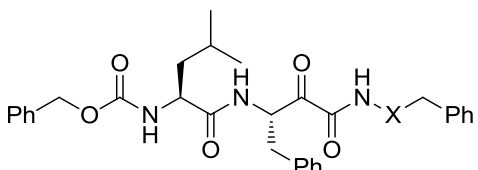



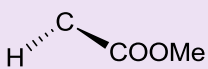
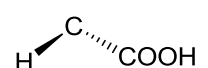
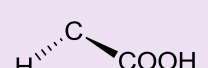


X	K _i (nM)	X	K _i (nM)
	15		8
	14		59
	21		71

Επίσης, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα *N,N*-διϋποκατεστημένα α-κετοαμιδικά παράγωγα είναι λιγότερα δραστικά από τα αντίστοιχα *N*-μονοϋποκατεστημένα. Πιθανή εξήγηση φαίνεται να είναι ο σχηματισμός ενός δεσμού υδρογόνου μεταξύ της -NH ομάδας και κάποιου αμινοξέος του ενεργού κέντρου.

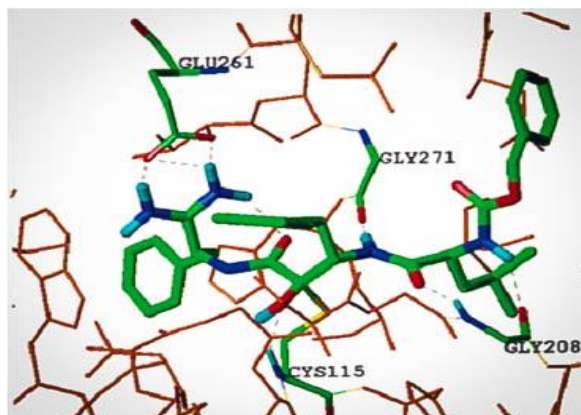
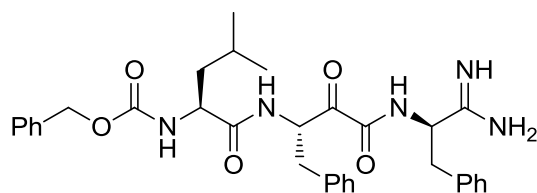
Η ερευνητική ομάδα Zheng *et al.*¹⁶⁹ συνέθεσε μια σειρά α-κετοαμιδικών παραγώγων από τα οποία, όσα είχαν κάποια ομάδα δότη δεσμού υδρογόνου εισχωρούσαν στη λιπόφιλη περιοχή του ενεργού κέντρου του ενζύμου, και παρουσίασαν ισχυρότερη δράση (Πίνακας 2.2).

Πίνακας 2.2.2: Ανασταλτική δράση ενώσεων α-κετοαμιδικών παραγώγων έναντι της καλπαΐνης I.



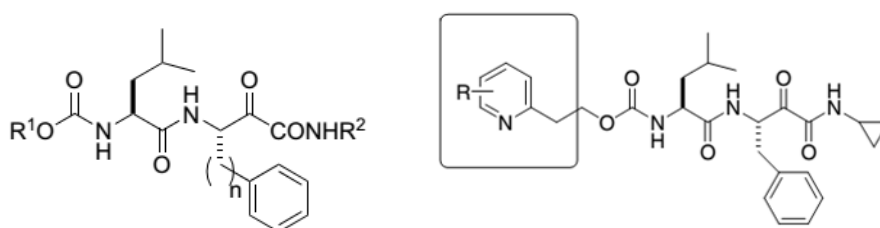
X	K_i (nM)
	940 ± 10
	680 ± 15
	>430.000
	830 ± 20
	74 ± 3
	4.190 ± 190
CH ₂	54 ± 3
NH	4,7 ± 0,2

Η ομάδα υπέθεσε ότι θα πρέπει να υπάρχει κάποιο αμινοξύ δέκτης, όπως ασπαρτικό ή γλουταμινικό οξύ, σε εκείνη την περιοχή που θα δημιουργεί δεσμό υδρογόνου με την ένωση. Αυτή η υπόθεση επιβεβαιώθηκε με την κρυσταλλογράφηση της πρωτεΐνης και στη συνέχεια από τα πειράματα μοριακής μοντελοποίησης των αντίστοιχων ενώσεων. Τα πειράματα προσομοίωσης με τη χρήση του προγράμματος GOLD 1.2 έδειξαν ότι η διαμόρφωση της ένωσης με την ισχυρότερη αναστολή, ευνοούσε το σχηματισμό δεσμού υδρογόνου μεταξύ της ένωσης και του GLU261 στη λιπόφιλη περιοχή πρόσδεσης (Εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1: Πόζα όπου φαίνεται ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου μεταξύ της καλπαΐνης I και ενός αναστολέα, όπως παράχθηκε με χρήση του λογισμικού GOLD 2.1.

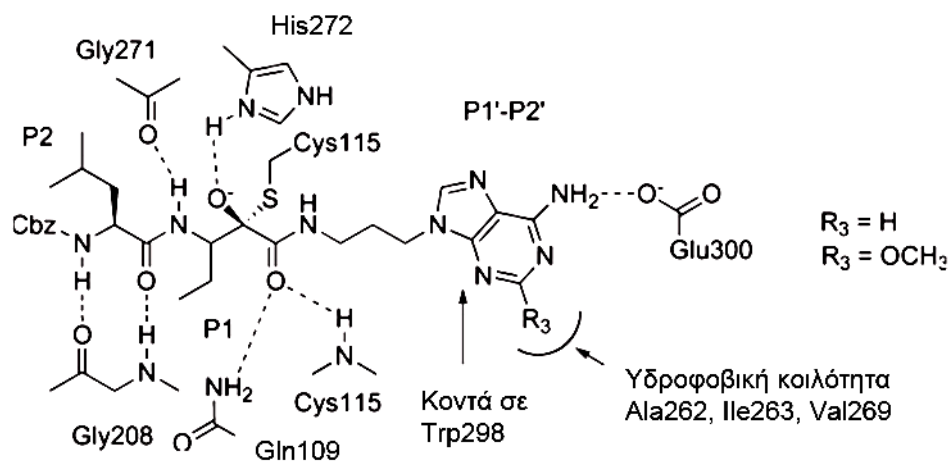
Η χρήση της ομάδας του α-κετοαμιδίου έχει προτιμηθεί για τη σύνθεση αναστολέων της καλπαΐνης, καθώς παρουσιάζει ευνοϊκές φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες έναντι των αντίστοιχων αλδευδών.^{170,171} Επίσης, α-κετοαμιδικά παράγωγα (Σχήμα 2.11) με βελτιστοποιημένες τις φυσικοχημικές ιδιότητές τους παρουσίασαν δυνατότητα χορήγησης από το στόμα με αρκετά καλή δράση και διαλυτότητα στο πλάσμα.^{172,173}



Σχήμα 2.11: Οι δύο βασικές κατηγορίες α-κετοαμιδικών παραγώγων που βελτιστοποιήθηκε η διαλυτότητα τους στο νερό.

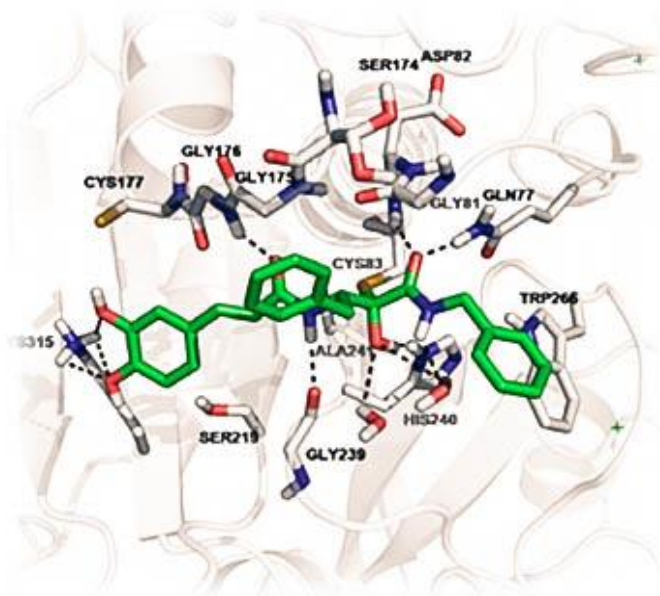
Ο τρόπος πρόσδεσης των α-κετοαμιδικών παραγώγων στο ενεργό κέντρο της καλπαΐνης που προτείνεται από τους Ovat *et al.*¹⁷⁴ επιβεβαιώνει τη συμμετοχή της λειτουργικής ομάδας του κετοαμιδίου στην πρόσδεση. Πιο συγκεκριμένα, τα παράγωγα αυτά αδρανοποιούν την πρωτεάση της κυστεΐνης μέσω του

αντιστρεπτού σχηματισμού μιας ενδιάμεσης τετραεδρικής ημιθειοκετάλης με την κυστεΐνη του ενεργού κέντρου. Αυτό το ενδιάμεσο είναι αρκετά σταθερό και γι' αυτό έχουν παρατηρηθεί χαμηλές K_i τιμές για τα πεπτιδικά α-κετοαμιδικά παράγωγα. Οι ενώσεις και ο τρόπος πρόσδεσης τους που προτείνεται από την ομάδα αυτή, φαίνεται στο Σχήμα 2.12.



Σχήμα 2.12: Προτεινόμενος τρόπος πρόσδεσης των ενώσεων που συντέθηκαν από τους Ovat *et al.*

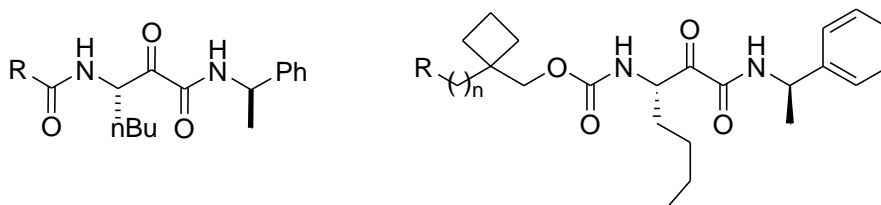
Παρόμοιος τρόπος πρόσδεσης προτάθηκε και από την ερευνητική ομάδα Yoo *et al.*¹⁷⁵ για τις ενώσεις που συνέθεσαν. Με τη χρήση του υπολογιστικού προγράμματος GOLD 4.0 παράγααν πιθανές πόζες (θέσεις) των ενώσεων τους στο ενεργό κέντρο της μ -καλπαΐνης, στις οποίες φαίνονται οι αλληλεπιδράσεις της α -κετοαμιδικής ομάδας με το ενεργό κέντρο (Εικόνα 2.2).



Εικόνα 2.2: Πόζα στην οποία εμφανίζεται η πρόσδεση ενός α-κετοαμιδικού παραγώγου στο ενεργό κέντρο της μ-καλπαΐνης (Y. J. Yoo *et al.*).

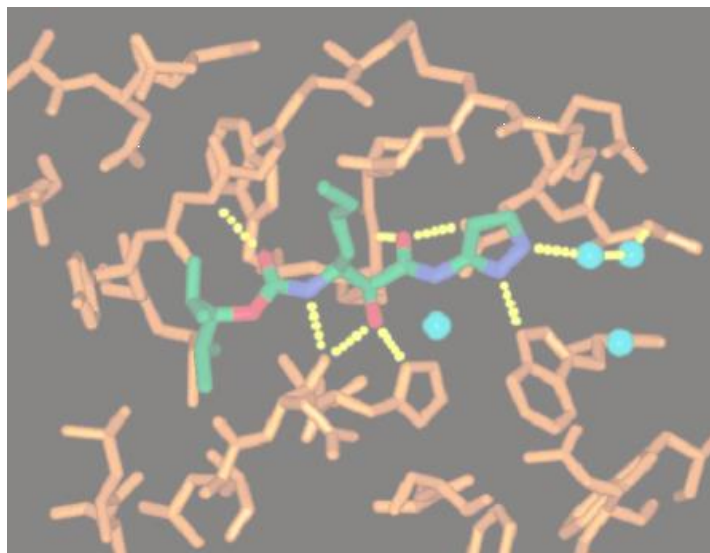
2.2.3.2 Αναστολείς της καθεψίνης K

α-Κετοαμιδικά παράγωγα έχουν συντεθεί ως αντιστρεπτοί αναστολείς της καθεψίνης K (Σχήμα 2.13).^{176,177}



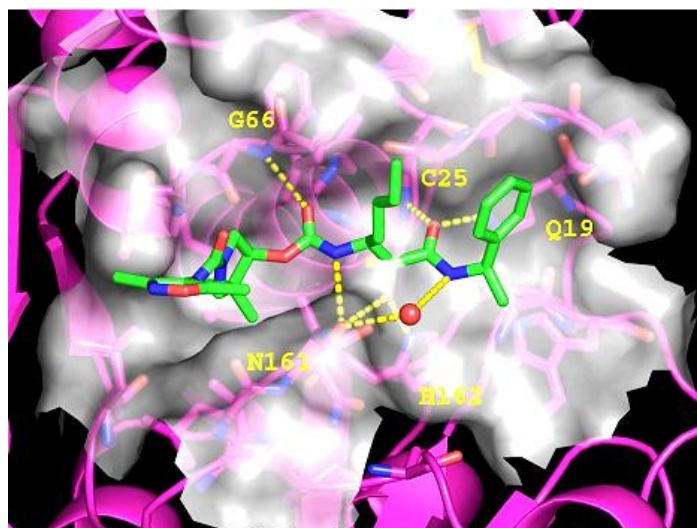
Σχήμα 2.13: Παραδείγματα α-κετοαμιδικών ενώσεων που έχουν δοκιμαστεί για την ανασταλτική τους δράση.

Από κρυσταλλογραφικές μελέτες διαφορετικών αναστολέων στο ενεργό κέντρο της καθεψίνης, έχει επισημανθεί ο πανομοιότυπος τρόπος πρόσδεσης των ενώσεων μέσω της α-κετοαμιδικής ομάδας. Αρχικά, η ερευνητική ομάδα Tavares *et al.*¹⁷⁸ πραγματοποίησε κρυσταλλογραφική μελέτη του συμπλόκου ενζύμου-υποκαταστάτη, από την οποία φαίνεται ότι η α-κετοαμιδική ομάδα συμμετέχει στην πρόσδεση του αναστολέα, δημιουργώντας δεσμούς υδρογόνου στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου (Εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3: Κρυσταλλογραφική μελέτη του α-κετοαμιδικού αναστολέα στο ενεργό κέντρο της καθεψίνης K με ανάλυση 2,2 Å.

Στη συνέχεια, η ερευνητική ομάδα Barrett *et al.*¹⁷⁹ διεξήγαγε κρυσταλλογραφική μελέτη ενός ακόμα α-κετοαμιδικού αναστολέα στο ενεργό κέντρο της καθεψίνης K. Από την κρυσταλλογραφική αυτή μελέτη φαίνονται οι δεσμοί υδρογόνου που δημιουργούν το α-καρβονύλιο και το αμίδιο με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου καθώς και η αλληλεπίδραση της αμιδικής -NH με ένα μόριο νερού (Εικόνα 2.4).

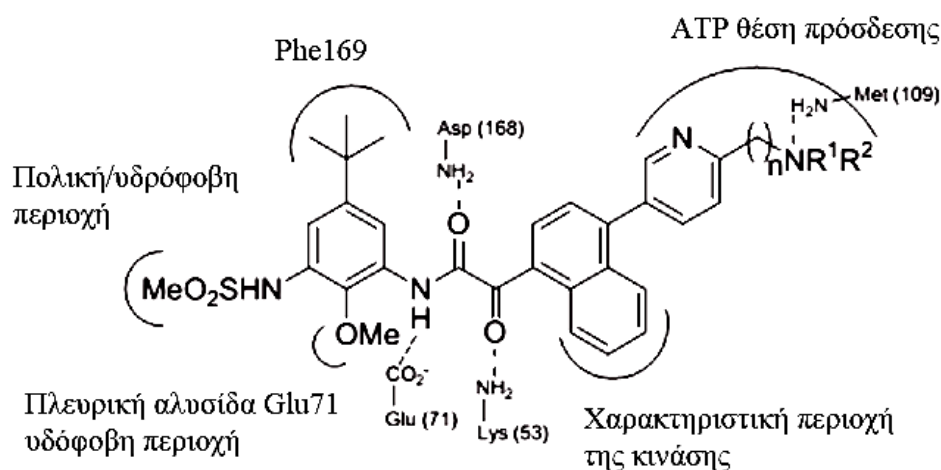


Εικόνα 2.4: Κρυσταλλογραφική μελέτη της καθεψίνης K με ένα α-κετοαμιδικό αναστολέα στο ενεργό κέντρο (PDB: 2BDL).

α-Κετοαμιδικοί αναστολείς έχουν συντεθεί και για την καθεψίνη S με πολύ καλά αποτελέσματα σε κυτταρικό επίπεδο.¹⁸⁰

2.2.4 Αναστολείς της κινάσης (MAP) p38

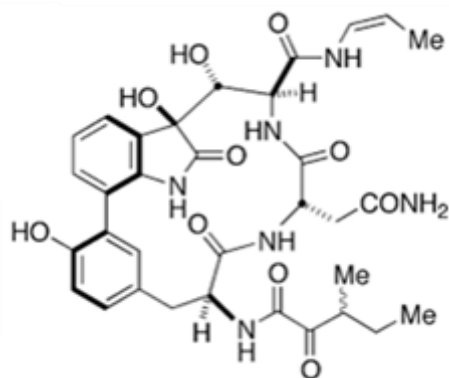
Η ερευνητική ομάδα Larson *et al.*^{181,182,183} έχει σχεδιάσει και συνθέσει α-κετοαμιδικά παράγωγα ως αναστολείς της πρωτεϊνικής κινάσης (MAP) p38.¹⁸⁴ Η σχεδίαση βασίστηκε στη δομή του γνωστού αναστολέα BIRB-796¹⁸⁵ στον οποίο η βασική λειτουργική ομάδα αντικαταστάθηκε από την α-κετοαμιδική και ακολούθησε μια πορεία υπολογιστικών μελετών της μοριακής πρόσδεσης υποψήφιων αναστολέων. Από αυτή την πορεία προέκυψαν α-κετοαμιδικά παράγωγα που έδωσαν ισχυρή αναστολή, ενώ ταυτόχρονα είχαν τη χημική ευελιξία και το επιθυμητό ADME προφίλ ιδιοτήτων. Από την υπολογιστική μελέτη αυτών των ενώσεων προτάθηκε ο τρόπος αλληλεπίδρασής τους με το ενεργό κέντρο της p38 (Σχήμα 2.14) από όπου φαίνεται ο ενεργός ρόλος της α-κετοαμιδικής ομάδας στη δημιουργία δεσμών υδρογόνου.



Σχήμα 2.14: Προτεινόμενος τρόπος πρόσδεσης των α -κετοαμιδικών παραγώγων σε αλλοστερικό κέντρο της p38 MAP κινάσης.

2.2.5 Αναστολείς του πεπτιδικού πρωτεασώματος

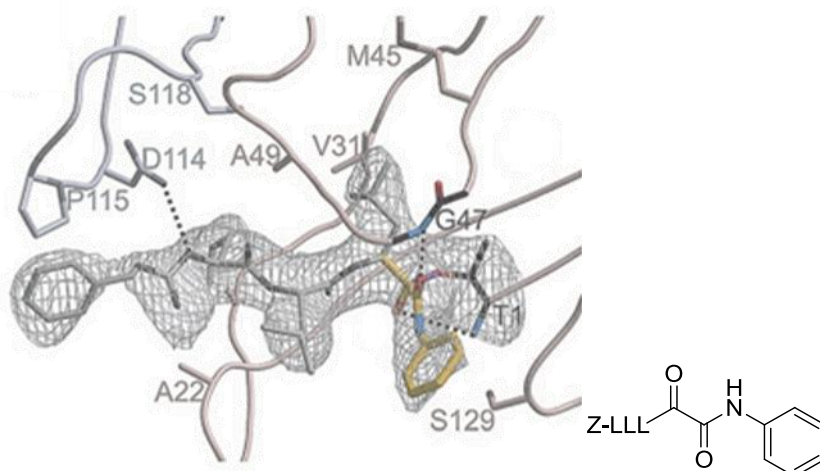
Το πεπτιδικό πρωτεάσωμα είναι μια πρωτεάση που καταλύει πολλές αντιδράσεις μέσα στο κύτταρο. Η ένωση TMC-95 A-D (**18**, Σχήμα 2.15), η οποία απομονώνεται από την *Apiospora montagnei* Sacc. TC 1093, περιέχει την α -κετοαμιδική ομάδα και εμφανίζει αναστολή έναντι της πρωτεάσης.¹⁸⁶



18

Σχήμα 2.15: Δομή της TMC-95 A-D.

Σύνθεση ενώσεων με πιθανή ανασταλτική δράση έναντι της πρωτεάσης, έδειξε ότι τα α-κετοαμιδικά ανάλογα είχαν ισχυρότερη δράση. Ακόμα, η προσομοίωση της μοριακής πρόσδεσης αυτών των ενώσεων έδειξε ότι το α-κετοαμίδιο σταθεροποιεί ενθαλπικά το σύμπλοκο ένωσης-ενζύμου, μέσω ενός δικτύου αλληλεπιδράσεων van der Waals και δεσμών υδρογόνου με τα αμινοξέα SER129 και TYR168 (Εικόνα 2.5).¹⁸⁷



Εικόνα 2.5: Πιθανός τρόπος πρόσδεσης 2-οξαμιδικών αναστολέων στο ενεργό κέντρο του πεπτιδικού πρωτεασώματος.

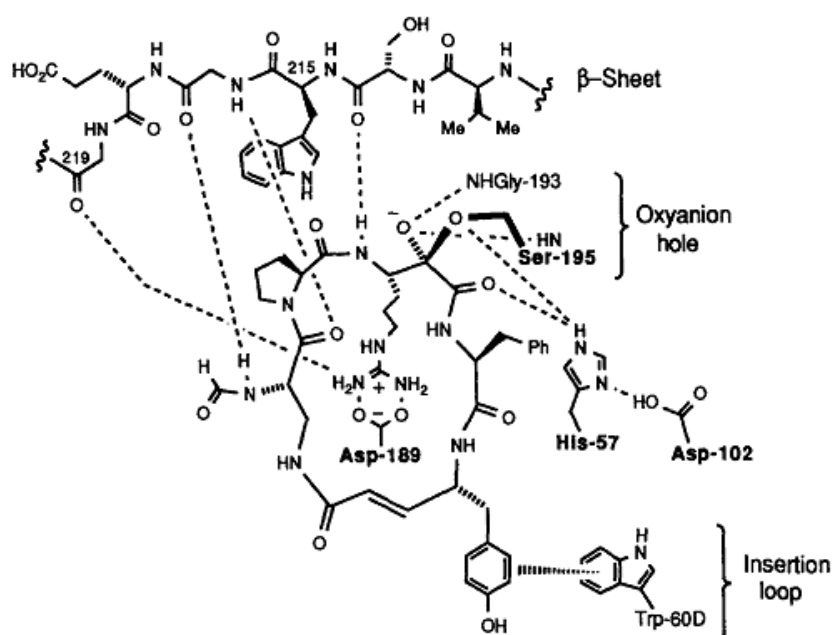
2.2.6 Αναστολείς των πρωτεασών της σερίνης

2.2.6.1 Αναστολείς της θρομβίνης και του παράγοντα Χα

Τόσο το ερευνητικό τμήμα της φαρμακοβιομηχανίας Merck¹⁸⁸ όσο και της Corvas¹⁸⁹ έχουν χρησιμοποιήσει τα παράγωγα των α-κετοαμιδίων για τη

σύνθεση ενώσεων με δράση ενάντια της θρομβίνης και του παράγοντα Χα. Επίσης, η ένωση CtA, εκχύλισμα του ιαπωνικού θαλάσσιου σπόγγου *Theonella sp.*, καθώς και ανάλογα κυκλικά αμιδικά πενταπεπτίδια της ένωσης, έχουν μελετηθεί για την ανασταλτική δράση τους στη θρομβίνη.^{190,191,192}

Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες του συμπλέγματος ένωσης CtA - ενζύμου¹⁹³ αλλά και άλλων α-κετοαμιδικών παραγώγων στο ενεργό κέντρο,¹⁹⁴ επιβεβαίωσαν ότι η α-κετοαμιδική ομάδα λειτουργεί ως ανάλογο του τετραεδρικού ενδιάμεσου μέσω της αλληλεπίδρασής της με την καταλυτική σερίνη (Σχήμα 2.16).

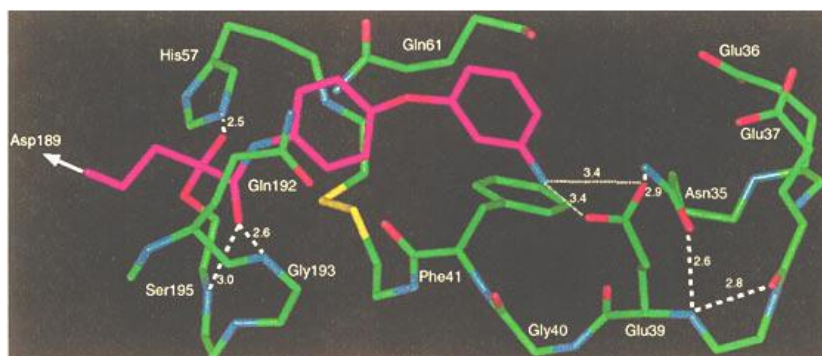


Σχήμα 2.16: Οι αλληλεπιδράσεις CtA – θρομβίνης όπως περιγράφηκαν στην κρυσταλλογραφική μελέτη.

Επιπρόσθετα, η σύνθεση αναλόγων της CtA στα οποία η α-κετο ομάδα είχε αντικατασταθεί από την αντίστοιχη α-υδροξυομάδα δεν είχαν καμία βιολογική δράση, αποδεικνύοντας τον καταλυτικό ρόλο του α-καρβονυλίου στην αναστολή του ενζύμου.¹⁹⁵

Ο τρόπος που αλληλεπιδρά η α-κετοαμιδική ομάδα με τη θρομβίνη, φαίνεται να επαληθεύεται και στην περίπτωση της σύμπλεξης τέτοιων αναλόγων με τον παράγοντα Χα (fXa) - μια πρωτεάση της σερίνης.^{196,197} Οι μελέτες της μοριακής πρόσδεσης αυτών των παραγώγων δείχνουν ότι το α-καρβονύλιο

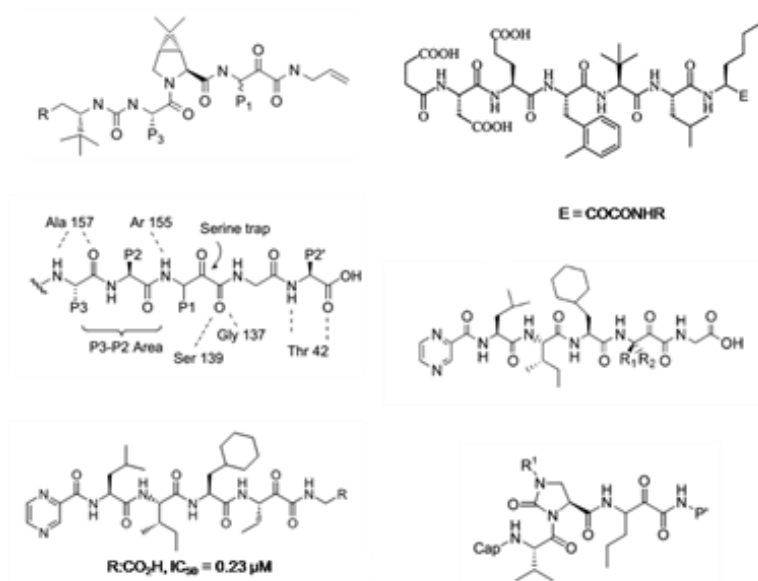
αλληλεπιδρά με τη SER195 ενώ και το οξυγόνο του αμιδίου σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου στο ενεργό κέντρο του fXa (Εικόνα 2.6).



Εικόνα 2.6: Μοριακή μοντελοποίηση μιας α-κετοαμιδικής ένωσης (ροζ) στο ενεργό κέντρο του fXa (πράσινο).

2.2.6.2 Αναστολείς της ηπατίτιδας C

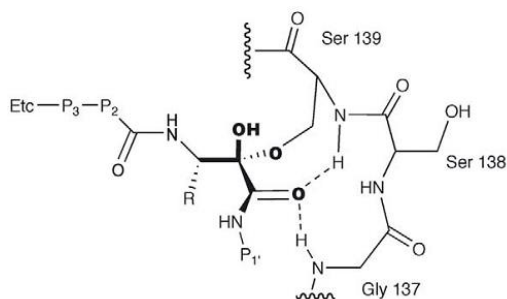
Αρκετές ενώσεις παράγωγα των α-κετοαμιδικών ομάδων έχουν συντεθεί ως πιθανοί αναστολείς της πρωτεάσης της ηπατίτιδας C (HCV) (Σχήμα 2.17).^{198,199,200,201,202,203,204,205,206,207,208,209}



Σχήμα 2.17: Ομάδες ενώσεων που έχουν δοκιμαστεί για τη δράση τους έναντι της πρωτεάσης της ηπατίτιδας C.

Κρυσταλλογραφικές μελέτες από τα συμπλέγματα της πρωτεΐνης με τους α-κετοαμιδικούς αναστολείς δείχνουν το σχηματισμό του ενδιάμεσου αναλόγου από την πυρηνόφιλη προσβολή της καταλυτικής σερίνης στο α-καρβονύλιο

(Σχήμα 2.18). Δηλαδή, δημιουργείται ένας ομοιοπολικός δεσμός μεταξύ της καταλυτικής σερίνης και του α-καβονυλίου, ενώ το ανιόν που προκύπτει σταθεροποιείται με έναν δεσμό υδρογόνου με την ιστιδίνη που βρίσκεται σε χωρική εγγύτητα στο ενεργό κέντρο.^{210,211,212,213,214,215,216,217,218}

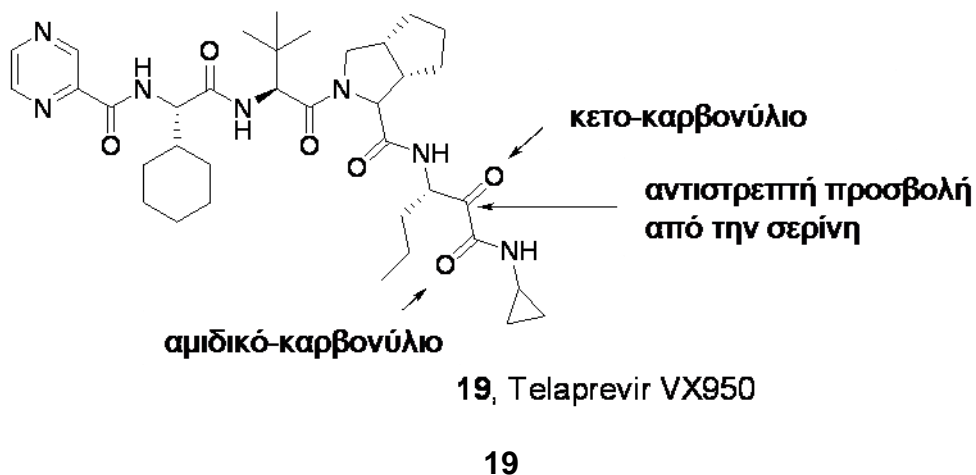


Σχήμα 2.18: Τρόπος πρόσδεσης ενός α-κετοαμιδικού παραγώγου στο ενεργό κέντρο της πρωτεάσης της HCV NS3/4A.

Τα α-κετοαμιδικά παράγωγα προσδένονται ισχυρά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και αυτό φαίνεται και από τον υπολογισμό των σταθερών K_i .^{219,220,221}

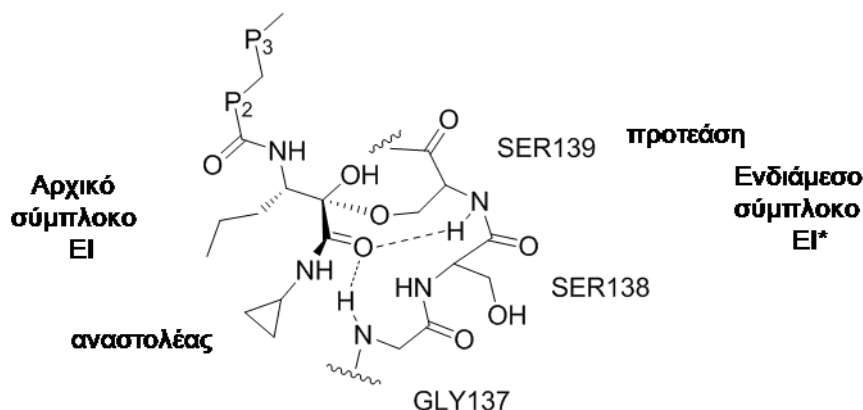
Υπάρχουν τουλάχιστον δύο ευθύγραμμα α-ακετοαμιδικά παράγωγα τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί ως φαρμακευτικά σκευάσματα για την αντιμετώπιση της ηπατίτιδας C. Είναι αναστολείς που προσδένονται αργά και αντιστρεπτά στο ενεργό κέντρο της NS3/4A πρωτεάσης.

Ο ένας είναι το φάρμακο Incivek (**19**, Telaprevir VX950, Σχήμα 2.19)^{222,223} που συντέθηκε το 2000 μέσα στα πλαίσια ενός ερευνητικού προγράμματος συνεργασίας μεταξύ των εταιριών Eli Lilly (Indianapolis) και Vertex. Τα αποτελέσματα της δράσης αυτής της ένωσης παρουσιάζονται συνοπτικά από τους Chen *et al.*²²⁴ ενώ υπάρχουν και πιο αναλυτικές ανασκοπήσεις από άλλους ερευνητές.^{225,226,227,228}



Σχήμα 2.19: Δομή του Telaprevir.

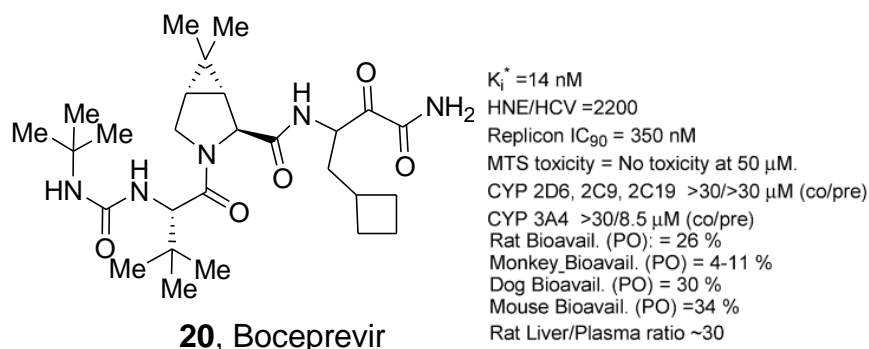
Ο τρόπος της πρόσδεσης του φαρμάκου στο ενεργό κέντρο του ενζύμου γίνεται σε δύο βήματα. Αρχικά δημιουργείται ένα ενδιάμεσο παροδικό σύμπλεγμα μεταξύ της ένωσης και του ενζύμου, το οποίο σταδιακά διευθετείται σε ένα σταθερό σύμπλεγμα με τη δημιουργία ενός ομοιοπολικού δεσμού (Σχήμα 2.20).^{229,230,231,232}



Σχήμα 2.20: Αλληλεπιδράσεις που σχηματίζονται κατά την πρόσδεση του Telaprevir στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.

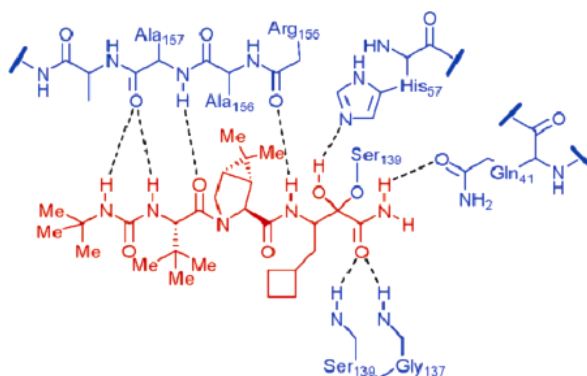
Από το 2011, το Telaprevir κυκλοφορεί σε Αμερική, Ευρώπη και Ιαπωνία.²³³ Ωστόσο, λόγω των παρενεργειών που είχε, προτάθηκε η σταδιακή αντικατάστασή του από μια ανάλογη ένωση, το Bosceprevir. Επίσης, λόγω της δυνατότητας εφαρμογής εναλλακτικών θεραπειών της ηπατίτιδας πλέον, από τον Οκτώβριο του 2014 η Vertex σταμάτησε τη διάθεση του φαρμάκου στις ΗΠΑ.

Το φάρμακο Victrelis (**20**, Bocicprevir SCH 503034, Σχήμα 2.21)^{234,235} που διατίθεται από τη φαρμακοβιομηχανία Merck, είναι μια ευθύγραμμη α-κετοαμιδική ένωση, η οποία χρησιμοποιείται, σε συνδυασμό με άλλα φαρμακευτικά σκευάσματα, στη θεραπεία της χρόνιας HCV G1. Διατίθεται σε κάψουλα και η χορήγησή της γίνεται από το στόμα.

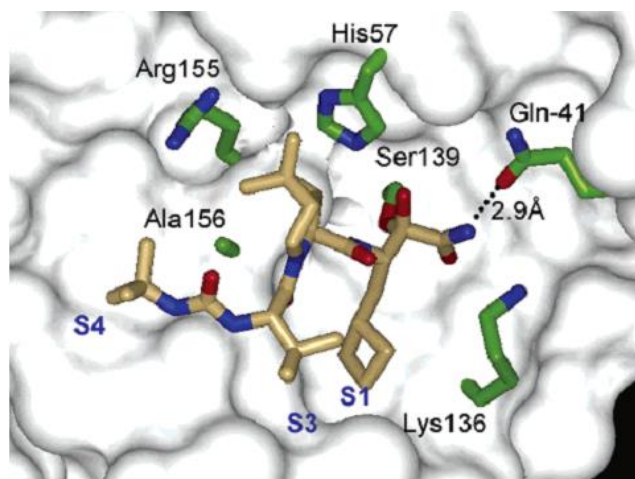


Σχήμα 2.21: Δομή και χαρακτηριστικά του Victrelis (Bocicprevir).

Χρησιμοποιείται ως αναστολέας της NS3 πρωτεάσης και ο τρόπος πρόσδεσης του φαρμάκου γίνεται μέσω της α-κετοομάδας, όπως έχει περιγραφεί από κρυσταλλογραφικές μελέτες (Σχήμα 2.22) (Εικόνα 2.7).^{236,237}



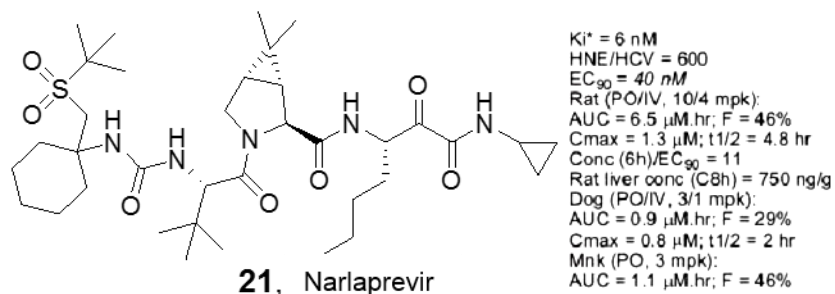
Σχήμα 2.22: Σχηματική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων που δημιουργούνται μεταξύ του Bocicprevir και του ενεργού κέντρου της NS3 πρωτεάσης κατά την πρόσδεση.



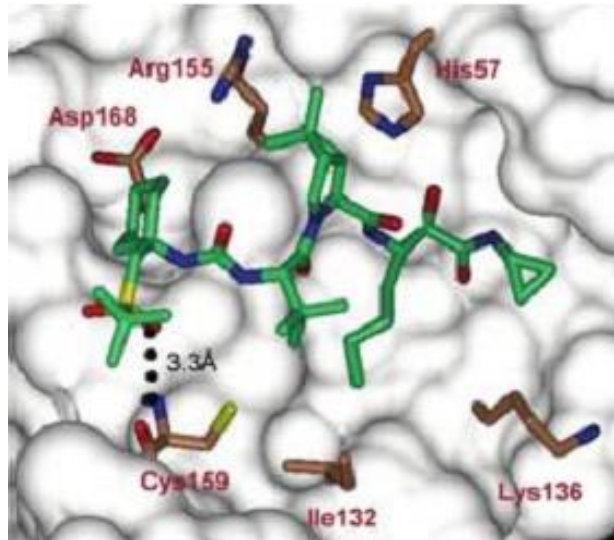
Εικόνα 2.7: Αποτελέσματα της κρυσταλλογραφικής μελέτης του συμπλέγματος Bocsepvir - NS3 πρωτεάσης.

Λόγω των εναλλακτικών θεραπειών που είναι πλέον διαθέσιμες, για την ηπατίτιδα C, η Merck έχει ανακοινώσει τη διακοπή της κυκλοφορίας του φαρμάκου στην ΗΠΑ από τον Δεκέμβριο του 2015 μέχρι σήμερα.

Στο στάδιο III των κλινικών ερευνών βρίσκεται ένα ακόμα ευθύγραμμο ακετοαμιδικό παράγωγο, το Narlaprevir (**21**, SCH 900518) (Σχήμα 2.23, Εικόνα 2.8).²³⁸



Σχήμα 2.23: Δομή και χαρακτηριστικά του Narlaprevir.



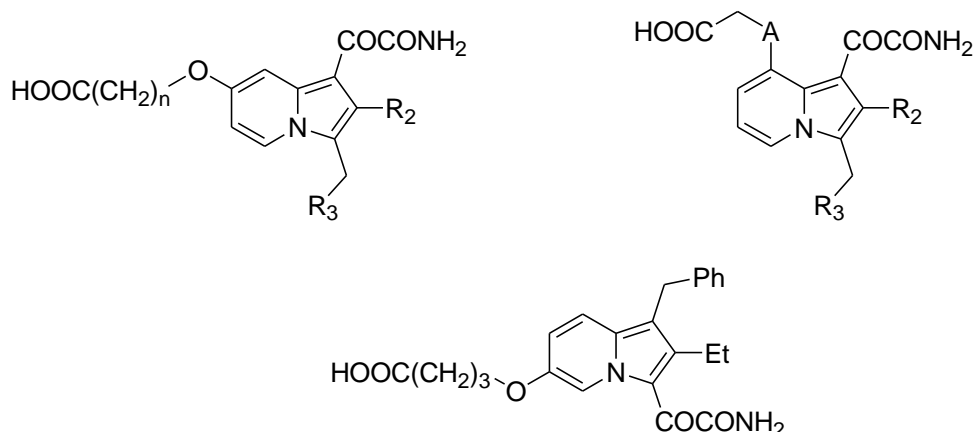
Εικόνα 2.8: Κρυσταλλογραφική μελέτη του συμπλέγματος Narlaprevir - NS3/4A πρωτεάσης.

2.2.7 Αναστολείς των φωσφολιπασών A₂

Στο καταλυτικό κέντρο των φωσφολιπασών A₂ περιέχεται είτε μια σερίνη είτε μια ιστιδίνη, ενώ μερικές από αυτές περιλαμβάνουν και ένα ιόν ασβεστίου, το οποίο συμμετέχει στην πρόσδεση του αναστολέα.

Έχουν συντεθεί ινδολικά α-κετοαμιδικά παράγωγα τα οποία μπορούν να αναστείλουν τη δράση ορισμένων εκκριτικών sPLA₂. Η ερευνητική ομάδα Draheim *et al.*¹⁰⁷ συνέθεσε μια σειρά από υποκατεστημένα ινδόλια, με δραστικότερα εκείνα που έφεραν την α-κετοαμιδική ομάδα ως υποκαταστάτη. Από αυτές τις ενώσεις, η LY315920 (Varespladib) εμφάνισε ισχυρή και εκλεκτική δράση²³⁹ και έφτασε μέχρι το στάδιο II των κλινικών δοκιμών. Η ερευνητική ομάδα της φαρμακευτικής εταιρίας Eli Lilly & Co. σε συνεργασία με τη Shionogi & Co., Ltd., προσπαθώντας να βελτιώσει το φαρμακολογικό προφίλ της LY315920, προχώρησε στη σύνθεση της LY333013 (Varespladib methyl).

Η ομάδα Hagishita *et al.*²⁴⁰ συνέθεσε παράγωγα της ένωσης Varespladib (Σχήμα 2.24) με καλά βιολογικά αποτελέσματα. Ωστόσο, οι ενώσεις αυτές δεν ήταν σταθερές στο οξυγόνο της ατμόσφαιρας.

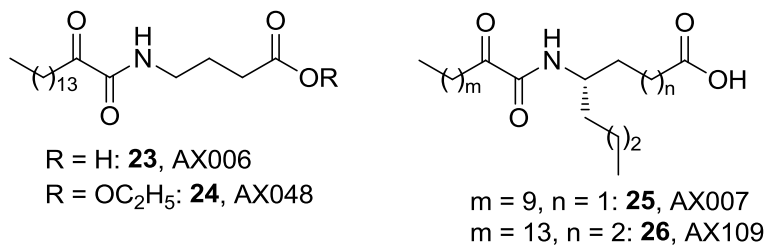


22

Σχήμα 2.24: Ενώσεις που σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν από τους Hagishita *et al.*

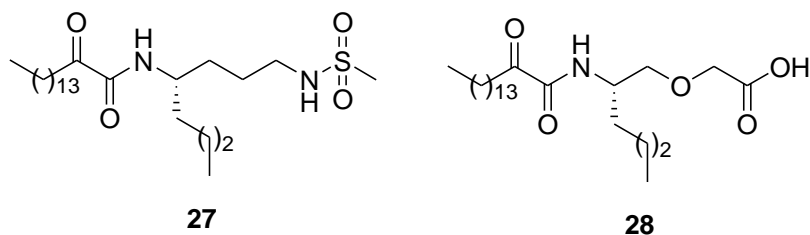
Κατά την ταυτοποίηση ενζύμων που ανήκουν στις φωσφολιπάσες (GI, GII, GV, GX, GXII sPLA₂) από την ομάδα του Gelb²⁴¹ η ένωση Me-Indoxam έδειξε να έχει ισχυρή αναστολή. Με βάση τις ενώσεις Me-Indoxam, Varespladib και Varespladib methyl έγινε εκτενής σχεδίαση και σύνθεση α-κετοαμιδικών παραγώγων προκειμένου να βρεθούν νέοι ισχυροί και εκλεκτικοί αναστολείς.^{242,243}

Η ερευνητική ομάδα του καθ. Γ. Κόκοτου στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών έχει αναπτύξει καινοτόμα α-κετοαμιδικά παράγωγα που αναστέλλουν την κυτοσολική cPLA₂. Το 2002 αναφέρθηκαν οι ενώσεις AX006 (**23**, Σχήμα 2.25) και AX007 (**25**, Σχήμα 2.25) για την αναστολή της δράσης της κυτοσολικής φωσφολιπάσης GIVA.^{244,245} Οι ενώσεις AX007 και AX109 (**26**, Σχήμα 2.25) αναστέλλουν εκλεκτικά τη φωσφολιπάση GIVA ενώ οι αντίστοιχοι εστέρες αναστέλλουν και τη GVIA.^{246,247,248} Η ένωση AX048 (**24**, Σχήμα 2.25) έδειξε να έχει *in vitro* αναλγητική δράση, καταστέλλοντας την παραγωγή της PGE₂.²⁴⁹ Με τη βοήθεια της τεχνικής της φασματομετρίας μάζας ανταλλαγής υδρογόνου/δευτερίου και προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής διαπιστώθηκε ότι ο αναστολέας AX007 προσδένεται στο ενεργό κέντρο της φωσφολιπάσης GIVA και αναπτύσσει αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου.²⁵⁰



Σχήμα 2.25: Δομή των 2-οξοαμιδικών αναστολέων της GIVA cPLA₂.

Από μελέτες βελτιστοποίησης της δομής αυτών των ενώσεων, προέκυψαν δύο ακόμα ενώσεις, η **27** και η **28** με ισχυρή ανασταλτική δράση.^{251,252}



Επίσης, σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν α-κετοαμιδικά παράγωγα φυσικών α-αμινοξέων. Από αυτά, η ένωση **7** (GK126, Σχήμα 1.1) είχε την ισχυρότερη δράση αναστολής των εκκριτικών φωσφολιπασών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

In silico ΘΕΩΡΗΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

3.1 Γενικά για τις υπολογιστικές τεχνικές

Ο όρος *in silico* (λατινικά: *in silicon*) αναφέρεται στη μάζα του πυριτίου που χρησιμοποιείται για την κατασκευή των ημιαγωγών από τα οποία κατασκευάζονται τα μικροκυκλώματα (chips) των ηλεκτρονικών υπολογιστών. Η έκφραση χρησιμοποιείται για να δηλώσει ότι κάτι υπολογίστηκε με τη βοήθεια υπολογιστή ή προσομοιώθηκε σε υπολογιστή.

In silico τεχνικές πρόσδεσης χρησιμοποιούνται για να διερευνήσουν τη συμπληρωματικότητα σε μοριακό επίπεδο ενός υποκαταστάτη και μιας πρωτεΐνης στόχου. Έτσι, τεχνικές προσομοίωσης της πρόσδεσης (docking) μπορούν να χρησιμοποιηθούν προκειμένου να ταυτοποιηθούν τα δομικά χαρακτηριστικά που είναι σημαντικά για την πρόσδεση ενός μορίου. Επιπρόσθετα, οι τεχνικές προσομοίωσης έχουν χρησιμοποιηθεί για την *in silico* σάρωση εικονικών βάσεων δεδομένων που περιέχουν οργανικές ενώσεις, προκειμένου να βρεθεί κατάλληλος προσδέτης. Οι τρόποι εφαρμογής όλων των προαναφερθέντων τεχνικών έχουν ερευνηθεί εκτεταμένα.²⁵³

Οι θεωρητικές μελέτες προσομοίωσης της πρόσδεσης εκτελούνται προκειμένου να υπολογιστούν και να ερευνηθούν οι αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται σε μοριακό επίπεδο. Για να εκτελεστούν αυτοί οι θεωρητικοί υπολογισμοί, απαραίτητη είναι η γνώση της τρισδιάστατης δομής τόσο των πρωτεϊνών όσο και των υποψήφιων αναστολέων. Ευτυχώς, σήμερα τέτοιες πληροφορίες αντλούνται και είναι διαθέσιμες με τη βοήθεια τεχνικών όπως είναι ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR) και η κρυσταλλογραφία ακτινών Χ.

Οι τεχνικές προσομοίωσης της πρόσδεσης είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για τη διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεΐνης-αναστολέα. Μέσω αυτών, αποκαλύπτεται η συμπληρωματικότητα μεταξύ των δομικών χαρακτηριστικών των πρωτεϊνών-στόχων και των δομικών χαρακτηριστικών

των προσδεμένων αναστολέων. Με την εφαρμογή των αλγόριθμων παράγεται ένας αριθμός πιθανών διαμορφώσεων (docking poses) του αναστολέα στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης στόχου. Στη συνέχεια, με τη χρήση εξισώσεων για τη βαθμονόμηση (scoring functions) των αλληλεπιδράσεων που προκύπτουν μεταξύ αναστολέα και ενεργού κέντρου, μπορούν να προβλεφθούν οι ενεργειακά ευνοϊκές από αυτές τις διαμορφώσεις και άρα ο πιθανός τρόπος πρόσδεσης της ένωσης.

Επίσης, έχει γίνει χρήση αυτοματοποιημένων μεθόδων για την προσομοίωση βάσεων δεδομένων με δομές υποψήφιων αναστολέων στο ενεργό κέντρο μιας πρωτεΐνης στόχου. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να μελετηθούν πιο εύκολα τα δομικά χαρακτηριστικά των ενώσεων, που είναι υπεύθυνα για την αποτελεσματική πρόσδεση.

Τα θεωρητικά πειράματα προσομοίωσης της πρόσδεσης ενώσεων στο ενεργό κέντρο μίας πρωτεΐνης-στόχου μπορούν να παράγουν μια μεγάλη βάση αποτελεσμάτων, τα οποία θα πρέπει να μελετηθούν προσεχτικά. Η ακρίβεια των πειραμάτων προσομοίωσης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον αλγόριθμο που θα χρησιμοποιηθεί κατά τη διάρκεια του πειράματος και από την εξίσωση βαθμονόμησης.^{254,255} Διαφορετικοί συνδυασμοί από αλγόριθμους και εξισώσεις βαθμονόμησης έχουν εφαρμοστεί σε συστήματα πρωτεΐνης-αναστολέα και τα αποτελέσματα διαφέρουν ως προς την ακρίβεια τους και την επιτυχία τους. Αυτές οι διαφοροποιήσεις εξαρτώνται από το πρωτεϊνικό σύστημα και τις φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ στόχου-αναστολέα.^{256,257,258} Αυτό συνιστά ότι η επιλογή των δύο παραγόντων θα πρέπει να γίνεται με βάση το προς εξέταση σύστημα.

Επίσης, άλλοι παράγοντες όπως είναι ευκίνησια της πρωτεΐνης και του αναστολέα καθώς και η συμμετοχή μορίων νερού στα πειράματα προσομοίωσης, έχουν αποτελέσει αντικείμενο μελέτης.^{259,260}

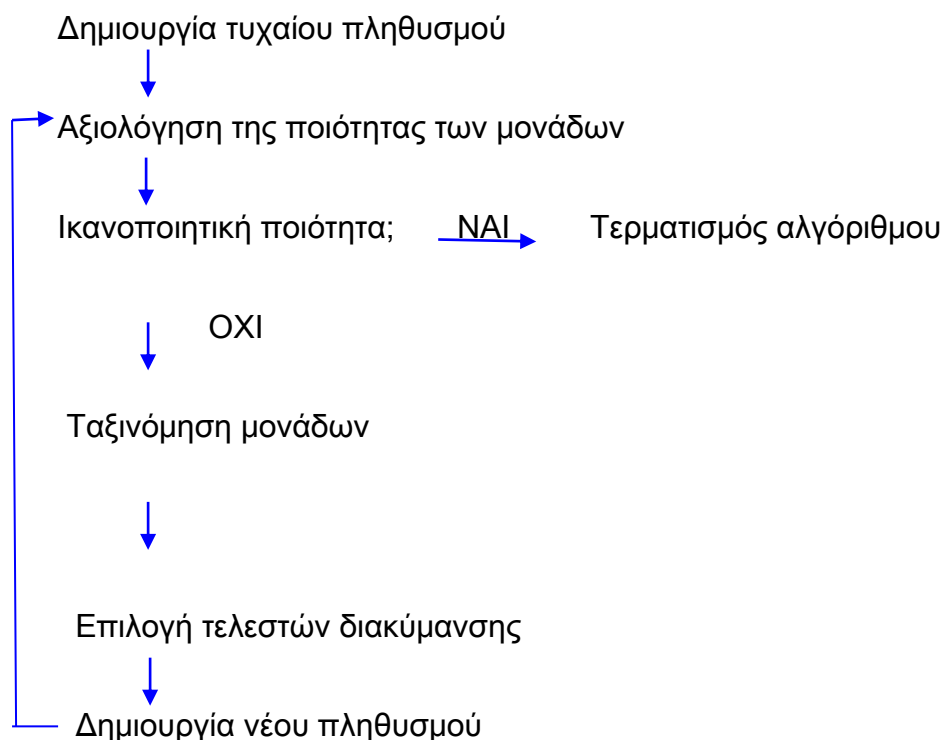
3.2 Το πρόγραμμα προσομοίωσης της μοριακής πρόσδεσης GOLD

3.2.1 Ο γενετικός αλγόριθμος

Το πρόγραμμα GOLD (**G**enetic **O**ptimization for **L**igand **D**ocking), το οποίο χρησιμοποιήσαμε κατά κύριο λόγο για τα πειράματα της προσομοίωσης της μοριακής πρόσδεσης, λειτουργεί με βάση γενετικό αλγόριθμο (GA, Genetic Algorithm).

Γενικά, οι αλγόριθμοι που πραγματοποιούν τη βελτιστοποίηση μιας συνάρτησης και βασίζονται στην εξελικτική θεωρία του Δαρβίνου ονομάζονται εξελικτικοί αλγόριθμοι. Αυτοί οι αλγόριθμοι επεξεργάζονται ένα σύνολο πιθανών λύσεων (*μονάδες*) και επιλέγουν συγκεκριμένες *μονάδες* για την περαιτέρω επεξεργασία. Η επιλογή γίνεται με βάση την τιμή της *ποιότητας* (*fitness value*) αυτών των *μονάδων*, η οποία περιγράφεται από το περιβάλλον. Το πιο διαδεδομένο είδος εξελικτικού αλγόριθμου είναι ο γενετικός αλγόριθμος (Holland 1975, Goldberg 1989).

Η βασική λειτουργία του γενετικού αλγόριθμου έχει περιγραφεί από τον Whitley.²⁶¹ Η *μονάδα* (*individual*) είναι ένα σημείο στο χώρο αναζήτησης και ο *γενότυπος* του (*genotype*) είναι η σειρά των αριθμών (ή το διάγραμμα) που την περιγράφει. Ο *φαινότυπος* (*phenotype*) είναι το σύνολο από τα γνωρίσματα της *μονάδας* και η *ποιότητα* (*fitness*) είναι η τιμή της συνάρτησης που αντιστοιχεί στη *μονάδα*. Ο *πληθυσμός* (*population*) είναι απλά το σύνολο των *μονάδων*. Αρχικά, στον αλγόριθμο επιλέγεται ο *πληθυσμός* των (συνήθως τυχαίων) *μονάδων* που θα αποτελέσουν την πρώτη *γενεά* (*generation*) και στη συνέχεια ξεκινάει ένας κύκλος παραγωγής της *n* *γενεάς* των *μονάδων*, από την προηγούμενη. Κάθε *γενεά* έχει το ίδιο σταθερό μέγεθος. Ένας κύκλος του αλγόριθμου εκτελεί μία *επιλογή* (*selection*) εφαρμόζοντας τους τελεστές διακύμανσης (*variation operators*) στις *μονάδες* του παρόντος *πληθυσμού*. Με τον τρόπο αυτό ο *πληθυσμός* εξελίσσεται καθώς η διαδικασία της επιλογής, ευνοεί τις *μονάδες* με ικανότητα αναπαραγωγής συχνότερη από τις άλλες του *πληθυσμού* (Σχήμα 3.1).



Σχήμα 3.1: Λειτουργία του γενετικού αλγόριθμου.

3.2.2 Χαρακτηριστικά του προγράμματος

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων προσομοίωσης με το πρόγραμμα GOLD, επιτρέπεται η πλήρης ευελιξία του αναστολέα και η μερική ευελιξία της πρωτεΐνης, κυρίως στο ενεργό κέντρο. Αυτή η κατηγορία αλγόριθμων είναι υπολογιστικές διαδικασίες που επιτρέπουν την άμεση ταυτοποίηση των ικανοποιητικών, αλλά όχι απαραίτητα βέλτιστων λύσεων σε προβλήματα πρόσδεσης. Υπάρχουν αρκετές αναφορές σχετικά με τη χρήση αυτών των αλγόριθμων για την επίλυση συνδυαστικών, ως προς την ευελιξία, προβλημάτων πρόσδεσης.^{262,263} Ο αλγόριθμος αυτός έχει χρησιμοποιηθεί τόσο σε μικρά μόρια^{264,265,266} όσο και σε μακρομόρια^{267,268} με επιτυχία στη διαμορφωτική ανάλυσή τους.

Επίσης, η απουσία των προσδεμένων μορίων νερού στην επιφάνεια του προσδέτη κατά την διάρκεια των πειραμάτων προσομοίωσης, φαίνεται να μην επηρεάζει την ικανότητα του αλγόριθμου ώστε να προβλεφθεί σωστά ο τρόπος πρόσδεσης του φαρμάκου. Αυτό, συνεπάγεται τη δυνατότητα αντικατάστασης των μορίων νερού από το φάρμακο και σε συνδυασμό με

κάποιον στερικό όρο, έχει ως αποτέλεσμα την εξεύρεση ενός μοτίβου αλληλεπιδράσεων μεταξύ αναστολέα και ενεργού κέντρου που είναι ενεργειακά οι ευνοϊκότερες.²⁶⁹

Στον γενετικό αλγόριθμο που χρησιμοποιείται κατά την πραγματοποίηση των πειραμάτων προσομοίωσης της μοριακής πρόσδεσης με τη χρήση του προγράμματος GOLD, εξετάζονται όλες τις διαφορετικές διαμορφώσεις του αναστολέα. Αυτές είναι αποτέλεσμα της πλήρους ευελιξίας των άκυκλων και της μερικής ευελιξίας των κυκλικών τμημάτων του αναστολέα καθώς και της μερικής ευελιξίας του τμήματος της πρωτεΐνης που είναι κοντά στο ενεργό κέντρο.²⁷⁰ Οι ομάδες -OH και -NH₃⁺ της πρωτεΐνης είναι ευέλικτες. Ο αλγόριθμος λειτουργεί με βάση κωδικοποιημένα μοτίβα δεσμών υδρογόνου προκειμένου να ερευνηθεί ο διαθέσιμος χώρος για την πρόσδεση.

Ο γενετικός αλγόριθμος που χρησιμοποιείται από το πρόγραμμα GOLD έχει επιτυχία 71% στην πρόβλεψη της σωστής διαμόρφωσης του αναστολέα κατά την πρόσδεση του στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης. Η αυξημένη ευελιξία ή το μεγάλο μέγεθος του αναστολέα μπορεί να δράσουν αρνητικά στη σωστή πρόβλεψη καθώς και οι δύο παράγοντες αποτελούν δείκτες της πολυπλοκότητας του προβλήματος. Επίσης, ο αλγόριθμος έχει περισσότερες πιθανότητες επιτυχίας όταν ο αναστολέας είναι φορτισμένος παρά όταν είναι υδρόφοβος. Αυτό συμβαίνει για δυο λόγους. Πρώτον, όταν ο αναστολέας είναι φορτισμένος, ο αλγόριθμος κάνει χρήση των μοτίβων για τις πιθανές αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου και καταλήγει πιο εύκολα στη λύση. Και δεύτερον, δεν υπάρχει στην εξίσωση βαθμονόμησης κάποιος παράγοντας που να εκτιμά τη συνεισφορά από την υδροφοβικότητα με συνέπεια αυτή να μην συμψηφίζεται σωστά για τη διαμόρφωση του τελικού αθροίσματος.

Σχετικά με την πρωτεΐνη, όταν η ανάλυση της κρυσταλλογραφικής μελέτης είναι μεγαλύτερη από 2,5 Å τότε η επιτυχία του αλγόριθμου είναι 77% ενώ σε χαμηλότερης ευκρίνειας κρυσταλλογραφικές αναλύσεις το ποσοστό επιτυχίας ελαττώνεται στο 52%. Ο αλγόριθμος έχει συγκεκριμένα κριτήρια για τις αποδεκτές γεωμετρίες, όπως μήκη δεσμών και γωνίες. Έτσι, όταν μια κρυσταλλογραφική μελέτη χαμηλής ανάλυσης παρουσιάζει μη αποδεκτές γεωμετρίες, υπάρχει πιθανότητα οι λύσεις που θα παραχθούν να μην

αναπαράγουν τη διαμόρφωση του αναστολέα όπως αυτός έχει κρυσταλλογραφηθεί.

Μια ακόμα αδυναμία του αλγόριθμου είναι η πρόβλεψη γεωμετριών οι οποίες δεν υπάρχουν μέσα στη βάση δεδομένων πάνω στην οποία βασίστηκε η δόμησή του. Για παράδειγμα, μια σπάνια κρυσταλλογραφική διαμόρφωση που δεν υπάρχει στην κρυσταλλογραφική βάση δεδομένων του Cambridge (Cambridge Structural Database)²⁷¹ δεν θα αναπαραχθεί από τον αλγόριθμο.

3.2.3 Λειτουργία του αλγόριθμου GOLD

Τα μέρη του προγράμματος έχουν περιγραφεί από τους Jones *et al.*^{269,269} Όπως και άλλα παρόμοια προγράμματα, η λειτουργία του προγράμματος χωρίζεται σε τρία βασικά βήματα:

1. Την εξίσωση βαθμονόμησης για την κατάταξη των διαφορετικών διαμορφώσεων που προκύπτουν από τις λύσεις. Υπάρχουν τέσσερις εξισώσεις διαθέσιμες στο πρόγραμμα και η επιλογή γίνεται με βάση το προς εξέταση σύστημα. Η προεπιλεγμένη εξίσωση που χρησιμοποιεί το πρόγραμμα είναι η *GoldScore*:

$$\text{GOLD Fitness} = S_{\text{hb_ext}} + S_{\text{vdw_ext}} + S_{\text{hb_int}} + S_{\text{vdw_int}} \quad (1)$$

όπου με το συμβολισμό $S_{\text{hb_ext}}$ εκφράζονται οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ πρωτεΐνης και αναστολέα, με το συμβολισμό $S_{\text{vdw_ext}}$ η συνεισφορά από τις δημιουργούμενες κατά την πρόσδεση van der Waals αλληλεπιδράσεις, με το συμβολισμό $S_{\text{hb_int}}$ η συνεισφορά στο άθροισμα από τους ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου του αναστολέα και με το συμβολισμό $S_{\text{vdw_int}}$ εκφράζεται η συνεισφορά από τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις.

2. Ένα μηχανισμό τοποθέτησης του αναστολέα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Ο μηχανισμός αυτός στηρίζεται πάνω σε μια μέθοδο για την εύρεση σημείων ταιριάσματος, η οποία χρησιμοποιείται μόνο από το πρόγραμμα GOLD. Αυτά τα σημεία προστίθενται στις ομάδες με δεσμούς υδρογόνου, τόσο του αναστολέα όσο και της πρωτεΐνης και χαρτογραφούνται οι πιθανοί δότες και δέκτες δεσμών υδρογόνου εκατέρωθεν. Επίσης, δημιουργούνται

υδρόφοβα σημεία μέσα στην κοιλότητα του ενζύμου, στα οποία μπορεί να ταιριάξουν οι -CH- ομάδες του αναστολέα.

3. Έναν αλγόριθμο έρευνας πιθανών διαμορφώσεων πρόσδεσης του αναστολέα. Στο γενετικό αλγόριθμο που χρησιμοποιείται στο GOLD μεταβάλλονται και βελτιώνονται οι εξής παράμετροι: α) οι δίεδρες γωνίες των δεσμών του αναστολέα που μπορούν να περιστρέφονται, β) η γεωμετρία των κυκλικών δομών, γ) η γεωμετρία των -OH και -NH₃⁺ ομάδων της πρωτεΐνης και δ) η χαρτογράφηση των σημείων πρόσδεσης.

3.2.4 Εξίσωση βαθμονόμησης ChemScore

Με την εξίσωση βαθμονόμησης ChemScore^{272,273} υπολογίζεται η ενέργεια πρόσδεσης όπως περιγράφεται από την εξίσωση:

$$\Delta G_{\text{binding}} = \Delta G'_{\text{binding}} + E_{\text{clash}} + E_{\text{int}} + E_{\text{cov}} \quad (2)$$

$$\text{όπου } \Delta G'_{\text{binding}} = \Delta G_o + \Delta G_{\text{Hbond}} S_{\text{Hbond}} + \Delta G_{\text{metal}} S_{\text{metal}} + \Delta G_{\text{lipo}} S_{\text{lipo}} + \Delta G_{\text{rot}} H_{\text{rot}}$$

Ο όρος E_{clash} εκφράζει την ενεργειακή βαθμονόμηση του συμπλόκου πρωτεΐνης-αναστολέα, ο E_{int} τη βαθμονόμηση από την εσωτερική ενέργεια του αναστολέα ενώ οι όροι S_{Hbond} , S_{metal} , και S_{lipo} εκφράζουν τα αθροίσματα από τους δεσμούς υδρογόνου, τους δεσμούς δέκτη-μετάλλου και τις λιποφιλικές αλληλεπιδράσεις. Επίσης, ο όρος H_{rot} εκφράζει την εντροπική απώλεια της διαμόρφωσης του αναστολέα κατά την πρόσδεση. Επειδή με το πρόγραμμα GOLD υπάρχει δυνατότητα χειρισμού των περιπτώσεων όπου ο αναστολέας προσδένεται μέσω ενός ομοιοπολικού δεσμού με τον υποδοχέα, ο όρος E_{cov} προστέθηκε για να χαρακτηριστεί η ενέργεια του δεσμού αυτού.

Ο όρος S_{metal} εκφράζεται από την εξίσωση:

$$S_{\text{metal}} = \sum_{MA} f(r_{MA}, r_{m,1}, r_{m,2}) \quad (3)$$

όπου ο όρος r_{MA} είναι η απόσταση μεταξύ μετάλλου - δέκτη ενώ οι όροι $r_{m,1}$ και $r_{m,2}$ είναι σταθερές που ελέγχουν το εύρος των αλληλεπιδράσεων μεταξύ μετάλλου και δέκτη. Έχει βρεθεί ότι η εφαρμογή του GOLD στην πρόβλεψη του τρόπου πρόσδεσης είναι ευαίσθητη στις παραμέτρους της εξίσωσης (3)

και γι' αυτό συνιστάται η βελτιστοποίηση των όρων $r_{m,1}$ και $r_{m,2}$ ανάλογα με το σύστημα που προσομοιώνεται.²⁷⁴

3.3 Το πρόγραμμα προσομοίωσης της μοριακής δυναμικής AMBER

3.3.1 Υπολογιστική χημεία

Η βάση για τη θεωρητική θεμελίωση της υπολογιστικής χημείας έγινε στα μέσα του 1800 με την εξίσωση του Ludwig Eduard Boltzmann (στατιστική μηχανική). Σε μια εποχή όπου η ύπαρξη των ατόμων και των μορίων ήταν έντονα αμφισβητήσιμη στην κοινότητα των φυσικών, ο Boltzmann υποστήριξε ότι η συμπεριφορά και οι αλληλεπιδράσεις μεμονωμένων ατόμων ή μορίων σε μικροσκοπική κλίμακα, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για να περιγράψει και να προβλέψει μακροσκοπικά φαινόμενα. Με βάση τη θεωρία του και τις εξισώσεις του, ο Boltzmann μπόρεσε να μειώσει το πρόβλημα της προσομοίωσης $\sim 10^{23}$ μορίων, στην προσομοίωση ~ 1 μορίου. Επίσης, μπόρεσε να περιγράψει τη συμπεριφορά των ιδανικών αερίων μέσω της ευρέως γνωστής εξίσωσης $PV = nRT$.

Η θεωρία του Boltzmann έμεινε ανεκμετάλλευτη μέχρι το πρώτο μισό του 20^{ου} αιώνα και την είσοδο της κβαντομηχανικής. Ο Max Planck ήταν αυτός που πρότεινε ότι το λάθος της κλασσικής μηχανικής ήταν να θεωρεί την εκπομπή της ακτινοβολίας μέλανος σώματος συνεχόμενη (εξίσωση Rayleigh-Jeans). Αντίθετα, υποστήριξε ότι το φάσμα της ακτινοβολίας του είναι κβαντισμένο, οδηγώντας σε μια εξίσωση η οποία προσέγγιζε με μεγαλύτερη ακρίβεια τα πειραματικά δεδομένα. Με τη βοήθεια της κβαντικής μηχανικής, η εξήγηση και πρόβλεψη φαινομένων σε ατομική κλίμακα βελτιώθηκε ραγδαία μέσα στα επόμενα χρόνια. Η μόνη δυσκολία, πλέον, ήταν η επίλυση των πολύπλοκων μαθηματικών εξισώσεων.

Είκοσι χρόνια μετά, η κυματική εξίσωση της κβαντικής μηχανικής του Erwin Schrödinger (4) συνέδεσε τη συνολική ενέργεια ενός συστήματος με τη θέση του στο χώρο και στο χρόνο.

$$i\hbar \frac{\partial}{\partial t} \Psi(\mathbf{r}, t) = -\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 \Psi(\mathbf{r}, t) + V(\mathbf{r}) \Psi(\mathbf{r}, t) \quad (4)$$

Για ένα χημικό σύστημα, η εφαρμογή αυτής της εξίσωσης γίνεται ιδιαίτερα πολύπλοκη, επειδή περιέχει πληροφορίες για όλα τα άτομα που το αποτελούν. Στα χημικά συστήματα η συνολική ενέργεια ενός συστήματος είναι το άθροισμα της κινητικής ενέργειας των ατόμων, καθώς και της ενέργειας από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φορτίων (πρωτονίων και ηλεκτρονίων).

Αρκετές προσεγγιστικές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί προκειμένου να υπολογίζεται τη λύση της εξίσωσης του Schrödinger. Από αυτές, η μέθοδος Born-Oppenheimer (5) έχει επικρατήσει και φαίνεται να αποτελεί τη βάση των περισσότερων υπολογιστικών μοριακών μοντέλων. Με βάση αυτήν, κάθε μοριακό σύστημα χωρίζεται σε δύο μέρη: το τμήμα των ηλεκτρονίων όπου τα νουκλεόνια συμπεριφέρονται ως σταθερά φορτισμένα σημεία και το τμήμα του πυρήνα όπου τα νουκλεόνια κινούνται εξαιτίας του ηλεκτρικού πεδίου το οποίο διαμορφώνεται από τα ηλεκτρόνια.

$$\Psi_{\text{total}} = \Psi_{\text{electronic}} + \Psi_{\text{nuclear}} \quad (5)$$

3.3.2 Κβαντική / στατιστική μηχανική

Ο κύριος στόχος της κβαντικής μηχανικής είναι ο υπολογισμός της κυματοσυνάρτησης που αντιστοιχεί στο μέρος των ηλεκτρονίων ($\Psi_{\text{electronic}}$). Ωστόσο, για συστήματα με περισσότερα από 100-200 άτομα αυτό παραμένει απαγορευτικό. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η χρήση της στατιστικής μηχανικής είναι απαραίτητη.

Με βάση τη στατιστική μηχανική, τα μακροσκοπικά χημικά συστήματα αποτελούνται από αριθμό ατόμων ίσο με τον αριθμό Avogadro (6.022×10^{23}). Για ένα σύστημα με N αριθμό σωματιδίων (της τάξης του αριθμού Avogadro) υπάρχουν $6N$ συνολικοί βαθμοί ελευθερίας που αντιστοιχούν στη θέση και την ορμή κάθε σωματιδίου, στις τρεις διαστάσεις. Αυτός ο $6N$ -διάστατος χώρος αναφέρεται ως χώρος των φάσεων (*phase space*) ενώ η συλλογή όλων των σημείων τα οποία συμμορφώνονται σε ένα μικρό σετ θερμοδυναμικών περιορισμών π.χ. σταθερός όγκος ή ενέργεια, ως ένα σύνολο (*ensemble*). Με βάση τη στατιστική μηχανική, οι ιδιότητες αυτού του συνόλου που είναι μέρος του συστήματος, μπορούν να αντιπροσωπώσουν και να προβλέψουν τις ιδιότητες του συστήματος συνολικά. Η επιβεβαίωση αυτής της υπόθεσης έγινε

από τον Josiah Gibbs, ο οποίος πραγματοποίησε πειραματικές μετρήσεις πάνω σε πραγματικά συστήματα.²⁷⁵

Υπάρχουν τέσσερα διαφορετικά είδη συνόλου (microcanonical, canonical, grand canonical, isobaric-isothermal) και διαφορετικοί μέθοδοι υπολογισμού της μέσης τιμής των ιδιοτήτων ενός συστήματος με βάση τις ιδιότητες ενός συνόλου του.²⁷⁶ Επίσης, υπάρχουν δύο είδη δειγματοληψίας για την επιλογή του αντιπροσωπευτικού συνόλου: η Monte Carlo και η μοριακή δυναμική (Molecular Dynamics).

Στην περίπτωση της Monte Carlo τεχνικής, η επιλογή των νέων διαμορφώσεων των θέσεων των ατόμων σε ένα μοριακό σύστημα γίνεται τυχαία. Στη συνέχεια, υπολογίζεται η ενέργεια αυτής της διαμόρφωσης και προστίθεται η συνεισφορά της στο άθροισμα της συνάρτησης επιμερισμού (*partition function*).

Στην περίπτωση της μοριακής δυναμικής, η επιλογή των νέων θέσεων προκύπτει από τις τελευταίες συντεταγμένες του συστήματος και την ολοκλήρωση των εξισώσεων της κίνησης του μοριακού συστήματος.

3.3.3 Μοριακή μηχανική

Στην κβαντική μηχανική, η επίλυση της εξίσωσης Schrödinger για την κυματοσυνάρτηση των ηλεκτρονίων είναι εφικτή για μικρά μόρια που αποτελούνται από 20-30 άτομα. Ωστόσο, για μεγαλύτερα συστήματα η επίλυσή της γίνεται δύσκολη. Υπήρξε, λοιπόν, η ανάγκη να βρεθεί ένα μοντέλο εξισώσεων με το οποίο θα υπολογίζονται αποτελεσματικά οι πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ατόμων, χωρίς την επίλυση της εξίσωσης Schrödinger. Οι εξισώσεις αυτές βασίζονται στη δυναμική ενέργεια των μορίων και περιγράφουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ατόμων του συστήματος. Αποτελούνται από αναλυτικούς παραγώγους οι οποίες μπορούν να υπολογιστούν μέσω της προσομοίωσης της μοριακής δυναμικής. Επειδή ο υπολογισμός των παραγόντων αυτών των εξισώσεων βασίζεται στις δυνάμεις που δρουν στον πυρήνα των ατόμων, αυτά τα μοντέλα μοριακής μηχανικής ονομάζονται πεδία δυνάμεων (*force fields*).

Οι παράγοντες από τους οποίους αποτελούνται τα περισσότερα πεδία δυνάμεων για τον υπολογισμό της δυναμικής ενέργειας είναι: τα μήκη δεσμών, οι γωνίες δεσμών, η τάση στρέψης των δεσμών καθώς και μη-δεσμικές αλληλεπιδράσεις.

Πιο αναλυτικά, για τον υπολογισμό της επιφάνειας της δυναμικής ενέργειας ενός χημικού δεσμού χρησιμοποιείται η μέθοδος Born-Oppenheimer, ενώ οι σειρές Taylor χρησιμοποιούνται για την επαναληψιμότητα του αποτελέσματος (6).

$$U(\vec{x}) = \frac{1}{2}k(\vec{x} - \vec{x}_{eq})^2 \quad (6)$$

Η γωνία θ ενός δεσμού μεταξύ δύο ατόμων ορίζεται από δυο συνεχόμενους δεσμούς. Συνήθως η εξίσωση που την περιγράφει είναι:

$$U(\vec{\theta}) = 1/2k(\vec{\theta} - \vec{\theta}_{eq})^2 \quad (7)$$

και ο υπολογισμός μπορεί να γίνει είτε με προχωρημένους υπολογισμούς κβαντικής μηχανικής είτε πειραματικά (φασματοσκοπικές μεθόδους).

Η τάση στρέψης ενός δεσμού ορίζεται μεταξύ τεσσάρων ατόμων τα οποία συνδέονται με τρεις συνεχόμενους δεσμούς. Η γωνία στρέψης ορίζεται ως η γωνία ϕ μεταξύ των δεσμών 1-2 και 3-4. Εδώ, οι σειρές Fourier χρησιμοποιούνται για την επαλήθευση του αποτελέσματος ενώ η εξίσωση που συνήθως περιγράφει τη δυναμική ενέργεια είναι:

$$U(\phi) = \sum_i^N k_i [1 + \cos(n_i\phi + \psi_i)] \quad (8)$$

Η δυναμική ενέργεια της τάσης στρέψης δεσμού είναι η σημαντικότερη από τις δεσμικές παραμέτρους σε ένα πεδίο δυνάμεων. Δυστυχώς, σε αντίθεση με το μήκος και τη γωνία δεσμού, δεν υπάρχουν φασματοσκοπικές μέθοδοι προσδιορισμού της. Ως εκ τούτου, οι παράμετροι της τάσης στρέψης είναι οι τελευταίες τιμές που συμπληρώνονται όταν σχεδιάζεται ένα πεδίο δυνάμεων, ενώ μικρές μεταβολές αυτών των τιμών μπορούν να βελτιώσουν αισθητά το συνολικό αποτέλεσμα.

Όσον αφορά τις μη-δεσμικές αλληλεπιδράσεις, επειδή είναι αποτέλεσμα αλληλεπιδράσεων φορτίου-φορτίου καλούνται ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Τα άτομα σε ένα πεδίο δυνάμεων έχουν μερικό φορτίο, το οποίο συνήθως υπολογίζεται με την εφαρμογή ενός ηλεκτροστατικού δυναμικού και στη συνέχεια τη χρήση κβαντομηχανικών μεθόδων. Μια πρακτική που ακολουθείται κατά τη χρήση αυτή της μεθόδου είναι η εφαρμογή περιορισμών, μια τεχνική που αναφέρεται ως ηλεκτροστατικό δυναμικό σταθερών ατόμων (*restrained electrostatic potential*, RESP).^{277,278,279} Αυτό γίνεται προκειμένου να εξασφαλιστεί ότι τα ισοδύναμα άτομα θα έχουν το ίδιο φορτίο.

Το ηλεκτροστατικό δυναμικό το οποίο προκαλείται από την αλληλεπίδραση φορτίων έχει τη μορφή:

$$U(r_{ij}) = k \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \quad (9)$$

Επιπρόσθετα, ένα ηλεκτροστατικό δυναμικό που συνυπολογίζεται είναι αυτό που προέρχεται από τις αλληλεπιδράσεις van der Waals και μια τυπική μορφή του είναι:

$$\begin{aligned} U_{LJ}(r_{ij}) &= 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \\ &= 4\varepsilon_{ij} \left[\frac{1}{4} \left(\frac{R_{min,ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \frac{1}{2} \left(\frac{R_{min,ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \end{aligned} \quad \text{Δυναμικό Lennard-Jones} \quad (10)$$

Αυτοί είναι οι βασικοί παράγοντες που λαμβάνονται υπ' όψιν για τη διαμόρφωση της εξίσωσης του δυναμικού στα περισσότερα πεδία δυνάμεων. Εκτός από τους παράγοντες αυτούς, υπάρχουν και άλλοι, π.χ. που ελέγχουν αν είναι αποδεκτή η τάση στρέψης ενός δεσμού και συνυπολογίζονται στο άθροισμα του δυναμικού, ανάλογα με το σχεδιασμό του πεδίου δυνάμεων.

3.3.4 Η γέννηση της υπολογιστικής βιολογίας

Ο Shneior Lifson (Weizmann Institute, Ισραήλ) ήταν ο πρώτος που είχε την ιδέα να δημιουργήσει ένα σταθερό/καθορισμένο πεδίο δυνάμεων (*consistent force field*, CFF) με τη δυνατότητα να προσομοιώνει οποιοδήποτε μοριακό

σύστημα. Πίστευε ότι αυτό το πεδίο δυνάμεων θα πρέπει να έχει εφαρμογή στις πρωτεΐνες και τα μακρομόρια (DNA, RNA). Με τη βοήθεια των Arieh Warshel και Michael Levitt το 1967 δημιουργήθηκε το πρόγραμμα CFF, το οποίο εφαρμόστηκε με επιτυχία σε μικρά οργανικά μόρια για τον υπολογισμό των δομικών, θερμοδυναμικών και φασματοσκοπικών ιδιοτήτων τους. Επίσης, ο Levitt το εφάρμοσε σε πρωτεΐνες πράγμα που οδήγησε στην πρώτη ελαχιστοποίηση της ενέργειας της δομής μιας ολόκληρης πρωτεΐνης. Η τεχνική αυτή έγινε αργότερα γνωστή με το όνομα *Energy Refinement*.²⁸⁰ Στη συνέχεια, ακολούθησαν η προσομοίωση του tRNA το 1968 και της αναδίπλωσης πρωτεΐνης το 1973.

Το 1971 ο Bruce Gelin, ο οποίος μόλις είχε αρχίσει να εργάζεται με τον Arieh Warshel ξαναέγραψε τον κώδικα του προγράμματος CFF διαμορφώνοντάς τον ώστε να είναι πιο προσιτός και κατανοητός. Σε αυτή τη μορφή ο κώδικας σηματοδότησε τη σύνδεση μεταξύ της υπολογιστικής χημείας και τη βιολογίας. Αποτέλεσε δε τη βάση για την ανάπτυξη προγραμμάτων όπως το CHARMM (Chemistry at HARvard Molecular Mechanics, ερευνητική ομάδα του Karplus, Πανεπιστήμιο Harvard) και AMBER (ερευνητική ομάδα του Peter Kollmann, UCSF, ανακαλύφθηκε από τους ερευνητές της εταιρίας Arnold Hagler).

3.3.5 Το πρόγραμμα AMBER

Η ιδέα για τη δημιουργία του AMBER²⁸¹ (Assisted Model Building with Energy Refinement) ξεκίνησε όταν ο Paul Weiner εντάχθηκε στην ερευνητική ομάδα του Peter Kollman (UCSA) το 1978. Ο Weiner είχε ασχοληθεί με μοριακή μηχανική και τεχνικές ταυτοποίησης με ακτίνες Χ ως μεταδιδακτορικός ερευνητής στο πανεπιστήμιο του Harvard, στην ερευνητική ομάδα του Martin Karplus (CHARMM). Ο Weiner είχε γνώσεις πάνω σε έναν κώδικα ο οποίος χρησιμοποιούσε μοριακή μηχανική για τον υπολογισμό συγκεκριμένων ενεργειακών ιδιοτήτων με εφαρμογή σε μικρό αριθμό μορίων.

Σκοπός των Weiner και Kollman ήταν η εξέλιξη αυτού του κώδικα σε ένα γενικευμένο πρόγραμμα μοριακής μηχανικής με το οποίο θα μπορούσαν να αναλυθούν ενεργειακοί όροι σε συνδυασμό με τη γραφική απεικόνισή τους. Επίσης, στο πρόγραμμα αυτό θα έπρεπε να μπορεί να υπολογίζεται η

ενέργεια μικρών μορίων και πολυμερών ενώ ταυτόχρονα να είναι εύχρηστο και κατανοητό από τους χρήστες.

Η επίτευξη του στόχου τους έγινε με τη δημιουργία του προγράμματος AMBER, όπως αυτό περιγράφεται σε σχετική δημοσίευση.²⁸² Μέσα από μια διαδικασία ευτυχών συγκυριών και πολυάριθμων συνεργασιών το πρόγραμμα εξελίχθηκε και συμπληρώθηκε με επιμέρους προγράμματα. Το 1995 το πακέτο προγραμμάτων AMBER έφτασε να αποτελείται από 65 προγράμματα, 930 αρχεία προγραμματισμού αποτελούμενα από περίπου 332.000 γραμμές εκ των οποίων οι 187.000 ήταν κώδικας.²⁸³



Εικόνα 3.1: Peter Kollman και Thomas Cheatham.

Από τότε μέχρι σήμερα, ο κώδικας έχει υποστεί πολλές βελτιστοποιήσεις και προσθήκες προγραμμάτων για την ανάλυση των αποτελεσμάτων της προσομοίωσης (Πίνακας 3.1).

Πίνακας 3.1: Η εξέλιξη του προγράμματος AMBER.

Έτος	Έκδοση	Οι σημαντικότερες τροποποιήσεις ανά έκδοση
1981	1.1	Ελαχιστοποίηση ενέργειας
1984	2	Προσθήκη Μοριακής Δυναμικής
1986	3	Υπολογισμοί ΔG, QM/MM
1989	3.1	Εκκαθάριση του κώδικα (<i>bug fixes</i>), βελτίωση της επίδοσης, καταμερισμός μνήμης (<i>shared memory</i>)
1991	4	<i>NMR refinement</i> (τεχνική στην οποία οι αρχικές συντεταγμένες του συστήματος έχουν προκύψει από πειράματα NMR), <i>normal modes</i> (τεχνική υπολογισμού της εντροπίας), βελτίωση της τεχνικής υπολογισμού της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης (<i>ΔG serious code bifurcation</i>)
1994	4.1	<i>Particle Mesh Ewald</i> (μέθοδος υπολογισμού των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων) , περισσότερος καταμερισμός μνήμης
1997	5	<i>Particle Mesh Ewald</i> (βελτιώσεις στον κώδικα)
1999	6	<i>Particle Mesh Ewald Molecular Dynamics (pmemd)</i> : επανεγγραφή σε <i>Fortran 90</i>
2002	7	Βελτιστοποιήσεις στη <i>Fortran 90</i>
2004	8	Βελτίωση της ταχύτητας εκτέλεσης της μοριακής δυναμικής (<i>fast engine pmemd</i>), επικύρωση των εκτελέσιμων τμημάτων του κώδικα (<i>configure scripts</i>)
2006	9	Εκτέλεση των προσομοιώσεων σε σταθερό pH
2008	10	Τα προγράμματα ανάλυσης του AMBER είναι προσβάσιμα μέσω διαδικτύου (<i>AmberTools: open source</i>), ενέργεια επιδιάλυσης <i>Poisson-Boltzmann</i> (<i>solvation energy</i>)
2010	11	Εισαγωγή του κώδικα <i>GPU</i>
2012	12	Βελτιστοποίηση του πεδίου δυνάμεων (<i>ff12SB</i>), βελτιστοποίηση του κώδικα <i>GPU</i>
2014	14	Πολύ καλύτερη επίδοση σε πολλαπλά <i>CPUs</i> και δραματική βελτίωση της ταχύτητας στα <i>GPUs</i>

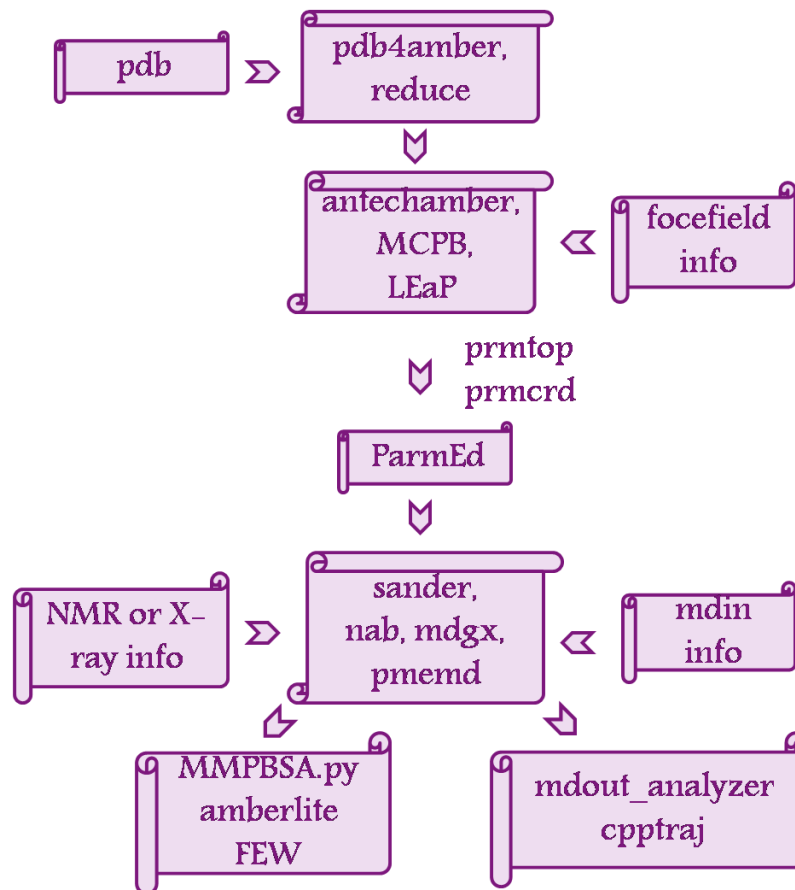
Πάνω από 40 επιστήμονες, ερευνητές και εξωτερικοί συνεργάτες έχουν συνεργαστεί για τη δημιουργία του κώδικα. Αν και ο αριθμός των χρηστών είναι δύσκολο να εκτιμηθεί, το πρόγραμμα είναι εγκατεστημένο σε 1000 διαδικτυακούς τόπους ενώ οι αναφορές στο πρόγραμμα στη διεθνή βιβλιογραφία φτάνει τις 4000 (2012).²⁸⁴

3.3.6 Δομή του AMBER

Το βασικό χαρακτηριστικό του προγράμματος είναι το πεδίο δυνάμεων που χρησιμοποιεί και το οποίο περιγράφεται από την εξίσωση:

$$\begin{aligned}
 U(q) = & \sum_{\text{bonds}} K_r(r - r_{eq})^2 + \sum_{\text{angles}} + K_\theta(\theta - \theta_{eq})^2 + \\
 & \sum_{\text{torsions}} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] + \frac{1}{2} \sum_i \sum_{j \in l_{1-4,i}} \left[\frac{A_{i,j}}{2.0R_{i,j}^{12}} - \frac{B_{i,j}}{2.0R_{i,j}^6} + \frac{q_i q_j}{1.2\epsilon R_{i,j}} \right] + \\
 & \frac{1}{2} \sum_i \sum_{j \notin l_{\text{excl},i}} \left[\frac{A_{i,j}}{R_{i,j}^{12}} - \frac{B_{i,j}}{R_{i,j}^6} + k_{elec} \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{i,j}} \right]
 \end{aligned} \tag{11}$$

Η πορεία εργασίας στο AMBER φαίνεται στο σχήμα που ακολουθεί ενώ η περιγραφή των προγραμμάτων που φαίνονται στο σχήμα μπορεί να αναζητηθεί στο εγχειρίδιο του AMBER.²⁸⁵ Παρακάτω, θα αναφερθούμε συνοπτικά στα πιο σημαντικά από αυτά τα προγράμματα.



Σχήμα 3.2: Πορεία εργασίας στο AMBER.

Οι τρεις βασικές μηχανές που περιέχονται στο πακέτο AMBER είναι οι: *sander*, *pmemd*, *pmemd.cuda*. Το *sander* είναι η βασική μηχανή του AMBER που χρησιμοποιείται για την ελαχιστοποίηση της ενέργειας και την εκτέλεση της μοριακής δυναμικής. Η ελαχιστοποίηση της ενέργειας επιτυγχάνεται με τη μετακίνηση των ατόμων σε ελαχιστοποιημένες ενεργειακές βαθμίδες μέχρις ότου επιτευχθεί μια μέση τιμή ελάχιστης ενέργειας. Προκειμένου να εξευρεθεί η ελάχιστη ενέργεια, το πρόγραμμα παράγει διαφορετικές διαμορφώσεις του συστήματος οι οποίες προκύπτουν από την ολοκλήρωση της Νευτώνειας εξίσωσης της κίνησης. Επίσης, πιο λεπτομερής αναζήτηση διαμορφώσεων και μοντελοποίηση της μοριακής δυναμικής με χρήση του πεδίου δυνάμεων του AMBER μπορεί να πραγματοποιηθεί στο *sander*, ενώ παράλληλα επιτρέπει την προσθήκη παραμέτρων και περιορισμών αναλόγως με το πείραμα στο οποίο εφαρμόζεται.

Με δεδομένη την ενεργειακή κατανάλωση των υπολογιστών που εκτελούν το *sander* καθώς και τις δυνατότητες από την ανάπτυξη των υπερ-υπολογιστών, το πρόγραμμα ξαναγράφηκε. Σκοπός ήταν η υψηλή απόδοση και η βελτίωση της σταθερότητάς του σε παράλληλους επεξεργαστές. Το πρόγραμμα αυτό ονομάστηκε *pmemd*, γράφτηκε από τον Bob Duke (National Institute of Environmental Health Sciences) και αποτέλεσε μέρος του AMBER6. Από το AMBER10 και μετά, το πρόγραμμα τροποποιήθηκε και βελτιστοποιήθηκε κυρίως από το εργαστήριο του Ross Walker (the San Diego Supercomputer Center) ενώ προστέθηκαν παράμετροι για την προσομοίωση μεγάλων συστημάτων.

Με την εμφάνιση των μονάδων επεξεργασίας γραφικών (*graphics processing units*, GPU) ως πρακτική και ισχυρή πλατφόρμα για τις υπολογιστικές επιστήμες, το πρόγραμμα *pmemd* μεταφέρθηκε σε αυτήν την GPU πλατφόρμα και ονομάστηκε *pmemd.cuda*. Τη εργασία αυτή ηγείται το εργαστήριο του Ross Walker σε συνεργασία με τον Scott Le Grand (nVIDIA), χρησιμοποιώντας τη γλώσσα προγραμματισμού της εταιρίας nVIDIA (**Compute Unified Device Architecture, CUDA**).²⁸⁶ Το πρόγραμμα *pmemd.cuda* συνεχώς αναβαθμίζεται καθώς η τεχνολογία των GPU εξελίσσεται ραγδαία. Η επίδραση της GPU τεχνολογίας στη χρονική επίδοση του προγράμματος προσομοίωσης, φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 3.2: Βελτίωση της επίδοσης του AMBER στην ταχύτητα παραγωγής χρόνου προσομοίωσης της μοριακής δυναμικής.²⁸³

Έκδοση AMBER	Έτος	Ταχύτητα (ps/ημέρα)
4.1	Ιούνιος, 1995	342
5	Νοέμβριος, 1997	347
6	Δεκέμβριος, 1999	421
7	Μάρτιος, 2002	508
8	Μάρτιος, 2004	677
9	Μάρτιος, 2006	941
10	Απρίλιος, 2008	1187
11	Μάρτιος, 2010	1230
11(GPU ^α)	Μάρτιος, 2010	50.790
12(GPU ^β)	Απρίλιος, 2012	75.389

Ο πίνακας αναφέρεται στις ταχύτητες 1000 βημάτων (time step = 2 fs, cutoff = 8 Å) σε έναν επεξεργαστή (Intel Xeon x86_64, 3,4 GHz, ή α=GTX580 ή β=GTX680 GPUs).

Για τον υπολογισμό της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης, χρησιμοποιείται το πρόγραμμα MM-PBSA.py με το οποίο υπολογίζονται οι τιμές των παραγόντων που συνεισφέρουν στη διαμόρφωση της τιμής της. Όπως φαίνεται και από το Σχήμα 3.3, η ενέργεια πρόσδεσης εξαρτάται από το άθροισμα των δυνάμεων van der Waals (ΔE_{vdW}), των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων (ΔE_{elec}) και των πολικών (ΔG_{PB}) και μη-πολικών (ΔG_{NP}) όρων της ελεύθερης ενέργειας διάλυσης.

$$\Delta G_{bind} = \Delta H - T \cdot \Delta S$$

$$\Delta E_{MM} + \Delta G_{sol}$$

$$\Delta E_{elec} + \Delta E_{vdW} \quad \Delta G_{PB} + \Delta G_{NP}$$

Σχήμα 3.3: Η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης ενός συστήματος είναι το άθροισμα των πολικών και μη πολικών αλληλεπιδράσεων.

Η συνεισφορά των πολικών όρων (ΔG_{PB}) υπολογίζεται με τη χρήση της μεθόδου Poisson-Boltzmann (PB).²⁸⁷ Για τον υπολογισμό της συνεισφοράς των μη-πολικών αλληλεπιδράσεων (ΔG_{NP}), χρησιμοποιείται η μέθοδος της εκτεθειμένης στο διαλύτη επιφάνειας (*solvent-accessible surface area*, SASA). Η ΔG_{NP} υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$\Delta G_{NP} = \gamma SA + \beta \quad (12)$$

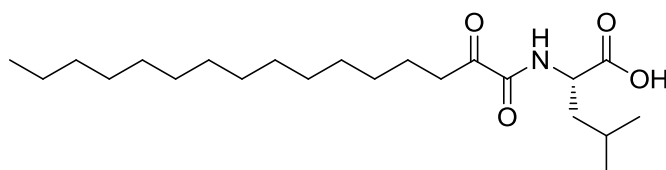
Όπου ο όρος SA είναι η επιφάνεια του συμπλόκου, ο όρος γ είναι $0,005420 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{\AA}^{-2}$ ενώ ο όρος β είναι $-1,008000 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$.²⁸⁸ Οι όροι γ και β είναι σταθερές που σχετίζονται με το συντελεστή επιφανειακής τάσης.

Με το πρόγραμμα crrtraj²⁸⁹ αναλύονται τα αρχεία με τις συντεταγμένες των συστημάτων, τα οποία έχουν προκύψει από τα πειράματα της μοριακής δυναμικής. Μέρος του κώδικα έχει γραφτεί από τον καθηγητή Thomas Cheatham (Πανεπιστήμιο Utah, PhD με υπεύθυνο καθηγητή τον Peter Kollman) σε γλώσσα C++. Με το πρόγραμμα αυτό μπορούν να διαβαστούν πολλαπλά αρχεία με συντεταγμένες αναφοράς και τοπολογίας (φορτία, δεσμοί, γωνίες και άλλα) να αναλυθούν και να παραχθούν αρχεία με μετρήσεις (RMSD, αποστάσεις, δεσμοί υδρογόνου, ενέργειες, δίεδρες γωνίες και άλλα). Η εφαρμογή του μπορεί να γίνει είτε για το σύνολο του συστήματος είτε για συγκεκριμένα μόρια και μπορεί να αναλύσει είτε μέρος των αρχείων που έχουν παραχθεί από την μοριακή δυναμική είτε το σύνολο. Η εκτέλεση των υπολογισμών δεν είναι χρονοβόρα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η έρευνα που διεξάγεται στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών με υπεύθυνο τον καθ. Γ. Κόκοτο, έχει ως στόχο την ανακάλυψη εκλεκτικών αναστολέων των φωσφολιπασών. Πρόσφατα, ένα από τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας ήταν η ανακάλυψη ότι η ένωση GK126 ένα 2-οξοαμιδικό παράγωγο της (S)-λευκίνης, είναι ισχυρός αναστολέας της εκκριτικής φωσφολιπάσης IIΑ (GIIA sPLA₂).



GK126

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η ανάπτυξη νέων ισχυρών και εκλεκτικών αναστολέων της φωσφολιπάσης GIIA sPLA₂ και η κατανόηση, μέσω μελετών της μοριακής μοντελοποίησης, του τρόπου αλληλεπίδρασης των αναστολέων με το ενεργό κέντρο του ενζύμου.

Ένας στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η βελτιστοποίηση της δράσης της GK126, με την εφαρμογή αλλαγών στην δομή της. Για τον σκοπό αυτό, σχεδιάστηκαν νέα 2-οξοαμιδικά παράγωγα των φυσικών αμινοξέων, S και R απεικόνισης, καθώς επίσης και μη φυσικών αμινοξέων. Για την αξιολόγηση της δράσης τους, χρησιμοποιήθηκαν πειράματα προσομοίωσης της μοριακής πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου με τη βοήθεια του προγράμματος GOLD. Με βάση αυτά τα *in silico* πειράματα μπορούν να επιλεγούν οι ενώσεις με τις ευνοϊκότερες βαθμονομίες πρόσδεσης ώστε να συντεθούν και να μελετηθεί με *in vitro* πειράματα η ανασταλτική τους δράση.

Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία, ότι παράγωγα που φέρουν τον δακτύλιο του ινδολίου έχουν ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι της GIIA sPLA₂. Ένας επιπλέον στόχος της παρούσας έρευνας ήταν να διερευνηθεί αν αντίστοιχα παράγωγα που φέρουν τον δακτύλιο της κουμαρίνης και της κινολινόνης έχουν ικανότητα πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Προς τούτο, νέα

παράγωγα της κουμαρίνης και της κινολινόνης σχεδιάστηκαν για να μελετηθεί υπολογιστικά η ικανότητα πρόσδεσής τους στο ενεργό κέντρο της GIIA sPLA₂.

Η όσο το δυνατόν σε βάθος κατανόηση του τρόπου αλληλεπίδρασης των αναστολέων με το ενεργό κέντρο του ενζύμου, οδήγησε στη διεξαγωγή προσομοίωσης της μοριακής δυναμικής του συμπλέγματος πρωτεΐνης-αναστολέα. Μελλοντικός άμεσος στόχος είναι η δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί ο συνθετικός αναστολέας που παρουσιάζει τα καλύτερα *in vitro* αποτελέσματα για την αντιμετώπιση καταστάσεων φλεγμονής, συμπεριλαμβανομένης και της αθηροσκλήρωσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΝΕΩΝ 2-ΟΞΟΑΜΙΔΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ

5.1 Σύγκριση κρυσταλλογραφικών μελετών της GIIA sPLA₂

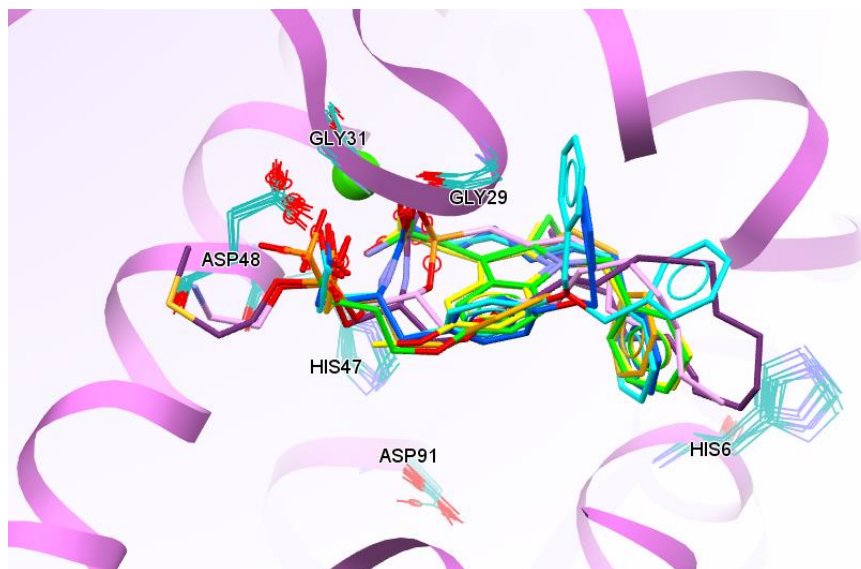
Η υπολογιστική μελέτη ξεκίνησε με τη σύγκριση των διαθέσιμων κρυσταλλογραφικών μελετών της πρωτεΐνης GIIA sPLA₂. Σκοπός ήταν να βρεθούν οι διαμορφωτικές διαφορές των αμινοξέων - κυρίως του ενεργού κέντρου - όταν το ένζυμο ήταν ελεύθερο και όταν υπήρχε κάποιος αναστολέας στο ενεργό κέντρο του.

Υπάρχουν 13 κρυσταλλογραφικές μελέτες της πρωτεΐνης GIIA sPLA₂ με ή χωρίς αναστολέα στο ενεργό της κέντρο, διαθέσιμες στη βάση δεδομένων PDB (www.rcsb.org), οι οποίες παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.1 κατά χρονολογική σειρά. Με τη βοήθεια του προγράμματος GOLD 5.2²⁹⁰ πραγματοποιήθηκε η υπέρθεση των δομών αυτών ανά δύο ή ανά τρεις για να διαπιστωθούν διαμορφωτικές διαφορές μεταξύ τους.

Πίνακας 5.1: Κρυσταλλογραφικές μελέτες της ανθρώπινης εκκριτικής φωσφολιπάσης IIA.

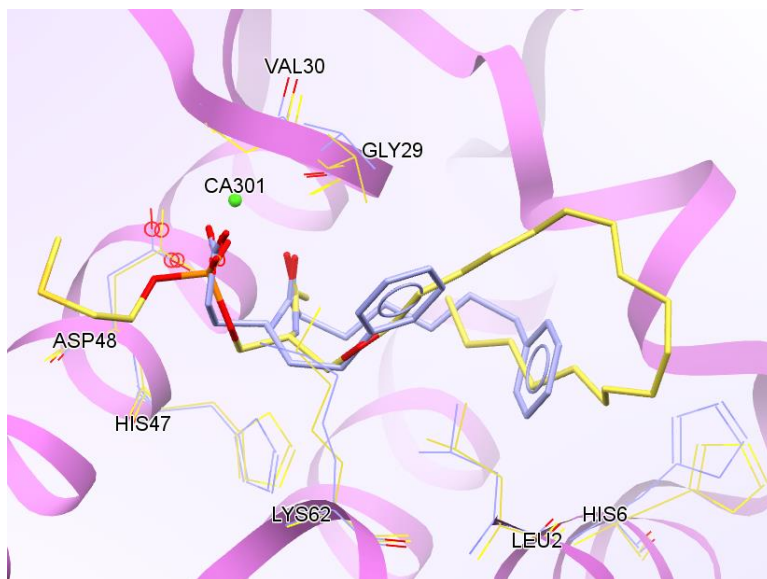
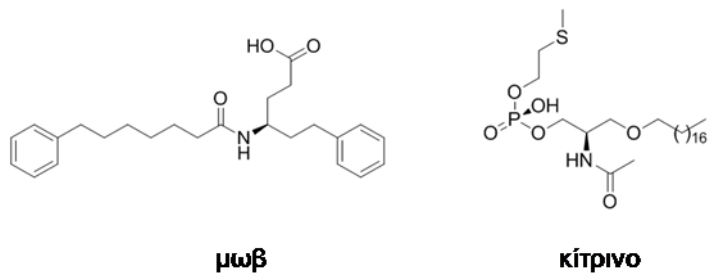
PDB	Έτος	Ανάλυση (Å)
3U8B, 3U8D, 3U8H, 3U8I	2012	1,10-2,30
1KQU	2003	2,10
1J1A	2003	2,20
1KVO	1996	2,0
1DCY	1995	2,70
1AYP	1995	2,57
1DB4	1995	2,20
1BBC	1991	2,20
1POD, 1POE	1991	2,10

Όπως απεικονίζεται από τις κρυσταλλογραφικές μελέτες, ο τρόπος πρόσδεσης των αναστολέων είναι αρκετά συγκεκριμένος ενώ καταλαμβάνουν τον ίδιο χώρο στο ενεργό κέντρο, ανεξάρτητα της δομής τους (Εικόνα 5.1).



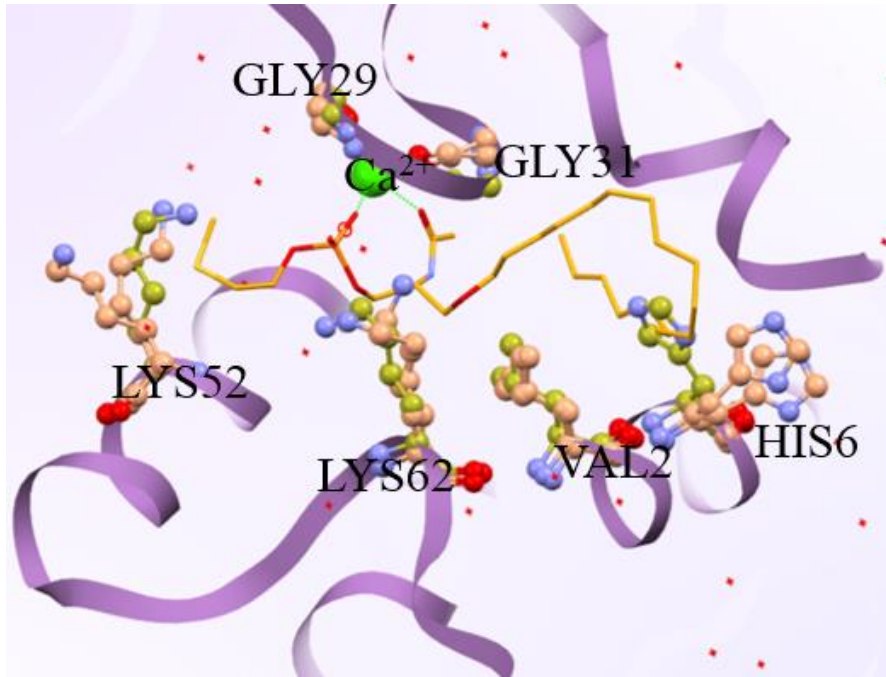
Εικόνα 5.1: Υπέρθεση των αναστολέων με τους οποίους έχει συγκρυσταλλωθεί η GIIA sPLA₂.

Το ενεργό κέντρο της GIIA sPLA₂ έχει την ιδιαιτερότητα ότι είναι μικρό, ρηχό και εκτεθειμένο στον διαλύτη. Για παράδειγμα, στην Εικόνα 5.2 απεικονίζεται η υπέρθεση δύο διαφορετικών δομικά αναστολέων στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Η υπέρθεση των δομών έγινε με την βοήθεια του προγράμματος GOLD. Με μωβ χρώμα παριστάνεται ένα αμιδικό παράγωγο της τυροσίνης (PDB:1KQU) ενώ με κίτρινο ένα ανάλογο φωσφολιπιδίου (PDB:1AYP). Παρά τις δομικές τους διαφορές, οι δύο αναστολείς καταλαμβάνουν τον ίδιο χώρο στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Επίσης, δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στη διαμόρφωση των αμινοξέων γύρω από τους αναστολείς.

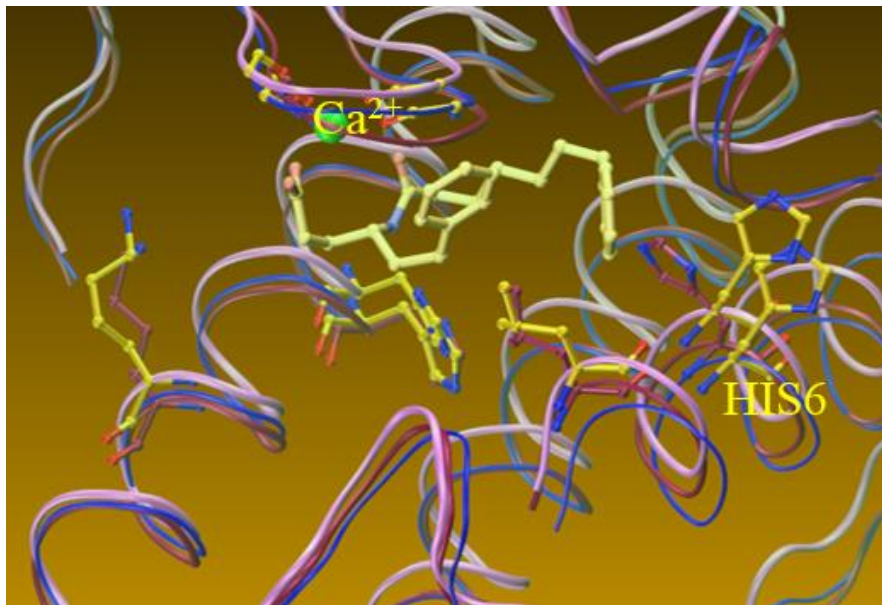


Εικόνα 5.2: Υπέρθεση των αναστολέων από τις κρυσταλλογραφικές μελέτες 1KQU (μωβ) και 1AYP (κίτρινο) στο ενεργό κέντρο.

Ωστόσο, όταν έγινε υπέρθεση του ενζύμου χωρίς αναστολέα και του ενζύμου με αναστολέα στο ενεργό κέντρο, παρατηρήθηκε ότι ο προσανατολισμός της HIS6 ήταν διαφορετικός. Δηλαδή, όταν δεν υπήρχε κάποιος αναστολέας η HIS6 προσανατολιζόταν προς το εσωτερικό του ενεργού κέντρου, ενώ παρουσία αναστολέα, προσανατολιζόταν προς τα έξω (Εικόνες 5.3 και 5.4).



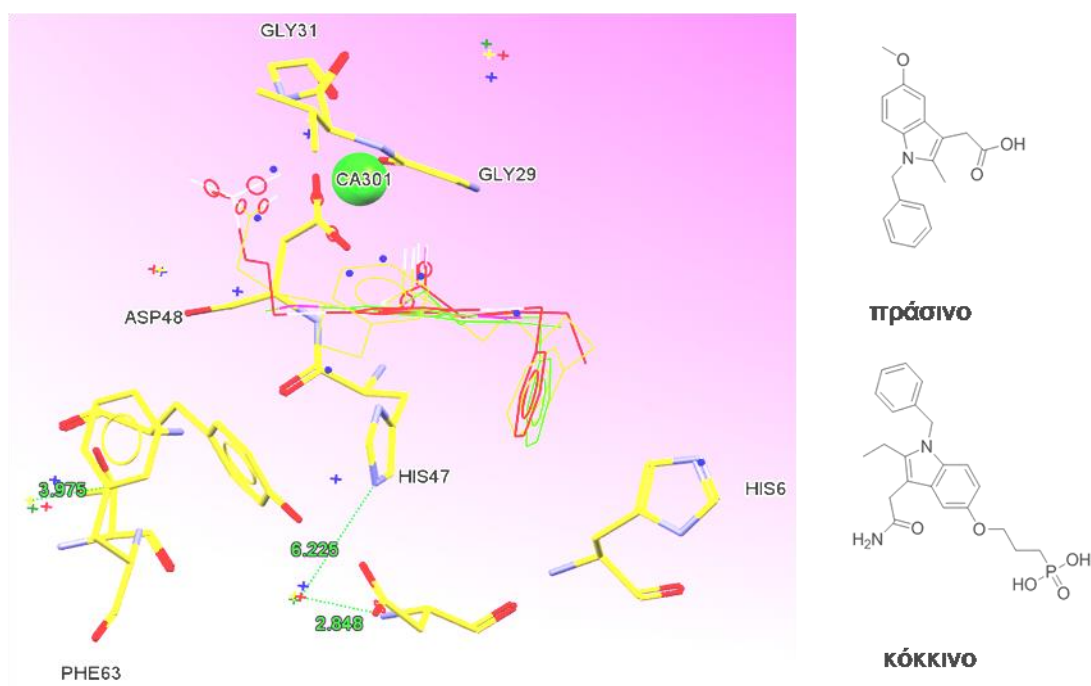
Εικόνα 5.3: Υπέρθηση **1AYP**, **1KQU**, **3U8B** (χωρίς αναστολέα) όπου απεικονίζονται μόνο τα κρίσιμα αμινοξέα του ενεργού κέντρου. Η **3U8B** δεν έχει αναστολέα στο ενεργό της κέντρο με αποτέλεσμα κατά την υπέρθεση η **HIS6** να εφάπτεται στον αναστολέα της **1AYP**.



Εικόνα 5.4: Υπέρθηση **1POD** (χωρίς αναστολέα), **1J1A**, **1KQU**. Η **HIS6** προσανατολίζεται προς το εσωτερικό του ενεργού κέντρου όταν δεν υπάρχει αναστολέας και προς τα έξω παρουσία αναστολέα.

Αυτή η παρατήρηση σε σχέση με την υπόθεση ότι η θέση της HIS6 καθορίζει τον ρόλο που θα έχει το ένζυμο ²⁹¹ - αν θα δράσει με τη καταλυτική του ιδιότητα ή θα αλληλοεπιδράσει με κάποιον υποδοχέα - χρησιμοποιήθηκε στην παραμετροποίηση των πειραμάτων προσομοίωσης. Δηλαδή, η HIS6 ορίστηκε ως ευκίνητη προκειμένου να διερευνηθεί η τοποθέτησή της ανάλογα με τον αναστολέα.

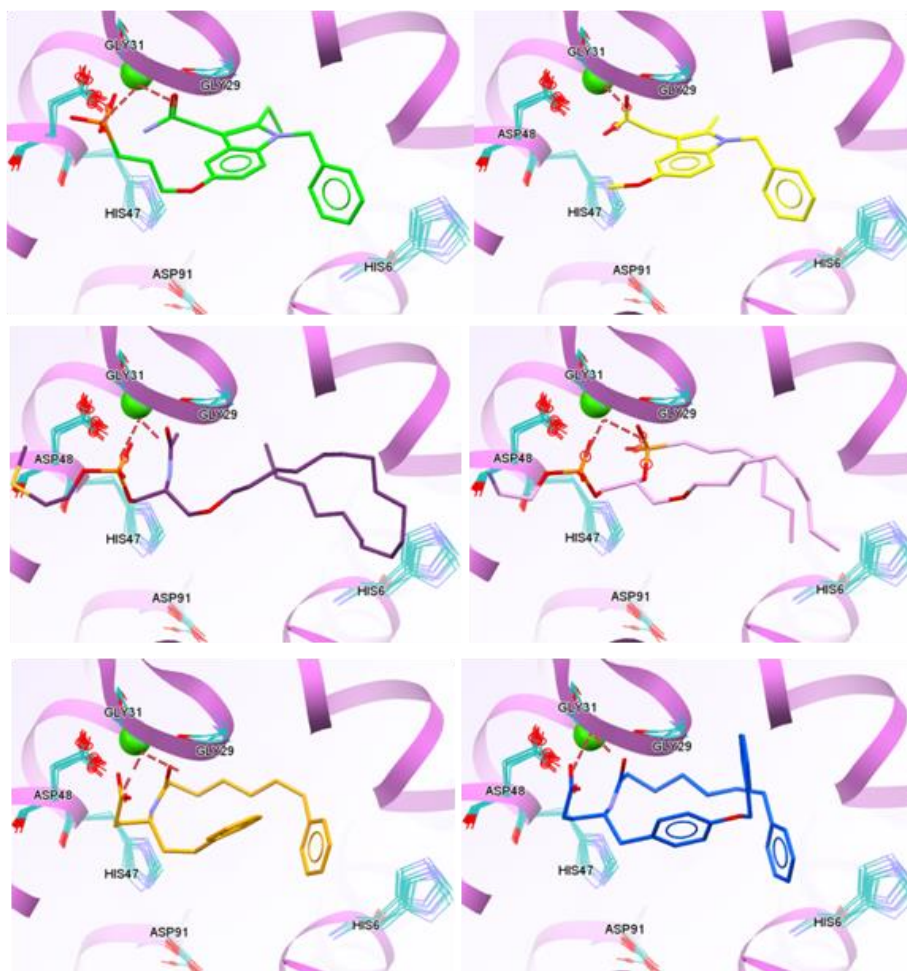
Επίσης, παρατηρήθηκε ότι όταν το ένζυμο είναι χωρίς αναστολέα, το ενεργό κέντρο του καταλαμβάνεται από μόρια νερού (Εικόνα 5.5). Ως εκ τούτου, φαίνεται ότι για την πρόσδεση του αναστολέα στο ενεργό κέντρο γίνεται μετακίνηση αυτών των μορίων. Αυτή η μετακίνηση δεν ευνοείται ενεργειακά και ενδεχομένως να είναι ένας από τους λόγους για τους οποίους ορισμένες ενώσεις ενώ έχουν αποτελεσματικές βαθμονομήσεις μοριακής πρόσδεσης *in silico*, δεν παρουσιάζουν ανάλογη συμπεριφορά και στις *in vitro* πειραματικές μελέτες.



Εικόνα 5.5: Υπέρθεση των αναστολέων 3U8D (κόκκινο) και 1DCY (πράσινο). Φαίνεται μόνο το ενεργό κέντρο με τους δύο αναστολείς. Οι κουκίδες είναι μόρια νερού.

Οι αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται μεταξύ του ενεργού κέντρου και των αναστολέων είναι παρόμοιες σε όλες τις κρυσταλλογραφικές μελέτες. Τα φορτισμένα μέρη των ενώσεων – όπως η αποπρωτονιομένη καρβοξυλομάδα

– αλληλοεπιδρούν με το ιόν ασβεστίου. Οι αλειφατικές αλυσίδες των ενώσεων διευθετούνται στο υδρόφοβο τμήμα του ενεργού κέντρου και αναπτύσσουν λιπόφιλες αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα. Επιπλέον, οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται είναι συνήθως μεταξύ των αμινοξέων GLY29 και GLY31 και των λειτουργικών ομάδων των αναστολέων (Εικόνα 5.6).



Εικόνα 5.6: Μερικοί από τους αναστολείς που έχουν συγκρυσταλλωθεί με το ένζυμο GIIA sPLA₂.

Μελετώντας τις διαμορφώσεις και τις αλληλεπιδράσεις των αναστολέων που έχουν συγκρυσταλλωθεί με το ένζυμο προέκυψαν τα παρακάτω συμπεράσματα:

α. οι δεσμοί υδρογόνου που φαίνεται να παίζουν καθοριστικό ρόλο στην πρόσδεση καταγράφονται στο πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 5.2: Δεσμοί υδρογόνου που παρατηρούνται στις κρυσταλλογραφικές μελέτες της GIIA sPLA₂.

ομάδα αναστολέα	αμινοξύ του ενεργού κέντρου	μέση απόσταση (Å)
-NH	HIS47	2,8-4,2
NHCO	GLY29	1,7-2,9
COO ⁻	GLY31	1,8-2,6

β. μια θέση υποκατάστασης του ιόντος ασβεστίου θα πρέπει να καταλαμβάνεται από μία λειτουργική ομάδα του αναστολέα (2,3-2,6 Å).

γ. το λιπόφιλο τμήμα του αναστολέα τοποθετείται με τέτοιο τρόπο ώστε να περιβάλλεται από τα αμινοξέα PHE5, HIS6, ALA17, GLY22, CYS44.

Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της προσομοίωσης νέων ενώσεων, έγινε με βάση τις αλληλεπιδράσεις γνωστών αναστολέων στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, όπως περιγράφονται από τις κρυσταλλογραφικές μελέτες.

5.2 Προετοιμασία για τη διεξαγωγή των πειραμάτων προσομοίωσης της μοριακής πρόσδεσης

5.2.1 Σχεδιασμός και προετοιμασία των δομών των υποψηφίων αναστολέων

Οι ενώσεις σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος SYBYL 8.0.²⁹² Κατά τη σχεδίαση, προσδιορίστηκε το είδος των δεσμών και η απεικόνιση του χειρόμορφου κέντρου, ενώ ο προσδιορισμός του φορτίου έγινε με την επιλογή του κατάλληλου 'Atom Type' (Edit → Modify → Atom Type). Οι καρβοξυλικές ομάδες ορίστηκαν ως αποπρωτονιομένες (O.co₂).

Στη συνέχεια, οι ενώσεις ελαχιστοποιήθηκαν με την εφαρμογή διαδοχικών αλγορίθμων. Αρχικά, επιλέχθηκε το κριτήριο 'energy change' για την εύρεση του ελάχιστου ενέργειας και εφαρμόστηκαν η μέθοδος απότομης καταβύθισης

‘steepest descent’ (300 βήματα), η μέθοδος συζυγών βαθμίδων ‘conjugate gradient’ (300 βήματα) και τέλος ο αλγόριθμος Powell²⁹³ (700 βήματα). Τα βήματα επαναλήφθηκαν, με το κριτήριο ‘Gradient’ $0,05 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{\AA}^{-1}$ για την εύρεση του τοπικού ελάχιστου. Κατά την διάρκεια των παραπάνω ελαχιστοποιήσεων, επιλέχθηκε και εφαρμόστηκε το πεδίο δυνάμεων Tripos.²⁹⁴

Για ορισμένες ενώσεις - αυτές με τα καλύτερα υπολογιστικά αποτελέσματα – χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος προσομοίωσης μοριακής δυναμικής υψηλής θερμοκρασίας ανόπτωσης (simulated annealing) με σκοπό να παραχθούν 30 πιθανές διαμορφώσεις τους. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν σε αυτή τη μέθοδο ήταν η θέρμανση των δομών στους 600 K για 1500 fs και στη συνέχεια ψύξη στους 250 K για 2000 fs. Χρησιμοποιήθηκε το πεδίο δυνάμεων Tripos και οι διαμορφώσεις που προέκυψαν, ελαχιστοποιήθηκαν με τον αλγόριθμο Powell με βαθμίδα ελαχιστοποίησης ενέργειας $0,05 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{\AA}^{-1}$ για 200 βήματα.

5.2.2 Προετοιμασία της πρωτεΐνης και παραμετροποίηση των υπολογιστικών προγραμμάτων προσομοίωσης

Η κρυσταλλική δομή της GlIA sPLA₂ που χρησιμοποιήθηκε για τα υπολογιστικά πειράματα είναι η 1KQU.¹¹³ Οι πλευρικές αλυσίδες που έλειπαν συμπληρώθηκαν με τη βοήθεια της εφαρμογής Prime του προγράμματος Maestro της Schrödinger.²⁹⁵

5.2.2.1 Ρυθμίσεις των πειραμάτων προσομοίωσης με το πρόγραμμα GOLD

Η πρωτεΐνη εισήχθη στο πρόγραμμα GOLD και προστέθηκαν τα υδρογόνα που έλειπαν από τη δομή. Το ενεργό κέντρο του ενζύμου ορίστηκε με κέντρο τον αναστολέα της κρυσταλλογραφικής μελέτης 1KQU και ακτίνα 5 \AA , συμπεριλαμβανομένων των κρίσιμων αμινοξέων LEU2, PHE5, HIS6, GLY29, GLY31, HIS47, ASP48, LYS52, LYS62 και ASP91. Οκτώ μόρια νερού κοντά στο ενεργό κέντρο διατηρήθηκαν και ορίστηκαν ως ‘Toggle’ και ‘Spin’ ενώ τα υπόλοιπα διαγράφηκαν από την κρυσταλλογραφική δομή. Κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης, η διαμόρφωση της πρωτεΐνης διατηρήθηκε σταθερή (rigid receptor) από το πρόγραμμα, ενώ υπάρχει η επιλογή κάποια αμινοξέα να

έχουν τη δυνατότητα περιστροφής των πλευρικών τους αλυσίδων. Έτσι, η HIS6 ορίστηκε ως ευέλικτη και οι δότες / δέκτες δεσμών υδρογόνου ορίστηκαν ως προσιτοί από το διαλύτη. Η γεωμετρία του ιόντος ασβεστίου ορίστηκε ως η προκαθορισμένη από το πρόγραμμα ('Default'). Ο αναστολέας ορίστηκε ευέλικτος με περιστροφή των αμιδικών ομάδων, των καρβοξυλομάδων και των αρωματικών δακτυλίων του.

Για τη βαθμονόμηση των λύσεων χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση *ChemScore*^{296,272} καθώς και οι παράμετροι που περιγράφονται στο φάκελο *chemscore.p450_csd.params*, ενώ συμψηφίστηκε και η εσωτερική ενέργεια του αναστολέα 'Internal ligand energy offset → Enabled'.

Επειδή στο GOLD υπολογίζονται οι αλληλεπιδράσεις και οι δεσμοί με βάση τον τύπο των ατόμων 'Atom Type', χρησιμοποιήθηκε η επιλογή 'Automatically set atom and bond types' για τον αναστολέα προκειμένου να οριστεί ο τύπος του αυτόματα από το πρόγραμμα. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η αυτόματη διόρθωση των τύπων των ατόμων και των δεσμών σε περίπτωση που υπάρχουν λάθη. Οι ρυθμίσεις του γενετικού αλγόριθμου ορίστηκαν από τις προεπιλεγμένες με 100.000 βήματα. Η επιλογή 'No of GA runs', που είναι ο αριθμός των κύκλων που χρησιμοποιείται ο γενετικός αλγόριθμος ανά πείραμα, ορίστηκε στα 10 βήματα.

5.2.2.2 Ρυθμίσεις των πειραμάτων προσομοίωσης με το πρόγραμμα GLIDE

Οι δομές των ενώσεων που σχεδιάστηκαν στο SYBYL εισήχθησαν στο Maestro και προετοιμάστηκαν κατάλληλα με την εφαρμογή LigPrep 2.3.²⁹⁷ Ο ιοντισμός των ενώσεων έγινε σε pH = 7,4 ενώ για τον προσδιορισμό του ιοντισμού χρησιμοποιήθηκε η εφαρμογή Erik 2.0.²⁹⁸ Το πεδίο δυνάμεων OPLS_2005 27 επιλέχθηκε για την ελαχιστοποίηση της ενέργειας των δομών. Η προετοιμασία της πρωτεΐνης έγινε με την εφαρμογή 'Protein Preparation Wizard'²⁹⁵ όπου ορίστηκαν οι δισουλφιδικοί δεσμοί, προστέθηκαν τα υδρογόνα και προβλέφθηκε ο ιοντισμός και η ταυτομέρεια των αμινοξέων του ενζύμου. Το ενεργό κέντρο του ενζύμου ορίστηκε ως ένας κύβος με κέντρο τον αναστολέα και μήκος πλευρών 12 Å. Για τη βαθμονόμηση των λύσεων

που παρήχθησαν από το GLIDE χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση *GlideScore* ενώ ο τρόπος πρόσδεσης ορίστηκε από τον αλγόριθμο 'extra precision' (XP) *Glide*,²⁹⁹ ο οποίος είναι πιο αξιόπιστος στις περιπτώσεις που το ενεργό κέντρο περιέχει μέταλλο.

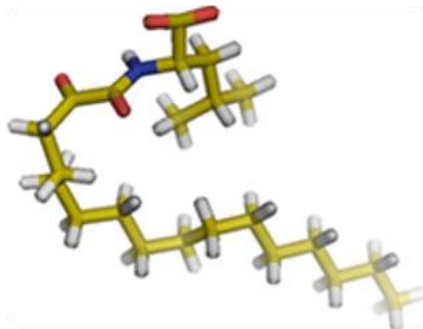
5.2.2.3 Ρυθμίσεις των πειραμάτων προσομοίωσης με το πρόγραμμα SYBYL

Η προετοιμασία της πρωτεΐνης έγινε με την εφαρμογή 'Protein Preparation'. Το ενεργό κέντρο ορίστηκε με κέντρο τον αναστολέα και με τη βοήθεια του 'protomol'. Η τιμή για το 'Threshold', το οποίο ορίζει τον όγκο του ενεργού κέντρου, ορίστηκε στα 0,5 και για το 'Bloat', όπου ορίζει αν θα συμπεριλάβει μικρές κοιλότητες που βρίσκονται κοντά στο ενεργό κέντρο, στο 0. Για την προσομοίωση της μοριακής πρόσδεσης χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος *Surflex-Dock*, κατά τη διάρκεια του οποίου η δομή της πρωτεΐνης διατηρείται σταθερή (rigid receptor), ενώ αυτή του αναστολέα παρουσιάζει πλήρη ευελιξία.

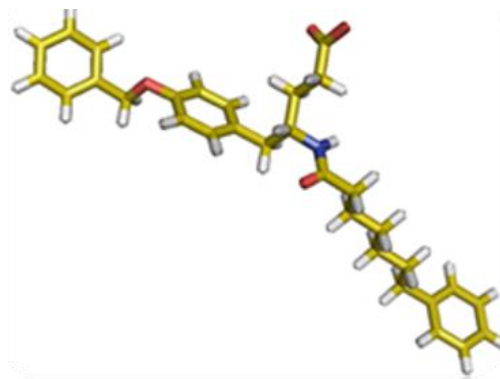
5.3 Επιλογή του κατάλληλου υπολογιστικού προγράμματος

Στο Εργαστήριο Μοριακής Μοντελοποίησης της Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας (υπεύθυνος καθ. Θ. Μαυρομούστακος) διαθέτει τρία προγράμματα προσομοίωσης της μοριακής πρόσδεσης και αυτά είναι: το GOLD 5.2 (Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC)), το Maestro 9.1 (Schrödinger computational technology) και το SYBYL 8.0 (Tripos). Προκειμένου να επιλέξουμε το καταλληλότερο πρόγραμμα για το σύστημα που εξετάζουμε, επιλέξαμε δύο γνωστούς από τη βιβλιογραφία αναστολείς. Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, αρχικά ήταν οι προβλεπόμενοι 'default' από τα προγράμματα.

Οι δύο αναστολείς που επιλέξαμε ήταν ο GK126¹¹⁸ και ένα αμιδικό παράγωγο της τυροσίνης **29**¹¹³ το οποίο έχει συγκρυσταλλωθεί με την πρωτεΐνη.



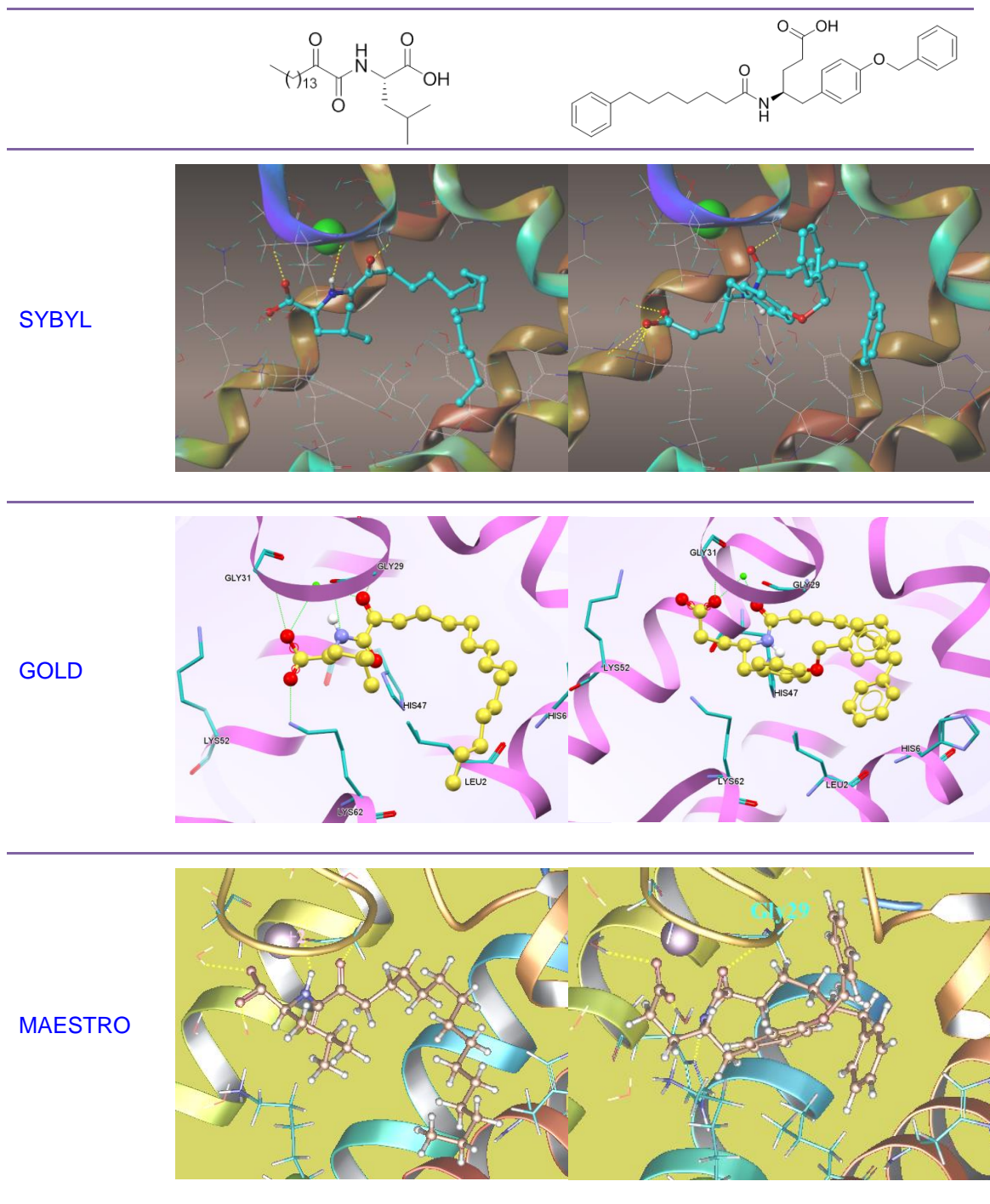
GK126



29

Τα αποτελέσματα από τα τρία προγράμματα αναγράφονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 5.3: Αποτελέσματα από τη μοριακή πρόσδεση δύο γνωστών αναστολέων με τη βοήθεια τριών διαφορετικών προγραμμάτων προσομοίωσης.



Μεταξύ των τριών προγραμμάτων, οι λύσεις που προέκυψαν για τη διευθέτηση των δύο ενώσεων στο ενεργό κέντρο του ενζύμου είναι παρόμοιες, ενώ οι αλληλεπιδράσεις ενζύμου-αναστολέα που σχηματίζονται

είναι σύμφωνες με αυτές που παρουσιάζονται στις κρυσταλλογραφικές μελέτες. Δεδομένου ότι οι βαθμονομήσεις για τις παραχθείσες διαμορφώσεις ήταν ικανοποιητικές και μέσα στις αναμενόμενες τιμές, αποφασίσαμε να συνεχίσουμε τα πειράματα με το πρόγραμμα **GOLD**, με το οποίο είχαν γίνει και τα πειράματα προσομοίωσης του αναστολέα GK126.¹¹⁸

5.4 Επιλογή της εξίσωσης βαθμονόμησης στο GOLD

Η βαθμονόμηση των αποτελεσμάτων προσομοίωσης της μοριακής πρόσδεσης με το πρόγραμμα GOLD γίνεται κυρίως με βάση την ενέργεια των διαμορφώσεων του αναστολέα, παρά με βάση τη συμμετοχή του στον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου.

Ανάλογα με το είδος των αναστολέων που θα προσομοιωθούν και την υπολογιστική μέθοδο που θα χρησιμοποιηθεί (π.χ. πολλοί αναστολείς / συγκριτικά αποτελέσματα ή ένας μόνο αναστολέας / μεμονωμένο αποτέλεσμα) το GOLD διαθέτει 4 προκαθορισμένες εξισώσεις για την βαθμονόμηση ενώ υπάρχει δυνατότητα τροποποίησης των παραμέτρων της κάθε εξίσωσης.

Η εξίσωση βαθμονόμησης *GoldScore* βασίζεται κυρίως στο σχηματισμό αλληλεπιδράσεων Van der Waals και δεσμών υδρογόνου.

Στην εξίσωση βαθμονόμησης *ChemScore* η ενέργεια πρόσδεσης διαμορφώνεται από παραμέτρους που επηρεάζονται από το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου, την αλληλεπίδραση μετάλλου / αναστολέα και την λιποφιλικότητα του αναστολέα. Επίσης, στην εξίσωση περιλαμβάνεται ο όρος / φραγμός $\Delta E(\text{clash})$ για φτωχές ενεργειακά διαμορφώσεις και η ενέργεια από την εσωτερική συστροφή $\Delta E(\text{int})$. Οι δύο αυτοί όροι αποκτούν μεγάλες τιμές για διαμορφώσεις που δεν ευνοούνται ενεργειακά.

Η εξίσωση βαθμονόμησης *Astex Statistical Potential (ASP)* υπολογίζει στατιστικά τα αποτελέσματα από πιθανές αλληλεπιδράσεις ατόμου- ατόμου.

Τέλος, στην εξίσωση βαθμονόμησης *ChemPLP* οι σχηματιζόμενοι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ του ενεργού κέντρου του ενζύμου και του αναστολέα, οι

οποίοι εξαρτώνται από τη γωνία και την απόσταση, παίζουν ρόλο στη διαμόρφωση του αθροίσματος.

Για την επιλογή της καταλληλότερης εξίσωσης για το σύστημα GIIA sPLA₂-2-οξοαμιδικά παράγωγα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα προσομοίωσης της μοριακής πρόσδεσης των ενώσεων GK126, 29 και BR4 (PDB: 1KQU) στα οποία χρησιμοποιήθηκε διαφορετική εξίσωση βαθμονόμησης κάθε φορά. Οι εξισώσεις βαθμονόμησης και οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε πείραμα καταγράφεται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 5.4: Πειράματα προσομοίωσης για την επιλογή της καταλληλότερης εξίσωσης βαθμονόμησης.

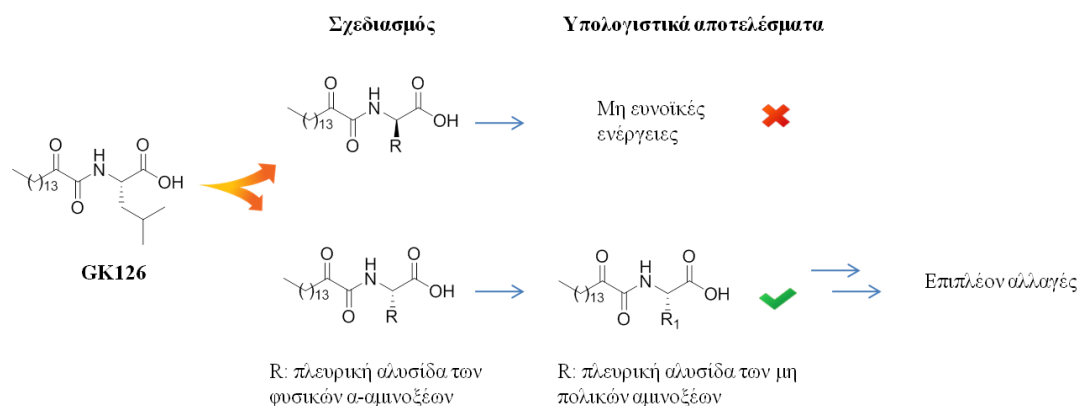
ενώσεις 'οδηγοί' που προσομοιώθηκαν	εξισώσεις βαθμονόμησης / παράμετροι
GK126 29 BR4 (PDB: 1KQU)	GoldScore/Default
	GoldScore/gold.params
	ChemScore/chemscore.params
	ChemScore/gold.params
	ASP/asp.params
	ChemPLP/chemplp.params

Τα υπολογιστικά αποτελέσματα που προέκυψαν από την εξίσωση βαθμονόμησης *ChemScore* με τη χρήση των παραμέτρων που περιγράφονται στο *chemscore.params*, αναπαρήγαγαν με μεγαλύτερη ακρίβεια τα πειραματικά αποτελέσματα. Αυτός ο συνδυασμός εξίσωσης και παραμέτρων χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα προσομοίωσης της μοριακή πρόσδεσης.

5.5 Σχεδίαση νέων υποψήφιων αναστολέων της GIIA sPLA₂ με βάση τη δομή του αναστολέα GK126

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, στο εργαστήριο του καθηγητή Γ. Κόκοτου, έχει γίνει σχεδιασμός και σύνθεση 2-οξοαμιδικών παραγώγων ως αναστολέων των φωσφολιπασών A₂. Από αυτούς, ο GK126 είχε την ισχυρότερη δράση στην αναστολή της GIIA sPLA₂.

Προκειμένου να βελτιώσουμε τη δράση του, μελετήσαμε αλλαγές στην πλευρική αλυσίδα της λευκίνης. Αρχικά, η λευκίνη αντικαταστάθηκε από άλλα φυσικά αμινοξέα (*S*) και (*R*) απεικόνισής (Σχήμα 5.1).



Σχήμα 5.1: Πορεία εργασίας για τον σχεδιασμό νέων υποψήφιων αναστολέων.

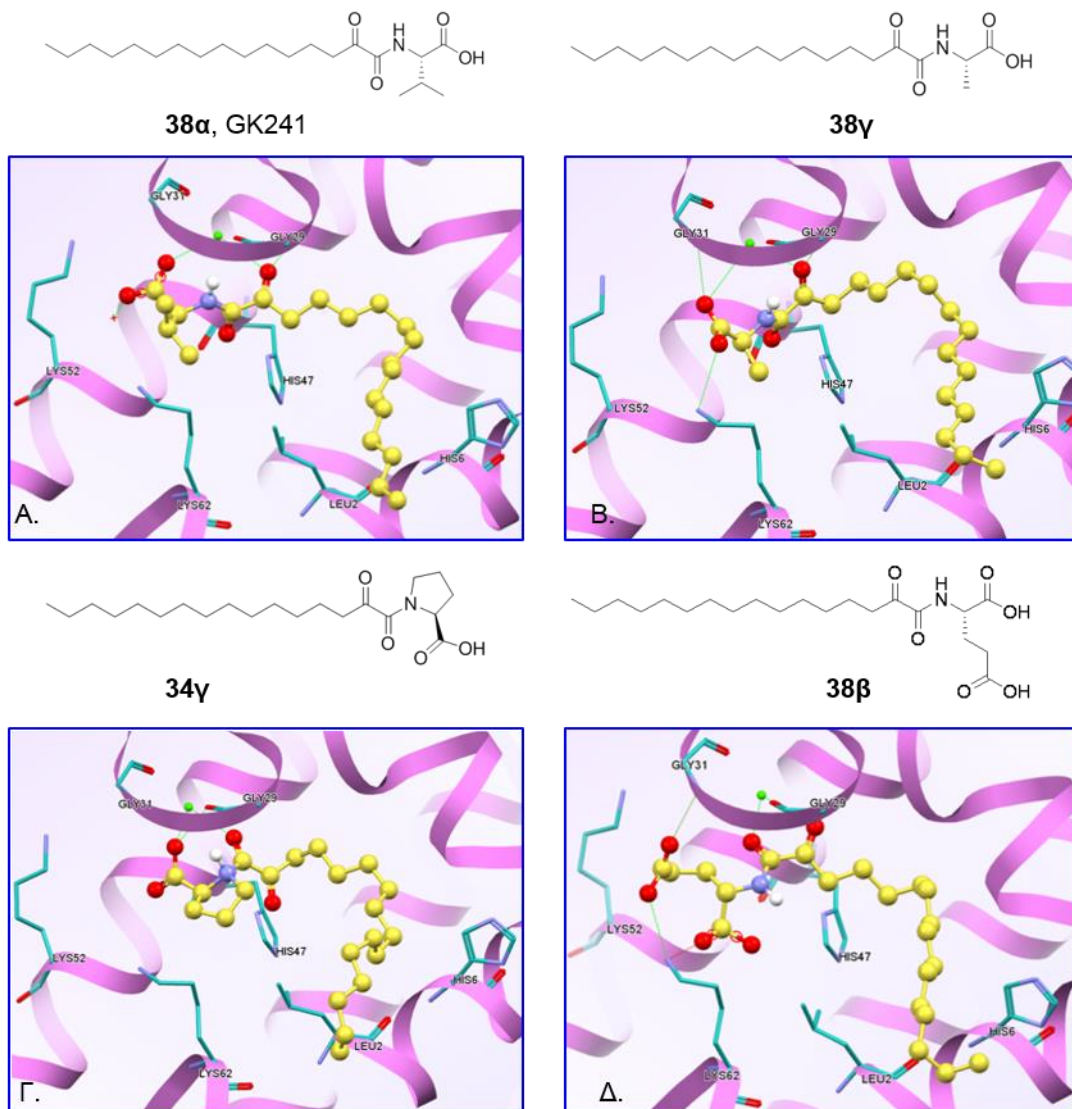
Οι δομές σχεδιάστηκαν στο SYBYL, όπως αναφέρθηκε στο υποκεφάλαιο 5.2.1, και εισήχθησαν στο GOLD για τα πειράματα προσομοίωσης της μοριακής πρόσδεσης τους στο ενεργό κέντρο της GIIA sPLA₂. Σε αυτό το πρώτο βήμα των υπολογιστικών πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκε μια διαμόρφωση από κάθε δομή για να προσομοιωθεί, προκειμένου να μειωθεί ο απαιτούμενος χρόνος για τη διεξαγωγή των υπολογισμών. Τα αποτελέσματα εκτιμήθηκαν με βάση: α) τη διευθέτηση των ενώσεων στο ενεργό κέντρο β) τις αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ ένωσης και ενεργού κέντρου και γ) τη βαθμονόμησή τους.

Για να επιτευχθεί η καλύτερη σύγκριση των υπολογισμών, τα 2-οξοαμιδικά παράγωγα χωρίστηκαν σε ομάδες που περιείχαν 3 έως 4 αμινοξέα. Η επιλογή έγινε με βάση τις ιδιότητες των αμινοξέων (π.χ. πολικά, μη πολικά), έτσι ώστε κάθε ομάδα να αποτελείται από διαφορετικούς τύπους αμινοξέων.

Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι τα παράγωγα των αμινοξέων με (*R*) απεικόνιση είχαν χαμηλότερες βαθμονομήσεις συγκριτικά με αυτά με (*S*), κάτι το οποίο έχει παρατηρηθεί και σε *in vitro* πειράματα.¹¹⁸ Γι' αυτό, σε αυτό το στάδιο προχωρήσαμε την έρευνα με τις δομές (*S*) απεικόνισής. Για κάθε μια από τις ενώσεις αυτές, παρήχθησαν 30 πιθανές διαμορφώσεις με τη μέθοδο προσομοίωσης μοριακής δυναμικής υψηλής θερμοκρασίας ανόπτησης και

προσομοιώθηκε η πρόσδεσή τους στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Ο λόγος που ακολουθήσαμε αυτή την πορεία ήταν για να αυξήσουμε τον αριθμό των παραγόμενων λύσεων έτσι ώστε να μειωθεί το στατιστικό λάθος επί του συνόλου των λύσεων.

Από αυτό τον κύκλο πειραμάτων προέκυψε ότι τα 2-οξοαμιδικά παράγωγα των αμινοξέων με μη πολικές πλευρικές αλυσίδες ήταν αυτά που είχαν τις επιθυμητές διαμορφώσεις σε μεγαλύτερο ποσοστό από ότι τα άλλα παράγωγα. Στο Σχήμα 5.2 απεικονίζονται μερικά από τα αποτελέσματα της διεύθησης των ενώσεων στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Οι αλληλεπιδράσεις που περιγράφονται στο Σχήμα 5.2, αναγράφονται αναλυτικά στο Πίνακα 5.5 που ακολουθεί. Στο Σχήμα 5.2 αναγράφονται και τα αποτελέσματα για το παράγωγο του (S)-γλουταμινικού οξέος για λόγους σύγκρισης.



Σχήμα 5.2: Τρόπος πρόσδεσης των 2-οξοαμιδικών παραγώγων όπως υπολογίστηκαν με χρήση του λογισμικού GOLD.

Πίνακας 5.5: Οι κύριες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των 2-οξοαμιδικών παραγώγων και του ενεργού κέντρου της GIIA sPLA₂ όπως υπολογίστηκαν με χρήση του λογισμικού GOLD.

Ηλεκτροστατικές Αλληλεπιδράσεις
Ca ²⁺ --- COO ⁻
Ca ²⁺ --- OCOCNH
Υδρογονικοί Δεσμοί
GLY29 --- OCNH / OCOCNH
GLY31 --- COO ⁻

Οι βαθμονομήσεις και οι ενεργειακοί υπολογισμοί για τις λύσεις του Σχήματος 5.2 συνοψίζονται στο Πίνακα 5.6.

Πίνακας 5.6: Ενεργειακοί υπολογισμοί για τις διαμορφώσεις των 2-οξοαμιδικών παραγώγων κατά την πρόσδεση, όπως υπολογίστηκαν από το GOLD.

Παράγωγο	ChemScore.Fitness	ΔG	ΔE_{clash} .Weighted	Rot.Weightd
GK241 , (S)-βαλίνη	36,69	-42,41	2,68	8,41
34β , (S)-προλίνη	34,03	-39,84	1,53	10,15
38γ , (S)-αλανίνη	33,13	-38,16	3,77	9,29
38δ , (S)-γλουταμινικό οξύ	27,65	-39,67	8,55	12,88

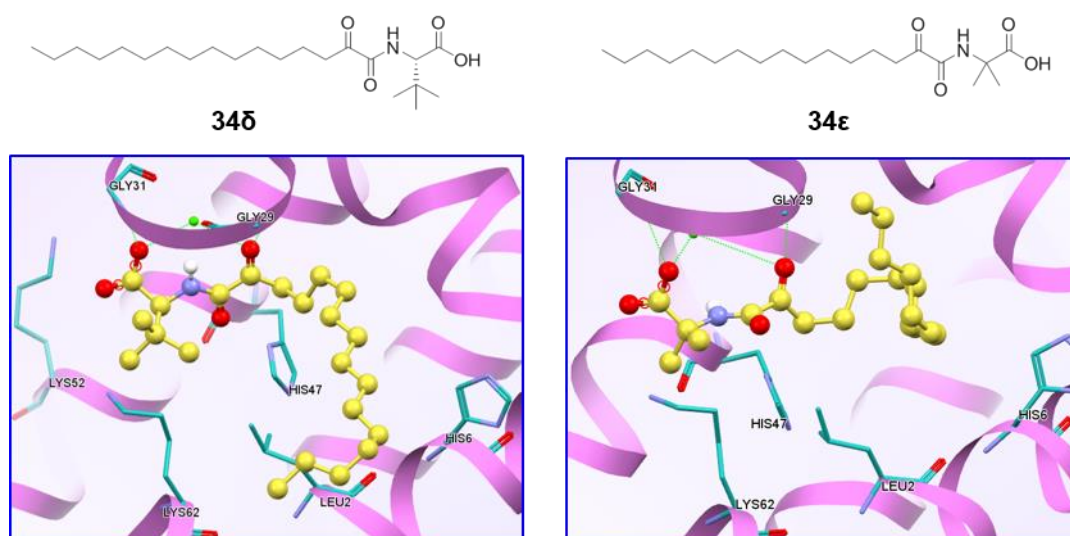
Από τον παραπάνω πίνακα, παρατηρούμε ότι οι λύσεις της γενικής εξίσωσης *ChemScore* για κάθε ένωση έχουν μικρές αριθμητικές διαφορές μεταξύ τους. Αυτό συμβαίνει πιθανότατα διότι οι ενώσεις που προσδέθηκαν έχουν μικρές δομικές διαφορές. Κατά συνέπεια, η βαθμονόμηση των ενώσεων με βάση αυτές τις λύσεις δεν είναι αρκετή για τη σωστή αξιολόγησή τους. Για τον λόγο αυτό, επιχειρήσαμε να αξιολογήσουμε τις ενώσεις και με βάση τους όρους της εξίσωσης *ChemScore* που δείχνουν το ενεργειακό κόστος (penalty) κατά την πρόσδεση, όπως ΔE_{clash} .Weighted και Rot.Weightd.

Με τον όρο ΔE_{clash} .Weighted εκτιμά την αρνητική συνεισφορά από τις αλληλεπιδράσεις στις οποίες τα άτομα που συμμετέχουν βρήσκονται σε λάθος απόσταση (π.χ. πολύ κοντά). Επίσης, συνυπολογίζει και τη λάθος γεωμετρία που πιθανόν να έχει ο αναστολέας κατά την πρόσδεση, όπως λάθος στην τάση δεσμών. Ο όρος Rot.Weightd. εκτιμά τις μη ενεργειακά ευνοϊκές αλλαγές εξ αιτίας του εντροπικού όρου, όταν οι απλοί άκυκλοι δεσμοί της ένωσης χάνουν τη δυνατότητα περιστροφής λόγω της πρόσδεσης.

Συνήθως, οι ενώσεις για τις οποίες οι αρνητικοί όροι της εξίσωσης *ChemScore* έχουν μεγάλες τιμές και σε μεγάλο ποσοστό (επί του συνόλου των λύσεων) σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ενώσεις, τείνουν να μην έχουν καλά βιολογικά αποτελέσματα, έστω και αν το αποτέλεσμα της εξίσωσης *ChemScore* είναι ικανοποιητικό.

Για παράδειγμα, η χωρική διευθέτηση του 2-οξοαμιδικού παραγώγου του γλουταμινικού οξέος **38δ** είναι ικανοποιητική (Σχήμα 5.2Δ) και δημιουργεί τις επιθυμητές αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου. Ωστόσο, οι τιμές των όρων που σχετίζονται με το ενεργειακό κόστος της πρόσδεσής του (ΔE_{clash.Weighted} και Rot.Weighted), είναι μεγαλύτερες σε σχέση με των άλλων ενώσεων. Το γεγονός αυτό πιθανόν να εξηγεί τη χαμηλή βιολογική του δράση.

Δεδομένων των παραπάνω υπολογιστικών αποτελεσμάτων, αποφασίσαμε να εξετάσουμε και δύο παράγωγα μη φυσικών αμινοξέων. Τα 2-οξοαμιδικά παράγωγα της *tert*-λευκίνης και του 2-αμινοϊσοβουτυρικού οξέος σχεδιάστηκαν και προσομοιώθηκε η πρόσδεσή τους στο ενεργό κέντρο της GIIA sPLA₂ με τη βοήθεια του προγράμματος GOLD. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στο Σχήμα 5.3. Παρατηρούμε ότι σχηματίζονται αλληλεπιδράσεις μεταξύ της καρβοξυλομάδας και της α-κετομάδας με το ασβέστιο του ενεργού κέντρου. Επιπλέον, σχηματίζεται ένας δεσμός υδρογόνου με την GLY29 και με την GLY31 αντίστοιχα.



Σχήμα 5.3: Τρόπος πρόσδεσης των 2-οξοαμιδικών παραγώγων της (*S*)-*tert*-λευκίνης (αριστερά) και του 2-αμινοϊσοβουτυρικού οξέος (δεξιά) όπως υπολογίστηκαν στο GOLD.

Τα αποτελέσματα των ενεργειακών υπολογισμών για τις δύο ενώσεις αναγράφονται στον Πίνακα 5.7.

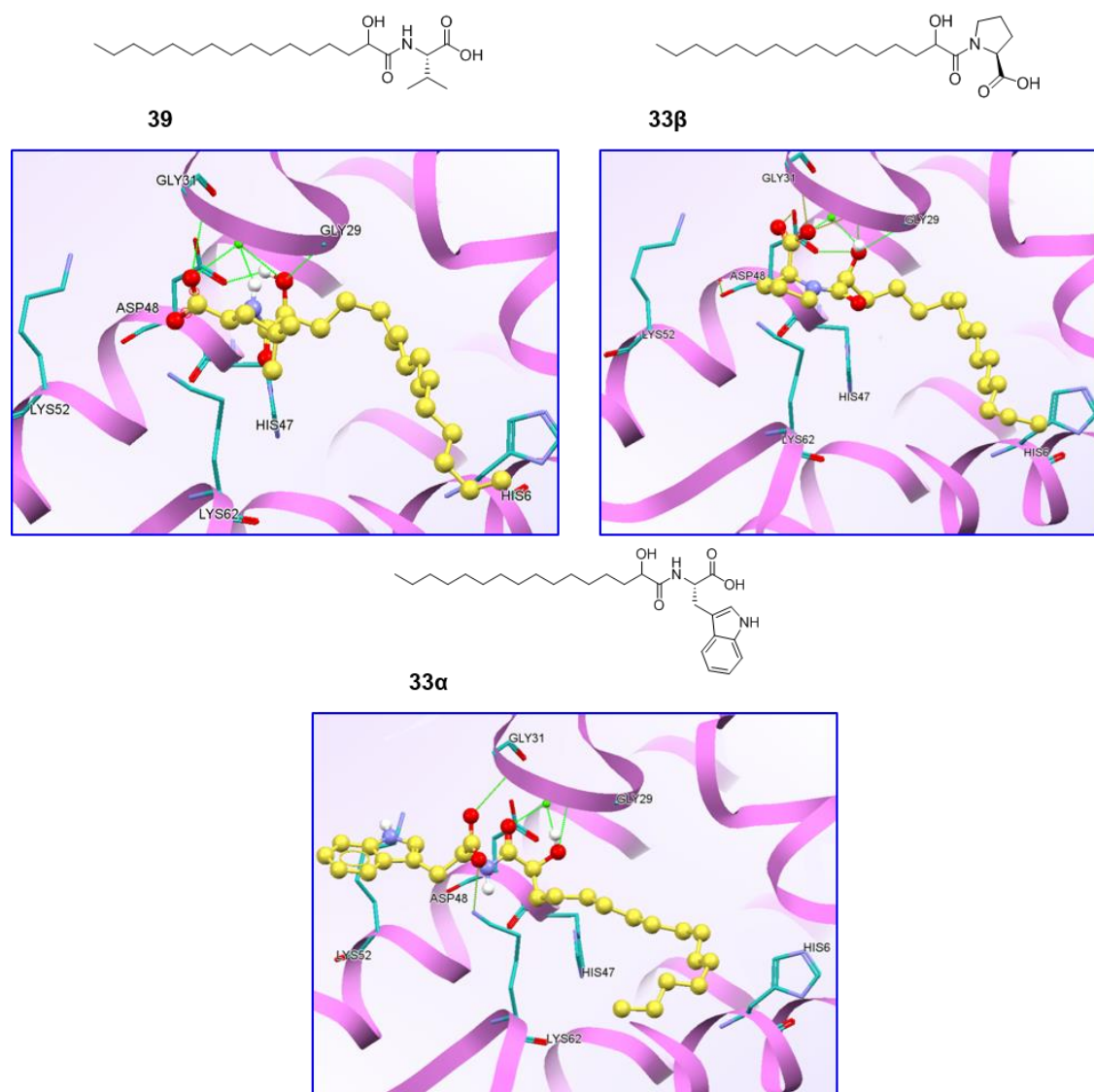
Πίνακας 5.7: Ενεργειακοί υπολογισμοί για τις διαμορφώσεις των ενώσεων 34γ και 34δ κατά την πρόσδεση, όπως υπολογίστηκαν στο GOLD.

Παράγωγο	ChemScore.Fitness	ΔG	ΔE_{clash} .Weighted	Rot.Weightd
34γ , (S)- <i>tert</i> -λευκίνη	33,25	-41,32	7,25	8,03
34δ , 2-αμινοϊσοβουτυρικό οξύ	31,69	-38,95	3,19	8,66

Στοχεύοντας στην αύξηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αναστολέων και του ενεργού κέντρου, αποφασίσαμε να σχεδιάσουμε και να μελετήσουμε 2-οξοαμιδικά παράγωγα διπεπτιδίων. Από τα αποτελέσματα των υπολογισμών, τα παράγωγα των διπεπτιδίων της βαλίνης, της φαινυλαλανίνης και της θρυπτοφάνης με την προλίνη, έδειξαν να έχουν περισσότερες πιθανότητες να προσδεθούν στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.

Επίσης, παράγωγα της 2-υδροξυαμιδικής ομάδας εξετάστηκαν προκειμένου να διερευνήσουμε το ρόλο της α -κετοομάδας στην πρόσδεση των αναστολέων. Τα υπολογιστικά τους αποτελέσματα (Σχήμα 5.4) ήταν ικανοποιητικά και παρατηρήθηκε ότι η 2-υδρόξυ ομάδα αλληλεπιδρά με το μέταλλο του ενεργού κέντρου.

Με βάση τους παραπάνω θεωρητικούς υπολογισμούς, προχωρήσαμε στην σύνθεση και τη βιολογική αποτίμηση της δράσης των 2-οξοαμιδικών παραγώγων μη πολικών αμινοξέων (**GK241**, **38γ-δ**, **34β**) και των δύο μη φυσικών αμινοξέων (**34γ**, **34δ**). Επίσης, το ίδιο έγινε και για τα τρία 2-οξοαμιδικά παράγωγα των διπεπτιδίων και τα 2-υδροξυαμιδικά παράγωγα μη πολικών αμινοξέων (**39** και **33α, β**).



Σχήμα 5.4: Τρόπος πρόσδεσης των 2-υδροξυαμιδικών παραγώγων των ενώσεων **39**, **33α** και **33β** στο ενεργό κέντρο της GIIA sPLA₂.

5.6 *In vitro* βιολογική αποτίμηση των 2-οξοαμιδικών παραγώγων

Οι ενώσεις που συντέθηκαν (η σύνθεσή τους παρουσιάζεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 6) στάλθηκαν στον καθηγητή του Πανεπιστημίου της Washington Michael Gelb, για τη βιολογική αποτίμηση της δράσης τους. Από τα αποτελέσματα, το 2-οξοαμιδικό παράγωγο της (S)-βαλίνης **GK241** ήταν αυτό που έδωσε ισχυρότερη αναστολή από τον γνωστό αναστολέα GK126. Τα πειράματα που εκτελέστηκαν και συνοψίζονται στο Πίνακα 5.8 αφορούν τον προσδιορισμό της βιολογικής δράσης (IC₅₀) του αναστολέα **GK241** έναντι των

μελών IIA και V των εκκριτικών φωσφολιπασών ανθρώπινης προέλευσης καθώς επίσης και έναντι της IIA μη ανθρώπινης προέλευσης (ποντίκια).

Πίνακας 5.8: IC₅₀ τιμές των ενώσεων GK241 και GK126 έναντι των εκκριτικών hGIIA, hGV και mGIIA.

IC ₅₀ τιμή	hGIIA	hGV	mGIIA
GK241	143 ± 50 nM	1200 ± 50 nM	68 ± 16 nM
GK126	300 ± 60 nM	440 ± 40 nM	180 ± 40 nM

Όπως φαίνεται από τον πίνακα, η δράση του **GK241** είναι ισχυρότερη από αυτή του GK126 και για τις δύο IIA, ανθρώπινης και ζωικής προέλευσης. Επίσης, είναι 10 φορές εκλεκτικότερη για την IIA από ότι για την V. Τα δύο αυτά μέλη χαρακτηρίζονται από υψηλή ομολογία και είναι δύσκολο να συντεθεί εκλεκτικός αναστολέας για αυτά.

Τα πειράματα συνεχίστηκαν με τον προσδιορισμό της δράσης του αναστολέα **GK241** έναντι και των άλλων μελών της εκκριτικής φωσφολιπάσης, προκειμένου να προσδιοριστεί η εκλεκτικότητά του. Στον πίνακα που ακολουθεί συγκεντρώνονται τα πειραματικά αποτελέσματα.

Πίνακας 5.9: Η δράση της ένωσης GK241 σε άλλες sPLA₂.

Μέλος	hGX	hGIB	mGX	hGIIE	hGIIF	mIID	mGV
% δραστικότητα σε 1 μM	5	2	2	7	6	1	10

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά, η αναστολή που προκαλεί ο αναστολέας **GK241** στη λειτουργία των άλλων μελών της εκκριτικής φωσφολιπάσης είναι αμελητέα. Αυτό προσδίδει πολύ ισχυρή εκλεκτικότητα στην ένωση, η οποία δρα ισχυρά έναντι της IIA.

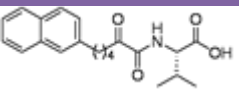
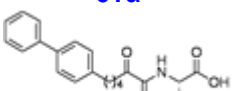
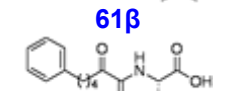
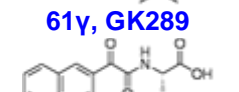
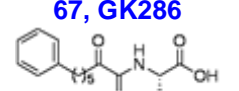
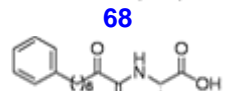
5.7 Σχεδιασμός νέων υποψήφιων αναστολέων με βάση τη δομή του αναστολέα GK241

Με βάση τα πειραματικά *in vitro* αποτελέσματα της ένωσης **GK241**, επιχειρήσαμε να βελτιώσουμε τη δράση της πραγματοποιώντας αλλαγές στη δομή της. Γνωρίζουμε ότι η μακριά αλειφατική αλυσίδα από την οποία

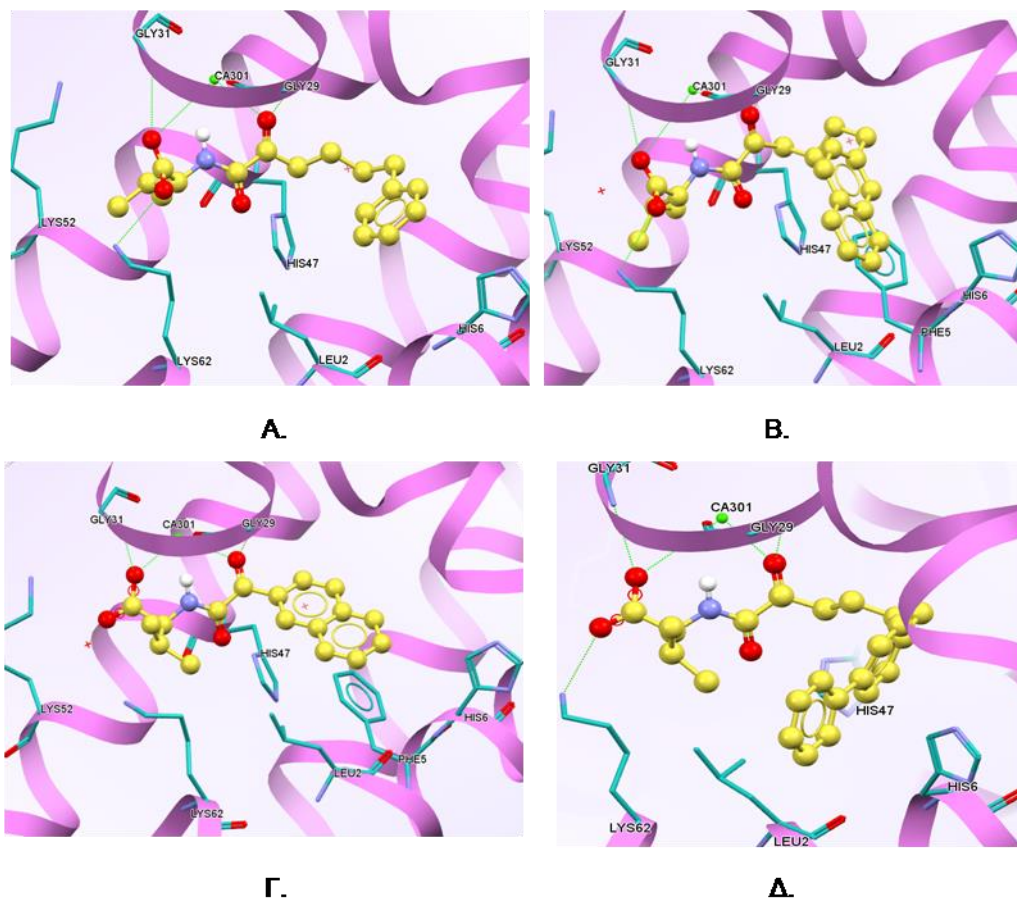
αποτελείται η δομή της ένωσης, είναι αρκετά ευέλικτη. Ωστόσο, η ευελιξία της περιορίζεται κατά την πρόσδεση, πράγμα που ενεργειακά συνεπάγεται εντροπικό κόστος. Θεωρήσαμε λοιπόν, ότι ένα μόριο το οποίο θα ήταν λιγότερο ευέλικτο, θα μπορούσε να προσδεθεί πιο σταθερά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και ταυτόχρονα θα μειωνόταν το ενεργειακό κόστος λόγω της πρόσδεσής του.

Αρχικά, σχεδιάσαμε ενώσεις στις οποίες η μακριά αλειφατική αλυσίδα είχε αντικατασταθεί με μία μικρότερη που έφερε κάποιο αρωματικό σύστημα. Τα αρωματικά συστήματα που χρησιμοποιήσαμε ήταν του φαινυλίου, του ναφθαλενίου και του διφαινυλίου. Μερικές από τις ενώσεις που σχεδιάστηκαν και προσομοιώθηκε η πρόσδεσή τους στο ενεργό κέντρο του ενζύμου IIA με τη βοήθεια του προγράμματος GOLD, φαίνονται στο πίνακα που ακολουθεί. Τα κριτήρια επιλογής της κατάλληλης λύσης για κάθε ένωση ήταν: α. ο κατάλληλος προσανατολισμός της ένωσης στο ενεργό κέντρο, β. τη βαθμονόμηση από το πρόγραμμα, γ. τους όρους ΔG και $\Delta E_{\text{clashWeighted}}$.

Πίνακας 5.10: Αποτελέσματα από τα πειράματα προσομοίωσης παραγώγων της ένωσης GK241.

	ChemScore Fitness	DG	DEclash Weighted	Rot.Weighted
 61α	37,02	-40,33	2,51	6,40
 61β	40,99	-46,45	3,26	6,35
 61γ, GK289	38,03	-38,72	0,37	6,51
 67, GK286	35,76	-43,13	4,93	4,22
 68	36,89	-41,13	2,78	6,80
 69	34,34	-41,57	5,71	7,06

Στο σχήμα που ακολουθεί απεικονίζεται ο τρόπος πρόσδεσης μερικών ενώσεων από τον πίνακα.



Σχήμα 5.5: Υπολογιστικά αποτελέσματα της πρόσδεσης των ενώσεων Α. 61γ, Β. 61α, Γ. 67 και Δ. 61β στο ενεργό κέντρο της GIIA sPLA₂.

Οι ενώσεις 68 και 69 δεν είχαν σωστή τοποθέτηση στο ενεργό κέντρο και γι' αυτό δεν συντέθηκαν.

5.8 *In vitro* βιολογική αποτίμηση των 2-οξοαμιδικών παραγώγων της ένωσης GK241

Οι ενώσεις 61α, 61β, 61γ και 67 συντέθηκαν και στάλθηκαν στο καθηγητή του Πανεπιστημίου της Washington Michael Gelb, για τη βιολογική αποτίμηση της δράσης τους. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ένζυμα τεσσάρων διαφορετικών τύπων της εκκριτικής φωσφολιπάσης A₂ (Πίνακας 5.11).

Πίνακας 5.11: Δράση των ενώσεων 61α, 61β, 61γ και 67 έναντι της εκκριτικής φωσφολιπάσης A₂.

Ένωση	%αναστολή*			
	hGIIA	hGIB	hGV	hGX
61α	27	20	26	51
61β	21	30	50	54
61γ	11	56	40	40
67	50	50	53	56

*10 μM συγκέντρωση του αναστολέα στο τελικό δ/μα.

Από τα βιολογικά αποτελέσματα των ενώσεων κανένα ανάλογο του αναστολέα **GK241** δεν παρουσίασε ανάλογη ή βελτιστοποιημένη βιολογική δράση. Προκειμένου να κατανοηθεί ο τρόπος με τον οποίο η αλλαγή της δομής του **GK241** μετέβαλε αρνητικά τη προβλεπόμενη βιολογική δράση των παραγώγων του, πραγματοποιήθηκαν πειράματα προσομοίωσης της μοριακής δυναμικής τα οποία αναφέρονται στη συνέχεια.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟΨΗΦΙΩΝ

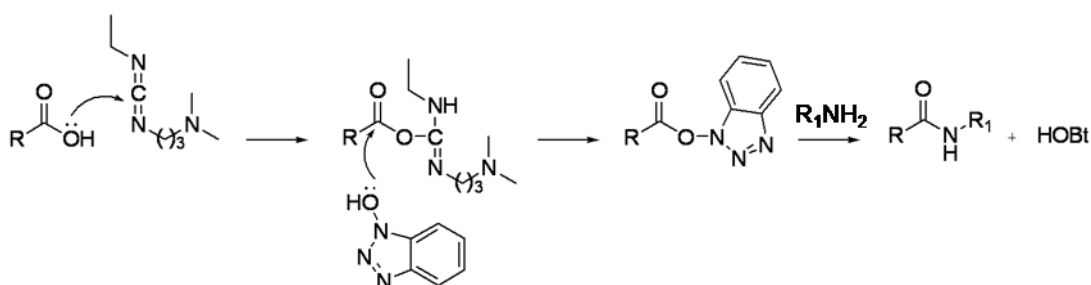
ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ

6.1 Συνθετική πορεία των ενώσεων που σχεδιάστηκαν με βάση τη δομή του αναστολέα GK126

6.1.1 Σύνθεση 2-οξοαμιδικών παραγώγων των α-αμινοξέων

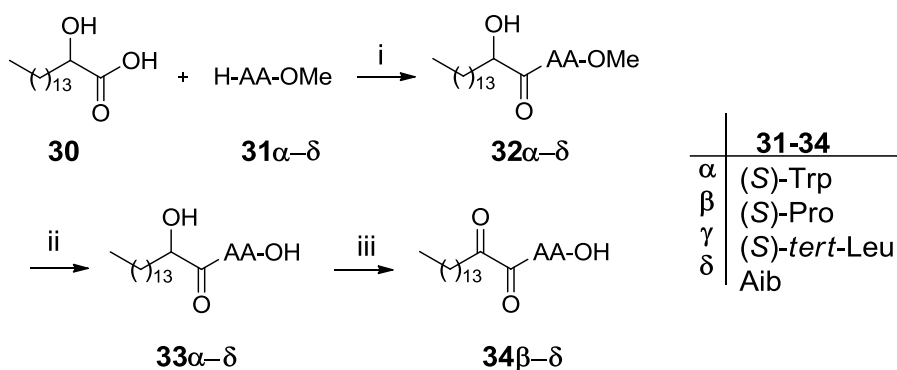
Η σύνθεση των 2-οξοαμιδικών παραγώγων ξεκίνησε από τη σύζευξη του 2-υδρόξυ δεκαεξανοϊκού οξέος με τον εστέρα του κατάλληλου κάθε φορά αμινοξέος.

Η αντίδραση σύζευξης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αντιδραστήριου σύζευξης N-αιθυλο-N'-διμεθυλαμινοπυρολυλοκαρβοδιιμίδιο (WSCl·HCl), παρουσία του 1-υδροξυβενζοτριάζολιου (HOBt) και βάσης τριαιθυλαμίνης, σε άνυδρο διαλύτη διχλωρομεθάνιο.¹¹⁸ Στο σχήμα που ακολουθεί φαίνεται ο μηχανισμός σύζευξης.



Σχήμα 6.1: Μηχανισμός της αντίδρασης σύζευξης με το αντιδραστήριο WSCl·HCl παρουσία HOBt.

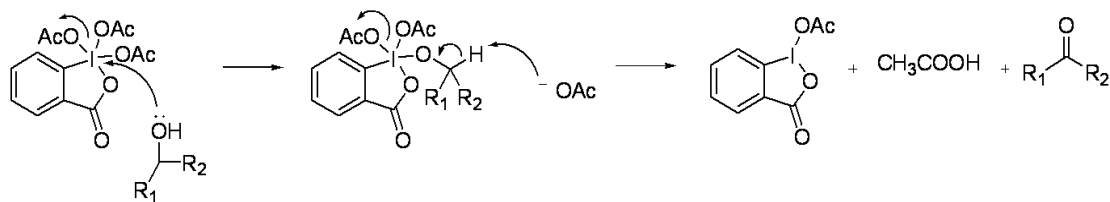
Όπως φαίνεται στο Σχήμα 6.2, από τη σύζευξη του 2-υδρόξυ δεκαεξανοϊκού οξέος με τον μεθυλεστέρα του εκάστοτε αμινοξέως, προέκυψε το αντίστοιχο παράγωγο **32** το οποίο στην συνέχεια υπέστη σαπωνοποίηση σε βασικές συνθήκες. Τέλος, το 2-υδροξυαμιδικό παράγωγο **33** οξειδώθηκε στο αντίστοιχο 2-οξοαμιδικό παράγωγο **34** με το αντιδραστήριο Dess-Martin,³⁰⁰ σε διαλύτη άνυδρο δίχλωρομεθάνιο.



Αντιδραστήρια και συνθήκες: i. WSCI·HCl, HOBt, Et₃N, CH₂Cl₂; ii. δ/μα NaOH 1N, MeOH; iii. Dess-Martin, CH₂Cl₂.

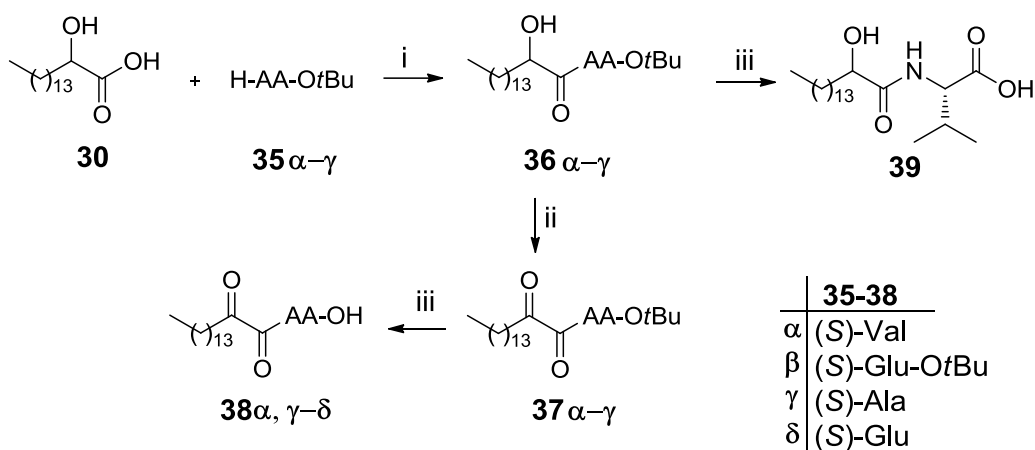
Σχήμα 6.2: Πορεία για τη σύνθεση των 2-οξοαμιδικών παραγώγων με πρώτη ύλη μεθυλεστέρες αμινοξέων.

Το αντιδραστήριο Dess-Martin (1,1,1-τριακετοξυ-1,1-διϋδρο-βενζοϊωδοξολ-3(1*H*)-όνη) είναι ήπιο οξειδωτικό πρωτοταγών αλκοολών προς αλδεΐδες και δευτεροταγών αλκοολών προς κετόνες. Στην περίπτωση των αλκοολών, ο μηχανισμός φαίνεται παρακάτω.



Σχήμα 6.3: Οξείδωση δευτεροταγούς αλκοόλης από το αντιδραστήριο Dess-Martin.

Στις περιπτώσεις που η σύνθεση ξεκίνησε από την σύζευξη του *tert*-βουτυλεστέρα του αμινοξέος **35** (Σχήμα 6.4), το 2-υδροξυαμιδικό παράγωγο **36** οξειδώθηκε στον αντίστοιχο 2-οξοαμιδικό παράγωγο **37**. Τέλος, έγινε απομάκρυνση της *tert*-βουτυλο-προστατευτικής ομάδας του καρβοξυλίου σε όξινες συνθήκες με τη χρήση διαλύματος 50% τριφθοροξικού οξέος σε διχλωρομεθάνιο, για την παραλαβή του τελικού προϊόντος **38** και **39**. Η οξείδωση της 2-υδροξυ ομάδας έγινε με τη χρήση του αντιδραστηρίου Dess-Martin.

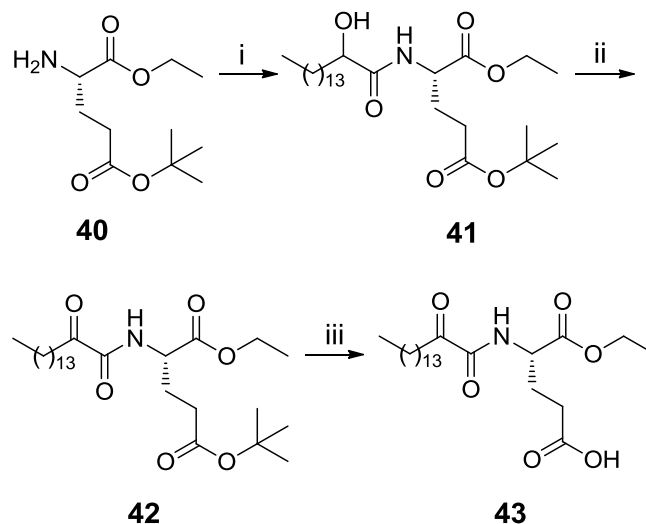


Αντιδραστήρια και συνθήκες: i. WSCI·HCl, HOBT, Et₃N, CH₂Cl₂; ii. Dess-Martin, CH₂Cl₂; iii. CF₃COOH, CH₂Cl₂.

Σχήμα 6.4: Πορεία για τη σύνθεση των 2-οξοαμιδικών παραγώγων με πρώτη ύλη *tert*-βουτυλεστέρες αμινοξέων.

6.1.2 Σύνθεση του (S)-5-αιθοξυ-5-οξο-4-(2-οξοδεκαεξαναμιδο)πεντανοϊκού οξέος

Η σύνθεση της ένωσης **43** ακολούθησε τη συνθετική πορεία που περιγράφεται στο Σχήμα 6.5.



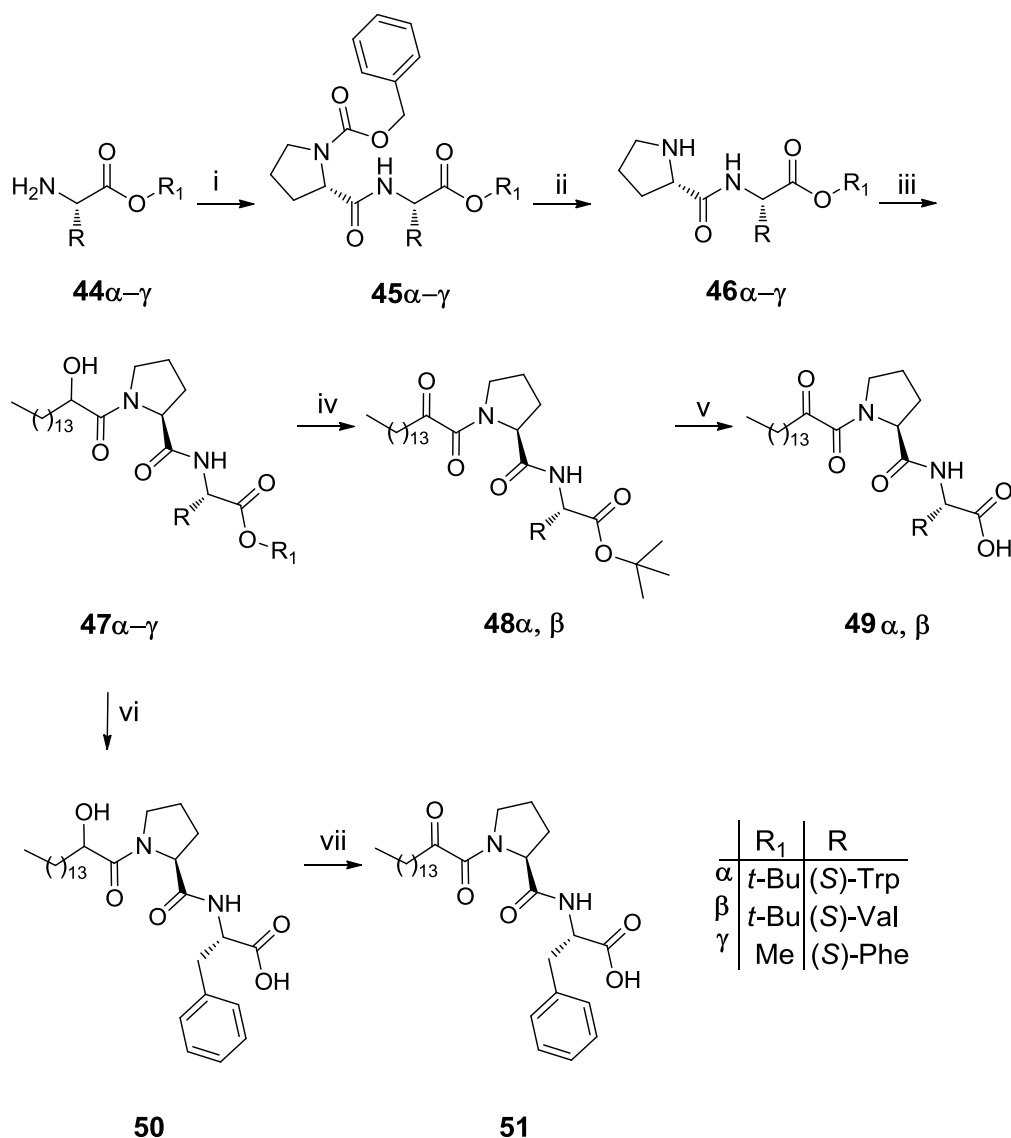
Αντιδραστήρια και συνθήκες: i. CH₃(CH₂)₁₃CHOHCOOH (**30**), WSCI·HCl, HOBT, Et₃N, CH₂Cl₂; ii. Dess-Martin, CH₂Cl₂; iii. CF₃COOH, CH₂Cl₂.

Σχήμα 6.5: Πορεία για τη σύνθεση της ένωσης **43**.

Αρχικά, πραγματοποιείται σύζευξη του 2-υδροξυδεκαεξανοϊκού οξέος **30** με το προστατευμένο παράγωγο γλουταμινικού οξέος **40**, χρησιμοποιώντας ως αντιδραστήριο σύζευξης το WSCI·HCl παρουσία HOBt. Στη συνέχεια, το 2-υδροξυαμίδιο **41** που παράγεται, οξειδώνεται με τη μέθοδο Dess-Martin στον αντίστοιχο 2-οξοαμίδιο **42**. Το επιθυμητό προϊόν **43** λαμβάνεται μετά από την αποπροστασία του γ-καρβοξυλίου της ένωσης **42** σε όξινες συνθήκες με TFA.

6.1.3 Σύνθεση 2-οξοαμιδικών παραγώγων των διπεπτιδίων

Η συνθετική πορεία των 2-οξοαμιδικών παραγώγων των διπεπτιδίων ξεκίνησε με τη σύζευξη της Z-προστατευμένης προλίνης με τον αντίστοιχο εστέρα του κατάλληλου αμινοξέος **44** (Σχήμα 6.6). Η πορεία που ακολουθήθηκε για την σύζευξη έχει περιγραφεί παραπάνω.



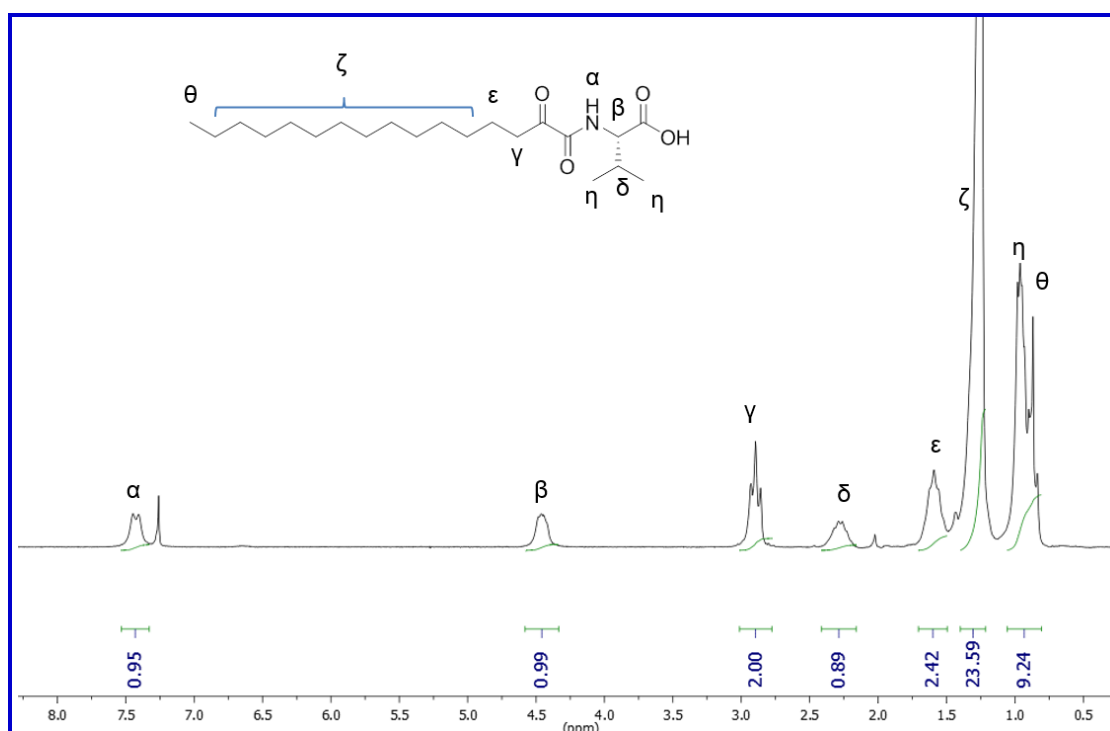
Αντιδραστήρια και συνθήκες: i. (Z)-Pro, WSCI·HCl, HOBT, Et₃N, CH₂Cl₂; ii. H₂/Pd, THF; iii. CH₃(CH₂)₁₃CHOHCOOH (**30**), WSCI·HCl, HOBT, Et₃N, CH₂Cl₂; iv. Dess-Martin, CH₂Cl₂; v. CF₃COOH, CH₂Cl₂; vi. δ/μα NaOH 1N, MeOH; vii. Dess-Martin, CH₂Cl₂.

Σχήμα 6.6: Πορεία για τη σύνθεση των 2-οξοαμιδικών παραγώγων των διπεπτιδίων.

Στη συνέχεια της σύνθεσης, το διπεπτίδιο **45** υφίσταται καταλυτική υδρογόνωση παρουσία 10% Pd/C, για την απομάκρυνση της καρβοβενζόξυ προστατευτικής ομάδας και το προϊόν **46** συζευγνύεται με το 2-υδροξυδεκαεξανοϊκό οξύ **30**. Ακολουθεί οξείδωση της 2-υδροξυ-ομάδας στην αντίστοιχη κετόνη **48** και το τελικό προϊόν **49** παραλαμβάνεται με απομάκρυνση του *tert*-βουτυλεστέρα σε όξινες συνθήκες.

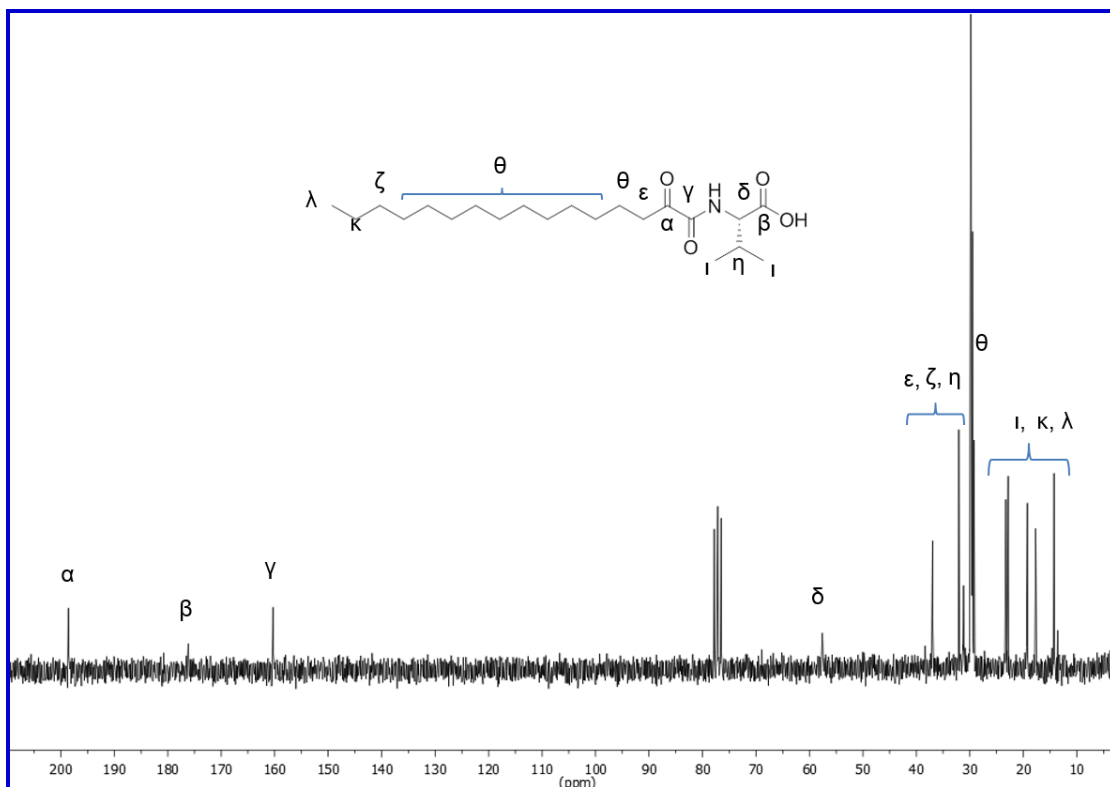
Ο μεθυλεστέρας **47γ** που προέκυψε, υπέστη σαπωνοποίηση σε αλκαλικές συνθήκες και η παραλαβή του τελικού προϊόντος **51** έγινε με την οξείδωση του **50** παρουσία του αντιδραστηρίου Dess-Martin.

Όλες οι ενώσεις ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού ($^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$) και με φασματομετρία μάζας. Παρατίθενται τα φάσματα ορισμένων τελικών 2-οξοαμιδίων.



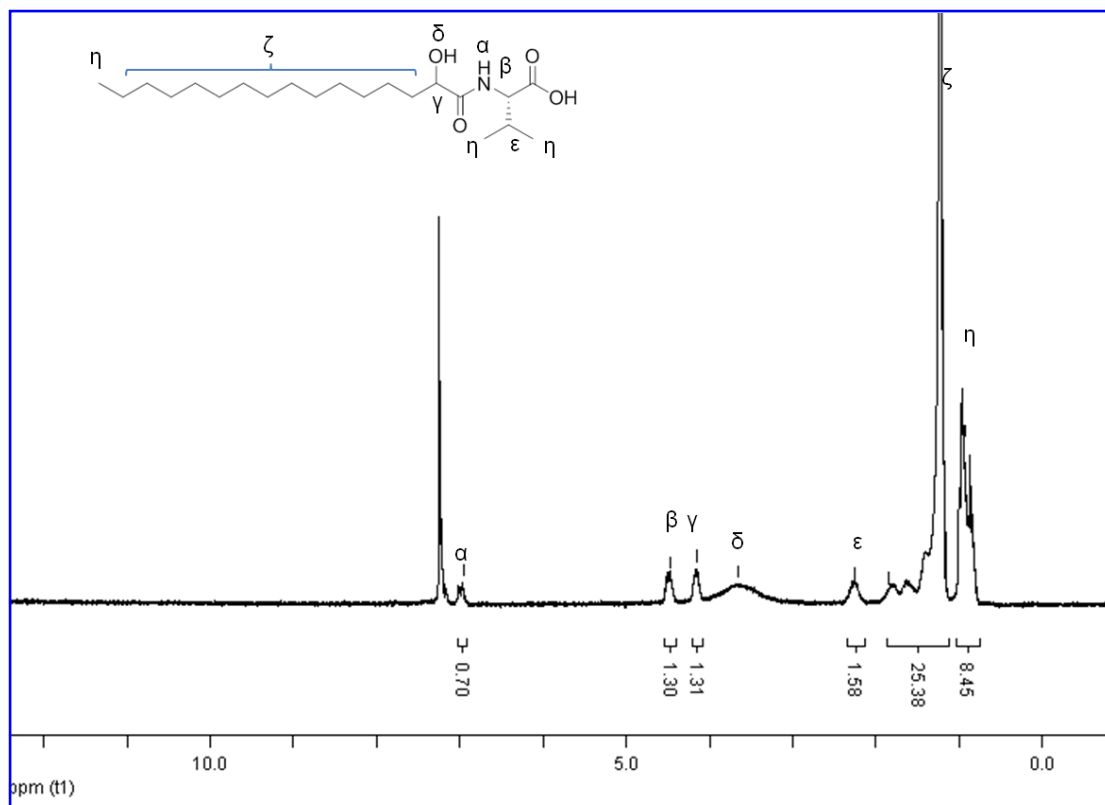
Σχήμα 6.7: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης GK241 σε CDCl_3 .

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης **GK241** (Σχήμα 6.7) το πρωτόνιο α της ομάδας του αμιδίου συντονίζεται στα 7.43 ppm. Η πολλαπλή κορυφή στα 4.59-4.35 ppm αντιστοιχεί στο μεθινικό πρωτόνιο β του ασύμμετρου κέντρου της βαλίνης. Η τριπλή κορυφή στα 2.91 ppm αντιστοιχεί στα πρωτόνια γ ενώ η πολλαπλή κορυφή στα 2.42-2.16 ppm στο μεθινικό πρωτόνιο δ . Τα μεθυλενικά πρωτόνια ϵ συντονίζονται στα 1.60 ppm ενώ η πολλαπλή κορυφή στα 1.24 ppm αντιστοιχεί στα πρωτόνια ζ των 11 μεθυλενίων της μακριάς αλειφατικής αλυσίδας. Η πολλαπλή κορυφή στα 1.08-0.79 ppm αντιστοιχεί στα πρωτόνια θ του τελικού μεθυλίου και των δύο μεθυλίων της πλευρικής αλυσίδας της βαλίνης η .



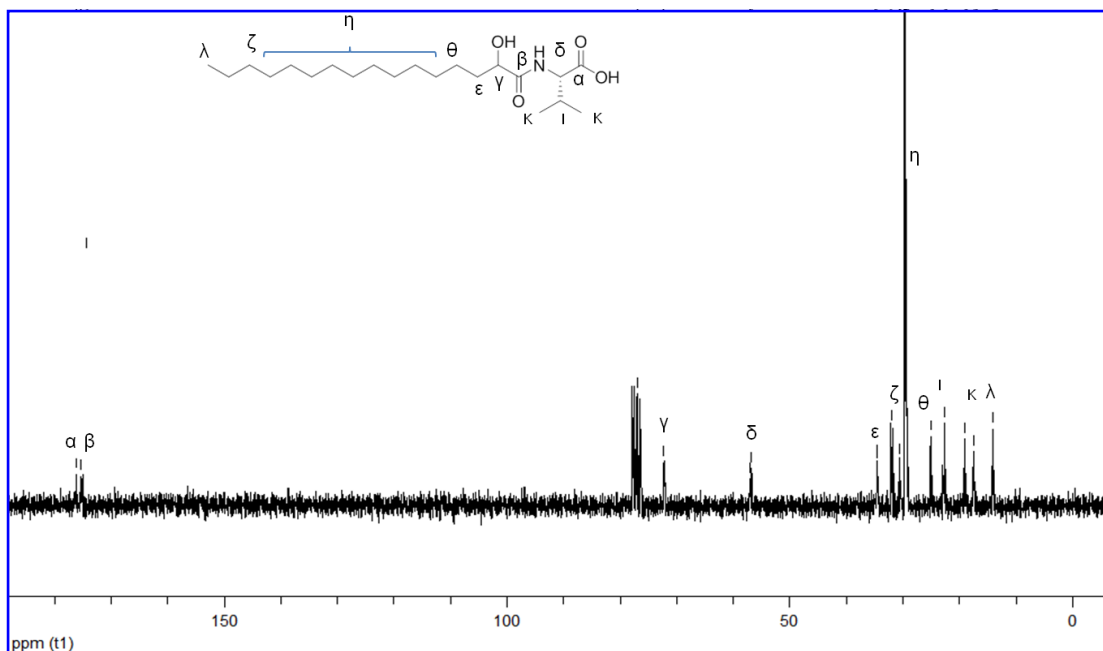
Σχήμα 6.8: Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης GK241 σε CDCl_3 .

Στο φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ της ίδιας ένωσης (Σχήμα 6.8), το σήμα του 2-οξοαμιδικού καρβονυλίου α παρουσιάζει χημική μετατόπιση στα 198.4 ppm, το σήμα του καρβονυλίου του καρβοξυλίου β παρουσιάζει χημική μετατόπιση στα 176.0 ppm και το σήμα του καρβονυλίου του αμιδίου γ παρουσιάζει χημική μετατόπιση στα 160.2 ppm. Η κορυφή στα 57.4 ppm αποδίδεται στον άνθρακα του ασύμμετρου κέντρου της βαλίνης δ. Στην περιοχή 32-37 ppm εμφανίζονται οι μεθυλενικοί άνθρακες ε και ζ ενώ στην περιοχή 31-23 ppm εμφανίζονται οι μεθυλενικοί άνθρακες η της αλειφατικής αλυσίδας. Οι άνθρακες των μεθυλίων της βαλίνης ι εμφανίζονται στα 19.1 και 17.5 ppm ενώ ο άνθρακας της ακραίας μεθυλομάδας κ της αλειφατικής αλυσίδας στα 14.1 ppm.



Σχήμα 6.9: Φάσμα ¹H-NMR της ένωσης 39 σε CDCl₃.

Στο φάσμα ¹H-NMR της ένωσης 39 (Σχήμα 6.9) το πρωτόνιο α της ομάδας του αμιδίου συντονίζεται στα 7.01 ppm. Οι δύο κορυφές στα 4.57-4.42 ppm και 4.24-4.10 ppm αντιστοιχούν στο πρωτόνιο β του ασύμμετρου άνθρακα της βαλίνης και στο πρωτόνιο γ ενώ το πρωτόνιο δ της υδρόξυλομάδας εμφανίζεται ως ευρεία κορυφή στα 3.68 ppm. Το πρωτόνιο ε του β-C της βαλίνης συντονίζεται στα 2.39-2.15 ppm και στην περιοχή 1.95-1.12 ppm συντονίζονται τα 13 πρωτόνια ζ των μεθυλενίων της αλειφατικής. Τα δυο πρωτόνια η των μεθυλίων της πλευρικής αλυσίδας της βαλίνης μαζί με το πρωτόνιο η του τελικού μεθυλίου της αλειφατικής αλυσίδας εμφανίζονται στην περιοχή 1.10-0.76 ppm.



Σχήμα 6.10: Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης **39** σε CDCl_3 .

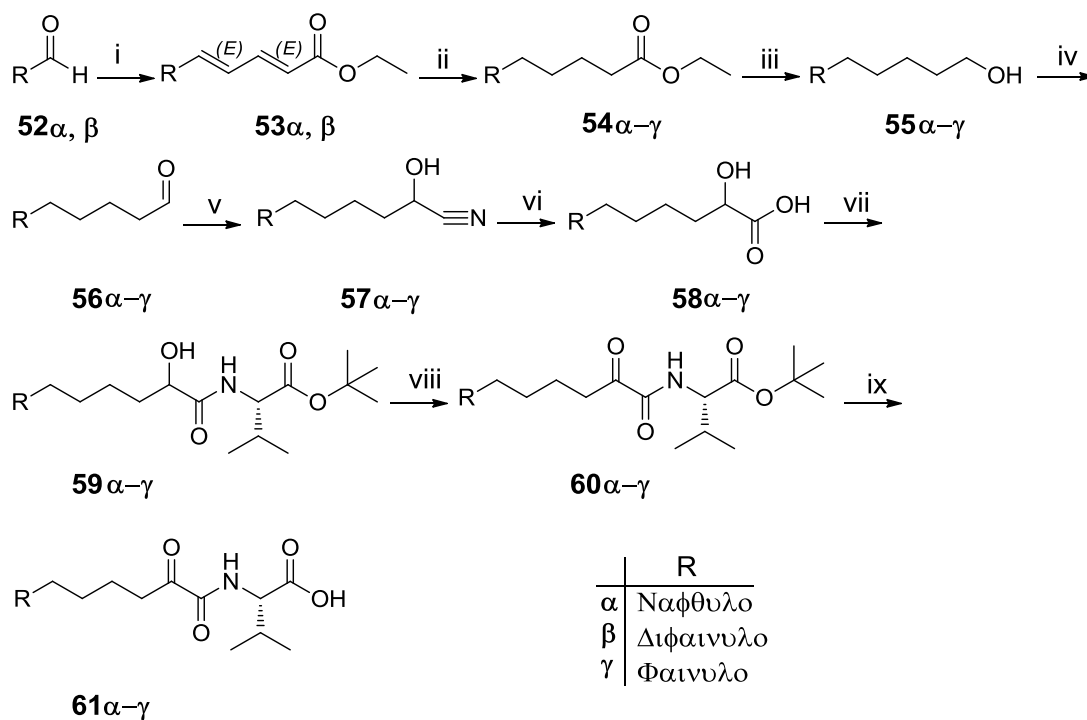
Στο φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης **39** (Σχήμα 6.10) ο άνθρακας α της καρβοξυλ ομάδας παρουσιάζει χημική μετατόπιση στα 176.2 ppm και ο άνθρακας β της ομάδας του αμιδίου παρουσιάζει χημική μετατόπιση στα 174.5 ppm. Ο άνθρακας γ της υδροξυλομάδας εμφανίζεται στα 72.3 ppm ενώ στα 57.0 ppm αποδίδεται η χημική μετατόπιση του άνθρακα δ του ασύμμετρου κέντρου. Στην περιοχή 34.6-25.1 ppm εμφανίζονται οι άνθρακες η των μεθυλενίων της αλειφατικής αλυσίδας. Οι άνθρακες κ των δύο μεθυλίων της πλευρικής αλυσίδας εμφανίζονται ως ξεχωριστές κορυφές στα 19.1 και 17.5 ενώ στα 14.1 συντονίζεται ο άνθρακας λ του τελικού μεθυλίου της αλειφατικής αλυσίδας.

6.2 Συνθετική πορεία των παραγώγων του αναστολέα GK241

6.2.1 Σύνθεση των 2-οξοαμιδικών αναλόγων του GK241 με αρωματικά συστήματα

Ξεκινώντας τη σύνθεση με πρώτη ύλη την αλδεΐδη **52**, πραγματοποιήθηκε η αντίδραση ολεφιντοποίησης Horner-Wadsworth-Emmons με το φωσφινικό

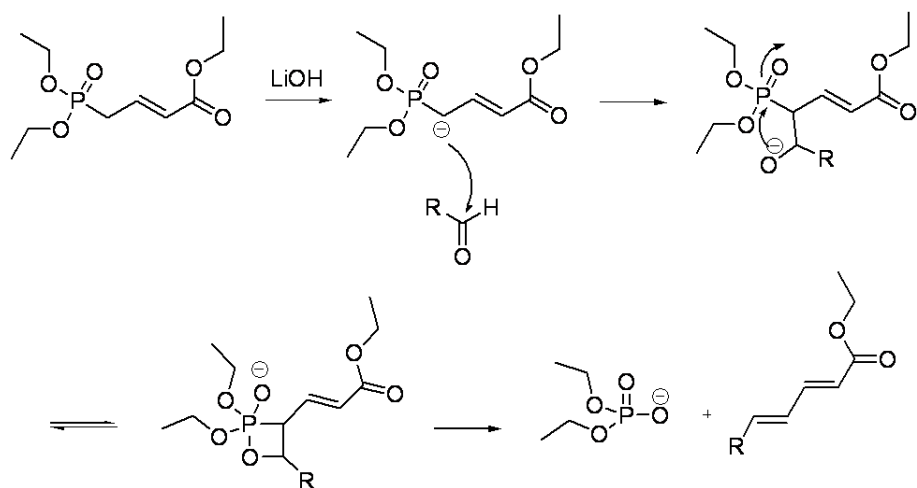
ανιόν (Σχήμα 6.11). Το φωσφινικό ανιόν παράχθηκε από τον τριαίθυλο 4-φωσφοнокροτονικό εστέρα μετά από κατεργασία με LiOH.



Αντιδραστήρια και συνθήκες: i. $\text{C}_2\text{H}_5\text{OOCH}=\text{CHCH}_2\text{P}(=\text{O})(\text{OC}_2\text{H}_5)_2$, LiOH-H₂O, άνυδρο THF, Ar; ii. H₂/Pd, THF; iii. LiAlH₄, THF ή DIBAL-H, Et₂O, Ar; iv. NaBr/H₂O, τουλουόλιο/EtOAc, AcNH-TEMPO, 0.5 M NaOCl/NaHCO₃/H₂O; v. (1.) NaHSO₃, CHCl₃ (2.) H₂O, 6M KCN; vi. (1.) π. HCl (2.) EtOH/H₂O, KOH; viii. (L)-Val-O^tBu, WSCI·HCl, HOBT, Et₃N, CH₂Cl₂; viii. Dess-Martin, CH₂Cl₂; ix. CF₃COOH, CH₂Cl₂.

Σχήμα 6.11: Πορεία για τη σύνθεση των ενώσεων 61α-γ.

Ο μηχανισμός με τον οποίο αντιδρά το υλίδιο του φωσφόρου με την αλδεΐδη έχει περιγραφεί από τους Wadsworth και Emmons³⁰¹ και περιγράφεται στο σχήμα που ακολουθεί:

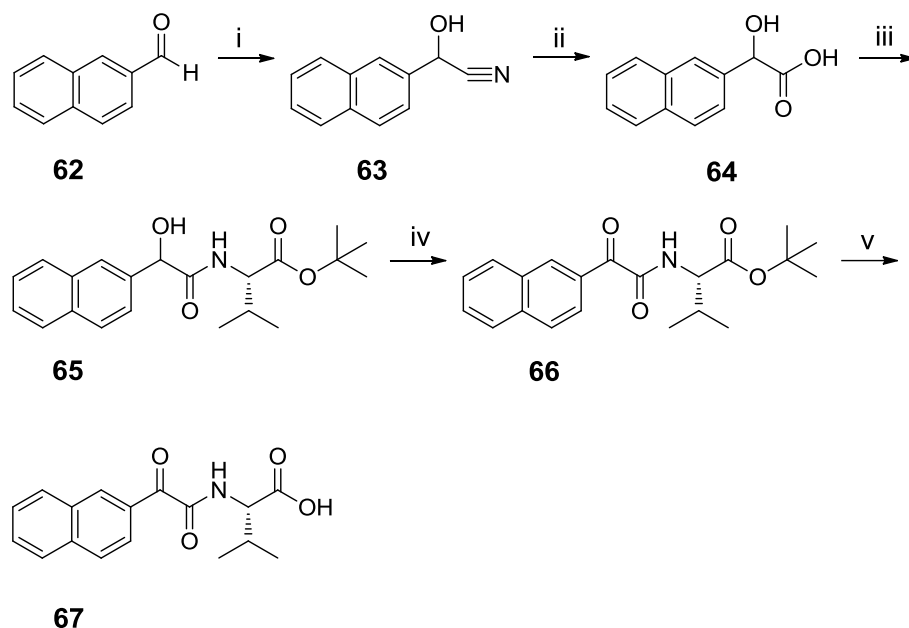


Σχήμα 6.12: Μηχανισμός ολεφिनοποίησης Wadsworth-Emmons.

Το προϊόν της ολεφिनοποίησης **53** μετά από καταλυτική υδρογόνωση και στη συνέχεια αναγωγή με DIBAL-H, παράγαγε την αντίστοιχη αλκοόλη **55**. Με τη μέθοδο οξειδωσης με AcNH-TEMPO/NaOCl έγινε οξείδωση της αλκοόλης στην αντίστοιχη αλδεΐδη **56**. Η αντίδραση αυτή είναι γρήγορη, πραγματοποιείται σε ήπιες συνθήκες και έχει υψηλές αποδόσεις. Η αλδεΐδη **56** με την επίδραση KCN μετατράπηκε στην κυανυδρίνη **57**, η οποία μετά από κατεργασία σε όξινες και εν συνεχεία βασικές συνθήκες, οδήγησε στο επιθυμητό 2-υδροξυ-οξύ **58**. Ακολούθησε σύζευξη με τον *tert*-βουτυλεστέρα της (L)-βαλίνης και το προϊόν οξειδώθηκε προς το 2-οξοαμιδικό παράγωγο **60**. Το τελικό προϊόν (**61α,β**) παρελήφθη μετά από αποπροστασία της καρβοξυλομάδας σε όξινες συνθήκες.

Η σύνθεση της **61γ** ξεκίνησε με πρώτη ύλη την αλκοόλη **55γ**, η οποία οξειδώθηκε σε αλδεΐδη. Αντίδραση της αλδεΐδης με κυανιούχο κάλιο οδήγησε στην κυανυδρίνη **57γ**. Στη συνέχεια, κατεργασία της κυανυδρίνης σε αρχικά όξινες και μετά βασικές συνθήκες οδήγησε στο επιθυμητό οξύ **58γ**. Τα επόμενα συνθετικά βήματα μέχρι την ανάκτηση του τελικού προϊόντος περιγράφηκαν παραπάνω.

6.2.2 Σύνθεση του (S)-3-μεθυλο-2-(2-(ναφθαλεν-2-υλ)-2-οξοακεταμιδο)βουτανοϊκού οξέος **67**

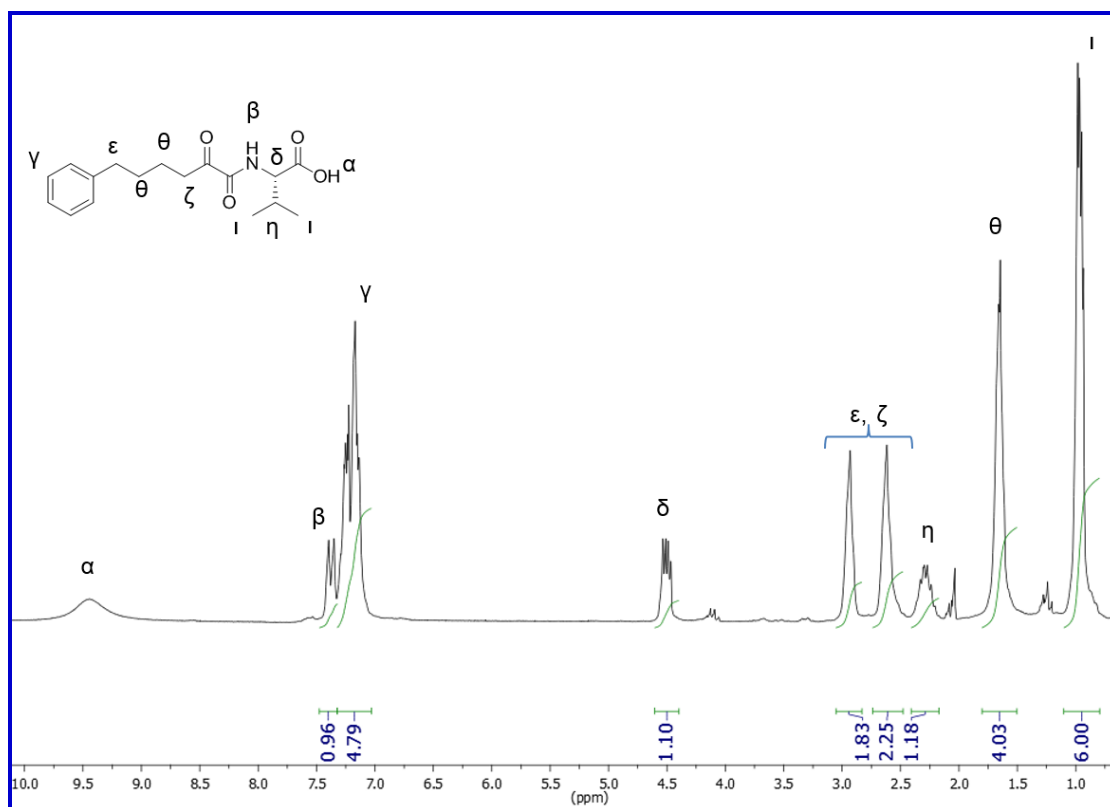


Αντιδραστήρια και συνθήκες: i. διάλυμα EtOAc:THF:80%CH₃COOH, 6M KCN, 18h; ii. (1.) π. HCl (2.) EtOH/H₂O, KOH iii. (L)-Val-O^tBu, WSCI·HCl, HOBT, Et₃N, CH₂Cl₂; iv. Dess-Martin, CH₂Cl₂; ε. CF₃COOH, CH₂Cl₂.

Σχήμα 6.13: Πορεία για την σύνθεση της ένωσης **67**.

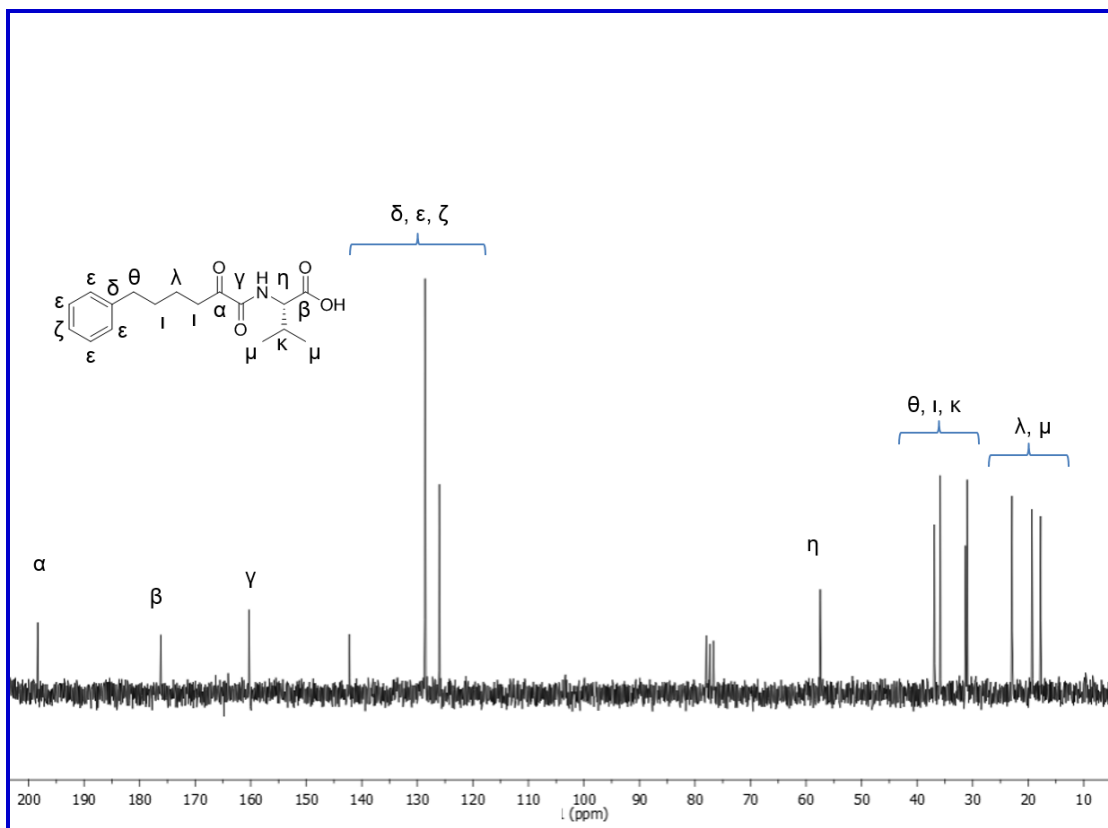
Η σύνθεση της ένωσης **67** ξεκίνησε από την 2-ναφθαλενυλο-καρβαλδεΐδη **62**, η οποία μέσω κυανυδρινικής σύνθεσης, παρήγαγε την ένωση **63**. Στην συνέχεια ακολούθησε κατεργασία σε όξινες και μετά αλκαλικές συνθήκες για την παραλαβή του 2-υδροξυ οξέος **64**. Σύζευξη της **64** με τον εστέρα της (S)-βαλίνης παρήγαγε την ένωση **65** η οποία με οξείδωση και απομάκρυνση της *tert*-βουτυλομάδας έδωσε το τελικό προϊόν **67**.

Όλες οι ενώσεις ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού (¹H-NMR και ¹³C-NMR) και με φασματομετρία μάζας. Παρατίθενται το φάσματα της ένωσης **61γ**.



Σχήμα 6.14: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης **61γ** σε CDCl_3 .

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης **61γ** (Σχήμα 6.14) το πρωτόνιο α του καρβοξυλίου αντιστοιχεί στη κορυφή στα 9.43 ppm ενώ στα 7.39-7.35 ppm εμφανίζεται η χημική μετατόπιση του αμιδικού πρωτονίου β. Η πολλαπλή κορυφή στα 7.32-7.06 ppm αντιστοιχεί στα πρωτόνια γ του αρωματικού δακτυλίου ενώ η πολλαπλή στα 4.55-4.46 ppm στο μεθινικό πρωτόνιο δ του ασύμμετρου άνθρακα της βαλίνης. Οι πολλαπλές κορυφές στα 3.05-2.82 ppm και 2.73-2.48 ppm αντιστοιχούν στα πρωτόνια ε και ζ αντίστοιχα. Η πολλαπλή κορυφή στα 2.39-2.15 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο η του β-C της βαλίνης ενώ η πολλαπλή στα 1.78-1.51 ppm αντιστοιχεί στα πρωτόνια θ των δύο μεσαίων μεθυλενίων της αλυσίδας. Στα 1.12-0.79 ppm εμφανίζονται οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων ι των μεθυλίων της πλευρικής αλυσίδας της βαλίνης.



Σχήμα 6.15: Φάσμα ¹³C-NMR της ένωσης 61γ σε CDCl₃.

Στο φάσμα ¹³C-NMR της ένωσης 61γ (Σχήμα 6.15) ο άνθρακας α της α-κετο ομάδας συντονίζεται στα 198.4 ppm, ενώ ο άνθρακας της ομάδας του καρβοξυλίου β στα 175.9 ppm. Ο άνθρακας γ της αμιδικής ομάδας συντονίζεται στα 160.0 ppm. Στην περιοχή 141.9-125.7 ppm εμφανίζονται οι άνθρακες δ, ε και ζ του αρωματικού δακτυλίου και στα 57.1 ppm εμφανίζεται ο α-C η της βαλίνης. Στην περιοχή 36.6-30.7 ppm εμφανίζονται οι άνθρακες θ και ι των μεθυλενίων καθώς και ο β-C κ της βαλίνης. Στην περιοχή 22.6-17.4 ppm εμφανίζονται οι άνθρακες λ του μεθυλενίου και μ των δύο μεθυλίων της βαλίνης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΤΗΣ ΚΟΥΜΑΡΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΙΝΟΛΙΝΟΝΗΣ ΩΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ GIIA sPLA₂

7.1 Σχεδιασμός παραγώγων της κουμαρίνης και της κινολιμόνης

Οι κουμαρίνες είναι παράγωγα της βενζοπυρόνης και συναντώνται σε πολλά φυσικά προϊόντα.³⁰² Ο ετεροκυκλικός δακτύλιος της κουμαρίνης έχει χρησιμοποιηθεί στη σύνθεση αναλόγων με βιολογική δράση. Υπάρχουν πολλές αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία για το μεγάλο εύρος των βιολογικών ιδιοτήτων τους όπως αντικαρκινικές,³⁰³ αντιοξειδωτικές³⁰⁴ και αντιφλεγμονώδεις.³⁰⁵ Επίσης, ανάλογα των κουμαρινών έχουν χρησιμοποιηθεί ως αναστολείς ενζύμων, όπως η ανθρώπινη 5-λιποξυγενάση³⁰⁶ και η hAChE/BACE1.³⁰⁷

Αντίστοιχα και η κινολιμόνη παρουσιάζει αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες ενώ τα παράγωγά της έχουν αποτελέσει ερευνητικό στόχο πολλών ερευνητικών ομάδων. Παράγωγα της κινολιμόνης έχουν δράση έναντι του ιού HIV^{308,309} ενώ ουσίες όπως το *rebamipide* παρουσιάζουν πολλαπλή φαρμακολογική δράση.

Όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο 2, ινδολικά παράγωγα έχουν συντεθεί για την αναστολή της GIIA sPLA₂. Δύο από αυτά, οι ενώσεις **1α** και **1β** (Σχήμα 1.1) έχουν περάσει το στάδιο I των κλινικών δοκιμών ενώ οι προσπάθειες για τη βελτίωση της δράσης τους συνεχίζονται.

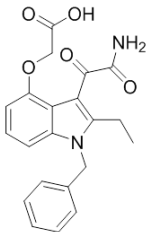
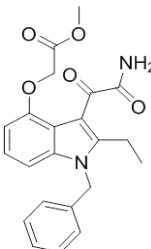
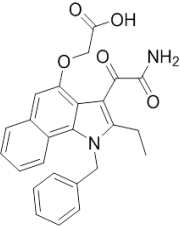
Λαμβάνοντας υπ' όψιν το είδος των υποκαταστατών των δύο αυτών αναστολέων, επιχειρήθηκε η αντικατάσταση του ινδολικού δακτυλίου από τους αντίστοιχους της κουμαρίνης και της κινολιμόνης. Πειράματα προσομοίωσης της μοριακής πρόσδεσης των νέων δομών έλαβαν χώρα, προκειμένου να εκτιμηθεί η ικανότητα πρόσδεσής τους στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.

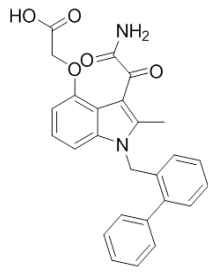
7.2 Πειράματα προσομοίωσης της μοριακής πρόσδεσης ινδολικών παραγώγων με γνωστή ανασταλτική δράση έναντι της GIIA sPLA₂

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν πειράματα προσομοίωσης της μοριακής πρόσδεσης των γνωστών ινδολικών αναστολέων και μελετήθηκε ο τρόπος πρόσδεσής τους στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Τα πειράματα εκτελέστηκαν με τη χρήση του προγράμματος GOLD και οι ρυθμίσεις είναι οι ίδιες που περιγράφηκαν στο κεφάλαιο 5.

Στον πίνακα που ακολουθεί απεικονίζονται οι δομές των γνωστών αναστολέων που προσομοιώθηκαν, καθώς και τα υπολογιστικά αποτελέσματα.

Πίνακας 7.1: Αποτελέσματα της προσομοίωσης της μοριακής πρόσδεσης των γνωστών αναστολέων της GIIA sPLA₂ με τη χρήση του προγράμματος GOLD.

Δομή	ΔG	ChemScore	InternalCorrection
 1α	-42,20	39,84	1,81
 1β	-46,09	43,50	1,45
 3	-48,66	42,78	1,41



-46,48

42,45

2,38

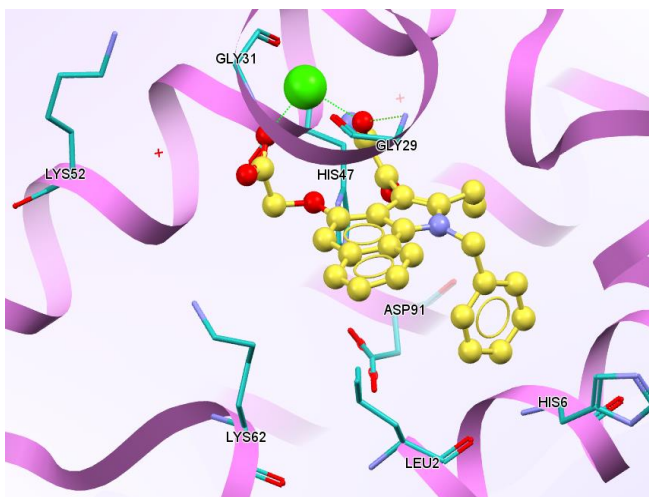
70

Ο τρόπος πρόσδεσης των ενώσεων απεικονίζεται στον πίνακα 7.2.

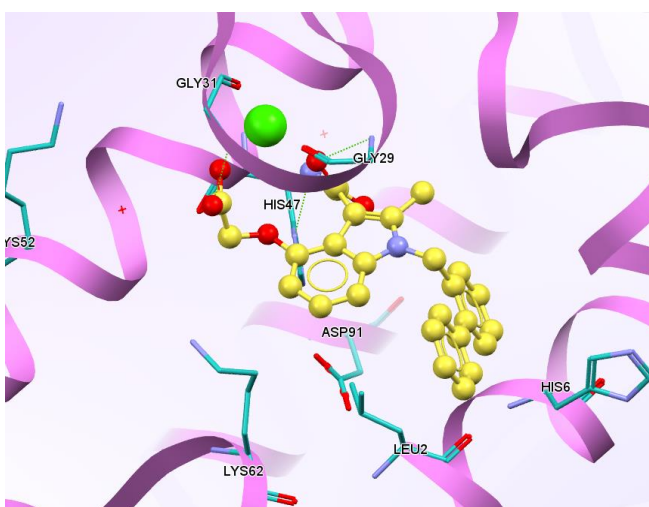
Πίνακας 7.2: Οι αλληλεπιδράσεις γνωστών ινδολικών αναστολέων με το ενεργό κέντρο της *GIIA sPLA₂*, όπως υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα GOLD.

Δομή / Αλληλεπιδράσεις	Αποτελέσματα της προσομοίωσης
<p>1α</p> <p>Ca²⁺ ... COO⁻/CONH</p> <p>GLY29 ... CONH</p>	
<p>1β</p> <p>Ca²⁺ ... COOCH₃/CONH</p> <p>HIS47 ... NHCOCO</p> <p>GLY29 ... CONH</p>	

3
Ca²⁺ ... COO⁻/CONH
GLY29 ... CONH



70
Ca²⁺ ... COO⁻/CONH
HIS47 ... NHCOCO
GLY29 ... CONH



Ο τρόπος αλληλεπίδρασης μεταξύ των ενώσεων και του μετάλλου του ενεργού κέντρου, είναι πανομοιότυπος και στις τέσσερις ενώσεις. Το ιόν του ασβεστίου αλληλεπιδρά με την ομάδα του καρβοξυλίου και με το αμιδίο μέσω του καρβονυλίου του. Επίσης, το καρβονύλιο του αμιδίου δημιουργεί έναν δεσμό υδρογόνου με τη GLY29 ενώ στις ενώσεις **1β** και **70** η αμιδική ομάδα αλληλεπιδρά με την καταλυτική HIS47.

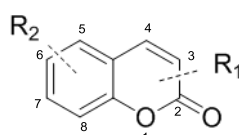
Γνωρίζοντας τον τρόπο αλληλεπίδρασης και τις βαθμονομήσεις των ενώσεων με γνωστή ανασταλτική δράση έναντι της GIIA sPLA₂, διεξάχθησαν σε πειράματα προσομοίωσης της πρόσδεσης των παραγώγων της κουμαρίνης και της κινολιμόνης.

7.3 Πειράματα προσομοίωσης της μοριακής πρόσδεσης των παραγώγων της κουμαρίνης και της κινολινόνης

Οι νέες δομές προέκυψαν από την ένωση **1a** (Varespladib, Σχήμα 1.1) με αντικατάσταση του ινδολικού δακτυλίου από την κουμαρίνη και την κινολινόνη. Το είδος των υποκαταστατών στις θέσεις 3,4 της ένωσης **1a** διατηρήθηκε, ενώ οι θέσεις υποκατάστασης άλλαξαν, καλύπτοντας όλους τους πιθανούς συνδυασμούς υποκατάστασης του δακτυλίου της κουμαρίνης και της κινολινόνης.

Στον παρακάτω πίνακα καταγράφονται οι δομές που προσομοιώθηκαν και τα αποτελέσματα από τα πειράματα προσομοίωσης με το πρόγραμμα GOLD. Επίσης, με τη βοήθεια του προγράμματος QikProp του πακέτου Maestro³¹⁰ υπολογίστηκαν οι πιθανές τιμές του logP των ενώσεων (εκτός από την **74** που είχε λάθος τοποθέτηση στο ενεργό κέντρο).

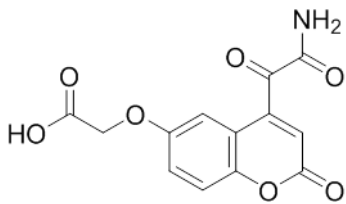
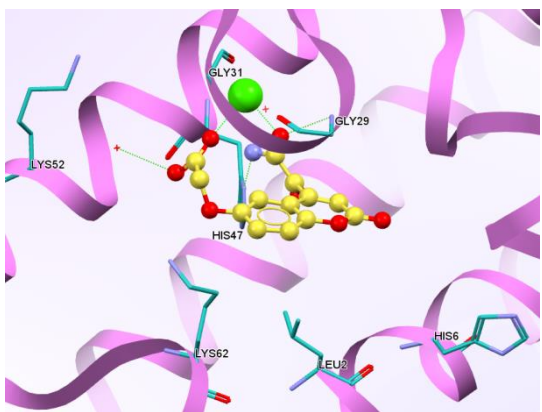
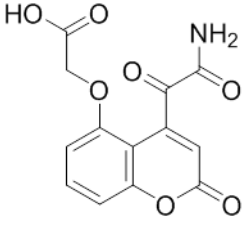
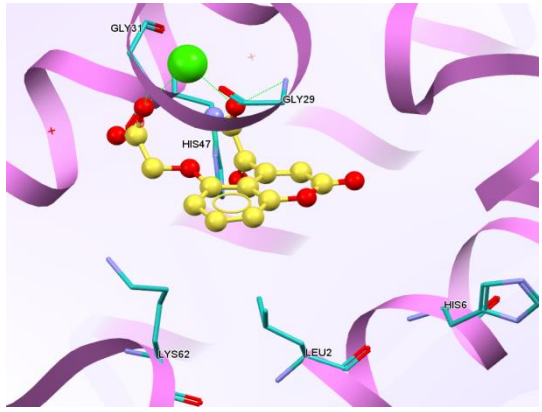
Πίνακας 7.3: Υπολογιστικά αποτελέσματα για τα παράγωγα της κουμαρίνης, όπως αυτά υπολογίστηκαν με τη βοήθεια των προγραμμάτων GOLD και QikProp.

Ένωση	 Θέσεις υποκατάστασης	ΔG	ChemScore	Internal Correction	logP
71	4,6	-38,84	36,86	0,46	-0,81
72	4,5	-34,19	32,88	0,3	-0,81
73	3,6	-34,08	32,08	0,74	-0,64
74	3,5	-35,16	31,69	0,82	-

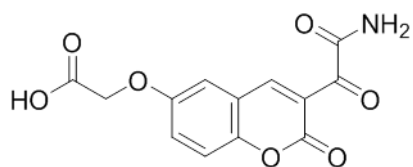
Οι ενώσεις με την υποκατάσταση στις θέσεις 4,6 και 4,5 έχουν ευνοϊκότερες βαθμονομήσεις.

Στον πίνακα που ακολουθεί περιγράφονται οι πιθανοί τρόποι πρόσδεσης των ενώσεων στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.

Πίνακας 7.4: Τρόπος πρόσδεσης των κουμαρινικών παραγώγων στο ενεργό κέντρο της *GIIA sPLA₂* όπως προέκυψε από τα πειράματα προσομοίωσης με το πρόγραμμα GOLD.

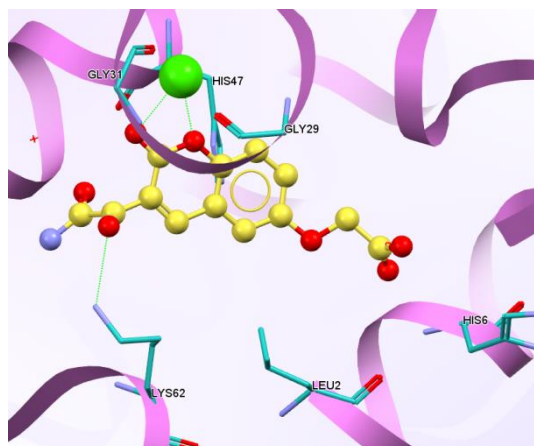
Ένωση	Δομή / Αλληλεπιδράσεις	Αποτελέσματα προσομοίωσης
71	 <p>Ca²⁺ ... COO⁻/CONH HIS47 ... NHCOCO GLY29 ... CONH</p>	
72	 <p>Ca²⁺ ... COO⁻/CONH HIS47 ... NHCOCO GLY29 ... CONH</p>	

73

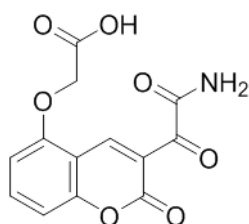


$\text{Ca}^{2+} \dots \text{R-COO-R}$

LYS62 ... COCONH

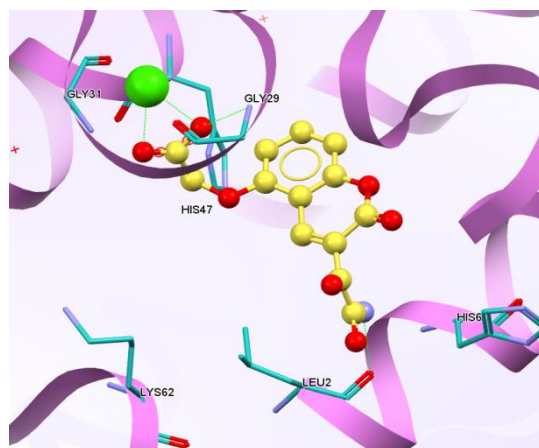


74



GLY29 / $\text{Ca}^{2+} \dots \text{COO}^-$

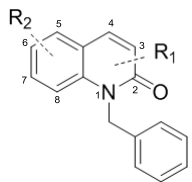
LEU2 ... NHCOCO



Οι ενώσεις που φέρουν την υποκατάσταση στις θέσεις 4,6 και 4,5 διευθετούνται στο ενεργό κέντρο με τρόπο παρόμοιο με τους ινδολικούς αναστολείς δημιουργώντας παρόμοιες αλληλεπιδράσεις. Αντίθετα, οι ενώσεις που φέρουν την υποκατάσταση στις θέσεις 3,5 και 3,6 δεν είχαν την επιθυμητή διευθέτηση στο ενεργό κέντρο.

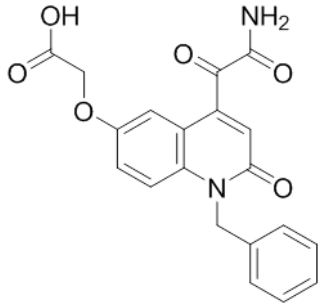
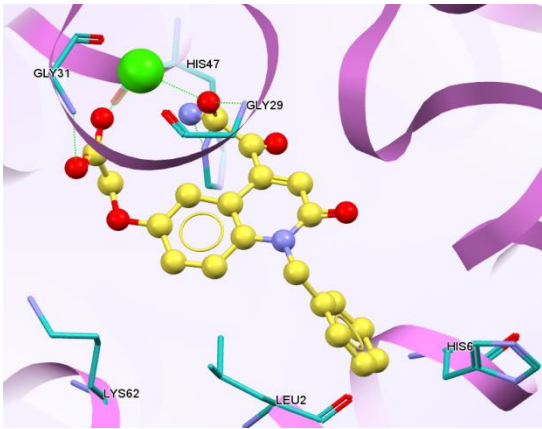
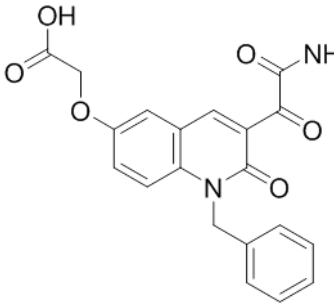
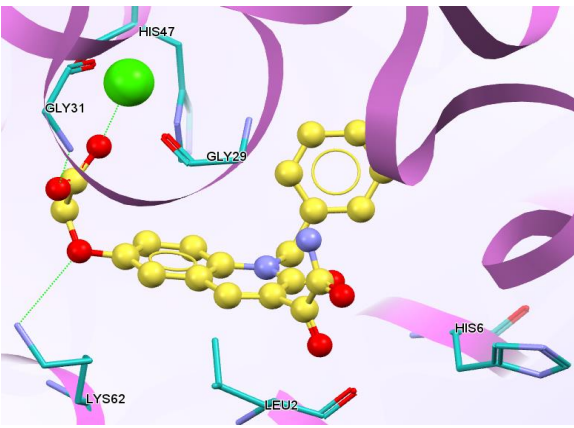
Όσον αφορά τα παράγωγα της κινολινόνης, στο πίνακα που ακολουθεί αναφέρονται τα αποτελέσματα από τους ενεργειακούς υπολογισμούς με το πρόγραμμα GOLD. Επίσης, αναγράφεται και ο υπολογισμός της τιμής του logP προσεγγιστικά, με τη βοήθεια του προγράμματος QikProp.

Πίνακας 7.5: Υπολογιστικά αποτελέσματα για τα παράγωγα της κινολινόνης, όπως αυτά υπολογίστηκαν με τη βοήθεια των προγραμμάτων GOLD και QikProp.

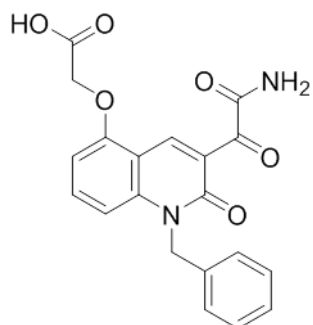
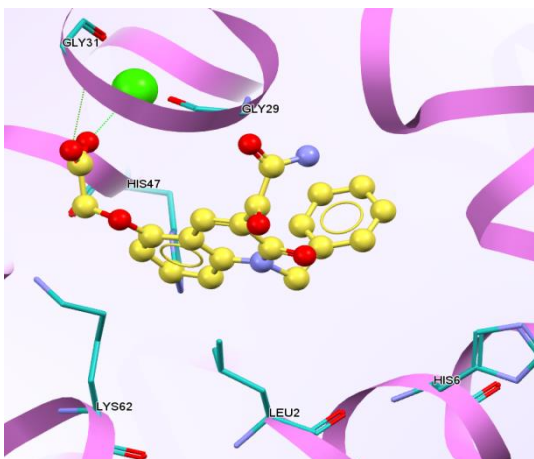
Ένωση		ΔG	ChemScore	Internal Correction	logP
Θέσεις υποκατάστασης					
75	4,6	-42,32	40,53	1,09	0,48
76	3,6	-40,66	40,05	0,46	0,65
77	3,5	-41,92	38,88	0,74	0,65
78	4,5	-40,03	38,50	0,89	0,48

Στον πίνακα που ακολουθεί, απεικονίζεται ο τρόπος πρόσδεσης των παραγώγων της κινολινόνης.

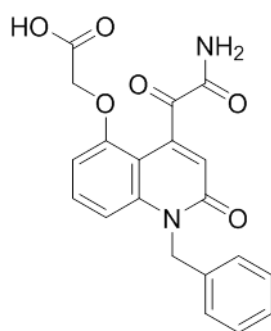
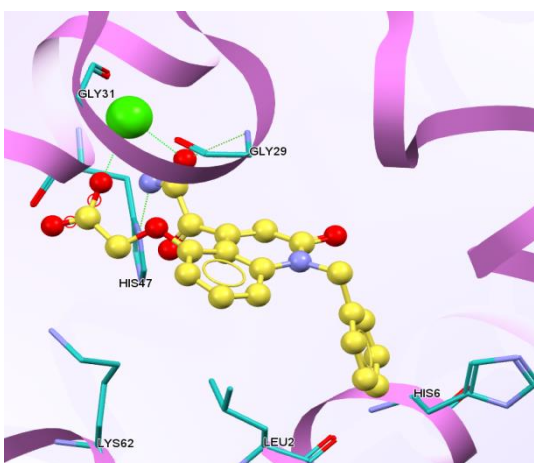
Πίνακας 7.6: Τρόπος πρόσδεσης των παραγώγων της κινολινόνης στο ενεργό κέντρο της GIIA sPLA₂ όπως προέκυψε από τα πειράματα προσομοίωσης με το πρόγραμμα GOLD.

Ενώσεις	Δομή / Αλληλεπιδράσεις	Αποτελέσματα προσομοίωσης
75	 <p data-bbox="421 853 722 1025"> Ca²⁺ ... COO⁻/CONH HIS47 ... NHCOCO GLY29 ... CONH </p>	
76	 <p data-bbox="405 1424 722 1597"> Ca²⁺ ... COO⁻ GLY31 ... COO⁻ LYS62 ... -OCH₂COO⁻ </p>	

77


 $\text{Ca}^{2+} \dots \text{COO}^-$
 $\text{GLY31} \dots \text{COO}^-$


78


 $\text{Ca}^{2+} \dots \text{COO}^-/\text{CONH}$
 $\text{HIS47} \dots \text{NHCOCO}$
 $\text{GLY29} \dots \text{CONH}$


Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων προσομοίωσης φαίνεται ότι όταν η υποκατάσταση είναι στις θέσεις 4,6 και 4,5 η διεύθυνση των ενώσεων είναι παρόμοια με αυτήν των ινδολικών αναστολέων. Επίσης, σε αυτές τις δύο ενώσεις οι αλληλεπιδράσεις με το ενεργό κέντρο είναι οι επιθυμητές. Η βαθμονόμηση των ενώσεων από το πρόγραμμα σε αυτήν την περίπτωση, δεν είναι ιδιαίτερα βοηθητική καθώς δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές με τα παράγωγα που φέρουν την υποκατάσταση στις θέσεις 3, 5 και 3, 6.

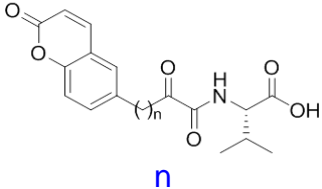
Συνολικά, φαίνεται ότι όταν η θέση των υποκαταστατών είναι στις θέσεις 4,6 τα παράγωγα της κουμαρίνης και της κινολινόνης έχουν παρόμοια υπολογιστικά αποτελέσματα με αυτά των ινδολικών αναστολέων. Επίσης, τα

παράγωγα της κινολινόλης πιθανότατα να παρουσιάζουν δυνατότητα πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου καθώς παρουσιάζουν ευνοϊκότερες βαθμονομήσεις.

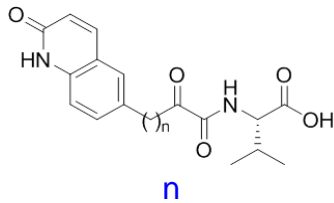
7.4 Πειράματα προσομοίωσης της μοριακής πρόσδεσης 2-οξοαμιδικών παραγώγων της κουμαρίνης και της κινολινόνης

Γνωρίζοντας την ανασταλτική δράση των 2-οξοαμιδικών παραγώγων έναντι της GIIA sPLA₂, προχωρήσαμε στον σχεδιασμό και την προσομοίωση της πρόσδεσης 2-οξοαμιδικών παραγώγων της κουμαρίνης και της κινολινόνης. Ορισμένα από τα καλύτερα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες.

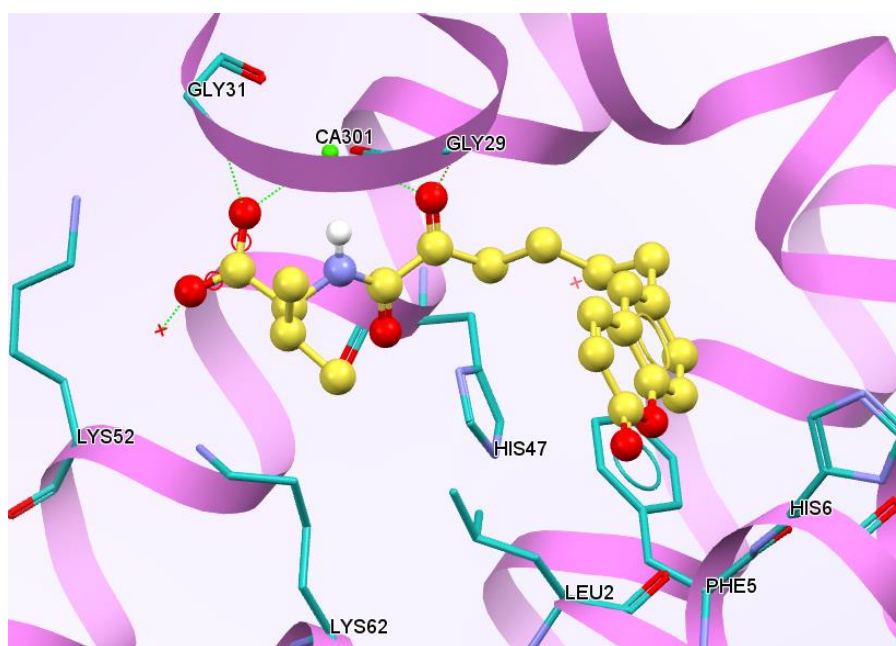
Πίνακας 7.7: Υπολογιστικά αποτελέσματα 2-οξοαμιδικών παραγώγων της κουμαρίνης.

Ένωση		ΔG	Chem.Score	ΔE_{clash}
79	6	-44,22	40,42	1,99
80	5	-48,21	42,08	1,40
81	4	-48,62	43,18	1,08
82	3	-43,53	39,36	2,80
83	0	-37,90	35,50	1,77

Πίνακας 7.8: Υπολογιστικά αποτελέσματα 2-οξοαμιδικών παραγώγων της κινολινόνης.

Ένωση		ΔG	Chem.Score	ΔE_{clash}
	n			
84	5	-48,94	39,81	2,77
85	4	-43,08	40,15	3,77
86	0	-38,41	36,41	1,79

Ο τρόπος πρόσδεσης της ένωσης **81** (Εικόνα 7.1) και τα αποτελέσματα από τη βαθμονόμηση, όπως προέκυψαν από τα πειράματα προσομοίωσης, έδειξαν ότι έχει την ικανότητα να προσδένεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου δημιουργώντας τις επιθυμητές αλληλεπιδράσεις.



Σχήμα 7.1: Ο τρόπος πρόσδεσης της ένωσης 81 όπως προέκυψε από τη χρήση του προγράμματος GOLD.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ

8.1 Μοριακή δυναμική

Για να κατανοηθεί ο τρόπος αλληλεπίδρασης του αναστολέα **GK241** με το ενεργό κέντρο του ενζύμου, αλλά και για να διερευνηθούν οι δομικές αλλαγές στην ένωση με σκοπό να επιτευχθεί μια ευνοϊκότερη πρόσδεση, προσομοιώθηκε η μοριακή δυναμική του συμπλόκου **GK241**-GIIA sPLA₂. Τα πειράματα έγιναν με τη βοήθεια του προγράμματος AMBER. Επίσης, πραγματοποιήθηκε προσομοίωση της μοριακής δυναμικής του συμπλόκου **61γ**-GIIA sPLA₂ ώστε να συγκριθεί η συμπεριφορά των δύο ενώσεων και να συσχετισθεί η βιολογική τους δράση.

8.1.1 Μέθοδος

Ο συνολικός χρόνος προσομοίωσης ήταν τα 200 ns για κάθε σύμπλοκο. Το πεδίο δυνάμεων *gaff* (general AMBER force field)³¹¹ χρησιμοποιήθηκε για να οριστούν οι παράμετροι των ενώσεων **GK241** και **61γ**. Το φορτίο τους ορίστηκε με την εφαρμογή Antechamber του προγράμματος AMBER με τη χρήση της μεθόδου *AM1-BCC* (Austin Model 1 with Bond Charge Correction).³¹² Στη συνέχεια, με τη βοήθεια της εφαρμογής *tLEaP* και του πεδίου δυνάμεων *ff12SB*^{313,314,315,316} ορίστηκαν οι παράμετροι των συστημάτων και προετοιμάστηκε το σύμπλεγμα πρωτεΐνης-αναστολέα. Η διαμόρφωση του δακτυλίου των HIS6, HIS47 και HIS27 διατηρήθηκε ίδια με αυτήν της κρυσταλλογραφικής μελέτης. Η HIS47 αλληλεπιδρά με το ASP48 και η HIS27 δρά ως υποκαταστάτης του ιόντος ασβεστίου.

Για την εμβάπτιση του συμπλέγματος στο νερό, χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο *TIP3P*³¹⁷ και γεωμετρία οκταέδρου με περικομμένες τις γωνίες. Η απόσταση της κάθε πλευράς του οκταέδρου ήταν 12 Å από την πρωτεΐνη. Τα συστήματα ενυδατώθηκαν με συνολικά 8.533 και 8.506 μόρια νερού αντίστοιχα. Επίσης, ορίστηκε η ύπαρξη δεσμών μεταξύ του μετάλλου (Ca²⁺) στο ενεργό κέντρο και των αμινοξέων HIS27, GLY29 και GLY31 και ορίστηκαν οι δισουλφιδικοί δεσμοί CYS83-CYS59, CYS124-CYS49, CYS117-CYS26, CYS50-CYS90,

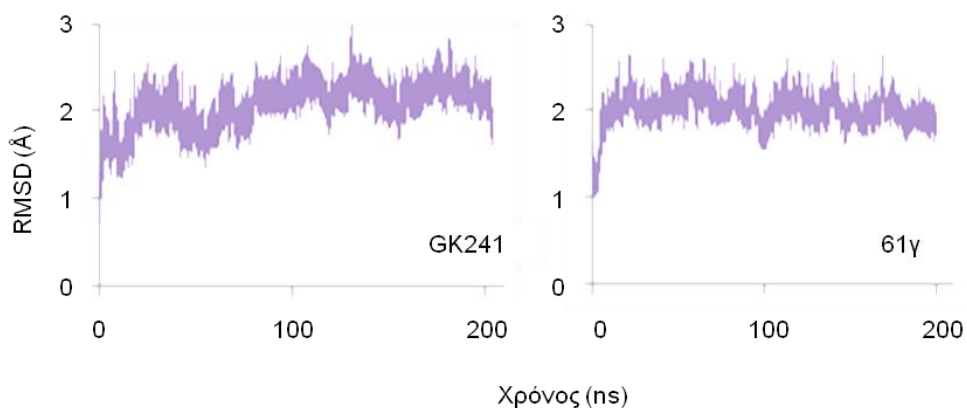
CYS28-CYS44, CYS43-CYS97, CYS88-CYS77 που υπάρχουν στη πρωτεΐνη. Τέλος, το συνολικό φορτίο του κάθε συμπλόκου έγινε ουδέτερο με την προσθήκη 18 ιόντων Cl⁻, η παραμετροποίηση των οποίων έγινε με τη χρήση του *frmod.ionsjc_tip3p* φακέλου.

Για την ελαχιστοποίηση της ενέργειας του ενυδατωμένου συμπλέγματος πρωτεΐνης-ένωσης χρησιμοποιήθηκε η εφαρμογή *sander*.^{318,319,320} Στο πρώτο βήμα εφαρμόστηκαν 1.500 βήματα της μεθόδου απότομης καταβύθισης 'steepest descent' και 1.500 βήματα της μεθόδου συζυγών βαθμίδων 'conjugate gradient'. Κατά τη διάρκεια της ελαχιστοποίησης, το σύμπλεγμα διατηρήθηκε σταθερό προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν τα μόρια του νερού. Ακολούθησαν πέντε βήματα στα οποία εφαρμόστηκαν 800 βήματα 'steepest descent' και 1.500 βήματα 'conjugate gradient' στο καθένα. Η ελευθερία του συμπλέγματος αυξήθηκε σταδιακά, μέχρι η αρμονική σταθερά δύναμης (*restrain_wt*) να λάβει την τιμή 10 kcal mol⁻¹ Å⁻¹. Στη συνέχεια τα συστήματα θερμάνθηκαν σταδιακά από τους 0 K μέχρι τους 300 K υπό σταθερό όγκο για 72 ps και αφέθηκαν να ισορροπήσουν για 50 ps υπό σταθερή πίεση 1 bar και διατηρώντας τη θερμοκρασία στους 300 K χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Langevin.³²¹ Τα συστήματα αφέθηκαν ελεύθερα χωρίς περιορισμούς, να ισορροπήσουν για επιπλέον 50 ps υπό σταθερή πίεση και θερμοκρασία. Τέλος, έγινε προσομοίωση της μοριακής δυναμικής συνολικού χρόνου 200 ns για κάθε σύστημα, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο PME (Particle Mesh Ewald) για τον υπολογισμό των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων στο σύστημα.³²² Στους ομοιοπολικούς δεσμούς που συμμετέχουν άτομα υδρογόνου εφαρμόστηκε ο αλγόριθμος *SHAKE*³²³ κατά τα βήματα της θέρμανσης, της εξισορρόπησης και της μοριακής δυναμικής του συστήματος. Για τη διατήρηση της θερμοκρασίας, στη μέθοδο Langevin η συχνότητα σύγκρουσης ορίστηκε στα 2,0 ps⁻¹. Η ανάλυση των παραχθέντων αρχείων έγινε με την εφαρμογή *ptraj* και *cpptraj* του AMBER.

8.1.2 Αποτελέσματα

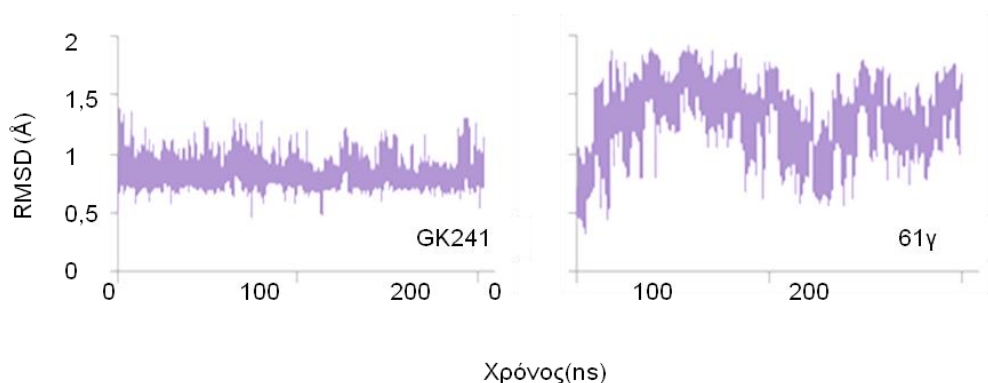
Οι υπολογισμοί για τις μεταβολές στις διαμορφώσεις των συστημάτων κατά τον χρόνο προσομοίωσης έγιναν με αναφορά τη κρυσταλλική δομή της

πρωτεΐνης. Στο Σχήμα 8.1 περιγράφονται τα διαγράμματα RMSD για τους πεπτιδικούς δεσμούς της πρωτεΐνης (Ca, C, N) στα δύο συστήματα. Κατά τη διάρκεια της μοριακής δυναμικής οι μεταβολές δεν είναι μεγάλες, καθώς οι τιμές του RMSD κινούνται γύρω από τα 2 Å. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι τα συστήματα είναι σταθερά και δεν παρατηρούνται εσφαλμένες δομικές μετατοπίσεις. Επίσης, η σταθερότητα των πρωτεϊνών είναι αναμενόμενη λόγω των επτά δισουλφιδικών δεσμών που περιέχουν.



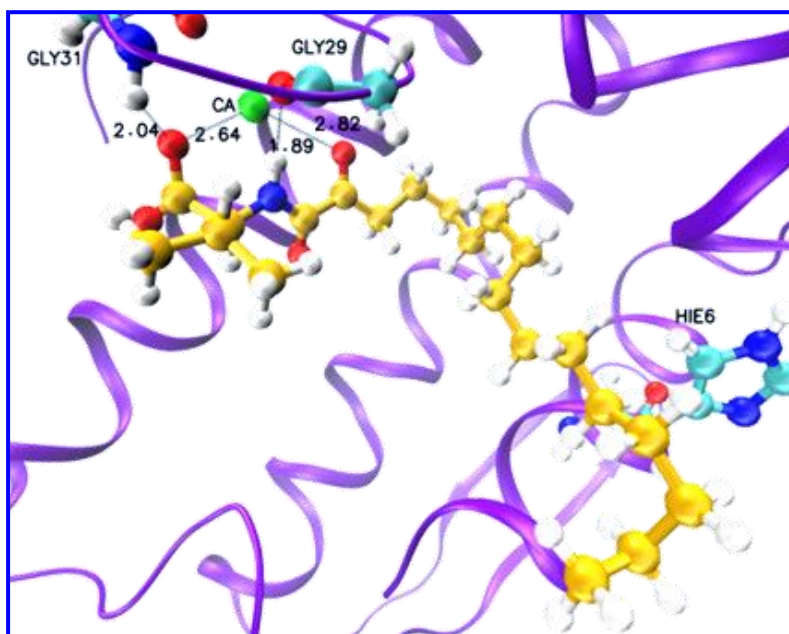
Σχήμα 8.1: Τιμή RMSD για τα άτομα Ca, C και N των δύο συμπλόκων κατά τη διάρκεια της δυναμικής.

Η αλλαγή της τοποθέτησης των δύο ενώσεων **GK241** και **61γ** στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, μελετήθηκε με τον υπολογισμό του RMSD των ατόμων που ανήκουν στο αμινοξύ της βαλίνης και στην ομάδα του 2-οξοαμιδίου (Σχήμα 8.2). Η επιλογή αυτών των ατόμων έγινε ώστε να παρακολουθηθεί η μεταβολή της θέσης των ομάδων που δημιουργούν τις σημαντικότερες αλληλεπιδράσεις με το ενεργό κέντρο.

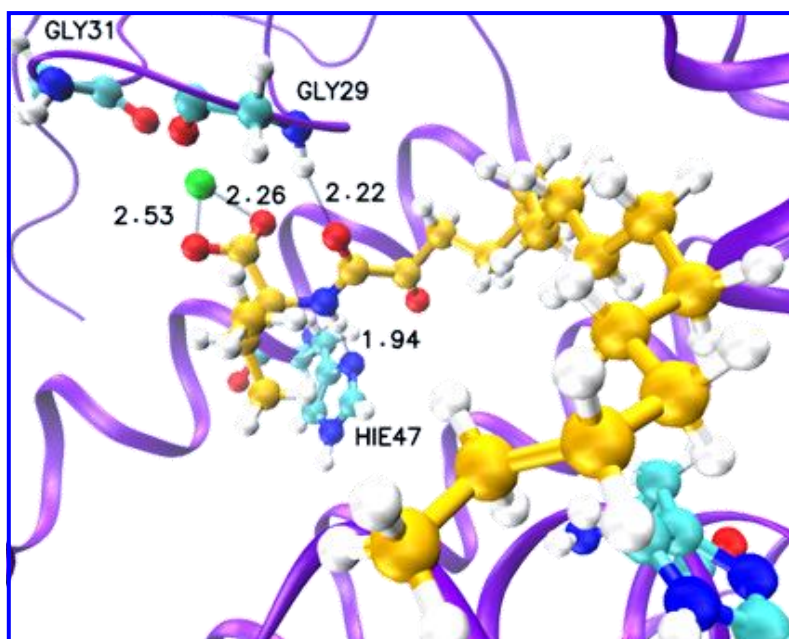


Σχήμα 8.2: Διακύμανση της τιμής RMSD για τα άτομα της ομάδας της βαλίνης και της 2-οξοαμιδική ομάδας των ενώσεων **GK241** και **61γ** κατά τη διάρκεια της δυναμικής.

Για την ένωση **GK241** οι τιμές είναι μικρότερες του 1 Å καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου της μοριακής δυναμικής. Το αποτέλεσμα υποδεικνύει ότι διατηρούνται σταθερές οι αποστάσεις μεταξύ των ατόμων οξυγόνου της καρβοξυλικής ομάδας και του ιόντος ασβεστίου, διατηρώντας την ικανότητα της καρβοξυλομάδας να δρα ως υποκαταστάτης του μετάλλου. Στις εικόνες 8.1 και 8.2 απεικονίζεται το σύστημα **GK241**-GIIA sPLA₂ στην αρχή και στο τέλος του χρόνου προσομοίωσης.

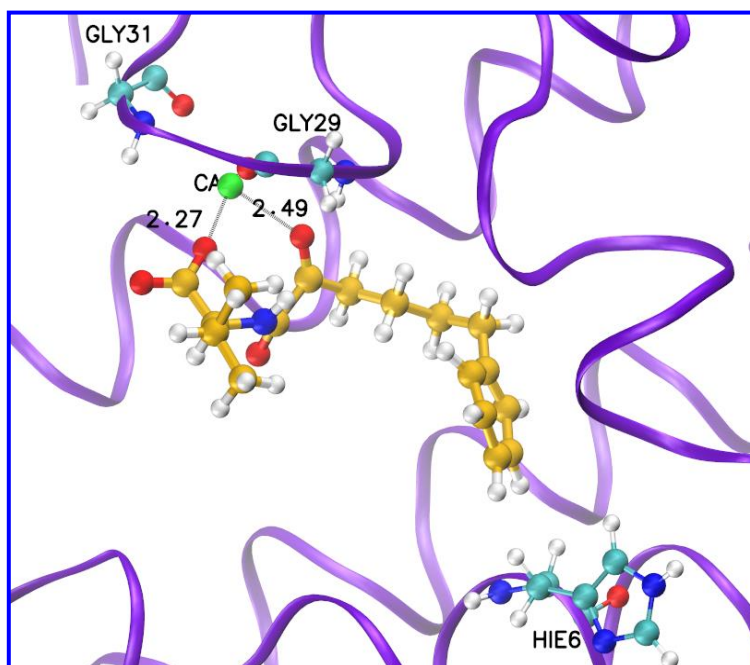


Εικόνα 8.1: Η διαμόρφωση της **GK241** στο ενεργό κέντρο της **GIIA sPLA₂** στην αρχή της προσομοίωσης.

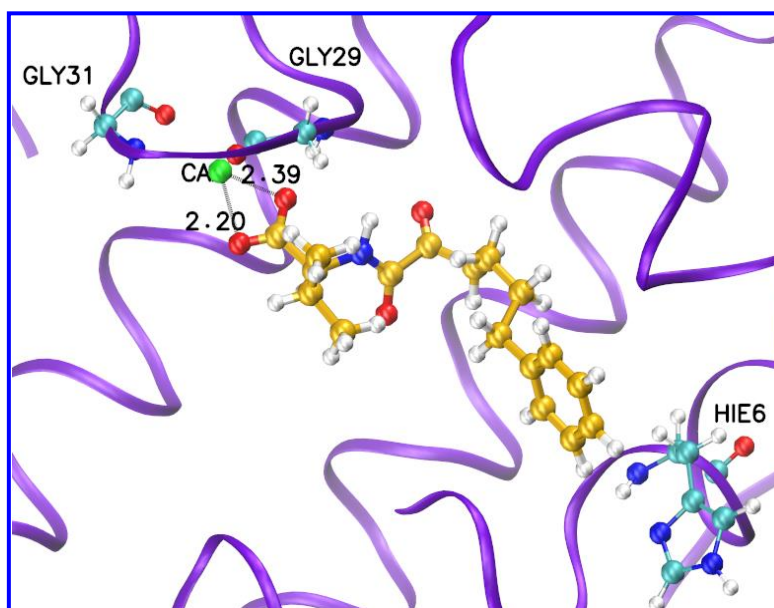


Εικόνα 8.2: Η διαμόρφωση της GK241 στο ενεργό κέντρο της GIIA sPLA₂ στο τέλος της προσομοίωσης.

Για την ένωση **61γ** η τιμή του RMSD κυμαίνεται μεταξύ 1-1,5 Å και όπως φαίνεται από τις Εικόνες 8.3 και 8.4 η διαμόρφωση της ένωσης κατά τη διάρκεια της μοριακής δυναμικής (200 ns) μεταβάλλεται αρκετά.



Εικόνα 8.3: Η διαμόρφωση της 61γ στο ενεργό κέντρο της GIIA sPLA₂ στην αρχή της προσομοίωσης.



Εικόνα 8.4: Η διαμόρφωση της 61γ στο ενεργό κέντρο της GIIA sPLA₂ στο τέλος της προσομοίωσης.

Για τη σταθεροποίηση της πρόσδεσης των μορίων στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, σημαντικό ρόλο παίζουν ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου, καθώς και η υποκατάσταση μίας θέσης συντάξεως του ιόντος ασβεστίου από τις λειτουργικές ομάδες του μορίου (καρβοξυλομάδα, α-κετοαμιδική ομάδα).

Στο Πίνακα 8.1 συνοψίζεται η μέση απόσταση των λειτουργικών ομάδων των αναστολέων από το μέταλλο κατά τη διάρκεια της μοριακής δυναμικής.

Πίνακας 8.1: Μέση απόσταση των αναστολέων από το μέταλλο.

Απόσταση (Å)	GK241	61γ
Ca ²⁺ ... -COO-	~2,2	~2,2
Ca ²⁺ ... -NHCO	5,0	6,5

Η ομάδα του καρβοξυλίου βρίσκεται σε κατάλληλη απόσταση για να δράσει ως υποκαταστάτης του Ca²⁺ και στα δύο συστήματα, κατά τη διάρκεια του υπολογισμού.

Όσον αφορά τον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου (Πίνακας 8.2), ένας σταθερός δεσμός υδρογόνου σχηματίζεται μεταξύ της GLY29 και της καρβοξυλομάδας και στα δύο συστήματα, ενώ για την ένωση **GK241** παρατηρείται ο σχηματισμός δύο επιπλέον δεσμών υδρογόνου, μεταξύ της GLY29 και της καρβονυλομάδας του αμιδίου και μεταξύ της HIS47 και του αμιδικού -NH.

Πίνακας 8.2: Δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των αμινοξέων του ενεργού κέντρου και των ενώσεων GK241 και 61γ. Τα μήκη των δεσμών εκφράζονται σε Å και η διάρκειά τους εκφράζεται ως το ποσοστό επί του συνόλου του χρόνου προσομοίωσης.

	GK241	61γ
GLY29	-COO ⁻ 3,05 Å 52 %	-COO ⁻ 2,94 Å 75,8 %
	-NHCO 2,9 Å 51 %	
HIS47	-NHCOCO 3,18 Å 30,47 %	

Οι υπολογισμοί των τιμών των ενεργειακών όρων για το κάθε σύστημα επιτεύχθηκαν με τη χρήση της μεθόδου MM-PBSA (Πίνακας 8.3). Με τη χρήση της μεθόδου υπολογίστηκαν οι τιμές της ενέργειας πρόσδεσης καθών των ενεργειακών όρων που συμβάλουν στη διαμόρφωση της.

Πίνακας 8.3: Συνεισφορές στην ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης ($\Delta G_{\text{πρόσδεσης}}$) για τα σύμπλοκα της **GIIA sPLA₂** με τις ενώσεις **GK241** και **61γ**, όπως υπολογίστηκαν με τη μέθοδο **MM-PBSA**.

Energy (kcal·mol ⁻¹)*	GK241	61γ
ΔE_{vdW}	-38,67 ± 4,61	-33,01 ± 0,73
ΔE_{elec}	-531,72 ± 1,28	-511,55 ± 4,03
ΔG_{PB}	534,51 ± 4,28	514,44 ± 4,42
ΔG_{NP}	-4,36 ± 0,03	-4,18 ± 0,04
$\Delta G_{\text{ele(tot)}} = \Delta E_{\text{ele}} + \Delta G_{\text{PB}}$	2,79 ± 5,56	2,89 ± 8,45
ΔG_{solv}	529,64 ± 4,24	510,25 ± 4,46
$\Delta E_{\text{MM, gas}}$	-570,39 ± 5,89	-544,57 ± 3,29
$\Delta H_{(\text{MM+solv})}$	-40,74 ± 1,64	-34,31 ± 1,17
$-T\Delta S_{\text{tot}}$	18,57 ± 1,16	16,46 ± 0,85
$\Delta G_{\text{MM-PBSA}}$	-22,17 ± 1,36	-17,85 ± 0,94

*Οι αριθμοί στις παρενθέσεις εκφράζουν τη τυπική απόκλιση (standard deviation).

Με βάση την ανάλυση των αποτελεσμάτων, η θεωρητική τιμή πρόσδεσης για το σύστημα **GK241**-**GIIA sPLA₂** είναι $\Delta G_{\text{πρόσδεσης}} = -22,17 \pm 1,36 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ενώ για το **61γ**-**GIIA sPLA₂** είναι $\Delta G_{\text{πρόσδεσης}} = -17,85 \pm 0,94 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Η συνολική ηλεκτροστατική συνεισφορά ($\Delta E_{\text{ele}} + \Delta G_{\text{PB}}$) είναι $2,79 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ για το σύστημα του **GK241** και $2,89 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ για το **61γ**. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι η μη ευνοϊκή ηλεκτροστατική συνεισφορά στην ελεύθερη ενέργεια διαλυτότητας (ΔG_{PB}) αντισταθμίζεται από την ευνοϊκή ηλεκτροστατική συνεισφορά στην ελεύθερη ενέργεια του συστήματος (ΔG_{ele}) όπως αυτή υπολογίζεται από τη μοριακή μηχανική (ΔE_{MM}). Οι αλληλεπιδράσεις στο σχηματισμό των συμπλόκων επηρεάζονται κυρίως από τις συνεισφορές van der Waals και από τη μη πολική συνεισφορά στην ελεύθερη ενέργεια διάλυσης.

8.1.3 Συμπεράσματα

Με βάση τα αποτελέσματα της προσομοίωσης της μοριακής δυναμικής των ενώσεων **GK241** και **61γ** στο ενεργό κέντρο της GIIA sPLA₂ δώθηκε πιθανή εξήγηση για τα πειραματικά *in vitro* αποτελέσματα και τη συσχέτιση δομής-δράσης.

Αρχικά, η καρβοξυλομάδα και η α-κέτο ομάδα του αναστολέα **GK241** είναι κοντά στο ιόν του ασβεστίου. Κατά τη διάρκεια της δυναμικής γίνεται μια επανατοποθέτηση του μορίου μέσα στην κοιλότητα με αποτέλεσμα η καρβοξυλομάδα να δρα ως δισχιδής υποκαταστάτης του μετάλλου του ενεργού κέντρου.

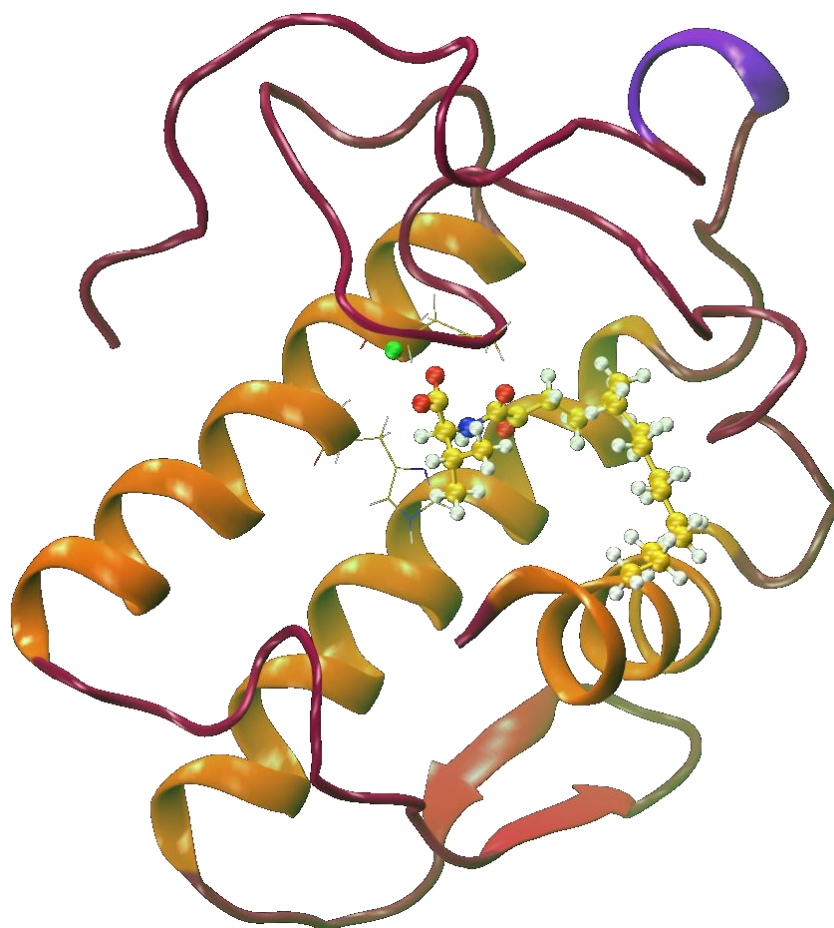
Οι δεσμοί υδρογόνου που υπάρχουν αρχικά είναι μεταξύ της καρβοξυλομάδας και της GLY31 και ένας παροδικός με την LYS61 μέσω γέφυρας δεσμού υδρογόνου (2 μόρια νερού). Μετά την επανατοποθέτηση του μορίου, δημιουργούνται δυο επιπλέον σταθεροί δεσμοί υδρογόνου μεταξύ του αμιδικού CO με την GLY29 και μεταξύ του αμιδικού -NH με την καταλυτική ιστοδίνη.

Οι παραπάνω αλληλεπιδράσεις παρατηρούνται από τα μισά του χρόνου της προσομοίωσης και μέχρι το τέλος. Ο λόγος για τον οποίο το μέρος της ένωσης που συμμετέχει στις παραπάνω αλληλεπιδράσεις, παραμένει σταθερά σε θέση ευνοϊκή για τη δημιουργία τους, είναι η διευθέτηση της μακριάς αλειφατικής αλυσίδας στην κοιλότητα. Παρ' ότι είναι αρκετά ευέλικτη, οι λιπόφιλες αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται, καθώς και πιθανότατα στερικοί λόγοι, ευνοούν τη σταθεροποίηση των λειτουργικών ομάδων της ένωσης κοντά στο ενεργό κέντρο, με αποτέλεσμα τη δημιουργία σταθερών αλληλεπιδράσεων.

Για την **61γ** παρατηρείται παρόμοια συμπεριφορά όσον αφορά τις αρχικές αλληλεπιδράσεις με το ενεργό κέντρο και την επανατοποθέτηση του μορίου μέσα στην κοιλότητα κατά τη διάρκεια της μοριακής δυναμικής. Ωστόσο, λόγω της ευελιξίας της αλειφατικής αλυσίδας καθώς και της τάσης του αρωματικού δακτυλίου να εισχωρήσει στο κέντρο του ενζύμου, στην τελική διαμόρφωση που λαμβάνει το μόριο, η α-κετοαμιδική ομάδα του είναι απομακρυσμένη από

τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου. Κατά συνέπεια, η τοποθέτησή της δεν ευνοεί το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου και το μόριο συγκρατείται στο ενεργό κέντρο μόνο από την ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση με το ιόν ασβεστίου και ενδεχομένως κάποιες επιπλέον παροδικές υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.

Συνεπώς, η τοποθέτηση της αλειφατικής αλυσίδας της **GK241** ευνοεί τον σχηματισμό των αλληλεπιδράσεων της ένωσης με το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Γι' αυτό, προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η ανασταλτική της δράση, θα πρέπει να εξεταστούν αλλαγές στη δομή της που να εξασφαλίζουν τον σχηματισμό αυτών των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ PGE₂ *ex vivo*

Η προσταγλανδίνη E₂ (PGE₂) είναι ένα βιοδραστικό λιπίδιο, το οποίο συμμετέχει σε ένα ευρύ φάσμα βιολογικών διεργασιών, που συνδέονται με την εμφάνιση της φλεγμονής, του πόνου, του καρκίνου³²⁴ και της αθηροσκλήρωσης.³²⁵ Η PGE₂ υπερεκφράζεται σε καρκινικά κύτταρα, η εμφάνιση των οποίων συνδέεται με την παρουσία χρόνιας φλεγμονής. Έχει ταυτοποιηθεί ως η κυριότερη από τις προσταγλανδίνες που συμμετέχουν στην εξέλιξη των κακοηθών όγκων του πνεύμονα και του μαστού.³²⁶ Από την άλλη πλευρά, έχει βρεθεί ότι η PGE₂ διευκολύνει την αρτηριακή θρόμβωση,^{325,327} και η παραγωγή της αυξάνεται με τον καπνό του τσιγάρου.³²⁸ Επίσης, αυξημένη παραγωγή των PGI₂/PGE₂ συνοδευόμενη από την επαγωγή της οδού COX-2 κατά την δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας, συμβάλει στη σταθερότητα της.^{329,330}

Η δράση των φωσφολιπασών A₂ σχετίζεται άμεσα με το σχηματισμό της PGE₂.^{331,332} Έτσι, η ανάπτυξη ουσιών οι οποίες μπορούν να καταστείλουν την παραγωγή της PGE₂ αποτελεί αντικείμενο μελέτης για την εύρεση θεραπείας ασθενειών που σχετίζονται με τη χρόνια φλεγμονή.

Στόχος των πειραμάτων μας ήταν να διαπιστώσουμε αν ο αναστολέας **GK241** της GIIA sPLA₂ παρουσιάζει δράση σε κυτταρικό επίπεδο, και πιο συγκεκριμένα σε μεσαγγειακά κύτταρα.

Τέσσερα είδη φωσφολιπάσης A₂ εκφράζονται στα μεσαγγειακά κύτταρα του νεφρικού σωμάτιου: η κυτοσολική GIVA cPLA₂, η iPLA₂ και οι εκκριτικές IIA και V sPLA₂.^{333,334} Τα μεσαγγειακά κύτταρα είναι τροποποιημένα λεία μυϊκά κύτταρα με ικανότητα να συσπώνονται, ενώ έχουν και φαγοκυτταρικές ικανότητες καθώς και ικανότητα παραγωγής συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας. Επίσης, επειδή συμβάλουν στη στήριξη κάποιων δομών του νεφρικού σπειράματος, έχουν σχετιστεί με τις περισσότερες από τις παθολογικές καταστάσεις του.

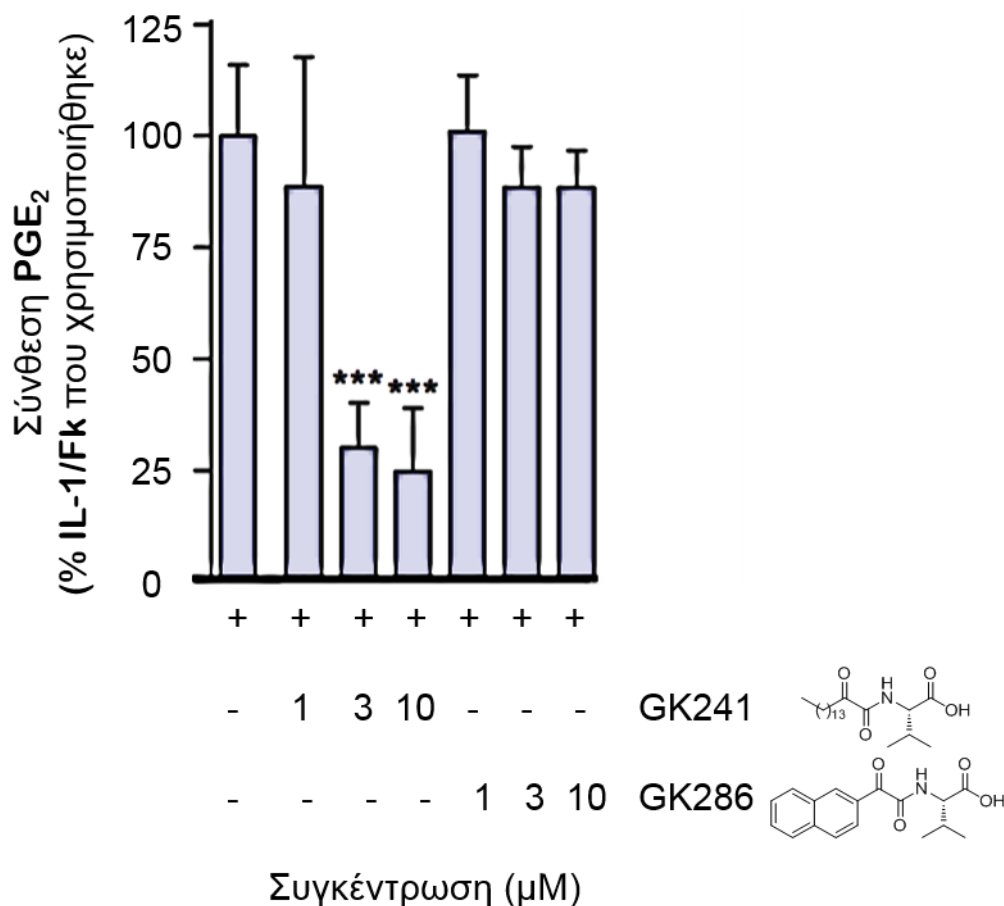
Δεδομένου της ισχυρής και εκλεκτικής δράσης του αναστολέα **GK241** έναντι της *GLIA sPLA₂*, πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε κυτταρικές καλλιέργειες με αντικείμενο την αξιολόγηση της δράσης της ένωσης ως προς την παραγωγή της προσταγλανδίνης *E₂*. Εκτός από την **GK241**, η ένωση **GK286** επίσης δοκιμάστηκε σε κυτταρικό επίπεδο για λόγους σύγκρισης.

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο της καθηγήτριας Andrea Huwiler στο Ινστιτούτο Φαρμακολογίας του Πανεπιστημίου της Βέρνης. Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές καλλιέργειες νεφρικών μεσαγγειακών κυττάρων ζωικής προέλευσης (ποντίκια), τα οποία ενεργοποιήθηκαν με ιντερλευκίνη 1 και φορσκολίνη για 24 ώρες. Σκοπός ήταν η επαγωγή της σύνθεσης μεγάλης ποσότητας *PGE₂*, όπως έχει περιγραφεί και αλλού.³³⁴ Οι καλλιέργειες μελετήθηκαν απουσία και παρουσία των αναστολέων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Το υπερκείμενο υλικό συλλέχθηκε και με τη μέθοδο ELISA έγινε ποσοτικός προσδιορισμός της *PGE₂* που εκκρίθηκε από τα κύτταρα.

Ο ισχυρός και εκλεκτικός αναστολέας **GK241** παρουσίασε σημαντική αναστολή της παραγωγής *PGE₂* (Σχήμα 9.1). Σε συγκέντρωση 3 μM της ένωσης, η σύνθεση της *PGE₂* μειώθηκε στο ~30%, ενώ σε μεγαλύτερη συγκέντρωση (10 μM) παρατηρήθηκε περαιτέρω μείωση του ποσοστού παραγωγής της *PGE₂*. Αντίθετα, παρουσία της ένωσης **GK286**, ακόμα και σε συγκέντρωση 10 μM , το ποσοστό παραγωγής της *PGE₂* δεν μειώθηκε σημαντικά (~90%).

Παρόλο που δεν είναι γνωστή η ακριβής βιολογική οδός μέσω της οποίας επάγεται η κυτταρική σύνθεση της προσταγλανδίνης *E₂*, από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι εμφανές ότι η *GLIA sPLA₂* εμπλέκεται σε αυτή. Αναστολή της δράσης της *GLIA sPLA₂* μειώνει της παραγωγή της *PGE₂* σε κυτταρικό επίπεδο. Ως εκ τούτου, επιπλέον πειράματα χρειάζεται να γίνουν ώστε να διαπιστωθεί αν ο αναστολέας **GK241** μπορεί να αποτελέσει μια πιθανή φαρμακευτική προσέγγιση για την αντιμετώπιση της παθολογικής σύνθεσης της *PGE₂*.

Με βάση το δεδομένο ότι η PGE₂ εμπλέκεται στην αθηροσκλήρωση και στην αθηροθρόμβωση, ο αναστολέας **GK241** που αναπτύχθηκε στην παρούσα διατριβή αποτελεί ένωση που μπορεί να παρουσιάζει *in vivo* δράση κατά της αθηροσκλήρωσης και αθηροθρόμβωσης.



Σχήμα 9.1: Επίδραση των ενώσεων GK241 και GK286, σε διάφορες συγκεντρώσεις (μM), στην παραγωγή PGE₂ από τα κύτταρα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΠΟΡΕΙΕΣ ΚΑΙ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

10.1 Μέθοδοι και υλικά

Για τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν χημικώς καθαρά αντιδραστήρια. Τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των ενώσεων προμηθευτήκαν από τις εταιρίες Fluka, Sigma, Aldrich και Bachem.

Η παρασκευή του ξηρού τετραϋδροφουρανίου έγινε με κατεργασία ποσότητας διαλύτη με οξείδιο του αργιλίου για 24 h. Στη συνέχεια ακολούθησε απόσταξη και ο διαλύτης αποθηκεύτηκε σε γυάλινο δοχείο που περιείχε κόσκινα. Για την παρασκευή ξηρού αιθέρα, ο διαλύτης κατεργάζεται αρχικά με χλωριούχο ασβέστιο (CaCl_2) και στη συνέχεια φυλάσσεται υπεράνω μεταλλικού νατρίου.

Οι συμπυκνώσεις των διαλυτών έγιναν υπό ελαττωμένη πίεση σε θερμοκρασία 35-45 °C ανάλογα με το διαλύτη. Ο καθαρισμός των προϊόντων που παρασκευάστηκαν έγινε με χρωματογραφία στήλης ή με ανακρυστάλλωση. Στις χρωματογραφίες στήλης η ροή διαλύτη έγινε είτε με εφαρμογή χαμηλής πίεσης στο πάνω μέρος της στήλης (στήλη Flash) είτε βαρυτικά (απλή στήλη). Για την στατική φάση το υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν silica gel 60 (70-230 mesh) για τις απλές χρωματογραφίες στήλης και silica gel 60 (230-400 mesh) για τις στήλες Flash.

Ο έλεγχος της πορείας των αντιδράσεων έγινε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) και χρησιμοποιήθηκαν πλάκες αλουμινίου πάχους 0.2 mm επιστρωμένες με silica gel 60 και φθορίζοντα δείκτη F254. Για την εμφάνιση των ουσιών στα φασματογραφήματα χρησιμοποιήθηκε λυχνία UV, διάλυμα φωσφομολυβδαινικού οξέος 7.5% σε αιθανόλη και διάλυμα νινυδρίνης 0.5% σε αιθανόλη. Ως διαλύτες ανάπτυξης των χρωματογραφημάτων λεπτής στοιβάδας χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα συστήματα:

1. πετρελαϊκός αιθέρας (σ.ζ. 40-60 °C)/ οξικός αιθυλεστέρας 9/1
2. πετρελαϊκός αιθέρας (σ.ζ. 40-60 °C)/ οξικός αιθυλεστέρας 4/1
3. πετρελαϊκός αιθέρας (σ.ζ. 40-60 °C)/ οξικός αιθυλεστέρας 1/1

4. πετρελαϊκός αιθέρας (σ.ζ. 40-60 °C)/ οξικός αιθυλεστέρας 5.5/4.5
5. πετρελαϊκός αιθέρας (σ.ζ. 40-60 °C)/ οξικός αιθυλεστέρας 1/2
6. πετρελαϊκός αιθέρας (σ.ζ. 40-60 °C)/ οξικός αιθυλεστέρας 2/1
7. πετρελαϊκός αιθέρας (σ.ζ. 40-60 °C)/ οξικός αιθυλεστέρας 3/2
8. πετρελαϊκός αιθέρας (σ.ζ. 40-60 °C)/ οξικός αιθυλεστέρας 1/4
9. πετρελαϊκός αιθέρας (σ.ζ. 40-60 °C)/ οξικός αιθυλεστέρας 3/7
10. χλωροφόρμιο / μεθανόλη 9/1
11. χλωροφόρμιο / μεθανόλη 95/5

Η ταυτοποίηση των ενώσεων πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και φασματομετρία μάζας. Τα φάσματα πρωτονίου (^1H) και άνθρακα (^{13}C) των ουσιών ελήφθησαν σε φασματογράφο πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού Varian Mercury (200 MHz και 50 MHz αντίστοιχα) σε δευτερωμένο διαλύτη χλωροφορμίου (CDCl_3) ή μεθανόλης (CD_3OD). Οι χημικές μετατοπίσεις εκφράζονται σε ppm. Οι σταθερές σύζευξης εκφράζονται σε Hz. Τα φάσματα μαζών ελήφθησαν σε φασματογράφο μάζας Finnigan, Surveyor MSQ Plus με την τεχνική του ιονισμού μέσω ηλεκτροψεκασμού (Electron Spray Ionization).

Ο προσδιορισμός του σημείου τήξεως των ενώσεων έγινε σε συσκευή Büchi 530 και τα αποτελέσματα δίνονται μη διορθωμένα. Η οπτική στροφική ικανότητα των ουσιών μετρήθηκε με ηλεκτρονικό πολωσίμετρο Perkin-Elmer, Model 343 με κυψελίδα 10 cm και σε θερμοκρασία δωματίου. Η μοριακή μάζα έχει μονάδα μέτρησης $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ σύμφωνα με το SI, αλλά για ιστορικούς λόγους σχεδόν πάντα εκφράζεται σε $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Οι ενώσεις **53β**,³³⁵ **54β**,³³⁵ **55α**,³³⁶ **56α**,³³⁶ **55β**,³³⁷ **56β**³³⁸ έχουν περιγραφεί στην βιβλιογραφία και τα πειραματικά δεδομένα είναι σύμφωνα με αυτήν.

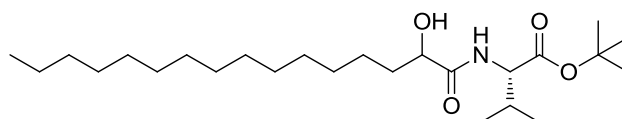
10.2 Συνθετικές πορείες

10.2.1 Γενική μέθοδος σύζευξης

Σε αναδευόμενο διάλυμα 2-υδροξυοξέος (1,0 mmol) και *tert*-βουτυλεστέρα ή μεθυλαιθυλεστέρα του άμινο συστατικού (1,0 mmol) σε CH₂Cl₂ (10 mL), προστίθεται Et₃N (0,3 mL, 2,2 mmol) και στη συνέχεια 1-(3-διμεθυλαμινοπροπυλ)-3-αιθυλκαρβοδιαμίδιο WSCI·HCl (0,21 g, 1,1 mmol) και 1-υδροξυβενζοτριαζόλιο HOBt (0,15 g, 1,0 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται στους 0 °C για 1 h και στη συνέχεια αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 18 h. Ακολουθεί συμπύκνωση του οργανικού διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα διαλύεται σε EtOAc (10 mL). Η οργανική στιβάδα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη και εκπλένεται διαδοχικά με υδατικό διάλυμα 5% κιτρικού οξέος (2 × 10 mL), κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl (10 mL), υδατικό διάλυμα 5% NaHCO₃ (2 × 10 mL) και κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl (10 mL). Στη συνέχεια η οργανική στιβάδα ξηραίνεται με Na₂SO₄ και ο οργανικός διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης.

(2S)-2-(2-υδροξυδεκαεξαναμιδο)-3-μεθυλοβουτανικός *tert*-βουτυλεστέρας

(2S)-*tert*-butyl 2-(2-hydroxyhexadecanamido)-3-methylbutanoate



36α (μίγμα διαστερεομερών)

Λευκό στερεό. Παρελήθη από τη σύζευξη του *tert*-βουτυλεστέρα της (L)-βαλίνης. Απόδοση: 62%.

M.T.: C₂₅H₄₉NO₄

M.B.: 427,66

Σύστημα έκλουσης (2): R_f 0,44

$[\alpha]^{20}_D$ 9,80 (c 1,01, CHCl₃)

Σ.Τ.: 49-53 °C

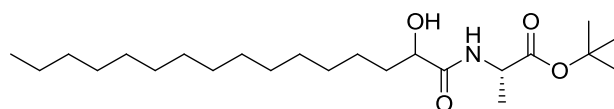
¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 7.17 (d, *J* = 9.0 Hz, ½H, NH), 7.05 (d, *J* = 9.0 Hz, ½H, NH), 4.46-4.31 (m, 1H, CH), 4.18-4.03 (m, 1H, CHOH), 4.00 (d, *J* = 4.8 Hz, ½H, OH), 3.83 (d, *J* = 4.8 Hz, ½H, OH), 2.24-2.03 (m, 1H, NHCHCH), 1.90-1.52 (m, 2H, CH₂CHOH), 1.44 (s, 9H, 3xCH₃), 1.34-1.13 (m, 24H, 12xCH₂), 0.97-0.75 (m, 9H, 3xCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 174.1, 174.0, 171.3, 170.9, 82.0, 81.9, 72.2, 71.9, 57.0, 56.8, 34.8, 31.8, 31.3, 31.2, 29.6, 29.5, 29.3, 29.3, 27.9, 25.0, 24.8, 22.6, 18.9, 18.8, 17.5, 17.4, 14.0.

MS (ESI) *m/z* (%): 428.3 (95) [M+H]⁺, 389.2 (100) [M - *t*Bu + NH₃], 372.4 (83) [M - *t*Bu + H]⁺.

(2S)-2-(2-υδροξυδεκαεξαναμιδο)προπανοϊκός *tert*-βουτυλεστέρας

(2S)-*tert*-butyl 2-(2-hydroxyhexadecanamido)propanoate



36γ (μίγμα διαστερεομερών)

Άχρωμο λάδι. Παρελήθη από τη σύζευξη του *tert*-βουτυλεστέρα της (L)-αλανίνης. Απόδοση 40%.

M.T.: C₂₃H₄₅NO₄

M.B.: 399,33

Σύστημα έκλουσης (3): R_f 0,58

$[\alpha]^{20}_D$ 7,7 (c 0,99, CHCl₃)

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 7.22-7.04 (m, 1H, NH), 4.56-4.35 (m, 1H, NHCH), 4.17-4.02 (m, 1H, CHOH), 3.45 (br, 1H, OH), 1.93-1.55 (m, 2H,

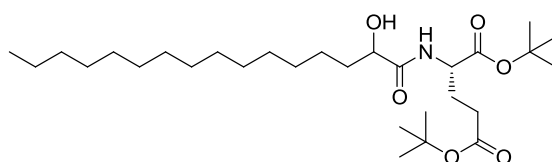
CH₂CHOH), 1.45 (s, 9H, 3xCH₃), 1.36 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, NHCHCH₃), 1.32-1.18 (s, 24H, 12xCH₂), 0.86 (t, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 173.9, 173.7, 172.3, 172.0, 81.9, 71.9, 48.1, 34.7, 34.6, 31.8, 29.6, 29.5, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 27.8, 24.9, 22.6, 18.4, 14.0.

MS (ESI) *m/z* (%): 400.4 (100) [M + H]⁺, 417.4 (25) [M + NH₃]⁺, 344.2 (45) [M - *t*Bu]⁺.

(2*S*)-2-(2-υδροξυδεκαεξαναμιδο)πεντανο-δι-ικος δι-*tert*-βουτυλεστέρας

(2*S*)-di-*tert*-butyl 2-(2-hydroxyhexadecanamido)pentanedioate



36β (μίγμα διαστερεομερών)

Υποκίτρινο στερεό. Παρελήθη από τη σύζευξη του δι-*tert*-βουτυλεστέρα του (L)-γλουταμινικού οξέος. Απόδοση 76%.

M.T.: C₂₉H₅₅NO₆

M.B.: 513,40

Σύστημα έκλουσης (1): R_f 0,65

[α]²⁰_D 8,1 (c 1,00, CHCl₃)

Σ.T.: 45-47 °C

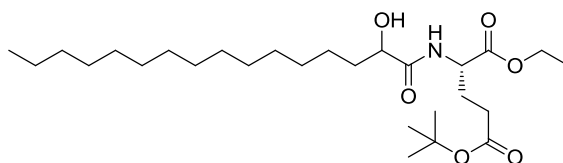
¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 7.24-7.06 (m, 1H, NH), 4.61-4.38 (m, 1H, NHCH), 4.22-4.02 (m, 1H, CHOH), 3.61 (br, 1H, OH), 2.44-1.71 (m, 6H, 3xCH₂), 1.53-1.38 (m, 18H, 6xCH₃), 1.36-1.17 (m, 24H, 12xCH₂), 0.97-0.78 (m, 3H, CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 174.2, 174.0, 172.0, 170.8, 82.3, 82.2, 82.2, 80.7, 80.7, 71.9, 51.7, 34.7, 31.8, 31.5, 29.6, 29.3, 29.2, 27.9, 27.6, 24.9, 22.6, 14.0.

MS (ESI) m/z (%): 514.6 (90) $[M + H]^+$.

**(2S)-2-(2-υδροξυδεκαεξαναμιδο)πεντανο-δι-ικος-1-αιθυλ-5-*tert*-
βουτυλεστέρας**

(2S)-5-*tert*-butyl 1-ethyl 2-(2-hydroxyhexadecanamido)pentanedioate



41 (μίγμα διαστερεομερών)

Κίτρινο λάδι. Παρελήθη από τη σύζευξη του αιθυλεστέρα του (L)-γλουταμινικού οξέος. Απόδοση 53%.

M.T.: $C_{27}H_{51}NO_6$

M.B.: 485,70

Σύστημα έκλουσης (1): R_f 0,76

$[\alpha]^{20}_D$ 5,80 (c 1,00, $CHCl_3$)

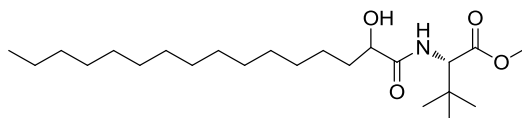
1H NMR ($CDCl_3$, 200 MHz): δ 7.33-7.19 (m, 1H, NH), 4.55-4.38 (m, 1H, NHCH), 4.18-3.95 (m, 3H, CHOH και $COOCH_2$), 2.33-1.74 (m, 6H, $2 \times CH_2$ και CH_2CHOH), 1.34 (s, 9H, $3 \times CH_3$), 1.29-1.07 (m, 27H, $12 \times CH_2$ και CH_3), 0.76 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 50 MHz): δ 174.6, 174.4, 171.8, 171.8, 171.5, 80.6, 71.8, 61.4, 51.1, 34.5, 34.5, 34.4, 31.7, 31.2, 29.4, 29.2, 29.1, 27.8, 27.1, 24.8, 24.7, 22.4, 13.9.

MS (ESI) m/z (%): 486.4 (100) $[M + H]^+$, 430.3 (75) $[M - tBu + H]^+$.

(2S)-2-(2-υδροξυδεκαεξαναμιδο)-3,3-διμεθυλοβουτανοϊκός μεθυλεστέρας

(2S)-methyl 2-(2-hydroxyhexadecanamido)-3,3-dimethylbutanoate



32γ (μίγμα διαστερομερών)

Λευκό στερεό. Παρελήθη από τη σύζευξη του μεθυλεστέρα της (L)-tert-λευκίνης. Απόδοση 84%.

M.T.: C₂₃H₄₅NO₄

M.B.: 399,61

Σύστημα έκλουσης (3): R_f 0,7

[α]²⁰_D 2,30 (c 1,00, CHCl₃)

Σ.Τ.: 73 °C

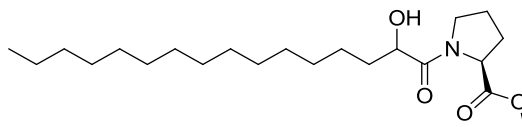
¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 7.29-7.07 (m, 1H, NH), 4.47-4.37 (m, 1H, NHCH), 4.21-4.04 (m, 1H, CHOH), 3.70 (s, 3H, CH₃), 1.93-1.70 (m, 2H, CH₂CHOH), 1.52-1.16 (m, 24H, 12xCH₂), 0.96 (s, 9H, 3xCH₃), 0.85 (t, J = 6.8 Hz, 3H, CH₃)

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 174.0, 172.1, 171.7, 72.2, 71.9, 59.5, 59.4, 51.7, 34.7, 31.8, 29.6, 29.3, 29.2, 26.4, 25.0, 24.9, 22.6, 14.0.

MS (ESI) m/z (%): 400.2 (100) [M + H]⁺.

(2S)-1-(2-υδροξυδεκαεξανο)πυρολιδο-2-καρβοξυλικός μεθυλεστέρας

(2S)-methyl 1-(2-hydroxyhexadecanoyl)pyrrolidine-2-carboxylate



32β (μίγμα διαστερομερών)

Λευκό στερεό. Παρελήθη από τη σύζευξη του μεθυλεστέρα της (L)-προλίνης. Απόδοση 64%.

M.T.: C₂₂H₄₁NO₄

M.B.: 383,57

Σύστημα έκλουσης (4): R_f 0,43

[α]²⁰_D -50,0 (c 1,00, CHCl₃)

Σ.Τ.: 42-55 °C

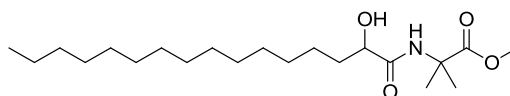
¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 4.75-4.43 (m, 1H, NCH), 4.29-4.14 (m, 1H, CHOH), 3.71 (s, 3H, CH₃), 3.62-3.44 (m, 2H, NCH₂), 3.06 (br, 1H, OH), 2.57-1.74 (m, 6H, NCH₂CH₂CH₂ και CH₂CHOH), 1.73-1.42 (m, 4H, 2xCH₂), 1.23 (s, 20H, 10xCH₂), 0.85 (t, J = 6.4 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 173.6, 172.4, 81.9, 69.5, 59.4, 59.1, 56.7, 52.5, 46.7, 45.6, 34.4, 32.7, 32.1, 29.9, 29.9, 29.7, 29.6, 29.2, 28.9, 25.3, 24.9, 22.9, 14.3.

MS (ESI) m/z (%): 384.4 (100) [M + H]⁺.

2-(2-υδροξυδεκαεξαναμιδο)-2-μεθυλοπροπανοϊκός μεθυλεστέρας

methyl 2-(2-hydroxyhexadecanamido)-2-methylpropanoate



32δ (ρακεμικό μίγμα)

Λευκό στερεό. Παρελήθη από τη σύζευξη του μεθυλεστέρα το 2-αμινοϊσοβουτυρικού οξέος. Απόδοση 54%.

M.T.: C₂₁H₄₁NO₄

M.B.: 371,55

Σύστημα έκλουσης (3): R_f 0,62

Σ.Τ.: 53-56 °C

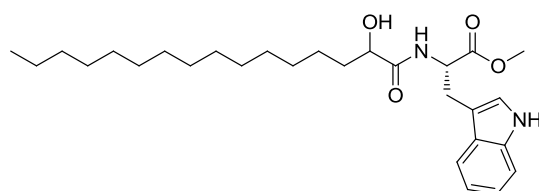
¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 7.13 (s, 1H, NH), 4.09-3.93 (m, 1H, CHOH), 3.72 (s, 3H, COOCH₃), 3.53 (br, 1H, OH), 1.84-1.58 (m, 2H, CH₂CHOH), 1.53 (s, 6H, 2xCH₃), 1.34-1.10 (m, 24H, 12xCH₂), 0.86 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 174.9, 173.7, 71.8, 55.9, 52.5, 34.5, 31.8, 29.6, 29.4, 29.3, 24.8, 24.6, 22.6, 14.0.

MS (ESI) *m/z* (%): 372.27 (100) [M + H]⁺.

**(2S)-2-(2-υδροξυδεκαεξαναμιδο)-3-(1H-ινδολ-3-) προπανοϊκός
μεθυλεστέρας**

(2S)-methyl 2-(2-hydroxyhexadecanamido)-3-(1*H*-indol-3-yl)propanoate



32α (μίγμα διαστερεομερών)

Λευκό στερεό. Παρελήφθη από τη σύζευξη του μεθυλεστέρα της (L)-τρυπτοφάνης. Απόδοση 52%.

M.T.: C₂₈H₄₄N₂O₄

M.B.: 472,66

Σύστημα έκλουσης (4): R_f 0,53

[α]²⁰_D 41,1 (*c* 1,00, CHCl₃)

Σ.Τ.: 78-85 °C

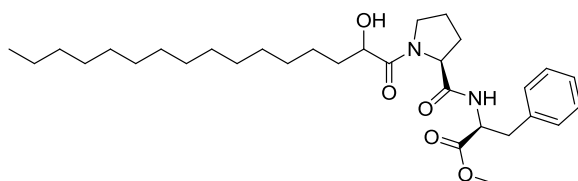
¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 8.22 (s, 1H, NH), 7.61-7.50 (m, 1H, CH αρωματικό), 7.43-6.88 (m, 5H, αρωματικά και NH), 5.08-4.88 (m, 1H, NHCH), 4.14-3.97 (m, 1H, CHOH), 3.81-3.67 (m, 3H, COOCH₃), 3.34 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, NHCHCH₂), 1.87-1.64 (m, 2H, CH₂CHOH), 1.62-1.15 (m, 24H, 12xCH₂), 0.89 (t, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz): δ 173.6, 172.3, 169.0, 168.4, 135.9, 122.7, 122.2, 119.6, 119.5, 118.5, 118.3, 111.3, 109.8, 80.6, 72.0, 52.4, 34.6, 31.9, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 27.6, 24.9, 22.6, 14.1.

MS (ESI) m/z (%): 473.3 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 100%.

**(2S)-2-((2S)-1-(2-υδροξυδεκαεξανο)πυρολιδο-2-καρβαμιδο)-3-φαινυλο
προπανοϊκός μεθυλεστέρας**

(2S)-methyl 2-((2S)-1-(2-hydroxyhexadecanoyl)pyrrolidine-2-carboxamido)-3-phenylpropanoate



47γ (μίγμα διαστερεομερών)

Άχρωμο λάδι. Παρελήθη από τη σύζευξη του μεθυλεστέρα του διπεπτιδίου (L)-προλίνη-(L)-φαινυλαλανίνη. Απόδοση 66%.

M.T.: $\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{N}_2\text{O}_5$

M.B.: 530,37

Σύστημα έκλουσης (8): R_f 0,45

$[\alpha]^{20}_D$ -28,5 (c 1,00, CHCl_3)

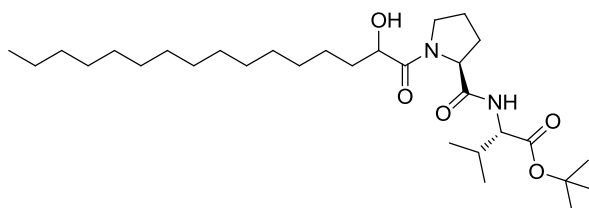
^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): δ 7.39 (d, $J = 8.0$ Hz, $\frac{1}{2}\text{H}$, NH), 7.32-7.06 (m, 5H, αρωματικά), 7.01 (d, $J = 7.4$ Hz, $\frac{1}{2}\text{H}$, NH), 4.93-4.68 (m, 1H, NHCH), 4.64-4.45 (m, 1H, NCH), 4.26-4.02 (m, 1H, CHOH), 3.69 (s, 1.5H, COOCH_3), 3.61 (s, 1.5H, COOCH_3), 3.51-2.86 (m, 5H, OH και NCH_2 και NHCHCHH), 2.40-2.14 (m, 1H, NCH_2CHH), 2.11-1.72 (m, 3H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.63-1.36 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 1.23 (s, 22H, $11\times\text{CH}_2$), 0.86 (t, $J = 6.4$ Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz): δ 174.4, 174.1, 171.5, 171.4, 170.1, 169.9, 135.7, 135.5, 129.0, 128.9, 128.2, 128.0, 126.7, 126.6, 69.2, 68.9, 59.7, 53.1, 52.9, 52.0, 46.4, 46.0, 37.7, 37.5, 34.2, 33.9, 31.6, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 26.8, 26.7, 24.9, 24.7, 24.2, 22.4, 13.8.

MS (ESI) m/z (%): 531.5 (100) $[M + H]^+$.

**(2S)-2-((2S)-1-(2-υδροξυδεκαεξανο)πυρολιδινο-2-καρβαμιδο)-3-μεθυλο
βουτανοϊκός *tert*-βουτυλεστέρας**

(2S)-*tert*-butyl 2-((2S)-1-(2-hydroxyhexadecanoyl)pyrrolidine-2-carboxamido)-3-methylbutanoate



47β (μίγμα διαστερεομερών)

Κίτρινο λάδι. Παρελήθη από τη σύζευξη του *tert*-βουτυλεστέρα του διπεπτιδίου (L)-προλίνη-(L)-βαλίνη. Απόδοση 66%.

M.T.: $C_{30}H_{56}N_2O_5$

M.B.: 524,42

Σύστημα έκλουσης (8): R_f 0,73

$[\alpha]^{20}_D$ -56,8 (c 1,00, $CHCl_3$)

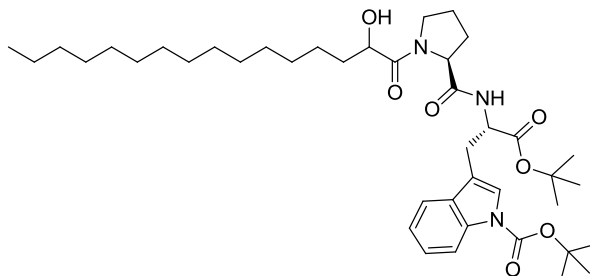
1H NMR ($CDCl_3$, 200 MHz): δ 7.20 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, NH), 4.74-4.51 (m, 1H, NCH), 4.35 (dd, $J_1 = 8.6$ Hz, $J_2 = 4.5$ Hz, 1H, NHCH), 4.28-4.12 (m, 1H, CHOH), 3.71-3.30 (m, 2H, NCH₂), 3.07 (br, 1H, OH), 2.47-2.28 (m, 1H, NCHCH), 2.25-1.72 (m, 6H, NCHCH₂CH₂, CH₂CHOH, CH), 1.45 (s, 9H, 3xCH₃), 1.23 (s, 24H, 12xCH₂), 0.96-0.76 (m, 9H, 3xCH₃).

^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$): δ 174.7, 174.2, 170.3, 81.8, 69.6, 69.2, 60.4, 60.0, 57.7, 57.6, 46.8, 46.5, 34.9, 34.2, 31.9, 31.3, 29.6, 29.5, 29.3, 29.3, 28.0, 26.6, 25.1, 25.1, 22.6, 18.9, 17.5, 14.1.

MS (ESI) m/z (%): 523.30 (100) $[M - H]^-$.

3-((2S)-3-(*tert*-βουτοξυ)-2-((2S)-1-(2-υδροξυδεκαεξανο)πυρολιδο-2-καρβαμιδο)-3-οξοπρολυλ)-1*H*-ινδολ-1-καρβοξυλικός *tert*-βουτυλεστέρας

tert-butyl 3-((2S)-3-(*tert*-butoxy)-2-((2S)-1-(2-hydroxyhexadecanoyl)pyrrolidine-2-carboxamido)-3-oxopropyl)-1*H*-indole-1-carboxylate



47α (μίγμα διαστερεομερών)

Κίτρινο λάδι. Παρελήθφη από τη σύζευξη του *tert*-βουτυλεστέρα του διπεπτιδίου (L)-προλίνη-(L)-τρυπτοφάνη. Απόδοση 68%.

M.T.: C₄₁H₆₅N₃O₇

M.B.: 711,48

Σύστημα έκλουσης (9): R_f 0,67

[α]_D²⁰ -12,9 (c 1,02, CHCl₃)

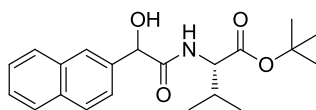
¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 8.09 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, NH), 7.63-7.50 (m, 1H, αρωματικά), 7.47-7.36 (m, 1H, αρωματικά), 7.34-7.09 (m, 3H, αρωματικά), 4.82-4.43 (m, 2H, NHCH και NCH), 4.21-3.95 (m, 1H, CHOH), 3.52-3.01 (m, 5H, NCH₂ και NHCHCH₂ και OH), 2.44-2.23 (m, 1H, NCHCHH), 2.13-1.74 (m, 3H, NCHCHHCH₂), 1.64 (s, 9H, 3xCH₃), 1.38 (s, 9H, 3xCH₃), 1.24 (s, 26H, 13xCH₂), 0.86 (t, *J* = 5.9 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 174.7, 170.4, 170.3, 170.2, 135.9, 130.6, 124.3, 124.2, 124.1, 122.4, 122.3, 119.1, 119.0, 115.1, 83.5, 82.2, 77.2, 76.6, 69.3, 69.0, 60.2, 60.1, 53.1, 46.6, 46.3, 34.1, 34.0, 31.8, 30.8, 29.6, 29.3, 29.0, 28.6, 28.1, 27.8, 27.1, 26.8, 24.9, 22.6, 14.0.

MS (ESI) *m/z* (%): 712.6 (100) [M + H]⁺, 656.6 (35) [M - *t*Bu + H]⁺.

(2S)-2-(2-υδροξυ-2-(ναφθυλο)ακεταμιδο)-3-μεθυλοβουτανοϊκός *tert*-βουτυλεστέρας

(2S)-*tert*-butyl 2-(2-hydroxy-2-(naphthalen-2-yl)acetamido)-3-methylbutanoate



65 (μίγμα διαστερεομερών)

Κίτρινο λάδι. Παρελήθη από τη σύζευξη του *tert*-βουτυλεστέρα της (L)-βαλίνης. Απόδοση 66%.

M.T.: C₂₁H₂₇NO₄

M.B.: 357,19

Σύστημα έκλουσης (5): R_f 0,26

[α]²⁰_D 7,9 (c 1,00, CHCl₃)

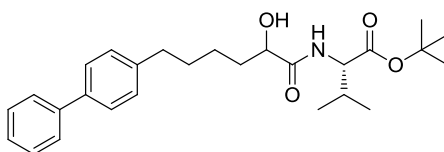
¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 7.88-7.68 (m, 4H, αρωματικά), 7.55-7.38 (m, 3H, αρωματικά), 7.29-6.77 (m, 1H, NH), 5.20 (d, J = 3.0 Hz, 1H, CHOH), 4.47-4.33 (m, 1H, NHCH), 2.20-1.97 (m, 1H, NHCHCH), 1.46-1.33 (m, 9H, 3xCH₃), 0.93-0.66 (m, 6H, 2xCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 172.1, 172.0, 170.7, 170.6, 136.7, 133.1, 133.0, 128.5, 128.3, 128.0, 127.5, 126.2, 126.1, 126.0, 125.9, 124.0, 123.9, 82.1, 74.3, 74.1, 57.3, 57.1, 31.3, 27.8, 18.7, 17.4, (17.2).

MS (ESI) m/z (%): 356.2 (100) [M - H]⁻, 357.1 (25) [M]⁻.

(2S)-2-(6-(διφαινυλ)-2-υδροξυεξαναμιδο)-3-μεθυλοβουτανοϊκός *tert*-βουτυλεστέρας

(2S)-*tert*-butyl 2-(6-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-2-hydroxyhexanamido)-3-methylbutanoate



59β (μίγμα διαστερεομερών)

Άχρωμο λάδι. Παρελήθφη από τη σύζευξη του *tert*-βουτυλεστέρα της (L)-βαλίνης. Απόδοση 68%.

M.T.: C₂₇H₃₇NO₄

M.B.: 439,27

Σύστημα έκλουσης (6): R_f 0,6

[α]²⁰_D 10,8 (c 1,00, CHCl₃)

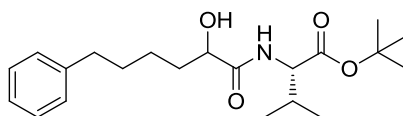
¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 7.64-6.90 (m, 10H, αρωματικά, NH), 4.47 (dd, J₁ = 9.0 Hz, J₂ = 4.6 Hz, 1H, NHCH), 4.25-4.05 (m, 1H, CHOH), 3.72-3.33 (m, 1H, OH), 2.67 (t, J = 7.4 Hz, 2H, CH₂), 2.31-2.08 (m, 1H, NHCHCH), 1.98-1.34 (m, 15H, 3xCH₂ και 3xCH₃), 1.00-0.81 (m, 6H, 2xCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 174.0, 171.3, 170.9, 141.4, 141.0, 138.5, 128.8, 128.6, 126.8, 82.1, 82.0, 72.0, 71.8, 57.0, 56.8, 35.3, 34.6, 31.3, 31.2, 31.1, 27.9, 24.6, 18.9, 18.8, 17.5, 17.4.

MS (ESI) m/z (%): 438.4 (100) [M - H]⁻, 439.3 (28) [M]⁻.

(2S)-2-(2-υδροξυ-6-φαινυλεξαναμιδο)-3-μεθυλοβουτανοϊκος *tert*-βουτυλεστέρας

(2S)-*tert*-butyl 2-(2-hydroxy-6-phenylhexanamido)-3-methylbutanoate



59γ (μίγμα διαστερεομερών)

Άχρωμο λάδι. Παρελήθφη από τη σύζευξη του *tert*-βουτυλεστέρα της (L)-βαλίνης. Απόδοση 92%.

M.T.: C₂₁H₃₃NO₄

M.B.: 363,24

Σύστημα έκλουσης (7): R_f 0,62

[α]²⁰_D 8,38 (c 0,99, CHCl₃)

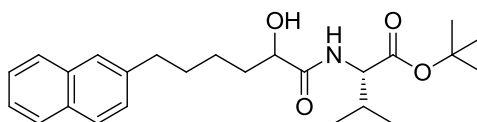
^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): δ 7.33-6.96 (m, 6H, αρωματικά και NH), 4.42 (dd, $J_1 = 9.0$ Hz, $J_2 = 4.6$ Hz, 1H, NHCH), 4.21-4.03 (m, 1H, CHOH), 3.72 (br, 1H, OH), 2.61 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, CH_2), 2.30-2.06 (m, 1H, NHCHCH), 1.96-1.52 (m, 6H, $3 \times \text{CH}_2$), 1.47 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$), 0.97-0.82 (m, 6H, $2 \times \text{CH}_3$).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz): δ 174.1, 174.0, 171.3, 170.8, 142.3, 128.2, 128.1, 125.5, 82.0, 81.9, 71.9, 71.8, 56.9, 56.7, 35.7, 34.5, 31.1, 27.9, 24.6, 18.8, 17.5, 17.4.

MS (ESI) m/z (%): 362.4 (100) $[\text{M} - \text{H}]^-$, 363.4 (23) $[\text{M}]^-$.

(2S)-2-(2-υδροξυ-6-(ναφθυλ)εξαναμιδο)-3-μεθυλοβουτανοϊκός *tert*-βουτυλεστέρας

(2S)-*tert*-butyl 2-(2-hydroxy-6-(naphthalen-2-yl)hexanamido)-3-methylbutanoate



59α (μίγμα διαστερεομερών)

Άχρωμο λάδι. Παρελήθη από τη σύζευξη του *tert*-βουτυλεστέρα της (L)-βαλίνης. Απόδοση 73%.

M.T.: $\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{NO}_4$

M.B.: 413,26

Σύστημα έκλουσης (7): R_f 0,7

$[\alpha]^{20}_D$ 10,1 (c 1,00, CHCl_3)

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): δ 7.86-7.68 (m, 3H, αρωματικά), 7.63-7.54 (m, 1H, αρωματικά), 7.51-7.24 (m, 3H, αρωματικά), 7.08 (d, $J = 8.8$ Hz, $\frac{1}{2}\text{H}$, NH), 6.91 (d, $J = 8.8$ Hz, $\frac{1}{2}\text{H}$, NH), 4.51-4.39 (m, 1H, NHCH), 4.21-4.06 (m, 1H, CHOH), 3.02 (br, 1H, OH), 2.78 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, CH_2), 2.27-2.06 (m, 1H, NHCHCH), 2.01-1.64 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 1.62-1.40 (m, 11H, CH_2 και $3 \times \text{CH}_3$), 0.98-0.80 (m, 6H, $2 \times \text{CH}_3$).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz): δ 173.9, 173.8, 171.3, 170.9, 139.8, 133.5, 131.8, 127.7, 127.5, 127.3, 127.2, 126.2, 125.7, 124.9, 82.1, 82.0, 72.0, 71.8, 57.0, 56.8, 35.8, 35.8, 34.7, 34.6, 31.3, 31.2, 31.0, 31.0, 27.9, 24.6, 18.9, 18.8, 17.5, 17.3.

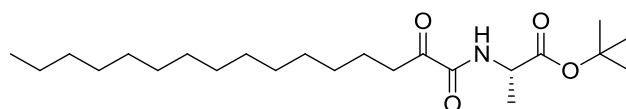
MS (ESI) m/z (%): 412.2 (100) $[\text{M} - \text{H}]^-$, 413.3 (20) $[\text{M}]^-$.

10.2.2 Γενική μέθοδος οξείδωσης υδροξυαμιδίων σε οξοαμίδια

Σε αναδεύόμενο διάλυμα 2-υδροξυαμιδίου (1,0 mmol) σε ξηρό CH_2Cl_2 (20 mL), προστίθεται αντιδραστήριο Dess-Martin (0,64 g, 1,5 mmol) και το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (μία έως τρεις ώρες), ο οργανικός διαλύτης συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα της αντίδρασης διαλύεται σε Et_2O (45 mL). Ακολουθεί προσθήκη κορεσμένου υδατικού διαλύματος NaHCO_3 (20 mL) το οποίο περιέχει $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (9,5 mmol διαλυμένο σε 15 mL νερό) και οι δύο στιβάδες αναδεύονται μέχρι η οργανική στιβάδα να γίνει διαυγής. Στη συνέχεια μεταφέρονται σε διαχωριστική χοάνη και διαχωρίζονται. Η οργανική στιβάδα εκπλένεται με νερό (20 mL), ξηραίνεται με Na_2SO_4 , ο οργανικός διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση και το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης.

(S)-2-(2-οξοδεκαεξαναμιδο)προπανοϊκός *tert*-βουτυλεστέρας

(S)-*tert*-butyl 2-(2-oxohexadecanamido)propanoate



37γ

Λευκό στερεό. Απόδοση 95%.

M.T.: $\text{C}_{23}\text{H}_{43}\text{NO}_4$

M.B.: 397,32

Σύστημα έκλουσης (1): R_f 0,87

$[\alpha]^{20}_D$ 5,0 (*c* 1,02, CHCl₃)

Σ.Τ.: 35-36 °C

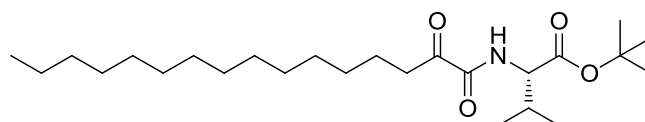
¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 7.44 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, NH), 4.52-4.33 (m, 1H, NHCH), 2.90 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂CO), 1.76-1.38 (m, 14H, 4xCH₃ CH₂CH₂CO), 1.38-1.17 (m, 22H, 11xCH₂), 0.86 (t, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 198.5, 171.1, 159.4, 82.4, 48.3, 36.6, 31.9, 29.6, 29.0, 27.9, 23.1, 22.6, 18.2, 14.1.

MS (ESI) *m/z* (%): 359.3 (100) [M - *t*Bu + H]⁺, 398.4 (40) [M + H]⁺, 415.3 (100) [M + NH₃]⁺.

(S)-3-μεθυλ-2-(2-οξοδεκαεξαναμιδο)βουτανοϊκός *tert*-βουτυλεστέρας

(*S*)-*tert*-butyl 3-methyl-2-(2-oxohexadecanamido)butanoate



37α

Κίτρινο λάδι. Απόδοση 92%.

M.T.: C₂₅H₄₇NO₄

M.B.: 425,35

Σύστημα έκλουσης (8): R_f 0,87

$[\alpha]^{20}_D$ 12,7 (*c* 1,00, CHCl₃)

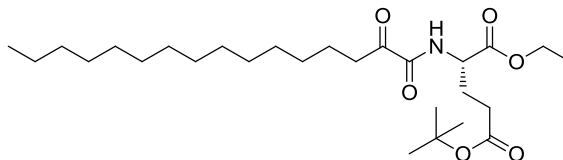
¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 7.40 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, NH), 4.40 (dd, *J*₁ = 9.2 Hz, *J*₂ = 4.4 Hz, 1H, NHCH), 2.91 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂COCO), 2.33-2.10 (m, 1H, NHCHCH), 1.71-1.53 (m, 2H, CH₂CH₂CO), 1.48 (s, 9H, 3xCH₃) 1.40-1.16 (m, 22H, 11xCH₂), 1.01-0.81 (m, 9H, 3xCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 198.2, 169.6, 159.5, 81.9, 57.1, 36.4, 31.5, 31.1, 29.2, 29.0, 28.7, 27.6, 22.8, 22.3, 18.6, 17.1, 13.7.

MS (ESI) *m/z* (%): 387.2 (100) [M - *t*Bu + H]⁺, 443.3 (40) [M + NH₃]⁺.

(S)-1-αιθυλ-2-(2-οξοδεκαεξαναμιδο)πεντανο-δι-ϊκος 5- tert-βουτυλεστέρας

(S)-5-*tert*-butyl 1-ethyl 2-(2-oxohexadecanamido)pentanedioate



42

Άχρωμο λάδι. Απόδοση 85%.

M.T.: C₂₇H₄₉NO₆

M.B.: 483,36

Σύστημα έκλουσης (2): R_f 0,84

[α]²⁰_D 11,6 (c 1,00, CHCl₃)

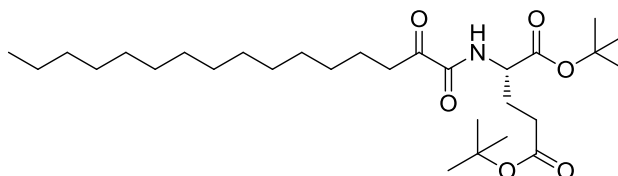
¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 7.52 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, NH), 4.60-4.49 (m, 1H, NHCH), 4.21 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H, COOCH₂), 2.89 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂COCO), 2.41-2.17 (m, 3H, CH₂CHH), 2.08-1.92 (m, 1H, CHH), 1.66-1.52 (m, 2H, CH₂CH₂CO), 1.43 (s, 9H, 3xCH₃), 1.37-1.17 (m, 25H, 11xCH₂ και CH₃), 0.85 (t, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 198.2, 171.6, 170.8, 159.9, 80.9, 61.7, 51.7, 36.7, 31.8, 31.2, 29.6, 29.4, 29.3, 29.0, 28.0, 27.2, 23.0, 22.6, 14.0.

MS (ESI) *m/z* (%): 484.4 (35) [M + H]⁺, 428.2 (100) [M - *t*Bu + H]⁺.

(S)-2-(2-οξοδεκαεξαναμιδο)-πεντανο-δι-ϊκός 1,5-δι-tert-βουτυλεστέρας

(S)-di-*tert*-butyl 2-(2-oxohexadecanamido)pentanedioate



37β

182

Κίτρινο λάδι. Απόδοση 84%.

M.T.: C₂₉H₅₃NO₆

M.B.: 511,39

Σύστημα έκλουσης (2): R_f 0,82

[α]_D²⁰ 9,18 (c 1,02, CHCl₃)

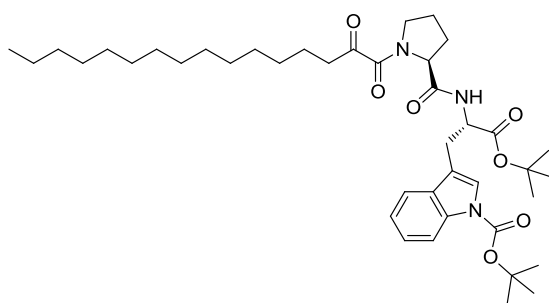
¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 7.47 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, NH), 4.49-4.37 (m, 1H, NHCH), 2.88 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂COCO), 2.38-2.08 (m, 3H, CH₂CHH), 2.05-1.87 (m, 1H, CHH), 1.66-1.51 (m, 2H, CH₂CH₂CO), 1.46 (s, 9H, 3xCH₃), 1.42 (s, 9H, 3xCH₃), 1.35-1.16 (m, 22H, 11xCH₂), 0.86 (t, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 198.3, 171.7, 170.0, 159.8, 82.7, 80.8, 52.1, 36.7, 31.8, 31.3, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 29.0, 28.0, 27.9, 27.4, 23.0, 22.6, 14.0.

MS (ESI) *m/z* (%): 512.5 (35) [M + H]⁺, 529.5 (100) [M + NH₄]⁺.

3-((S)-3-(*tert*-βουτυλ)-3-οξο-2-((S)-1-(2-οξοδεκαεξανούλο)πυρρολιδο-2-καρβοξαμιδο)προπυλ)-1*H*-ινδολο-1-καρβοξυλικός *tert*-βουτυλεστέρας

tert-butyl 3-((S)-3-(*tert*-butoxy)-3-oxo-2-((S)-1-(2-oxohexadecanoyl)pyrrolidine-2-carboxamido)propyl)-1*H*-indole-1-carboxylate



48α

Κίτρινο λάδι. Απόδοση 80%.

M.T.: C₄₁H₆₃N₃O₇

M.B.: 709,47

Σύστημα έκλουσης (3): R_f 0,72

[α]²⁰_D -15,7° (c 1,00, CHCl₃)

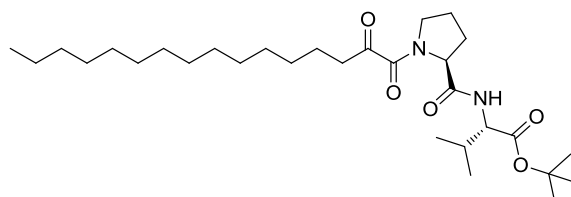
¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 8.26-8.03 (m, 1H, NH), 7.76-7.02 (m, 5H, αρωματικά), 5.00-4.61 (m, 1H, NHCH), 4.62-4.43 (m, 1H, NCH), 3.87-3.51 (m, 2H, NHCHCH₂), 3.41-3.11 (m, 2H, NCH₂), 3.08-2.41 (m, 2H, CH₂CO), 2.37-1.08 (m, 46H), 1.00-0.71 (m, 3H, CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 200.0, 171.0, 169.9, 163.7, 149.4, 124.5, 124.3, 124.1, 122.6, 122.4, 119.2, 119.1, 115.2, 115.1, 83.4, 82.4, 60.5, 53.2, 48.0, 39.1, 31.9, 29.6, 29.3, 28.1, 27.9, 25.1, 22.6, 14.1.

MS (ESI) m/z (%): 1437.84 (100) [2M + NH₄ + H]⁺, 727.51 (55) [M + NH₄]⁺.

(S)-3-μεθυλ-2-((S)-1-(2-οξοδεκαεξανούλ)πυρρολιδο-2-καρβοξαμιδο)βουτανοϊκός *tert*-βουτυλεστέρας

(S)-*tert*-butyl 3-methyl-2-((S)-1-(2-oxohexadecanoyl)pyrrolidine-2-carboxamido)butanoate



48β

Κίτρινο λάδι. Απόδοση 80%.

M.T.: C₃₀H₅₄N₂O₅

M.B.: 522,40

Σύστημα έκλουσης (10): R_f 0,92

[α]²⁰_D -55,6 (c 1,00, CHCl₃)

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 6.99 (d, J = 8.4 Hz, ½H, NH), 6.11 (d, J = 8.4 Hz, ½H, NH), 4.90-4.54 (m, 1H, NCH), 4.46-4.26 (m, 1H, NHCH), 3.85-3.49 (m, 2H, NCH₂), 3.12-2.60 (m, 2H, CH₂CO), 2.49-1.74 (m, 5H, NHCHCH και

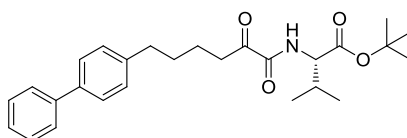
NCHCH₂CH₂), 1.69-1.40 (m, 9H, 3xCH₃), 1.24 (s, 24H, 12xCH₂), 0.92-0.76 (m, 9H, 3xCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 200.3, 171.2, 170.7, 170.0, 82.2, 81.8, 60.9, 60.4, 57.6, 57.4, 47.9, 47.5, 39.3, 38.6, 32.2, 31.9, 31.1, 29.6, 29.4, 29.3, 29.1, 28.0, 27.1, 25.2, 22.9, 22.8, 22.7, 22.2, 18.9, 18.8, 17.4, 17.4, 14.1.

MS (ESI) m/z (%): 467.5 (100) [M - tBu + H]⁺, 523.4 (20) [M + H]⁺.

2(S)-(2-οξο-6-διφαινυλεξαναμιδο)-3-μεθυλοβουτανοϊκός *tert*-βουτυλεστέρας

(*S*)-*tert*-butyl 2-(6-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-2-oxohexanamido)-3-methylbutanoate



60β

Κίτρινο λάδι. Απόδοση 82%.

M.T.: C₂₇H₃₅NO₄

M.B.: 437,57

Σύστημα έκλουσης (5)

[α]_D²⁰ 12,2 (c 1,00, CHCl₃)

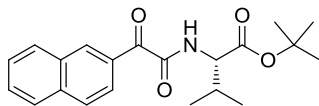
¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 7.75-7.16 (m, 10H, αρωματικά, NH), 4.48-4.29 (m, 1H, NHCH), 3.11-2.87 (m, 2H, CH₂), 2.80-2.55 (m, 2H, CH₂CO), 2.34-2.09 (m, 1H, NHCHCH), 1.85-1.60 (m, 4H, 2xCH₂), 1.48 (s, 9H, 3xCH₃) 1.04-0.82 (m, 6H, 2xCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 198.3, 169.9, 159.8, 141.1, 141.0, 138.6, 128.7, 128.6, 127.0, 126.9, 82.3, 57.4, 36.5, 35.1, 31.4, 30.7, 27.9, 22.7, 18.9, 17.4.

MS (ESI) m/z (%): 436.4 (100) [M - H]⁻.

3-μεθυλο-2(S)-(2-(ναφθυλ)-2-οξοακεταμιδο)βουτανοϊκος *tert*-βουτυλεστέρας

(S)-*tert*-butyl 3-methyl-2-(2-(naphthalen-2-yl)-2-oxoacetamido)butanoate



66

Κίτρινο λάδι. Απόδοση 95%.

M.T.: C₂₁H₂₅NO₄

M.B.: 355,18

Σύστημα έκλουσης (5)

[α]²⁰_D 7,03 (c 1,01, CHCl₃)

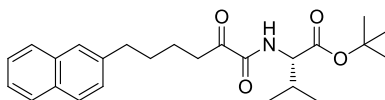
¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 9.21-8.96 (m, 1H, αρωματικά), 8.23-7.05 (m, 7H, αρωματικά και NH), 4.55 (dd, *J*₁ = 9.2 Hz, *J*₂ = 4.6 Hz, 1H, NHCH), 2.43-2.08 (m, 1H, NHCHCH), 1.50 (s, 9H, 3xCH₃), 1.09-0.79 (m, 6H, 2xCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 186.6, 170.0, 161.6, 136.0, 134.8, 134.7, 132.2, 130.4, 130.2, 129.2, 128.2, 127.6, 126.7, 125.1, 82.3, 57.6, 31.5, 27.9, 19.0, 18.9, 17.6.

MS (ESI) m/z (%): 354.1 (100) [M - H]⁻, 355.2 (34) [M]⁻.

3-μεθυλο-2-(2-οξο-6-ναφθυλεξαναμιδο)βουτανοϊκός *tert*-βουτυλεστέρας

(S)-*tert*-butyl 3-methyl-2-(6-(naphthalen-2-yl)-2-oxohexanamido)butanoate



60α

Άχρωμο λάδι. Απόδοση 91%.

M.T.: C₂₅H₃₃NO₄

M.B.: 411,53

Σύστημα έκλουσης (1): R_f 0,66

$[\alpha]_D^{20}$ 11,1 (c 1,00, CHCl_3)

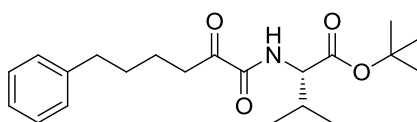
^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): δ 7.86-7.68 (m, 3H, αρωματικά), 7.65-7.53 (m, 1H, αρωματικά), 7.52-7.18 (m, 4H, αρωματικά και NH), 4.39 (dd, $J_1 = 9.2$ Hz, $J_2 = 4.6$ Hz, 1H, NHCH), 2.99 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2), 2.80 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH_2CO), 2.32-2.08 (m, 1H, NHCHCH), 1.86-1.58 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 1.48 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$), 1.00-0.82 (m, 6H, $2 \times \text{CH}_3$).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz): δ 198.3, 169.9, 159.8, 139.4, 133.5, 131.8, 127.8, 127.5, 127.3, 127.2, 126.3, 125.8, 125.0, 82.3, 57.4, 36.5, 35.6, 31.4, 30.6, 27.9, 22.7, 18.9, 17.4.

MS (ESI) m/z (%): 356.2 (100) $[\text{M} - t\text{Bu} + \text{H}]^+$, 412.2 (62) $[\text{M} + \text{H}]^+$, 429.4 (92) $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$, 434.1 (75) $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

2(S)-(2-οξο-6-φαινυλεξαναμιδο)-3-μεθυλοβουτανοϊκος *tert*-βουτυλεστέρας

(*S*)-*tert*-butyl 3-methyl-2-(2-oxo-6-phenylhexanamido)butanoate



60γ

Άχρωμο λάδι. Απόδοση 74%.

M.T.: $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{NO}_4$

M.B.: 361,23

Σύστημα έκλουσης (1): R_f 0,57

$[\alpha]_D^{20}$ 11,3 (c 1,00, CHCl_3)

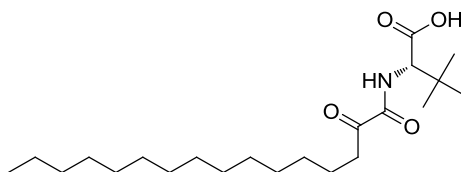
^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): δ 7.50-6.94 (m, 6H, αρωματικά και NH), 4.36 (dd, $J_1 = 9.2$ Hz, $J_2 = 4.6$ Hz, 1H, NHCH), 2.93 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, CH_2), 2.62 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, CH_2CO), 2.31-2.06 (m, 1H, NHCHCH), 1.73-1.55 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 1.46 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$), 1.00-0.74 (m, 6H, $2 \times \text{CH}_3$).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz): δ 197.9, 169.7, 159.8, 142.0, 128.3, 125.6, 82.3, 57.1, 36.5, 35.5, 31.4, 30.7, 27.9, 22.6, 18.9, 17.4.

MS (ESI) m/z (%): 360.4 (100) $[\text{M} - \text{H}]^-$, 361.4 (20) $[\text{M}]^-$.

(S)-3,3-διμεθυλ-2-(2-οξοδεκαεξαναμιδο)βουτανοϊκό οξύ

(S)-3,3-dimethyl-2-(2-oxohexadecanamido)butanoic acid



34γ

Άχρωμο λάδι. Απόδοση 62%.

M.T.: $\text{C}_{22}\text{H}_{41}\text{NO}_4$

M.B.: 383,57

Σύστημα έκλουσης (10): R_f 0,35

$[\alpha]^{20}_D$ 1,8 (c 1,00, CHCl_3)

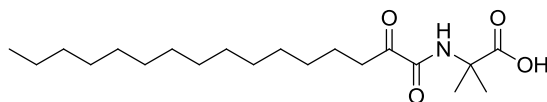
^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): δ 7.50 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, NH), 4.31 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, NHCH), 2.91 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, CH_2CO), 1.74-1.49 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.43-1.18 (m, 22H, $11 \times \text{CH}_2$), 1.01 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$), 0.88 (t, $J = 6.4$ Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz): δ 198.5, 175.7, 159.8, 60.8, 36.8, 34.7, 31.9, 29.6, 29.4, 29.3, 29.0, 26.5, 23.0, 22.6, 14.1.

HRMS (ESI) υπολογισμός για $\text{C}_{22}\text{H}_{41}\text{NNaO}_4$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 406.2928. Βρέθηκε: 406.2945.

2-μεθυλ-2-(2-οξοδεκαεξαναμιδο)προπανοϊκό οξύ

2-methyl-2-(2-oxohexadecanamido)propanoic acid



34δ

Άχρωμο λάδι. Απόδοση 95%.

M.T.: C₂₀H₃₇NO₄

M.B.: 355,51

Σύστημα έκλουσης (10): R_f 0,41

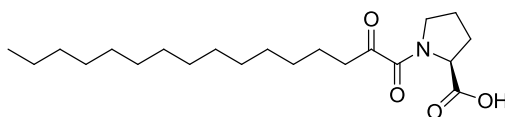
¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 7.77 (br s, 1H, COOH), 2.88 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂CO), 1.66-1.40 (m, 8H, 2xCH₃ και CH₂CH₂CO), 1.39-1.15 (m, 22H, 11xCH₂), 0.88 (t, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 199.0, 198.8, 180.6, 160.0, 57.2, 57.2, 36.4, 31.9, 29.6, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.1, 24.2, 23.0, 22.6, 14.1.

HRMS (ESI) υπολογίστηκε για C₂₀H₃₇NNaO₄ [M + Na]⁺: 378.2615. Βρέθηκε: 378.2627.

(S)-1-(2-οξοδεκαεξανούλ)πυρρολιδο-2-καρβοξυλικό οξύ

(S)-1-(2-oxohexadecanoyl)pyrrolidine-2-carboxylic acid



34β (στροφομερή)

Άχρωμο λάδι. Απόδοση 80%.

M.T.: C₂₁H₃₇NO₄

M.B.: 367,52

Σύστημα έκλουσης (11): R_f 0,68

$[\alpha]^{20}_D - 3,2$ (c 1,01, CHCl_3)

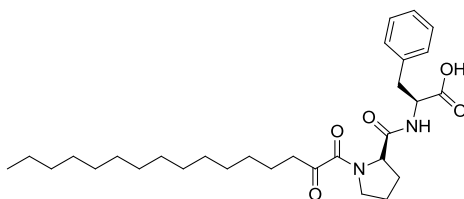
^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): δ 7.40 (br, 1H, COOH), 4.86-4.31 (m, 1H, NCH), 3.95-3.41 (m, 2H, NCH_2), 3.06-2.60 (m, 2H, CH_2CO), 2.46-1.12 (m, 28H, $\text{NCHCH}_2\text{CH}_2$ και $12 \times \text{CH}_2$), 0.88 (t, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz): δ 200.0, 177.4, 163.0, 61.3, 48.3, 47.4, 39.1, 38.5, 31.9, 29.7, 29.5, 29.3, 29.1, 25.1, 23.1, 22.7, 22.6, 14.0.

HRMS (ESI) υπολογίστηκε για $\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{NO}_4$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 368.2795. Βρέθηκε: 368,2794.

(S, S)-2-(1-(2-οξοδεκαεξανούλ)πυρρολιδο-2-καρβοξαμιδο)-3-φαινυλοπροπανοϊκό οξύ

(S)-2-((S)-1-(2-oxohexadecanoyl)pyrrolidine-2-carboxamido)-3-phenylpropanoic acid



51γ

Κίτρινο στερεό. Απόδοση 93%.

M.T.: $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_5$

M.B: 514,70

Σύστημα έκλουσης (10): R_f 0,39

$[\alpha]^{20}_D -36,7$ (c 1,00, CHCl_3)

Σ.Τ.: 77-80 °C

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): δ 8.03-7.37 (m, 1H, NH), 7.46-6.86 (m, 5H, αρωματικά), 5.67 (br, 1H), 4.86-4.39 (m, 2H, NHCH και NCH), 3.82-2.50 (m, 6H, NCH_2 και NHCHCH_2), 2.22-1.37 (m, 4H, $\text{NCHCH}_2\text{CH}_2$), 1.22 (s, 26H, $13 \times \text{CH}_2$), 1.01-0.72 (m, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz): δ 199.9, 177.2, 175.8, 175.7, 171.4, 170.4, 163.9, 141.7, 129.4, 129.3, 128.6, 128.4, 127.0, 61.0, 60.3, 53.3, 52.9, 48.0, 47.5, 39.3, 38.6, 37.4, 31.9, 29.6, 29.4, 29.3, 29.0, 27.0, 25.0, 22.6, 20.8, 14.1.

HRMS (ESI) υπολογίστηκε για $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{NaO}_5$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 537.3299. Βρέθηκε: 537.3302

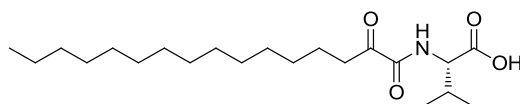
10.2.3 Γενική μέθοδος αποπροστασίας της καρβοξυλικής ομάδας

tert-βουτυλεστέρες

Σε σφαιρική φιάλη προστίθεται ο *tert*-βουτυλεστέρας (1,0 mmol) και στη συνέχεια διάλυμα 50% TFA σε ξηρό CH_2Cl_2 (0,5 M). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για τρεις ώρες. Στη συνέχεια προστίθεται CH_2Cl_2 (5 mL) και ακολουθεί συμπύκνωση υπό ελαττωμένη πίεση. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρι να απομακρυνθεί το TFA και το προϊόν καθαρίζεται με καταβύθιση.

(S)-3-μεθυλ-2-(2-οξοδεκαεξαναμιδο)βουτανοϊκό οξύ

(S)-3-methyl-2-(2-oxohexadecanamido)butanoic acid



38α

Λευκό στερεό. Απόδοση 72%.

M.T.: $\text{C}_{21}\text{H}_{39}\text{NO}_4$

M.B: 369,54

R_f (10): 0,5

$[\alpha]^{20}_D$ 5,04 (c 1,03, CHCl_3)

Σ.T.: 55-58 °C

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): δ 7.43 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, NH), 4.59-4.35 (m, 1H, NHCH), 2.91 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, CH_2CO), 2.42-2.16 (m, 1H, NHCHCH), 1.74-

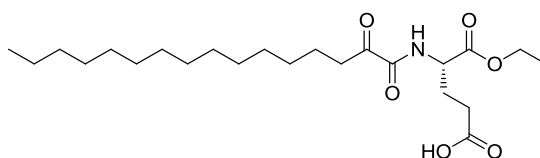
1.50 (m, 2H, CH₂CH₂CO), 1.47-1.15 (m, 22H, 11xCH₂), 1.08-0.79 (m, 9H, 3xCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 198.4, 175.9, 160.1, 57.4, 36.8, 31.9, 31.0, 29.6, 29.4, 29.3, 29.0, 23.1, 22.6, 19.0, 17.5, 14.0.

HRMS (ESI) υπολογίστηκε για C₂₁H₄₀NO₄ [M + H]⁺: 370.2952. Βρέθηκε: 370.2938.

(S)-5-αιθοξυ-5-οξο-4-(2-οξοδεκαεξαναμιδο)πεντανοϊκό οξύ

(S)-5-ethoxy-5-oxo-4-(2-oxohexadecanamido)pentanoic acid



43

Λευκό στερεό. Απόδοση 93%.

M.T.: C₂₃H₄₁NO₆

M.B: 427,57

R_f (11): 0,56

[α]²⁰_D 13,4 (c 1,03, CHCl₃)

Σ.T.: 64-66 °C

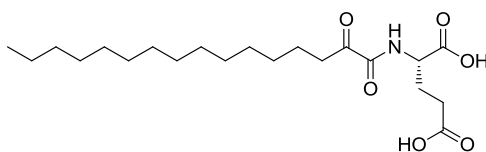
¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 9.75 (br, 1H, COOH), 7.57 (d, J = 8.2 Hz, 1H, NH), 4.67-4.49 (m, 1H, NHCH), 4.22 (q, J = 7.0 Hz, 2H, COOCH₂), 2.89 (t, J = 7.2 Hz, 2H, CH₂CO), 2.36-1.94 (m, 2H, NHCHCH₂CH₂), 1.70-1.48 (m, 2H, NHCHCH₂), 1.46-1.08 (m, 24H, 12xCH₂), 0.87 (t, J = 6.8 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 198.1, 177.8, 170.7, 160.0, 61.9, 51.5, 36.7, 31.8, 29.9, 29.6, 29.3, 29.2, 29.0, 26.9, 23.0, 22.6, 14.0.

HRMS (ESI) υπολογίστηκε για C₂₃H₄₁NNaO₆ [M + Na]⁺: 450.2826. Βρέθηκε: 450.2826.

(S)-2-(2-οξοδεκαναμιδο)πεντανο-δι-ϊκό οξύ

(S)-2-(2-oxohexadecanamido)pentanedioic acid



38δ

Λευκό στερεό. Απόδοση 90%.

M.T.: C₂₁H₃₇NO₆

M.B: 399,52

R_f (11): 0,29

[α]²⁰_D 30,5 (c 1,02, CHCl₃)

Σ.T.: 100-103 °C

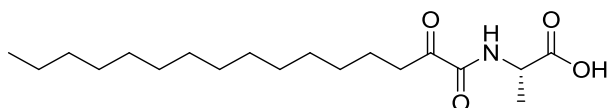
¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 9.67 (br, 1H, COOH), 7.63 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, NH), 4.72-4.56 (m, 1H, NHCH), 2.91 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂CO), 2.64-2.43 (m, 2H, NHCHCH₂CH₂), 2.38-2.20 (m, 2H, NHCHCH₂), 1.72-1.51 (m, 2H, CH₂CH₂CO), 1.44-1.18 (m, 22H, 11xCH₂), 0.88 (t, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 198.1, 178.5, 176.2, 159.8, 51.2, 36.7, 31.9, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.0, 23.0, 22.6, 14.1.

HRMS (ESI) υπολογίστηκε για C₂₁H₃₇NNaO₆ [M + Na]⁺: 422.2513. Βρέθηκε: 422.2513.

(S)-2-(2-οξοδεκαεξαναμιδο)προπανοϊκό οξύ

(S)-2-(2-oxohexadecanamido)propanoic acid



38γ

Λευκό στερεό. Απόδοση 90%.

M.T.: C₁₉H₃₅NO₄

M.B: 341,49

R_f (11): 0,41

[α]²⁰_D 5,8 (c 1,03, CHCl₃)

Σ.Τ.: 98-101 °C

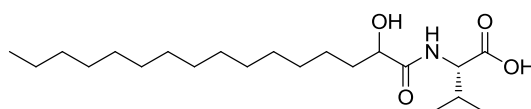
¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 8.92 (br, 1H, COOH), 7.43 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, NH), 4.69-4.50 (m, 1H, NHCH), 2.91 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂CO), 1.70-1.48 (m, 5H, CH₂CH₂CO και CH₃), 1.44-1.19 (s, 22H, 11xCH₂), 0.88 (t, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 198.3, 176.8, 159.6, 47.8, 36.7, 31.9, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.0, 23.0, 22.6, 17.7, 14.1.

HRMS (ESI) υπολογίστηκε για C₁₉H₃₆NO₄ [M + H]⁺: 342.2639. Βρέθηκε: 342.2650.

(2S)-2-(2-υδροξυδεκαεξαναμιδο)-3-μεθυλοβουτανοϊκό οξύ

(2S)-2-(2-hydroxyhexadecanamido)-3-methylbutanoic acid



39 (μίγμα διαστερεομερών)

Λευκό στερεό. Απόδοση 93%.

M.T.: C₂₁H₄₁NO₄

M.B: 371,55

R_f (10): 0,35

[α]²⁰_D 17,1 (c 1,00, MeOH)

Σ.Τ.: 95-99 °C

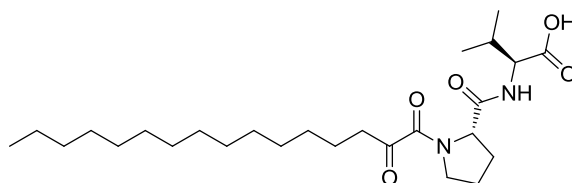
^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): δ 7.01 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, NH), 4.57-4.42 (m, 1H, NHCH), 4.24-4.10 (m, 1H, CHOH), 3.68 (br, 1H, OH), 2.39-2.15 (m, 1H, NHCHCH), 1.95-1.53 (m, 2H, CH_2CHOH), 1.51-1.12 (s, 24H, $12 \times \text{CH}_2$), 1.10-0.76 (m, 9H, $3 \times \text{CH}_3$).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz): δ 176.2, 175.3, 174.4, 72.2, 57.0, 56.7, 34.5, 34.4, 31.8, 30.6, 30.5, 29.6, 29.3, 25.0, 22.6, 19.0, 17.4, 14.1.

HRMS (ESI) υπολογίστηκε για $\text{C}_{21}\text{H}_{41}\text{NNaO}_4$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 394.2928. Βρέθηκε: 394.2947.

(S)-3-μεθυλ-2-((S)-1-(2-οξοδεκαεξανοϋλ)πυρρολιδινο-2-καρβοξαμιδο)βουτανοϊκό οξύ

(S)-3-methyl-2-((S)-1-(2-oxohexadecanoyl)pyrrolidine-2-carboxamido)butanoic acid



51 β

Λευκό στερεό. Απόδοση 90%.

M.T.: $\text{C}_{26}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_5$

M.B: 466,34

R_f (10): 0,37

$[\alpha]^{20}_D$ -62,4 (c 1,00, CHCl_3)

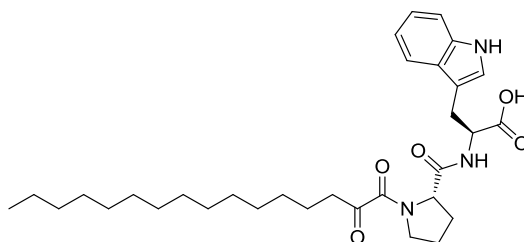
^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): δ 8.16 (br, 1H, COOH), 6.33 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, NH), 4.83-4.46 (m, 2H, NHCH και NCH), 3.81-3.51 (m, 2H, NCH_2), 3.09-2.55 (m, 2H, CH_2CO), 2.41-1.78 (m, 5H, NHCHCH και $\text{NCHCH}_2\text{CH}_2$), 1.70-1.37 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.23 (s, 22H, $11 \times \text{CH}_2$), 1.03-0.75 (m, 9H, $3 \times \text{CH}_3$).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz): δ 200.3, 175.6, 171.0, 164.4, 60.7, 57.6, 48.4, 39.6, 32.1, 31.1, 29.9, 29.6, 27.4, 25.5, 22.9, 19.3, 17.7, 14.3.

HRMS (ESI) υπολογίστηκε για $C_{26}H_{46}N_2NaO_5$ $[M + Na]^+$: 489.3299. Βρέθηκε: 489.3303.

(S)-3-(1*H*-ινδολο-3-ϋλ)-2-((S)-1-(2-οξοδεκαεξανοϋλο)πυρρολιдино-2-καρβοξαμιδο)προπανοϊκο οξύ

(S)-3-(1*H*-indol-3-yl)-2-((S)-1-(2-oxohexadecanoyl)pyrrolidine-2-carboxamido)propanoic acid



51α

Κίτρινο λάδι. Απόδοση 90%.

M.T.: $C_{32}H_{47}N_3O_5$

M.B: 553,73

R_f (10): 0,35 (5 σταγόνες CH_3COOH)

$[\alpha]^{20}_D$ -12,6 (c 1,00, $CHCl_3$)

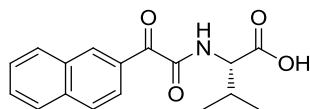
1H NMR ($CDCl_3$, 200 MHz): δ 8.49-8.03 (m, 1H, NH), 7.80-6.91 (m, 5H, αρωματικά), 5.03-4.42 (m, 2H, NHCH και NCH), 3.79-2.42 (m, 4H, NCH_2 και $NHCHCH_2$), 2.36-1.03 (m, 30H, $NCHCH_2CH_2$ και $13 \times CH_2$), 0.87 (t, $J = 6.3$ Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 50 MHz): δ 200.3, 170.8, 169.9, 163.9, 135.9, 127.6, 123.1, 122.0, 119.4, 118.8, 111.1, 110.1, 82.4, 82.1, 60.9, 60.4, 53.6, 53.2, 48.0, 47.4, 39.2, 38.6, 32.0, 31.9, 29.6, 29.5, 29.3, 29.0, 27.9, 25.0, 22.7, 22.1, 14.1.

HRMS (ESI) υπολογίστηκε για $C_{32}H_{47}N_3NaO_5$ $[M + Na]^+$: 576.3408. Βρέθηκε: 576.3415.

(S)-3-μεθυλο-2-(2-ναφθυλ-2-οξοακεταμιδο)βουτανοϊκό οξύ

(S)-3-methyl-2-(2-(naphthalen-2-yl)-2-oxoacetamido)butanoic acid



67

Κίτρινο στερεό. Απόδοση 80%.

M.T.: C₁₇H₁₇NO₄

M.B: 299,32

R_f (11): 0,36

[α]²⁰_D -25,3 (c 1,03, CHCl₃)

Σ.Τ.: 122-124 °C

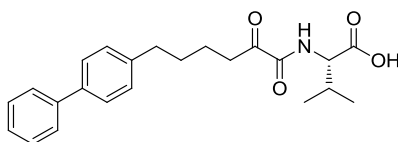
¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 9.58 (br, 1H, COOH), 9.15 (s, 1H, αρωματικά), 8.17 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, NH), 8.00 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, αρωματικά), 7.94-7.76 (m, 2H, αρωματικά), 7.75-7.44 (m, 3H, αρωματικά), 4.71 (dd, *J*₁ = 9.0 Hz, *J*₂ = 4.6 Hz, 1H, NHCH), 2.54-2.26 (m, 1H, NHCHCH), 1.18-0.95 (m, 6H, 2xCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 186.4, 176.4, 161.9, 136.0, 135.0, 132.2, 130.3, 130.2, 129.4, 128.4, 127.6, 126.8, 125.0, 57.1, 31.1, 19.1, 17.5.

HRMS (ESI) υπολογίστηκε για C₁₇H₁₈NO₄ [M + H]⁺: 300.1230. Βρέθηκε: 300.1216.

(S)-2-(2-οξο-6-διφαινυλο-δεκαεξαναμιδο)-3-μεθυλοβουτανοϊκό οξύ

(S)-2-(6-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-2-oxohexanamido)-3-methylbutanoic acid



61β

Λευκό στερεό. Απόδοση 92%.

197

M.T.: C₂₃H₂₇NO₄

M.B: 381,19

R_f (10): 0,44

[α]²⁰_D -6,1 (c 1,00, CHCl₃)

Σ.T.: 123-124 °C

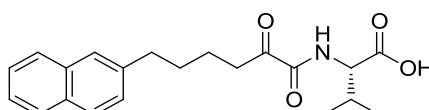
¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 7.70-7.08 (m, 10H, αρωματικά και NH), 4.56-4.26 (m, 1H, NHCH), 3.12-2.80 (m, 2H, CH₂), 2.76-2.46 (m, 2H, CH₂CO), 2.39-2.08 (m, 1H, NHCHCH), 1.83-1.44 (m, 4H, 2xCH₂), 1.10-0.68 (m, 6H, 2xCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 198.1, 176.2, 160.1, 141.0, 140.9, 138.6, 128.7, 128.6, 127.0, 126.9, 57.5, 36.6, 35.2, 30.7, 27.3, 22.6, 19.1, 17.5.

HRMS (ESI) υπολογίστηκε για C₂₃H₂₈NO₄ [M + H]⁺: 382.2013. Βρέθηκε: 382.1995.

(S)-3-μεθυλο-2-(2-οξο-6-ναφθυλ-εξαναμιδο)βουτανοϊκό οξύ

(S)-3-methyl-2-(6-(naphthalen-2-yl)-2-oxohexanamido)butanoic acid



61α

Άχρωμο στερεό. Απόδοση 83%.

M.T.: C₂₁H₂₅NO₄

M.B: 355,43

R_f (11): 0,32

[α]²⁰_D -2,8 (c 0,50, CHCl₃)

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 7.85-7.69 (m, 3H, αρωματικά), 7.64-7.58 (m, 1H, αρωματικά), 7.51-7.28 (m, 4H, αρωματικά και NH), 5.94 (br, 1H, COOH),

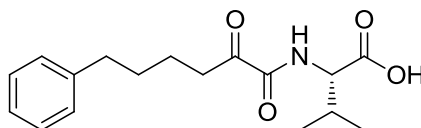
4.52 (dd, $J_1 = 9.2$ Hz, $J_2 = 4.6$ Hz, 1H, NHCH), 2.98 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, CH₂), 2.81 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH₂CO), 2.41-2.21 (m, 1H, NHCHCH), 1.88-1.59 (m, 4H, 2xCH₂), 1.08-0.89 (m, 6H, 2xCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 198.1, 175.4, 159.9, 139.4, 133.5, 131.9, 127.8, 127.5, 127.3, 127.2, 126.3, 125.8, 125.0, 56.9, 36.5, 35.6, 31.0, 30.5, 22.7, 19.0, 17.4.

HRMS (ESI) υπολογίστηκε για C₂₁H₂₆NO₄ [M + H]⁺: 356.1856. Βρέθηκε: 356.1841.

(S)-3-μεθυλ-2-(2-οξο-6-φαινυλεξαναμιδο)βουτανοϊκο οξύ

(S)-3-methyl-2-(2-oxo-6-phenylhexanamido)butanoic acid



61γ

Άχρωμο λάδι. Απόδοση 50%.

M.T.: C₁₇H₂₃NO₄

M.B: 305,37

R_f (11): 0,5

[α]²⁰_D 5,8 (c 1,00, CHCl₃)

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 9.43 (br, 1H, COOH), 7.37 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, NH), 7.32-7.03 (m, 5H, αρωματικά), 4.50 (dd, $J_1 = 9.0$ Hz, $J_2 = 4.6$ Hz, 1H, NHCH), 3.04-2.86 (m, 2H, CH₂), 2.72-2.50 (m, 2H, CH₂CO), 2.41-2.16 (m, 1H, NHCHCH), 1.79-1.50 (m, 4H, 2xCH₂), 1.11-0.81 (m, 6H, 2xCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 198.0, 175.8, 159.9, 141.9, 128.2, 128.2, 125.7, 57.1, 36.5, 35.5, 30.9, 30.6, 22.5, 19.0, 17.4.

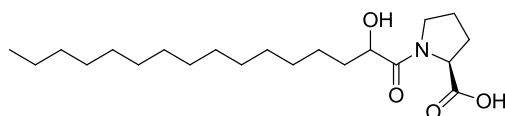
HRMS (ESI) υπολογίστηκε για C₁₇H₂₄NO₄ [M + H]⁺: 306.1700. Βρέθηκε: 306.1695.

10.2.4 Γενική μέθοδος σαπωνωποίησης μεθυλεστέρων

Σε αναδευόμενο διάλυμα του μεθυλεστέρα (1,0 mmol) σε νερό (10 mL) προστίθεται υδατικό διάλυμα 1 N NaOH (1 mL, 1,0 mmol). Το μίγμα τίθεται υπό έντονη ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 18 ώρες. Στη συνέχεια το μίγμα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη και εκπλένεται με EtOAc (3 x 10 mL). Ακολουθεί οξίνιση με υδατικό διάλυμα 4 N HCl μέχρι pH = 1 και παραλαβή του προϊόντος με εκχύλιση της υδατικής στιβάδας με EtOAc (3 x 10 mL). Οι οργανικές στιβάδες συλλέγονται, ξηραίνονται με Na₂SO₄ και ο οργανικός διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση, για να παραληφθεί το προϊόν. Το προϊόν καθαρίζεται με καταβύθιση.

(2S)-1-(2-υδροξυδεκαεξανουΐλ)πυρρολιδο-2-καρβοξυλικό οξύ

(2S)-1-(2-hydroxyhexadecanoyl)pyrrolidine-2-carboxylic acid



33β (μίγμα διαστερεομερών)

Λευκό στερεό. Απόδοση 80%.

M.T.: C₂₁H₃₉NO₄

M.B: 369,54

R_f (10): 0,65

[α]_D²⁰ -5,2 (c 1,02, CHCl₃)

Σ.T.: 71-74 °C

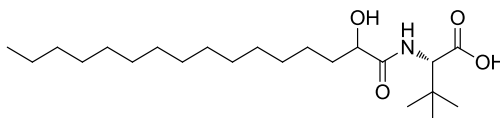
¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 4.82-4.38 (m, 1H, NCH), 4.37-4.08 (m, 1H, CHOH), 3.82-3.30 (m, 2H, NCH₂), 2.56-1.76 (m, 4H, NCHCH₂CH₂), 1.73-1.00 (m, 26H, 13xCH₂), 0.86 (t, J = 6.8 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 174.6, 167.8, 81.5, 69.5, 59.5, 56.4, 46.7, 45.4, 33.9, 32.3, 31.8, 29.5, 29.5, 29.4, 29.3, 28.9, 28.4, 25.0, 24.5, 22.6, 22.1, 14.0.

HRMS (ESI) υπολογίστηκε για $C_{21}H_{39}NNaO_4$ $[M + Na]^+$: 392.2771. Βρέθηκε: 392.2785.

(2S)-2-(2-υδροξυδεκαεξαναμιδο)-3,3-διμεθυλοβουτανοϊκό οξύ

(2S)-2-(2-hydroxyhexadecanamido)-3,3-dimethylbutanoic acid



33γ (μίγμα διαστερεομερών)

Λευκό στερεό. Απόδοση 80%.

M.T.: $C_{22}H_{43}NO_4$

M.B: 385,32

R_f (11): 0,42

$[\alpha]^{20}_D$ 1,8 (c 1,00, $CHCl_3$)

Σ.Τ.: 99-101 °C

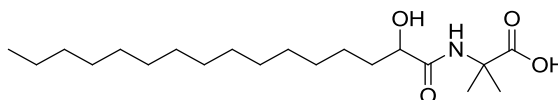
1H NMR ($CDCl_3$, 200 MHz): δ 7.52-7.01 (m, 1H, NH), 4.51-4.25 (m, 1H, NHCH), 4.24-4.03 (m, 1H, CHOH), 1.92-1.11 (m, 26H, 13x CH_2), 0.96 (s, 9H, 3x CH_3), 0.89-0.72 (m, 3H, CH_3).

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 50 MHz): δ 175.5, 174.6, 174.4, 74.5, 59.8, 34.6, 34.5, 31.9, 29.7, 29.6, 29.5, 29.3, 26.5, 25.1, 24.5, 22.6, 14.1.

MS (ESI) m/z (%): 386.2 (100) $[M + H]^+$.

2-(2-υδροξυδεκαεξαναμιδο)-2-μεθυλοπροπανοϊκό οξύ

2-(2-hydroxyhexadecanamido)-2-methylpropanoic acid



33δ (ρεκεμικό μίγμα)

Λευκό στερεό. Απόδοση 72%.

M.T.: C₂₀H₃₉NO₄

M.B: 357,29

R_f (11): 0,35

[α]_D²⁰ 1,7 (c 1,02, MeOH)

Σ.Τ.: 81-83 °C

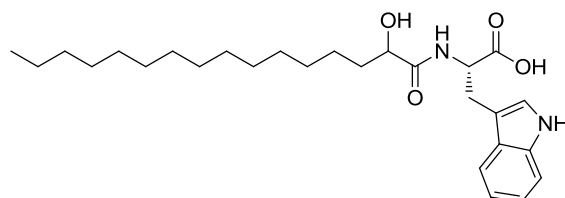
¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 7.20 (br s, 1H, NH), 4.21-3.92 (m, 1H, CHOH), 1.94-1.03 (m, 32H, 13xCH₂ και 2xCH₃), 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 173.1, 96.9, 96.4, 72.0, 34.3, 34.3, 31.9, 29.8, 29.6, 29.5, 29.3, 25.1, 24.7, 24.5, 22.7, 14.1.

MS (ESI) m/z (%): 358.3 (100) [M + H]⁺.

(2S)-2-(2-υδροξυδεκαεξαναμιδο)-3-(1H-ινδολο)προπανοϊκο οξύ

(2S)-2-(2-hydroxyhexadecanamido)-3-(1H-indol-3-yl)propanoic acid



33α (μίγμα διαστερομερών)

Λευκό στερεό. Απόδοση 80%.

M.T.: C₂₇H₄₂N₂O₄

M.B: 458,63

R_f (11): 0,15

[α]_D²⁰ 18,7 (c 1,00, MeOH)

Σ.Τ.: 144-146 °C

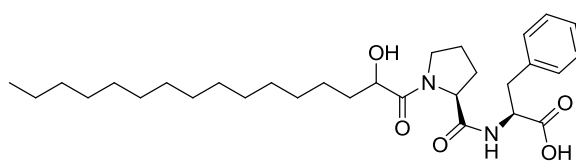
^1H NMR (CD_3OD , 200 MHz): δ 7.63-7.51 (m, 1H, NH), 7.36-7.26 (m, 1H, αρωματικά), 7.15-6.92 (m, 3H, αρωματικά), 4.82-4.67 (m, 1H, NHCH), 4.01-3.88 (m, 1H, CHOH), 3.44-3.19 (m, 2H, NHCHCH₂), 1.77-1.50 (m, 2H, -CH₂CHOH), 1.48-1.12 (m, 24H, 12xCH₂), 0.89 (t, J = 6.6 Hz, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (50 MHz, CD_3OD): δ 177.0, 175.0, 142.0, 128.9, 124.5, 122.4, 119.9, 119.4, 112.2, 110.4, 72.5, 53.3, 35.5, 33.1, 30.8, 30.5, 28.5, 25.9, 23.8, 14.5.

HRMS (ESI) υπολογίστηκε για $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{NaO}_4$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 481.3037. Βρέθηκε: 481.3057.

(2S)-2-((2S)-1-(2-υδροξυδεκαεξανούλ)πυρρολιδο-2-καρβοξαμιδο)-3-φαινυλοπροπανοϊκό οξύ

(2S)-2-((2S)-1-(2-hydroxyhexadecanoyl)pyrrolidine-2-carboxamido)-3-phenylpropanoic acid



50

Άχρωμο λάδι. Απόδοση 77%.

M.T.: $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_5$

M.B: 516,36

R_f (10): 0,52

$[\alpha]^{20}_D$ -48,8 (c 0,88, CHCl_3)

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): δ 7.50-6.98 (m, 5H, αρωματικά), 5.04-4.05 (m, 3H, NHCH και NCH και CHOH), 3.64-2.82 (m, 4H, NCH₂ και NHCHCH₂), 2.45-1.71 (m, 4H, NHCHCH₂CH₂), 1.67-1.01 (m, 26H, 13xCH₂), 1.03-0.78 (m, 3H, CH₃).

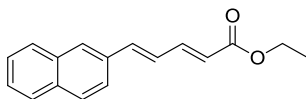
MS (ESI) m/z (%): 515.6 (100) $[\text{M} - \text{H}]^-$.

10.2.5 Μέθοδος επιμήκυνσης της ανθρακικής αλυσίδας - αντίδραση ολεφινοποίησης Horner-Wadsworth-Emmons.

Σε αναδευόμενο διάλυμα της αλδεΐδης (1,0 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουρανιο (10 mL) και υπό αδρανή ατμόσφαιρα αργού, προστίθεται $C_2H_5OOCH=CHCH_2P(=O)(OC_2H_5)_2$ (1,5 mmol). Ακολουθεί προσθήκη μοριακών κοσκίνων (1,5 g/mmol αλδεΐδης) και τέλος $LiOH \cdot H_2O$ (1,5 mmol). Το μίγμα αναδεύεται υπο αναρροή για 24 ώρες, ακολουθεί διήθηση με celite και απομακρύνεται ο οργανικός διαλύτης υπο ελαττωμένη πίεση. Τέλος, το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως σύστημα έκλουσης πετρελαϊκό αιθέρα/ αιθέρα .

(2E,4E)-5-(ναφθαλενο)πεντα-2,4-δι-ενοϊκος αιθυλεστερας

(2E,4E)-ethyl 5-(naphthalen-2-yl)penta-2,4-dienoate



53α

Λευκό στερεο. Απόδοση 50%.

M.T.: $C_{17}H_{16}O_2$

M.B: 252,31

Σύστημα έκλουσης (2): R_f 0,25

Σ.Τ.: 100-102 °C

1H NMR ($CDCl_3$, 200 MHz): δ 7.90-7.60 (m, 5H), 7.55-7.45 (m, 3H), 7.10-6.95 (m, 2H), 6.04 (s, 1H), 4.26 (m, 2H), 1.28 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 50 MHz): δ 167.1, 144.6, 140.4, 133.5, 133.4, 128.5, 128.2, 128.1, 127.7, 126.6, 126.5, 126.4, 123.3, 121.3, 60.4, 14.3.

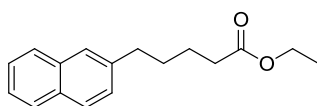
MS (ESI) m/z (%): 253 (100) $[M + H]^+$.

10.2.6 Γενική μέθοδος καταλυτικής υδρογόνωσης

Σε διάλυμα της ακόρεστης ένωσης (1,0 mmol) σε απόλυτη αιθανόλη (10 ml) προστίθεται καταλύτης Pd/C 10% και υπο ατμόσφαιρα H₂, αφήνεται υπό ανάδευση για 24 ώρες. Ακολουθεί διήθηση με celite, συμπύκνωση του διαλύτη υπο ελαττωμένη πίεση και καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης έκλουσης πετρελαϊκού αιθέρα / οξικός αιθυλεστέρας.

5-(ναφθυλο)πεντανοϊκός αιθυλεστέρας

ethyl 5-(naphthalen-2-yl)pentanoate



54α

Άχρωμο λάδι. Απόδοση 80%.

M.T.: C₁₇H₂₀O₂

M.B: 256,15

Σύστημα έκλουσης (1): R_f 0,75

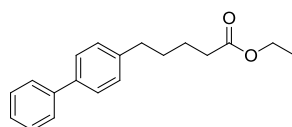
¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 8.03-7.18 (m, 7H), 4.34-4.06 (m, 2H), 3.03-2.69 (m, 2H), 2.51-2.31 (m, 2H), 1.91-1.69 (m, 4H), 1.41-1.22 (m, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 173.4, 139.4, 133.4, 131.8, 127.6, 127.4, 127.2, 127.1, 126.2, 125.7, 124.9, 60.0, 35.5, 34.0, 30.5, 24.4, 14.1.

MS (ESI) m/z (%): 274.1 (100) [M + NH₄]⁺, 257.3 (15) [M + H]⁺.

5-διφαινυλο-πεντανοϊκός αιθυλεστέρας

ethyl 5-([1,1'-biphenyl]-4-yl)pentanoate



54β

205

Άχρωμο λάδι. Απόδοση 86%.

M.T.: C₁₉H₂₂O₂

M.B: 282,16

Σύστημα έκλουσης (6): R_f 0,83

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 7.60-7.27 (m, 9H), 4.16-4.11 (m, 2H), 2.70-2.60 (m, 2H), 2.40-2.30 (m, 2H), 1.75-1.65 (m, 4H), 1.30-1.19 (m, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 173.9, 141.5, 138.9, 129.0, 129.0, 127.3, 127.2, 60.5, 35.4, 34.4, 31.1, 24.9, 14.5.

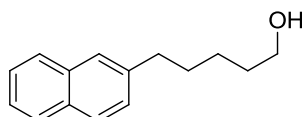
MS (ESI) m/z (%): 300.0 (100) [M + NH₄]⁺, 283.2 (15) [M + H]⁺.

10.2.7 Γενική μέθοδος αναγωγής εστέρων σε πρωτοταγείς αλκοόλες

Σε αναδευόμενο διάλυμα του εστέρα (1,0 mmol) σε Et₂O (10 ml) υπο ατμόσφαιρα αργού, προστίθεται στάγδην το αναγωγικό DIBAL-H (διάλυμα 1M σε εξάνια, 2,3 mmol, 2,3 ml). Το μίγμα αφήνεται υπο ανάδευση για 2 ώρες. Ακολούθως, προστίθενται 20 ml νερού και το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση για 30 λεπτά ακόμα. Διαχωρίζεται η οργανική στιβάδα και γίνονται εκχυλίσεις της υδατικής στιβάδας 3 φορές με 50 ml Et₂O. Οι οργανικές φάσεις συγκεντρώνονται, εκπλένονται με κορεσμένο διάλυμα NaCl, ξηραίνονται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνονται. Το τελικό προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης πετρελαϊκός αιθέρας / οξικός αιθυλεστέρας.

5-(ναφθυλο)πεντανόλη

5-(naphthalen-2-yl)pentan-1-ol



55α

Λευκό στερεό. Απόδοση 100%.

M.T.: C₁₅H₁₈O

M.B: 214,14

Σύστημα έκλουσης (3): R_f 0,74

Σ.Τ.: 38-39 °C

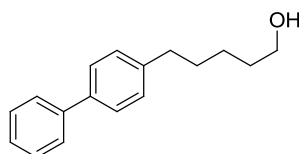
¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 7.82-7.25 (m, 7H), 3.66 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.85 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.15 (br, 1H), 1.8-1.4 (m, 6H).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 140.4, 133.9, 132.2, 128.1, 127.9, 127.7, 126.6, 126.2, 125.3, 63.0, 36.3, 32.9, 31.4, 25.7.

MS (ESI) *m/z* (%): 232.4 (100) [M + NH₄]⁺.

5-διφαινυλπεντανόλη

5-([1,1'-biphenyl]-4-yl)pentan-1-ol



55β

Λευκό ημιστερεό. Απόδοση 80%.

M.T.: C₁₇H₂₀O

M.B: 240,15

Σύστημα έκλουσης (6): R_f 0,5

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 7.66-7.28 (m, 9H), 3.84-3.35 (m, 2H), 3.04-2.52 (m, 2H), 1.74-0.96 (m, 6H).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 142.0, 141.4, 138.9, 129.1, 129.0, 127.3, 127.2, 62.8, 35.8, 32.9, 31.6, 25.8.

MS (ESI) *m/z* (%): 258.1 (100) [M + NH₄]⁺.

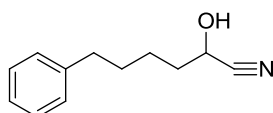
10.2.8 Γενική μέθοδος οξειδωσης πρωτοταγών αλκοολών σε αλδεΐδες και ακολούθως σε κυανυδρίνες

Σε αναδευόμενο διάλυμα της αλκοόλης (1,0 mmol) σε τουλουόλιο και οξικό αιθυλεστέρα (1:1, 6 ml) προστίθενται H₂O (0,5 ml) και NaBr (0,11 g, 1,1 mmol). Το μίγμα ψύχεται στους -5 °C και υπο έντονη ανάδευση γίνεται προσθήκη του AcNH-TEMPO (0,21 mg, 0,01 mmol). Στην συνέχεια προστίθεται το υδατικό διάλυμα 0,5 M σε NaOCl (2,2 ml, 1,1 mmol), NaHCO₃ (0,24 g, 3,0 mmol) και H₂O (5 ml) στάγδιν. Διαχωρίζεται η υδατική φάση απο την οργανική και η οργανική εκχυλίζεται με διαδοχικές εκπλύσεις με υδατικά διαλύματα: 5% KI σε 1% κιτρικό οξύ, 10% Na₂S₂O₃ και κορεσμένο διάλυμα NaCl. Ακολουθεί ξήρανση της οργανικής φάσης και συμπύκνωση του διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση. Το προϊόν χρησιμοποιείται απευθείας στην επόμενη αντίδραση.

Σε διάλυμα της αλδεΐδης (1,0 mmol) σε διχλωρομεθάνιο (1,3 ml) προστίθενται υδατικό διάλυμα NaHSO₃ (0,25 ml, 1,5 mmol). Συνεχίζεται η ανάδευση του διαλύματος για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί συμπύκνωση του οργανικού διαλύτη και προσθήκη νερού (1 ml). Το μίγμα ψύχεται στους 0 °C και υπό έντονη ανάδευση γίνεται στάγδην προσθήκη υδατικού διαλύματος KCN 6 M (0,25 ml, 1,5 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπο ανάδευση για 18 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στην συνέχεια προστίθεται διχλωρομεθάνιο για την παραλαβή του προϊόντος και η οργανική φάση εκπλένεται με κορεσμένο διάλυμα NaCl, ξηραίνεται με Na₂SO₄ και ο οργανικός διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το τελικό προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως σύστημα έκλουσης πετρελαϊκό αιθέρα / οξικό αιθυλεστέρα.

2-υδροξυ-6-φαινυλεξανονιτρίλιο

2-hydroxy-6-phenylhexanenitrile



56γ

Άχρωμο λάδι. Απόδοση 78%.

M.T.: C₁₂H₁₅NO

M.B: 189,12

Σύστημα έκλουσης (2): R_f 0,5

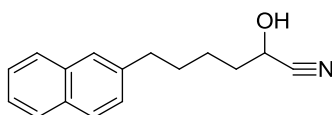
¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 7.44-7.15 (m, 5H), 4.56-4.32 (m, 1H), 4.03 (br, 1H), 2.81-2.59 (m, 2H), 2.01-1.48 (m, 6H).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 141.7, 128.1, 125.5, 119.9, 60.7, 35.3, 34.6, 30.4, 23.9.

MS (ESI) m/z (%): 207.3 (90) [M + NH₄]⁺.

2-υδροξυ-6-ναφθυλεξανονιτρίλιο

2-hydroxy-6-(naphthalen-2-yl)hexanenitrile



56α

Κίτρινο λάδι. Απόδοση 56%.

M.T.: C₁₆H₁₇NO

M.B: 239,13

Σύστημα έκλουσης (2): R_f 0,45

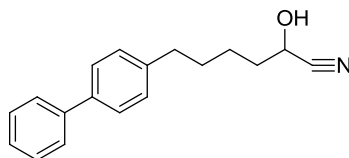
¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 7.95-7.19 (m, 7H), 4.41 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 2.99 (br, 1H), 2.88-2.66 (m, 2H), 1.98-1.42 (m, 6H).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 139.3, 133.4, 131.8, 127.8, 127.5, 127.3, 127.1, 126.3, 125.9, 125.1, 119.9, 61.0, 35.6, 34.9, 30.5, 24.1.

MS (ESI) m/z (%): 257.1 (100) [M + NH₄]⁺, 223.1 (80) [M - OH]⁺.

2-υδροξυ-6-διφαινουλεξανονιτριλιο

6-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-2-hydroxyhexanenitrile



56β

Ροζ στερεό. Απόδοση 80%.

M.T.: C₁₈H₁₉NO

M.B: 265,15

Σύστημα έκλουσης (6): R_f 0,23

Σ.Τ.: 78-82 °C

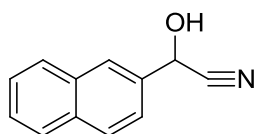
¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 7.69-7.25 (m, 9H), 4.50-4.46 (m, 1H), 3.64 (br, 1H), 2.83-2.70 (m, 2H), 1.97-1.90 (m, 2H), 1.80-1.61 (m, 4H).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 140.9, 140.7, 138.5, 128.6, 128.6, 126.9, 126.7, 120.0, 60.8, 35.0, 34.7, 30.5, 24.1.

MS (ESI) m/z (%): 282.9 (100) [M + NH₄]⁺.

υδροξυ-ναφθυλοακετονιτριλιο

2-hydroxy-2-(naphthalen-2-yl)acetonitrile



63

Σε διάλυμα της ουσίας σε οξικό αιθυλεστέρα-τετραϋδροφουράνιο-80% οξικό οξύ προστέθηκε διάλυμα κυανιούχου νατρίου. Το μίγμα αναδεύτηκε για 18 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό ελαττωμένη πίεση και προστέθηκε διχλωρομεθάνιο για την παραλαβή του προϊόντος. Η οργανική φάση εκπλένεται με κορεσμένο διάλυμα NaCl,

ξηραίνεται με Na_2SO_4 και ο οργανικός διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το τελικό προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως σύστημα έκλουσης πετρελαϊκό αιθέρα / οξικό αιθυλεστέρα 1/4.

Λευκό στερεό. Απόδοση 95%.

M.T.: $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{NO}$

M.B: 183,07

Σ.T.: 110-113 °C

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): δ 7.99-7.24 (m, 7H), 5.78-5.59 (m, 1H), 2.08 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz): δ 133.6, 132.8, 132.3, 129.4, 128.3, 127.7, 127.2, 123.6, 63.8.

MS (ESI) m/z (%): 157.1 (73) $[\text{M} - \text{CN}]^+$.

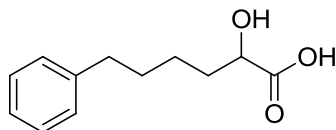
10.2.9 Μέθοδος υδρόλυσης των υδροξυ-νιτριλίων σε υδροξυ-οξέα

Αιώρημα του νιτριλίου (1,0 mmol) σε πυκνό υδροχλωρικό οξύ (2,5 ml) τίθεται υπό ανάδευση για 18 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Γίνεται προσθήκη 5 ml νερού και παραλαμβάνεται το μίγμα με χλωροφόρμιο. Η οργανική φάση εκπλένεται με κορεσμένο διάλυμα NaCl και ξηραίνεται με Na_2SO_4 . Ακολουθεί συμπύκνωση του οργανικού διαλύτη και καταβύθιση του αμιδικού προϊόντος με παγωμένο πετρελαϊκό αιθέρα.

Σε διάλυμα του αμιδίου (0,8 mmol) σε αιθανόλη/νερό (2/1, 6 mL) προστίθεται KOH (8,0 mmol, 449 mg) και το μίγμα τίθεται υπό αναρροή για 2 ώρες. Ακολουθεί συμπύκνωση της αιθανόλης, προσθήκη 10 ml νερού, οξίνιση με HCl 1N μέχρι $\text{pH} \sim 1$ και εκχυλίσεις της υδατικής στιβάδας με EtOAc . Έπειτα, συλλέγονται οι οργανικές φάσεις, ξηραίνονται με Na_2SO_4 και συμπυκνώνεται ο οργανικός διαλύτης. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με ανακρουστάλλωση με CH_2Cl_2 και πετρελαϊκό αιθέρα.

2-υδροξυ-6-φαιτυλεξανοϊκο οξύ

2-hydroxy-6-phenylhexanoic acid



58γ

Λευκό στερεό. Απόδοση 63%.

M.T.: C₁₂H₁₆O₃

M.B: 208,11

R_f (10): 0,1

Σ.T.: 100-102 °C

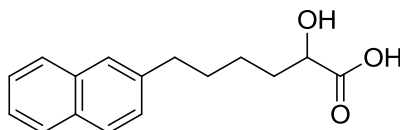
¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 7.41-7.10 (m, 5H), 4.36-4.20 (m, 1H), 2.64 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.02-1.37 (m, 6H).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 179.5, 142.3, 128.4, 128.3, 125.7, 70.1, 35.7, 34.0, 31.1, 24.4.

MS (ESI) *m/z* (%): 208.1 (100) [M]⁻.

2-υδροξυ-6-ναφθυλεξανοϊκο οξύ

2-hydroxy-6-(naphthalen-2-yl)hexanoic acid



58α

Λευκό στερεό. Απόδοση 98%.

M.T.: C₁₆H₁₈O₃

M.B: 258,13

Σ.T.: 115-118 °C

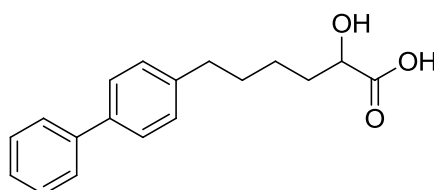
^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): δ 7.81-7.25 (m, 7H), 4.35-4.10 (m, 1H), 2.78 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.07-1.31 (m, 6H).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz): δ 177.1, 139.8, 133.4, 131.7, 127.6, 127.4, 127.2, 127.2, 126.1, 125.7, 124.9, 69.9, 49.7, 49.2, 48.8, 35.7, 33.9, 30.9, 24.5.

MS (ESI) m/z (%): 257.2 (100) $[\text{M} - \text{H}]^-$.

2-υδροξυ-6-διφαινυλεξανοϊκο οξύ

6-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-2-hydroxyhexanoic acid



58β

Λευκό στερεό. Απόδοση 93%.

M.T.: $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_3$

M.B: 284,14

R_f (6): 0,5

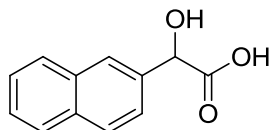
^1H NMR (DMSO, 200 MHz): δ 7.48-7.11 (m, 9H), 4.06-3.94 (m, 1H), 2.58-2.50 (m, 2H), 1.74-1.37 (m, 6H).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz): δ 177.1, 141.4, 140.9, 138.4, 128.6, 128.5, 126.8, 126.8, 69.9, 35.2, 33.9, 31.0, 24.5.

MS (ESI) m/z (%): 282.9 (100) $[\text{M} - \text{H}]^-$.

υδροξυ-ναφθυλοξικό οξύ

2-hydroxy-2-(naphthalen-2-yl)acetic acid



64

Λευκό στερεό. Απόδοση 90%.

M.T.: C₁₂H₁₀O₃

M.B: 202,06

R_f (8): 0,6

Σ.T.: 57-60 °C

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 7.89-7.24 (m, 7H), 5.28 (s, 1H), 3.32-3.08 (m, 1H).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 175.1, 135.8, 133.1, 128.2, 127.9, 127.5, 126.2, 126.1, 126.1, 125.8, 124.1, 72.6.

MS (ESI) m/z (%): 202.21 (100) [M + H]⁺.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας 11.1: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων.

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity	Απορρόφηση, κατανομή, μεταβολισμός, απέκκριση και τοξικότητα
Arahidonic acid	Αραχιδονικό οξύ
Atom types	Τύπος ατόμων
Docosahexaenoic acid	Εικοσιδυαεξαενοϊκό οξύ
Eicosapentaenoic acid	Εικοσαπενταενοϊκό οξύ
In vitro	Πείραμα στον σωλήνα
In vivo	Πείραμα σε πειραματόζωα
In silico	Υπολογιστικά πειράματα με την χρήση ηλεκτρονικών υπολογιστών
Phosphatidylcholine	Φωσφατιδυλοχολίνη
Phosphatidylethanolamine	Φωσφατιδυλαιθανολαμίνη
Phosphatidylglycerol	Φωσφατιδυλογλυκερόλη
Phosphatidylserine	Φωσφατιδυλοσερίνη
Prostaglandins	Προσταγλανδίνη
Platelet activating factor	Παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων
Protein preparation wizard	Εφαρμογή προετοιμασίας πρωτεϊνών
Leukotrienes	Λευκοτριένια
Lysophosphatidic acid	Λυσοφωσφατιδικό οξύ
Lysophosphatidylcholine	Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη

Solvent accessible surface area	Επιφάνεια προσιτή από το διαλύτη
Synovial fluid	Αρθρικό υγρό ασθενών που πάσχουν από ρευματοειδή αρθρίτιδα

Συντμήσεις – Αρκτικόλεξα – Ακρωνύμια

Ακρωνύμια και ανάπτυξη τους

cPLA ₂	Cytosolic phospholipase A ₂
iPLA ₂	Calcium independent phospholipase A ₂
sPLA ₂	Secreted phospholipase A ₂
Lp-PLA ₂	Lipoprotein-associated phospholipase A ₂
PAF-AH	Platelet activating factor acetylhydrolases
PC	Phosphatidilocholine
PE	Phosphatidylethanolamine
PS	Phosphatidylserine
PG	Phosphatidylglycerol
EPA	Eicosapentaenoic acid
DHA	Docosahexaenoic acid
LPC	Lysophosphatidylcholine
LPA	Lysophosphatidic acid
PGE ₂	Prostaglandins
HIS	Histidine
ASP	Aspartic acid
LTs	Leukotrienes
LDL	Low-density lipoprotein
AA	Arachidonic acid
HDL	High-density lipoprotein
HER	Human epidermal growth factor receptor
LTB ₄	Leukotriene B ₄ receptors

TXA2	Thromboxane A2
ADME	Absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity
RESP	Restrained electrostatic potential
QM	Quantum mechanics
MM	Molecular mechanics
PME	Particle mesh Ewald
CPU	Central processing unit
GPU	Graphics processing unit
MM-PBSA.py	Molecular mechanics Poisson-Boltzmann surface area.python
LEaP	Law enforcement alerting portal
sander	Simulated annealing with NMR-derived energy restrains
PMEMD	Particle mesh Ewald molecular dynamics
ptraj	Processing and analysis of trajectories
SASA	Solvent accessible surface area
RMSD	Root mean square deviation
DIBAL-H	Diisobutylaluminium hydride
AcNH-TEMPO	4-Acetamido-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl
TFA	Trifluoroacetic acid
DMSO	Dimethyl sulfoxide
NMR	Nuclear magnetic resonance

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Dennis, E. A.; Cao, J.; Hsu, Y. H.; Magrioti, V.; Kokotos, G. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6130-6185.
2. Murakami, M.; Taketomi, Y.; Miki, Y.; Sato, H.; Hirabayashi, T.; Yamamoto, K. Recent progress in phospholipase A research: from cells to animals to humans. *Prog. Lipid. Res.* **2011**, *50*, 152-92.
3. Cummings, B. S.; McHowat, J.; Schnellmann, R. G. Role of an endoplasmic reticulum Ca(2+)-independent phospholipase A(2) in oxidant-induced renal cell death. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **2002**, *283*, F492-F498.
4. Chen, C. H. Platelet-activating factor acetylhydrolase: is it good or bad for you. *Curr. Opin. Lipidol.* **2004**, *15*, 337-341.
5. Serruys, P. W.; Garcia-Garcia, H. M.; Buszman, P.; Erne, P.; Verheye, S.; Aschermann, M.; Duckers, H.; Bleie, O.; Dudek, D.; Bøtker, H. E.; von Birgelen, C.; D'Amico, D.; Hutchinson, T.; Zambanini, A.; Mastik, F.; van Es, G.-A.; van der Steen, A. F. W.; Vince, D. G.; Ganz, P.; Hamm, C. W.; Wijns, W.; Zalewski, A. Effects of the direct lipoprotein-associated phospholipase A2 inhibitor darapladib on human coronary atherosclerotic plaque. *Circulation* **2008**, *118*, 1172-1182.
6. Hiraoka, M.; Abe, A.; Lu, Y.; Yang, K.; Han, X.; Gross, R. W.; Shayman, J. A. Lysosomal phospholipase A2 and phospholipidosis. *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26*, 6139-6148.
7. Jaworski, K.; Ahmadian, M.; Duncan, R. E.; Sarkadi-Nagy, E.; Varady, K. A.; Hellerstein, M. K.; Lee, H.-Y.; Samuel, V. T.; Shulman, G. I.; Kim, K.-H.; de Val, S.; Kang, C.; Sul, H. S. AdPLA ablation increases lipolysis and prevents obesity induced by high-fat feeding or leptin deficiency. *Nat. Med.* **2009**, *15*, 159-168.

-
8. Murakami, M.; Lambeau, G. Emerging roles of secreted phospholipase A₂ enzymes: An update. *Biochimie* **2013**, *95*, 43-50.
 9. Chakraborti, S. Phospholipase A₂ isoforms: a perspective. *Cell Signal* **2003**, *15*, 637-65.
 10. Quach, N. D.; Arnold, R. D.; Cummings, B. S. Secretory phospholipase A₂ enzymes as pharmacological targets for treatment of disease. *Biochem. Pharmacol.* **2014**, *90*, 338-348.
 11. Murakami, M.; Taketomi, Y.; Sato, H.; Yamamoto, K. J. B. Secreted phospholipase A₂ revisited. *J. Biochem.* **2011**, *150*, 233-255.
 12. Singer, A. G.; Ghomashchi, F.; Le Calvez, C.; Bollinger, J.; Bezzine, S.; Rouault, M.; Sadilek, M.; Nguyen, E.; Lazdunski, M.; Lambeau, M.; Gelb, M. H. Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A₂. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 48535-48549.
 13. Jemel, I.; Li, H.; Oslund, R. C.; Payré, C.; Dabert-Gay, A.-S.; Douguet, D.; Chargui, K.; Scarzello, S.; Gelb, M. H.; Lambeau, G. Group X secreted phospholipase A₂ proenzyme is matured by a furin-like proprotein convertase and releases arachidonic acid inside of human HEK293 cells. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 36509-36521.
 14. Bezzine, S.; Koduri, R. S.; Valentin, E.; Murakami, M.; Kudo, I.; Ghomashchi, F.; Sadilek, M.; Lambeau, G.; Gelb, M. H. Exogenously added human group X secreted phospholipase A₂ but not the group IB, IIA, and V enzymes efficiently release arachidonic acid from adherent mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 3179-3191.
 15. Murakami, M.; Shimbara, S.; Kambe, T.; Kuwata, H.; Winstead, M. V.; Tischfield, J. A.; Kudo, I. The functions of five distinct mammalian phospholipase A₂s in regulating arachidonic acid release. Type IIA and type V secretory phospholipases A₂ are functionally redundant and act in concert with cytosolic phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 14411-14423.

-
16. Murakami, M.; Kambe, T.; Shimbara, S.; Higashino, K.; Hanasaki, K.; Arita, H.; Horiguchi, M.; Arita, M.; Arai, H.; Inoue, K.; Kudo, I. Different functional aspects of the group II subfamily (Types IIA and V) and type X secretory phospholipase A₂s in regulating arachidonic acid release and prostaglandin generation. Implications of cyclooxygenase-2 induction and phospholipid scramblase-mediated cellular membrane perturbation. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 31435-31444.
 17. Murakami, M.; Koduri, R. S.; Enomoto, A.; Shimbara, S.; Seki, M.; Yoshihara, K.; Singer, A.; Valentin, E.; Ghomashchi, F.; Lambeau, G.; Gelb, M. H.; Kudo, I. Distinct arachidonate-releasing functions of mammalian secreted phospholipases A₂ in fibroblastic and mastocytoma cells through heparan sulfate shuttling and external plasma membrane mechanisms. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 10083-10096.
 18. Murakami, M.; Masuda, S.; Shimbara, S.; Bezzine, S.; Lazdunski, M.; Lambeau, G.; Gelb, M. H.; Matsukura, S.; Kokubu, F.; Adachi, M.; Kudo, I. Cellular arachidonate-releasing function of novel classes of secretory phospholipase A₂s (groups III and XII). *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 10657-10667.
 19. Sato, H.; Taketomi, Y.; Isogai, Y.; Masuda, S.; Kobayashi, T.; Yamamoto, K.; Murakami, M. Group III secreted phospholipase A₂ transgenic mice spontaneously develop inflammation. *Biochem. J.* **2009**, *421*, 17-27.
 20. Yamamoto, K.; Taketomi, T.; Isogai, Y.; Miki, Y.; Sato, H.; Masuda, S.; Nishito, Y.; Morioka, K.; Ishimoto, Y.; Suzuki, N.; Yokoya, Y.; Hanasaki, K.; Ishikawa, Y.; Ishii, T.; Kobayashi, T.; Fukami, K.; Ikeda, K.; Nakanishi, H.; Taguchi, R.; Murakami, M. Hair follicular expression and function of group X secreted phospholipase A₂ in mouse skin. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 11616-11631.

-
21. Satake, Y.; Diaz, B. L.; Balestrieri, B.; Lam, B. K.; Kanaoka, Y.; Grusby, M. J.; Arm, J. P. Role of group V phospholipase A2 in zymosan-induced eicosanoid generation and vascular permeability revealed by targeted gene disruption. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 16488-16494.
 22. Kim, Y. J.; Kim, K. P.; Han, S. K.; Munoz, N. M.; Zhu, X.; Sano, H.; Leff, A. R.; Cho, W. Group V phospholipase A2 induces leukotriene biosynthesis in human neutrophils through the activation of group IVA phospholipase A2. *J. Biol Chem.* **2002**, *277*, 36479-36488.
 23. Lai, Y.; Oslund, R. C.; Bollinger, J. G.; Henderson, W. R. Jr.; Santana, L. F.; Altemeier, W. A.; Gelb, M. H.; Hallstrand, T. S. Eosinophil cysteinyl leukotriene synthesis mediated by exogenous secreted phospholipase A2 group X. *J. Biol Chem.* **2010**, *285*, 41491-41500.
 24. Rosenson, R. S. Phospholipase A2 inhibition and atherosclerotic vascular disease: prospects for targeting secretory and lipoprotein-associated phospholipase A2 enzymes. *Curr. Opinion Lipid.* **2010**, *21*, 473-480.
 25. Zhou, L.; Nilsson, A. Sources of eicosanoid precursor fatty acid pools in tissues. *J. Lipid Res.* **2001**, *42*, 1521-1542.
 26. Murakami, M. Lipid mediators in life science. *Exp. Anim.* **2011**, *60*, 7-20.
 27. Beck, S.; Lambeau, G.; Scholz-Pedretti, K.; Gelb, M. H.; Janssen, M. J.; Edwards, S. H.; Wilton, D. C.; Pfeilschifter, J.; Kaszkin, M. Potentiation of tumor necrosis factor alpha-induced secreted phospholipase A₂ (sPLA₂)-IIA expression in mesangial cells by an autocrine loop involving sPLA₂ and peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 29799-29812.
 28. Sved, P.; Scott, K. F.; McLeod, D.; King, N. J.; Singh, J.; Tsatralis, T.; Nikolov, B.; Boulas, J.; Nallan, L.; Gelb, M. H.; Sajinovic, M.; Graham, G. G.; Russell, P. J.; Dong, Q. Oncogenic action of secreted phospholipase A₂ in prostate cancer. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 6934-6940.

-
29. Sribar, J.; Krizaj, I. Secreted phospholipases A₂ – not just enzymes. *Acta Chim. Slov.* **2011**, *58*, 678-88.
 30. Sarrazin, S.; Lamanna, W. C.; Esko, J. D. Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, *3*, 1-33.
 31. Murakami, M.; Kambe, T.; Shimbara, S.; Yamamoto, S.; Kuwata, H.; Kudo, I. Functional association of type IIA secretory phospholipase A(2) with the glycosylphosphatidylinositolanchored heparan sulfate proteoglycan in the cyclooxygenase-2-mediated delayed prostanoid-biosynthetic pathway. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 29927-29936.
 32. Nelson, J.; Gibbons, E.; Pickett, K. R.; Streeter, M.; Warcup, A. O.; Yeung, C. H. Y.; Judd, A. M.; Bell, J. D. Relationship between membrane permeability and specificity of human secretory phospholipase A(2) isoforms during cell death. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1808*, 1913-1920.
 33. Diccianni, M. B.; McLean, L. R.; Stuart, W. D.; Mistry, M. J.; Gil, C. M.; Harmony, J. A. Porcine pancreatic phospholipase A₂ isoforms: differential regulation by heparin. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1082*, 85-93.
 34. Murakami, M.; Sato, H.; Taketomi, Y.; Yamamoto, K. Integrated lipidomics in the secreted phospholipase A₂ biology. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 1474-1495.
 35. Pruzanski, W.; Stefanski, E.; Kopilov, J.; Kuksis, A. Mitogenic effect of lipoproteins on human vascular smooth muscle cells: The impact of hydrolysis by gr II A Phospholipase A2. *Lab. Invest.* **2001**, *81*, 757-765.
 36. Webb, N. R. Secretory phospholipase A2 enzymes in atherogenesis. *Curr. Opin. Lipidol.* **2005**, *16*, 341-344.
 37. Murakami, M.; Kudo, I. New phospholipase A2 isozymes with a potential role in atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* **2003**, *14*, 431-436.

-
38. Ross, R. Atherosclerosis: an inflammatory disease: reply. *N. Engl. J. Med.* **1999**, *340*, 115-126.
 39. Steinberg, D. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nat. Med.* **2002**, *8*, 1211-1217.
 40. Mallat, Z.; Lambeau, G.; Tedgui, A. Lipoprotein-associated and secreted phospholipases A₂ in cardiovascular disease: roles as biological effectors and biomarkers. *Circulation* **2010**, *122*, 2183-2200.
 41. Sato, H.; Kato, R.; Isogai, Y.; Saka, G.; Ohtsuki, M.; Taketomi, Y.; Yamamoto, K.; Tsutsumi, K.; Yamada, J.; Masuda, S.; Ishikawa, Y.; Ishii, T.; Kobayashi, T.; Ikeda, K.; Taguchi, R.; Hatakeyama, S.; Hara, S.; Kudo, I.; Itabe, H.; Murakami, M. Analyses of group III secreted phospholipase A₂ transgenic mice reveals potential participation of this enzyme in plasma lipoprotein modification, macrophage foamcell formation, and atherosclerosis. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 33483-33497.
 42. Kimura-Matsumoto, M.; Ishikawa, Y.; Komiyama, K.; Tsuruta, T.; Murakami, M.; Masuda, S.; Akasaka, Y.; Ito, K.; Ishiguro, S.; Morita, H.; Sato, S.; Ishii, T. Expression of secretory phospholipase A₂ in human atherosclerosis development. *Atherosclerosis* **2008**, *196*, 81-91.
 43. Magrioti, V.; Kokotos, G. Phospholipase A₂ inhibitors as potential therapeutic agents for the treatment of inflammatory diseases. *Exp. Opin. Ther. Pat.* **2010**, *20*, 1-18.
 44. Magrioti, V.; Kokotos, G. Phospholipase A₂ inhibitors for the treatment of inflammatory diseases: A patent review (2010-present). *Exp. Opin. Ther. Pat.* **2013**, *3*, 333-344.
 45. Webb, N. R.; Bostrom, M. A.; Szilvassy, S. J.; van der Westhuyzen, D. R.; Daugherty, A.; de Beer, F. C. Macrophage-expressed group IIA secretory phospholipase A₂ increases atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2003**, *23*, 263-268.

-
46. Bostrom, M. A.; Boyanovsky, B. B.; Jordan, C. T.; Wadsworth, M. P.; Taatjes, D. J.; de Beer, F. C.; Webb, N. R. Group V secretory phospholipase A2 promotes atherosclerosis: evidence from genetically altered mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2007**, *27*, 600-606.
 47. Boilard, E.; Lai, Y.; Larabee, K.; Balestrieri, B.; Ghomashchi, F.; Fujioka, D.; Gobezie, R.; Coblyn, J. S.; Weinblatt, M. E.; Massarotti, E. M.; Thornhill, T. S.; Divangahi, M.; Remold, H.; Lambeau, G.; Gelb, M. H.; Arm, J. P.; Lee, D. M. A novel anti-inflammatory role for secretory phospholipase A2 in immune complex-mediated arthritis. *EMBO Mol. Med.* **2010**, *2*, 172-187.
 48. Seilhamer, J. J.; Pruzanski, W.; Vadas, P.; Plant, S.; Miller, J. A.; Kloss, J.; Johnson, L. K. Cloning and recombinant expression of phospholipase A2 present in rheumatoid arthritic synovial fluid. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 5335-5338.
 49. Meek, R. L.; Urieli-Shoval, S.; Benditt, E. P. Expression of apolipoprotein serum amyloid A mRNA in human atherosclerotic lesions and cultured vascular cells: implications for serum amyloid A function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 3186-3190.
 50. Sullivan, C. P.; Seidl, S. E.; Rich, C. B.; Raymondjean, M.; Schreiber, B. M. Secretory phospholipase A₂ group IIA is a novel serum amyloid A target gene. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 565-575.
 51. Tietge, U. J.; Maugeais, C.; Cain, W.; Grass, D.; Glick, J. M.; de Beer, F. C.; Rader, D. J. Overexpression of secretory phospholipase A2 causes rapid catabolism and altered tissue uptake of high density lipoprotein cholesteryl ester and apolipoprotein A-I. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 10077-10084.
 52. Tietge, U. J.; Maugeais, C.; Lund-Katz, S.; Grass, D.; deBeer, F. C.; Rader, D. J. Human secretory phospholipaseA2 mediates decreased plasma levels of HDL cholesterol and ApoA-I in response to

-
- inflammation in human ApoA-I transgenic mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2002**, *22*, 1213-1218.
53. de Beer, F. C.; de Beer, M. C.; van der Westhuyzen, D. R.; Castellani, L. W.; Lusic, A. J.; Swanson, M. E.; Grass, D. S. Secretory non-pancreatic phospholipase A₂: influence on lipoprotein metabolism. *J. Lipid Res.* **1997**, *38*, 2232-2239.
54. Ivandic, B.; Castellani, L. W.; Wang, X. P.; Qiao, J. H.; Mehrabian, M.; Navab, M.; Fogelman, A. M.; Grass, D. S.; Swanson, M. E.; de Beer, M. C.; de Beer, F.; Lusic, A. J. Role of group II secretory phospholipase A₂ in atherosclerosis. 1. Increased atherogenesis and altered lipoproteins in transgenic mice expressing group IIa phospholipase A₂. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **1999**, *19*, 1284-1290.
55. Cavigiolo, G.; Jayaraman, S. Proteolysis of apolipoprotein A-I by secretory phospholipase A₂: A new link between inflammation and atherosclerosis. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 10011-10023.
56. Libby, P.; Ridker, P. M.; Maseri, A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* **2002**, *105*, 1135-1143.
57. Goodson, N. Coronary artery disease and rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **2002**, *14*, 115-120.
58. Mallat, Z.; Benessiano, J.; Simon, T.; Ederhy, S.; Sebella-Arguelles, C.; Cohen, A.; Huart, V.; Wareham, N. J.; Luben, R.; Khaw, K. T.; Tedgui, A.; Boekholdt, S. M. Circulating secretory phospholipase A₂ activity and risk of incident coronary events in healthy men and women: The EPIC-NORFOLK study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Bio.* **2007**, *27*, 1177-1183.
59. Liu, P. Y.; Li, Y. H.; Tsai, W. C.; Chao, T.-H.; Tsai, L.-M.; Wu, H.-L.; Chen, J.-H. Prognostic value and the changes of plasma levels of secretory type II phospholipase A₂ in patients with coronary artery disease undergoing percutaneous coronary intervention. *Eur. Heart J.* **2003**, *24*, 1824-1832.

-
60. Koenig, W.; Vossen, C. Y.; Mallat, Z.; Brenner, H.; Benessiano, J.; Rothenbacher, D. Association between type II secretory phospholipase A₂ plasma concentrations and activity and cardiovascular events in patients with coronary heart disease. *Eur. Heart J.* **2009**, *30*, 2742-2748.
 61. Hui, D. Y. Phospholipase A₂ enzymes in metabolic and cardiovascular diseases. *Curr. Opin. Lipidol.* **2012**, *23*, 235-240.
 62. Schwartz, G. G.; Olsson, A. G.; Abt, M.; Ballantyne, C. M.; Barter, P. J.; Brumm, J.; Chaitman, B. R.; Holme, I. M.; Kallend, D.; Letter, L. A.; Leitersdorf, E.; McMurray, J. J. V.; Mundi, H.; Nicholls, S. J.; Shah, P. K.; Tardif, J. C.; Wright, R. S. Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *367*, 2089-2099.
 63. Nicholls, S. J.; Kastelein, J. J.; Schwartz, G. G. VISTA-16 Investigators. Varespladib and cardiovascular events in patients with an acute coronary syndrome: the VISTA-16 randomized clinical trial. *JAMA* **2014**, *311*, 252-562.
 64. Nicholls, S. J.; Pisaniello, A. D.; Kataoka, Y.; Puri, R. Lipid pharmacotherapy for treatment of atherosclerosis. *Expert Opin. Pharmacother.* **2014**, *15*, 1119-1125.
 65. Weinrauch, Y.; Elsbach, P.; Madsen, L. M.; Foreman, A.; Weiss, J. The potent anti-Staphylococcus aureus activity of a sterile rabbit inflammatory fluid is due to a 14-kD phospholipase A₂. *J. Clin. Invest.* **1996**, *97*, 250-257.
 66. Balestrieri, B.; Maekawa, A.; Xing, W.; Gelb, M. H.; Katz, H. R.; Arm, J. P. Group V secretory phospholipase A₂ modulates phagosome maturation and regulates the innate immune response against *Candida albicans*. *J. Immunol.* **2009**, *182*, 4891-4898.
 67. Leung, S. Y.; Chen, X.; Chu, K. M.; Yuen, S. T.; Mathy, J.; Ji, J.; Chan, A. S.; Li, R.; Law, S.; Troyanskaya, O. G.; Tu, I. P.; Wong, J.; So, S.; Botstein, D.; Brown, P. O. Phospholipase A₂ group IIA expression in

-
- gastric adenocarcinoma is associated with prolonged survival and less frequent metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *99*, 16203-16208.
68. Mulherkar, R.; Kirtane, B. M.; Ramchandani, A.; Mansukhani, N. P.; Kannan, S.; Naresh, K. N. Expression of enhancing factor/phospholipase A2 in skin results in abnormal epidermis and increased sensitivity to chemical carcinogenesis. *Oncogene* **2003**, *22*, 1936-1944.
69. Jiang, J.; Neubauer, B. L.; Graff, J. R.; Chedid, M.; Thomas, J. E.; Roehm, N. W.; Zhang, S.; Eckert, G. J.; Koch, M. O.; Eble, J. N.; Cheng, L. Expression of group IIA secretory phospholipase A2 is elevated in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma. *Am. J. Pathol.* **2002**, *160*, 667-671.
70. Yamashita, S.; Yamashita, J.; Ogawa, M. Overexpression of group II phospholipase A2 in human breast cancer tissues is closely associated with their malignant potency. *Br. J. Cancer* **1994**, *69*, 1166-70.
71. Takayama, K.; Hara, S.; Kudo, I.; Inoue, K. Detection of 14-kDa group II phospholipase A2 in human seminal plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *178*, 1505-1511.
72. Masuda, S.; Murakami, M.; Matsumoto, S.; Eguchi, N.; Urade, Y.; Lambeau, G.; Gelb, M. H.; Ishikawa, Y.; Ishii, T.; Kudo, I. Localization of various secretory phospholipase A₂ enzymes in male reproductive organs. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1686*, 61-76.
73. Fleming, A. D.; Yanagimachi, R. Evidence suggesting the importance of fatty acids and the fatty acid moieties of sperm membrane phospholipids in the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. *J. Exp. Zool.* **1984**, *229*, 485-489.
74. Fluhr, J. W.; Kao, J.; Jain, M.; Ahn, S. K.; Feingold, K. R.; Elias, P. M. Generation of free fatty acids from phospholipids regulates stratum corneum acidification and integrity. *J. Invest. Dermatol.* **2001**, *117*, 44-51.

-
75. Dusko, I.; Bollinger, J. M.; Gelb, M.; Mauro, T. M. sPLA₂ and the epidermal barrier. *Biochimica et Biophysica Acta* **2014**, *1841*, 416-421.
 76. Grass, D. S.; Felkner, R. H.; Chiang, M. Y.; Wallace, R. E.; Nevalainen, T. J.; Bennett, C. F.; Swanson, M. E. Expression of human group II PLA₂ in transgenic mice results in epidermal hyperplasia in the absence of inflammatory infiltrate. *J. Clin. Invest.* **1996**, *97*, 2233-2241.
 77. Haas, U.; Podda, M.; Behne, M.; Gurrieri, S.; Alonso, A.; Furstenberger, G.; Pfeilschifter, J.; Lambeau, G.; Gelb, M. H.; Kaszkin, M. Characterization and differentiation-dependent regulation of secreted phospholipases A₂ in human keratinocytes and in healthy and psoriatic human skin. *J. Invest. Dermatol.* **2005**, *124*, 204-211.
 78. Munoz, N. M.; Meliton, A. Y.; Arm, J. P.; Bonventre, J. V.; Cho, W.; Leff, A. R. Deletion of secretory group V phospholipase A₂ attenuates cell migration and airway hyperresponsiveness in immunosensitized mice. *J. Immunol.* **2007**, *179*, 4800-4807.
 79. Masuda, S.; Murakami, M.; Mitsuishi, M.; Komiyama, K.; Ishikawa, Y.; Ishii, T.; Kudo, I. Expression of secretory phospholipase A₂ enzymes in lungs of humans with pneumonia and their potential prostaglandin-synthetic function in human lung-derived cells. *Biochem. J.* **2005**, *387*, 27-38.
 80. Hallstrand, T. S.; Chi, E. Y.; Singer, A. G.; Gelb, M. H.; Henderson, W. R. Jr. Secreted phospholipase A₂ group X overexpression in asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2007**, *176*, 1072-1078.
 81. Henderson, W. R. Jr.; Chi, E. Y.; Bollinger, J. G.; Tien, Y. T.; Ye, X.; Castelli, L.; Rubtsov, Y. P.; Singer, A. G.; Chiang, G. K.; Nevalainen, T.; Rudensky, A. Y.; Gelb, M. H. Importance of group X-secreted phospholipase A₂ in allergen-induced airway inflammation and remodeling in a mouse asthma model. *J. Exp. Med.* **2007**, *204*, 865-877.

-
82. Munoz, N. M.; Meliton, A. Y.; Meliton, L. N.; Dudek, S. M.; Leff, A. R. Secretory group V phospholipase A2 regulates acute lung injury and neutrophilic inflammation caused by LPS in mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2009**, *296*, L879-L887.
 83. Dong, Z.; Meller, J.; Succop, P.; Wang, J.; Wikenheiser-Brokamp, K.; Starnes S.; Lu, S. Secretory phospholipase A2-IIa upregulates HER/HER2-elicited signaling in lung cancer cells. *Int. J. Oncol.* **2014**, *45*, 978-984.
 84. Baselga, J.; Swain, S. M. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 463-75.
 85. Hayden, M. S.; Ghosh, S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* **2008**, *132*, 344-62.
 86. Yamamoto, K.; Isogai, Y.; Sato, H.; Taketomi, Y.; Murakami, M. Secreted phospholipase A₂, lipoprotein hydrolysis, and atherosclerosis: integration with lipidomics. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *400*, 1829-1842.
 87. Meyer, A. M.; Dwyer-Nield, L. D.; Hurteau, G. J.; Keith, R. L.; O'Leary, E.; You, M.; Bonventre, J. V.; Nemenoff, R. A.; Malkinson, A. M. Decreased lung tumorigenesis in mice genetically deficient in cytosolic phospholipase A2. *Carcinogenesis* **2004**, *25*, 1517-1524.
 88. Bennett, D. T.; Deng, X.-S.; Yu, J. A.; Bell, M. T.; Mauchley, D. C.; Meng, X.; Reece, T. B.; Fullerton, D. A.; Weyant, M. J. Cancer stem cell phenotype is supported by secretory phospholipase A₂ in human lung cancer cells. *Ann. Thorac. Surg.* **2014**, *98*, 439-446.
 89. Masuda, S.; Yamamoto, K.; Hirabayashi, T.; Ishikawa, Y.; Ishii, T.; Kudo, I.; Murakami, M. Human group III secreted phospholipase A₂ promotes neuronal outgrowth and survival. *Biochem. J.* **2008**, *409*, 429-438.
 90. Nakashima, S.; Kitamoto, K.; Arioka, M. The catalytic activity, but not receptor binding, of sPLA₂s plays a critical role for neurite outgrowth induction in PC12 cells. *Brain Res.* **2004**, *1015*, 207-211.

-
91. Yagami, T.; Yamamoto, Y.; Koma, H. The role of secretory phospholipase A₂ in the central nervous system and neurological diseases. *Mol. Neurobiol.* **2014**, *49*, 863-876.
 92. Matsuzawa, A.; Murakami, M.; Atsumi, G.; Imai, K.; Prados, P.; Inoue, K.; Kudo, I. Release of secretory phospholipase A₂ from rat neuronal cells and its possible function in the regulation of catecholamine secretion. *Biochem. J.* **1996**, *318*, 701-709.
 93. Yagami, T.; Ueda, K.; Asakura, K.; Hayasaki-Kajiwara, Y.; Nakazato, H.; Sakaeda, T.; Hata, S.; Kuroda, T.; Takasu, N.; Hori, Y. Group IB secretory phospholipase A₂ induces neuronal cell death via apoptosis. *J. Neurochem.* **2002**, *81*, 449-461.
 94. Farooqui, A. A.; Ong, W. Y.; Horrocks, L. A. Inhibitors of brain phospholipase A₂ activity: their neuropharmacological effects and therapeutic importance for the treatment of neurologic disorders. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58*, 591-620.
 95. Bradley, J. D.; Dmitrienko, A. A.; Kivitz, A. J.; Gluck, O. S.; Weaver, A. L.; Wiesenhutter, C.; Myers, S. L.; Sides, G. D. A randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial of LY333013, a selective inhibitor of group II secretory phospholipase A₂, in the treatment of rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **2005**, *32*, 417-423.
 96. Lapointe, S.; Brkovic, A.; Cloutier, I.; Tanguay, J. F.; Arm, J. P.; Sirois, M. G. Group V secreted phospholipase A₂ contributes to LPS-induced leukocyte recruitment. *J. Cell Physiol.* **2010**, *224*, 127-134.
 97. Chen, J.; Engle, S. J.; Seilhamer, J. J.; Tischfield, J. A. Cloning and recombinant expression of a novel human low molecular weight Ca²⁺-dependent phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 2365-2368.
 98. Masuda, S.; Murakami, M.; Ishikawa, Y.; Ishii, T.; Kudo, I. Diverse cellular localizations of secretory phospholipase A₂ enzymes in several human tissues. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1736*, 200-210.

-
99. Yano, T.; Fujioka, D.; Saito, Y.; Kobayashi, T.; Nakamura, T.; Obata, J. E.; Kawabata, K.; Watanabe, K.; Watanabe, Y.; Mishina, H.; Tamaru, S.; Kugiyama, K. Group V secretory phospholipase A2 plays a pathogenic role in myocardial ischaemiareperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* **2011**, *90*, 335-343.
100. Barish, G. D.; Atkins, A. R.; Downes, M.; Olson, P.; Chong, L. W.; Nelson, M.; Zou, Y.; Hwang, H.; Kang, H.; Curtiss, L.; Evans, R. M.; Lee, C. H. PPAR δ regulates multiple proinflammatory pathways to suppress atherosclerosis. *PNAS* **2008**, *105*, 4271-4276.
101. Namgaladze, D.; Morbitzer, D.; von Knethen, A.; Brune, B. Phospholipase A2-modified low-density lipoprotein activates macrophage peroxisome proliferator-activated receptors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2010**, *30*, 313-320.
102. Bryant, K. J.; Bidgood, M. J.; Lei, P. W.; Taberner, M.; Salom, C.; Kumar, V.; Lee, L.; Church, W. B.; Courtenay, B.; Smart, B. P.; Gelb, M. H. Cahill, M. A.; Graham, G. G.; McNeil, H. P.; Scott, K. F. A bifunctional role for group IIA secreted phospholipase A₂ in human rheumatoid fibroblast-like synoviocyte arachidonic acid metabolism. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 2492-2503.
103. von Allmen, C. E.; Schmitz, N.; Bauer, M.; Hinton, H. J.; Kurrer, M. O.; Buser, R. B.; Gwerder, M.; Muntwiler, S.; Sparwasser, T.; Beerli, R. R.; Bachmann, M. F. (2009) Secretory phospholipase A₂-IID is an effector molecule of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 11673-11678.
104. www.rcsb.org
105. Murakami, M.; Taketomi, Y.; Girard, C.; Yamamoto, K.; Lambeau, G. Emerging roles of secreted phospholipase A2 enzymes: Lessons from transgenic and knockout mice. *Biochimie* **2010**, *92*, 561-582.
106. Edwards, S. H.; Thompson, D.; Baker, S. F.; Wood, S. P.; Wilton, D. C. The crystal structure of the H48Q active site mutant of human group IIA

-
- secreted phospholipase A₂ at 1.5 Å resolution provides an insight into the catalytic mechanism. *Biochemistry* **2002**, *41*, 15468-15476.
107. Jain, M. K.; Berg, O. G. Coupling of the i-face and the active site of phospholipase A₂ for interfacial activation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 473-479.
108. Draheim, S. E.; Bach, N. J.; Dillard, R. D.; Berry, D. R.; Carlson, D. G.; Chirgadze, N. Y.; Clawson, D. K.; Hartley, L. W.; Johnson, L. M.; Jones, N. D.; McKinney, E. R.; Mihelich, E. D.; Olkowski, J. L.; Schevitz, R. W.; Smith, A. C.; Snyder, D. W.; Sommers, C. D.; Wery, J.-P. Indole inhibitors of human nonpancreatic secretory phospholipase A₂. 3. Indole-3-glyoxamides. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 5159-5175.
109. Smart, B. P.; Oslund, R. C.; Walsh, L. A.; Gelb, M. H. The first potent inhibitor of mammalian group X secreted phospholipase A₂: Elucidation of sites for enhanced binding. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2858-2860.
110. Oslund, R. C.; Cermak, N.; Gelb, M. H. Highly specific and broadly potent inhibitors of mammalian secreted phospholipase A₂. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4708-4714.
111. Beaton, H. G.; Bennion, C.; Connolly, S.; Cook, A. R.; Gensmantel, N. P.; Hallam, C.; Hardy, K.; Hitchin, B.; Jackson, C. G.; Robinson, D. H. Discovery of new non-phospholipid inhibitors of the secretory phospholipases A₂. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 557-559.
112. Cha, S. S.; Lee, D.; Adams, J.; Kurdyla, J. T.; Jones, C. S.; Marshall, L. A.; Bolognese, B.; Abdel-Meguid, S. S.; Oh, B. H. High-resolution X-ray crystallography reveals precise binding interactions between human nonpancreatic secreted phospholipase A₂ and a highly potent inhibitor (FPL67047XX). *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3878-3881.
113. Hansford, K. A.; Reid, R. C.; Clark, C. I.; Tyndall, J. D. A.; Whitehouse, M. W.; Guthrie, T.; McGeary, R. P.; Schafer, K.; Martin, J. L.; Fairlie, D. P. D-Tyrosine as a chiral precursor to potent inhibitors of human

-
- nonpancreatic secretory phospholipase A₂ (IIa) with antiinflammatory activity. *ChemBioChem* **2003**, *4*, 181-185.
114. Antonopoulou, G.; Barbayianni, E.; Magrioti, V.; Cotton, N.; Stephens, D.; Constantinou-Kokotou, V.; Dennis, E. A.; Kokotos, G. Structure-activity relationships of natural and non-natural amino acid-based amide and 2-oxoamide inhibitors of human phospholipase A₂ enzymes. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 10257-10269.
115. Kokotos, G.; Six, D. A.; Loukas, V.; Smith, T.; Constantinou-Kokotos, V.; Hadjipavlou-Litina, D.; Kotsovolou, S.; Chiou, A.; Beltzner, C. C.; Dennis, E. A. Inhibition of group IVA cytosolic phospholipase A₂ by novel 2-oxoamides in vitro, in cells and in vivo. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3615-3628.
116. Stephens, D.; Barbayianni, E.; Constantinou-Kokotou, V.; Peristeraki, A.; Six, D. A.; Cooper, J.; Harkewicz, R.; Deems, R. A.; Dennis, E. A.; Kokotos, G. Differential inhibition of group IVA and group VIA phospholipases A₂ by 2-oxoamides. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2821-2828.
117. Six, D. A.; Barbayianni, E.; Loukas, V.; Constantinou-Kokotou, V.; Hadjipavlou-Litina, D.; Stephens, D.; Wong, A. C.; Magrioti, V.; Moutevelis-Minakakis, P.; Baker, S. F.; Dennis, E. A.; Kokotos, G. Structure-activity relationship of 2-oxoamide inhibition of group IVA cytosolic phospholipase A₂ and group V secreted phospholipase A₂. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 4222-4235.
118. Mouchlis, V. D.; Magrioti, V.; Barbayianni, E.; Cermak, N.; Oslund, R. C.; Mavromoustakos, T. M.; Gelb, M. H.; Kokotos, G. Inhibition of secreted phospholipase A₂ by 2-oxoamides based on α -amino acids: Synthesis, in vitro evaluation and molecular docking calculations. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 735-743.
119. Sulkowski, M. S. Specific targeted antiviral therapy for hepatitis C. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **2007**, *9*, 5-13.

-
120. Steuer, C.; Gege, C.; Fischl, W.; Heinonen, K. H.; Bartenschlager, R.; Klein, C. D. Synthesis and biological evaluation of α -ketoamides as inhibitors of the Dengue virus protease with antiviral activity in cell-culture. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 4067-4074.
121. Ogilvie, W.; Bailey, M.; Poupart, M. A.; Abraham, A.; Bhavsar, A.; Bonneau, P.; Bordeleau, J.; Bousquet, Y.; Chabot, C.; Duceppe, J. S.; Fazal, G.; Goulet, S.; Grand-Maître, C.; Guse, I.; Halmos, T.; Lavallée, P.; Leach, M.; Malenfant, E.; O'Meara, J.; Plante, R.; Plouffe, C.; Poirier, M.; Soucy, F.; Yoakim, C.; Déziel, R. Peptidomimetic inhibitors of the human cytomegalovirus protease. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 4113-4135.
122. Koutek, B.; Prestwich, G. D.; Howlett, A. C.; Chin, S. A.; Salehani, D.; Akhavan, N.; Deutsch, D. G. Inhibitors of arachidonoyl ethanolamide hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 22937-22940.
123. Deutsch, D. G.; Omeir, R.; Arreaza, G.; Salehani, D.; Prestwich, G. D.; Huang, Z.; Howlett, A. Methyl arachidonoyl fluorophosphonate: a potent irreversible inhibitor of anandamide amidase. *Biochem. Pharmacol.* **1997**, *53*, 255-260.
124. Bisogno, T.; Melck, D.; Depetrocellis, L.; Bobrov, M. Y.; Gretskaya, N. M.; Bezuglov, V. V.; Sitachitta, N.; Gerwick W. H.; DiMarzo, V. Arachidonoylserotonin and other novel inhibitors of fatty acid amide hydrolase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *248*, 515-522.
125. Boger, D. L.; Sato, H.; Lerner, A. E.; Austin, B. J.; Patterson, J. E.; Patricelli, M. P.; Cravatt, B. F. Trifluoromethyl ketone inhibitors of fatty acid amide hydrolase: A probe of structural and conformational features contributing to inhibition. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 265-270.
126. Boger, D. L.; Sato, H.; Lerner, A. E.; Hedrick, M. P.; Fecik, R. A.; Miyauchi, H.; Wilkie, G. D.; Austin, B. J.; Patricelli, M. P.; Cravatt, B. F. Exceptionally potent inhibitors of fatty acid amide hydrolase: The enzyme responsible for degradation of endogenous oleamide and anandamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**, *97*, 5044-5049.

-
127. De Petrocellis, L.; Melck, D.; Ueda, N.; Maurelli, S.; Kurahashi, Y.; Yamamoto, S.; Marino, G.; Di Marzo, V. Novel inhibitors of brain, neuronal, and basophilic anandamide amidohydrolase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *231*, 82-88.
128. Vandevorde, S.; Tsuboi, K.; Ueda, N.; Jonsson, K. O.; Fowler, C. J.; Lambert, D. M.; Deutsch, D. G.; Uedaand, N.; Yamamoto, S. Esters, retroesters, and a retroamide of palmitic acid: Pool for the first selective inhibitors of N-palmitoylethanolamine- selective acid amidase. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4373-4376.
129. Slee, D. H.; Laslo, K. L.; Elder, J. H.; Ollmann, I. R.; Wlodower, A.; Wong, C.-H. Selectivity in the inhibition of HIV and FIV protease: inhibitory and mechanistic studies of pyrrolidinecontaining α -keto amide and hydroxyethylamine core structures. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 11867-11878.
130. Simmons, J.-W.; Cox, R. C.; Egmond, M. R.; Verheij, H. M. Rational design of α -keto triglyceride analogues as inhibitors for *Staphylococcus hyicus* lipase. *Biochemistry* **1999**, *38*, 6346-6351.
131. Chiou, A.; Markidis, T.; Constantinou-Kokotou, V.; Verger, R.; Kokotos, G. Synthesis and study of a lipophilic α -keto amide inhibitor of pancreatic lipase. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 347-350.
132. Mandadapu, S. R.; Weerawarna, P. M.; Gunnam, M. R.; Alliston, K. R.; Lushington, G. H.; Kim, Y.; Chang, K. O.; Groutas, W. C. Potent inhibition of norovirus 3CL protease by peptidyl α -ketoamides and α -ketoheterocycles. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 4820-4826.
133. Choe, Y.; Brinen, L. S.; Price, M. S.; Engel, J. C.; Lange, M.; Grisostomi, C.; Weston, S. G.; Pallai, P. V.; Cheng, H.; Hardy, L. W.; Hartsough, D. S.; McMakin, M.; Tilton, R. F.; Baldino, C. M.; Craik, C. S. Development of α -keto-based inhibitors of cruzain, a cysteine protease implicated in Chagas disease. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 2141-2156.

-
134. Han, W.; Hu, Z.; Jiang, X.; Decicco, C. P. Alpha-ketoamides, alpha-ketoesters and alpha-diketones as HCV NS3 protease inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 711-713.
135. Bennett, J. M.; Campbell, A. D.; Campbell, A. J.; Carr, M. G.; Dunsdon, R. M.; Greening, J. R.; Hurst, D. N.; Jennings, N. S.; Jones, P. S.; Jordan, S.; Kay, P. B.; O'Brien, M. A.; King-Underwood, J.; Raynham, T. M.; Wilkinson, C. S.; Wilkinson, T. C.; Wilson, F. X. The identification of alpha-ketoamides as potent inhibitors of hepatitis C virus NS3-4A proteinase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 355-357.
136. Arasappan, A.; Njoroge, F. G.; Parekh, T. N.; Yang, X.; Pichardo, J.; Butkiewicz, N.; Prongay, A.; Yao, N.; Girijavallabhan, V. Novel 2-oxoimidazolidine-4-carboxylic acid derivatives as hepatitis C virus NS3-4A serine protease inhibitors: synthesis, activity and X-ray crystal structure of an enzyme inhibitor complex. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5751-5755.
137. Bogen, S. L.; Pan, W.; Ruan, S.; Nair, L. G.; Arasappan, A.; Bennett, F.; Chen, K. X.; Jao, E.; Venkatraman, S.; Vibulbhan, B.; Liu, R.; Cheng, K. C.; Guo, Z.; Tong, X.; Saksena, A. K.; Girijavallabhan, V.; Njoroge, F. G. Toward the back-up of boceprevir (SCH 503034): discovery of new extended P4-capped ketoamide inhibitors of hepatitis C virus NS3 serine protease with improved potency and pharmacokinetic profiles. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3679-3688.
138. Tsuda, M.; Muraoka, Y.; Nagai, M.; Aoyagi, T.; Takeuchin, T. Poststatin a new inhibitor of prolyl endopeptidase V. Endopeptidase inhibitory activity of poststatin analogues. *J. Antibiot.* **1996**, *49*, 890-899.
139. Tsuda, M.; Muraoka, Y.; Nagai, M.; Aoyagi, T.; Takeuchin, T. Poststatin a new inhibitor of prolyl endopeptidase VIII. Endopeptidase inhibitory activity of non-peptidyl poststatin analogues. *J. Antibiot.* **1996**, *49*, 1022-1030.

-
140. Wasserman, H. H.; Petersen, A. K. Synthesis of the cyclic peptidic protease inhibitor eurystatin A using acyl cyano phosphorane methodology. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8972-8973.
141. Kaneko, I.; Fearon, D. T.; Austen, K. F. Inhibition of the alternative pathway of human complement *in vitro* by a natural microbial product, complestatin. *J. Immunol.* **1980**, *124*, 1194-1198.
142. Kaneko, I.; Kamoshida, K.; Takahashi, S. Complestatin, a potent anti-complement substance produce by *Streptomyces lavendulae* I. Fermentation, isolation and biological characterization. *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 236-241.
143. Matsuzaki, K.; Ikeda, H.; Ogino, T.; Matsumoto, A.; Woodruff, H. B.; Tanaka, H.; Omura, S. Chlorozeptins I and II, novel inhibitors against gp 120-CD4 binding from *Streptomyces sp.* *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 1173-1174.
144. Gouda, H.; Matsuzaki, K.; Tanaka, H.; Hirono, S.; Omura, S.; McCauley, J. A.; Sprengeler, P. A.; Furst, G. T.; Smith, A. B. Stereostructure of (-)-Chlorozeptin I, a novel inhibitor of gp120-CD4 binding, via high-temperature molecular dynamics, Monte Carlo conformational searching, and NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 13087-13088.
145. Bierer, B. E.; Somers, P. K.; Wandless, T. J.; Burakoff, S. J.; Schreiber, S. L. Probing immunosuppressant action with a non-natural immunophilin ligand. *Science* **1990**, *250*, 556-559.
146. Li, J.; Chen, G.; Webster, J. M. Synthesis and antistaphylococcal activity of nematophin and its analogs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 1349-1352.
147. Jones, D. M.; Atrash, B.; Teger-Nilsson, A.-C.; Gyzander, E.; Deinum, J.; Szelke, M. Design and synthesis of thrombin inhibitors. *Lett. Pept. Sci.* **1995**, *2*, 147-154.

-
148. Lubisch, W.; Beckenbach, E.; Bopp, S.; Hofmann, H.-P.; Kartal, A.; Kaestel, C.; Lindner, T.; Metz-Garrecht, M.; Reeb, J.; Regner, F.; Vierling, M.; Moeller, A. Benzoylalanine-derived ketoamides carrying vinylbenzyl amino residues: discovery of potent water-soluble calpain inhibitors with oral bioavailability. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2404-2412.
149. Adang, A. E. P.; de Man, A. P. A.; Vogel, G. M. T.; Grootenhuis, P. D. J.; Smit, M. J.; Peters, C. A. M.; Visser, A.; Rewinkel, J. B. M.; van Dinther, T.; Lucas, H.; Kelder, J.; van Aelst, S.; Meuleman, D. G.; van Boeckel, C. A. A. Unique overlap in the prerequisites for thrombin inhibition and oral bioavailability resulting in potent oral anti-thrombotics. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4419-4432.
150. Ocaint, T. D.; Rich, D. H. α -Keto amide inhibitors of aminopeptidases. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 451-456.
151. Harbeson, S. L.; Abelleira, S. M.; Akiyama, A.; Barrett, R.; Carroll, R. M.; Straub, J. N.; Tkacz, J. N.; Wu, C.; Musso, G. F. Stereospecific synthesis of peptidyl α -keto amides as inhibitors of calpain. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2918-2929.
152. Umezawa, H.; Aoyagi, T.; Suda, H.; Hamada, M.; Takeuchi, T. Bestatin, an inhibitor of aminopeptidase B, produced by actinomycetes. *J. Antibiot.* **1976**, *29*, 97-99.
153. Yuan, W.; Munoz, B.; Wong, C. H. Development of selective tight-binding inhibitors of leukotriene A₄ hydrolase. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 211-220.
154. Schmidt, E. W.; Raventos-Suarez, C.; Bifano, M.; Menendez, A. T.; Fairchild, C. R.; Faulkner, D. J. Scleritodermin A, a cytotoxic cyclic peptide from the lithistid sponge *Scleritoderma nodosum*. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 475-478.
155. Sellanes, D.; Campot, F.; Núñez, I.; Lin, G.; Espósito, P.; Dematteis, S.; Saldaña, J.; Domínguez, L.; Manta, E.; Serra, G. Preparation and

-
- biological evaluation of key fragments and open analogs of scleritodermin A. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 5384-5395.
156. Bacher, G.; Beckers, T.; Emig, P.; Klenner, T.; Kutscher, B.; Nickel, B. New small-molecule tubulin inhibitors. *Pure Appl. Chem.* **2001**, *73*, 1459-1464.
157. Bacher, G.; Nickel, B.; Emig, P.; Vanhoefer, U.; Seeber, S.; Shandra, A.; Klenner, T.; Beckers, T. D-24851, a novel synthetic microtubule inhibitor, exerts curative antitumoral activity *in vivo*, shows efficacy toward multidrug-resistant tumor cells, and lacks neurotoxicity. *Cancer Research* **2001**, *61*, 392-399.
158. Kormarnitsky, P.; Lapierre, L.; Wallner, B.; Goldenring, J. Indibulin (ZIO-301): An orally active tubulin polymerization inhibitor with a unique molecular mechanism of action. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, B276.
159. Kuppens, I. E. L. M.; Witteveen, P. O.; Schot, M.; Schuessler, V. M.; Daehling, A.; Beijnen, J. H.; Voest, E. E.; Schellens, J. H. M. Phase I dose-finding and pharmacokinetic trial of orally administered indibulin (D-24851) to patients with solid tumors. *Invest New Drugs* **2007**, *25*, 227-235.
160. Dawson, S.; Dawson, A.; Marinzi, C.; Dawson, P. E. Anti-tumor promoting effects of palmitoyl: protein thioesterase inhibitors against a human neurotumor cell line. *Cancer Letters* **2002**, *187*, 163-168.
161. Zhang, H.; Johnson, P. Inhibition of calpaina by calmidazolium and calpastatin. *J. Enzyme Znhib.* **1988**, *2*, 163-166.
162. Johnson, P.; Hammer, J. L. Inhibitory effects of spermine and spermidme on muscle calpain II. *Experientia* **1990**, *46*, 276-278.
163. Hu, L. Y.; Abeles, R. H. Inhibition of cathepsin B and papain by peptidyl α -keto ester, α -keto amides, α -diketones, and α -keto acids. *Arch. Biochem. Biophys.* **1990**, *281*, 271-274.

-
164. Li, Z.; Pati, G. S.; Golubski, Z. E.; Hori, H.; Tehrani, K.; Foreman, J. E.; Eveleth, D. D.; Bartus, R. T.; Powers, J. C. Peptide α -keto ester, α -keto amide, and α -keto acid inhibitors of calpains and other cysteine proteases. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3472-3480.
165. Scott, D. L.; White, S. P.; Otwinoweki, Z.; Yuan, W.; Gelb, M. H.; Sigle, P. B. Interfacial catalysis; The mechanism of phospholipase A₂. *Science* **1990**, *250*, 1541-1546.
166. Harbeson, S. L.; Abelleira, S. M.; Akiyama, A.; Barrett, R.; Carroll, R. M.; Straub, J. A.; Tkacz, J. N.; Wu, C.; Musso, G. F. Stereospecific synthesis of peptidyl α -keto amides as inhibitors of calpain. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2918-2929.
167. Li, Z.; Ortega-Vilain, A. C.; Patil, G. S.; Chu, D. L.; Foreman, J. E.; Eveleth, D. D.; Powers, J. C. Novel peptidyl α -keto amide inhibitors of calpains and other cysteine proteases. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4089-4098.
168. Chatterjee, S.; Dunn, D.; Tao, M.; Wells, G.; Gu, Z. Q.; Bihovsky, R.; Ator, M. A.; Siman, R.; Mallamo, J. P. Pz-achiral, P'-extended α -ketoamide inhibitors of calpain I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2371-2374.
169. Donkor, I. O.; Han, J.; Zheng, X. Design, synthesis, molecular modeling studies, and calpain inhibitory activity of novel α -ketoamides incorporating polar residues at the P1'-position. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 72-79.
170. Bihovsky, R.; Tao, M.; Mallamo, J. P.; Wells, G. J. 1,2-Benzothiazine 1,1-dioxide α -ketoamide analogues as potent calpain I inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1035-1038.
171. Lescop, C.; Herzner, H.; Siendt, H.; Bolliger, R.; Henneböhle, M.; Weyermann, P.; Briguët, A.; Courdier-Fruh, I.; Erb, M.; Foster, M.; Meier, T.; Magyar, J. P.; von Sprecher, A. Novel cell-penetrating α -keto-amide

-
- calpain inhibitors as potential treatment for muscular dystrophy. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 5176-5181.
172. Shirasaki, Y.; Miyashita, H.; Yamaguchi, M. Exploration of orally available calpain inhibitors. Part 3: Dipeptidyl α -ketoamide derivatives containing pyridine moiety. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 5691-5698.
173. Shirasaki, Y.; Miyashita, H.; Yamaguchi, M.; Inoue, J.; Nakamura, M. Exploration of orally available calpain inhibitors: Peptidyl α -ketoamides containing an amphiphile at P3 site. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 4473-4484.
174. Ovat, A.; Li, Z. Z.; Hampton, C. Y.; Asress, S. A.; Fernández, F. M.; Glass, J. D.; Powers, J. C. Peptidyl α -ketoamides with nucleobases, methylpiperazine, and dimethylaminoalkyl substituents as calpain inhibitors. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 6326-6336.
175. Yoo, Y. J.; Nam, D. H.; Jung, S. Y.; Jang, J. W.; Kim, H. J.; Jin, C.; Pae, A. N.; Lee, Y. S. Synthesis of cinnamoyl ketoamides as hybrid structures of antioxidants and calpain inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 2850-2854.
176. Catalano, J. G.; Deaton, D. N.; Long, S. T.; McFadyen, R. B.; Miller, L. R.; Payne, J. A.; Wells-Knecht, K. J.; Wright, L. L. Design of small molecule ketoamide-based inhibitors of cathepsin K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 719-722.
177. Tavares, F. X.; Deaton, D. N.; Miller, L. R.; Wright, L. L. Ketoamide-based inhibitors of cysteine protease, cathepsin K: P3 Modifications. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5057-5068.
178. Tavares, F. X.; Boncek, V.; Deaton, D. N.; Hassell, A. M.; Long, S. T.; Miller, A. B.; Payne, A. A.; Miller, L. R.; Shewchuk, L. M.; Wells-Knecht, K.; Willard, D. H. Jr.; Wright, L. L.; Zhou, H. Q. Design of potent, selective, and orally bioavailable inhibitors of cysteine protease cathepsin K. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 588-599.

-
179. Barrett, D. G.; Catalano, J. G.; Deaton, D. N.; Hassell, A. M.; Long, S. T.; Miller, A. B.; Miller, L. R.; Ray, J. A.; Samano, V.; Shewchuk, L. M.; Wells-Knecht, K. J.; Willard, D. H. Jr.; Wright, L. L. Novel, potent P2–P3 pyrrolidine derivatives of ketoamide-based cathepsin K inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1735-1739.
180. Chen, J. C.; Uang, B. J.; Lyu, P. C.; Chang, J. Y.; Liu, K. J.; Kuo, C. C.; Hsieh, H. P.; Wang, H. C.; Cheng, C. S.; Chang, Y. H.; Chang, M. D. T.; Chang, W. S. W.; Lin C. C. Design and synthesis of α -ketoamides as cathepsin S inhibitors with potential applications against tumor invasion and angiogenesis. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 4545-4549.
181. Montalban, A. G.; Boman, E.; Chang, C. D.; Ceide, S. C.; Dahl, R.; Dalesandro, D.; Delaet, N. G. J.; Erb, E.; Ernst, J. T.; Gibbs, A.; Kahl, J.; Kessler, L.; Lundström, J.; Miller, S.; Nakanishi, H.; Roberts, E.; Saiah, E.; Sullivan, R.; Wang Z.; Larson, C. J. The design and synthesis of novel α -ketoamide-based p38 MAP kinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 1772-1777.
182. Montalban, A. G.; Boman, E.; Chang, C. D.; Ceide, S. C.; Dahl, R.; Dalesandro, D.; Delaet, N. G. J.; Erb, E.; Gibbs, A.; Kahl, J.; Kessler, L.; Lundström, J.; Miller, S.; Nakanishi, H.; Roberts, E.; Saiah, E.; Sullivan, R.; Wang, Z.; Larson, C. J. 'Reverse' α -ketoamide-based p38 MAP kinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5456-5459.
183. Montalban, A. G.; Boman, E.; Chang, C. D.; Ceide, S. C.; Dahl, R.; Dalesandro, D.; Delaet, N. G. J.; Erb, E.; Ernst, J. T.; Gibbs, A.; Kahl, J.; Kessler, L.; Kucharski, J.; Lum, C.; Lundström, J.; Miller, S.; Nakanishi, H.; Roberts, E.; Saiah, E.; Sullivan, R.; Urban, J.; Wang, Z.; Larson, C. J. Optimization of α -ketoamide based p38 inhibitors through modifications to the region that binds to the allosteric site. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 4819-4824.

-
184. Han, J.; Lee, J.-D.; Tobias, P. S.; Ulevitch, R. J. Endotoxin induces rapid protein tyrosine phosphorylation in 70Z/3 cells expressing CD14. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 25009-25014.
185. Gupta, A.; Yong, C.-L.; Madwed, J. B.; Staehle, H.; Wood, C. C. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of single doses of an oral p38 MAP kinase inhibitor (BIRB 796 BS) in healthy human males a placebo-controlled, randomised study, double blinded at each dose level. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2002**, *109*, S67 (A158).
186. Albrecht, B. K.; Williams, R. M. A concise formal total synthesis of TMC-95A/B proteasome inhibitors. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 197-200.
187. Stein, M. L.; Cui, H.; Beck, P.; Dubiella, C.; Voss, C.; Krüger, A.; Schmidt, B.; Groll, M. Systematic comparison of peptidic proteasome inhibitors highlights the α -ketoamide electrophile as an auspicious reversible lead motif. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 1679-1683.
188. Brady, S. F.; Sisko, J. T.; Stauffer, K. J.; Colton, C. D.; Qiu, H.; Lewis, S. D.; Ng, A. S.; Shafer, J. A.; Bogusky, M. J.; Verber, D. F.; Nutt, R. F. Amide and α -keto carbonyl inhibitors of thrombin based on arginine and lysine: Synthesis, stability and biological characterization. *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 1063-1078.
189. Ripka, W.; Brunck, T.; Stanssens, P.; La Roche, Y.; Lauwereys, M.; Lambeir, A. M.; Lasters, I.; DeMaeyer, M.; Vlasuk, G.; Levy, O.; Webb, T.; Pearson, T. D. Strategies in the design of inhibitors of serine proteases of the coagulation cascade-Factor Xa. *Eur. J. Med. Chem.* **1995**, *30*, 87-100.
190. Maryanoff, B. E.; Greco, M. N.; Zhang, H. C.; Andrade-Gordon, P.; Kauffman, J. A.; Nicolaou, K. C.; Liu, A.; Brungs, P. H. Macrocyclic peptide inhibitors of serine proteases. Convergent total synthesis of cyclotheonamides A and B via a late-stage primary amine intermediate. Study of thrombin inhibition under diverse conditions. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1225-1239.

-
191. Maryanoff, B. E.; Zhang, H. C.; Greco, M. N.; Glover, K. A.; Kauffman, J. A.; Andrade-Gordon, P. Cyclotheonamide derivatives: Synthesis and thrombin inhibition. Exploration of specific structure-function issues *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 1025-1038.
192. Fueetani, N.; Matsunaga, S.; Matsumoto, H.; Takebayashi, Y. Cyclotheonamides, potent thrombin inhibitors, from a marine sponge *Theonella sp.* *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7063-7054.
193. Maryanoff, B. E.; Qiu, X.; Padmanabhan, K. P.; Tulinsky, A.; Almond, Jr H. R.; Andrade-Gordon, P.; Greco, M. N.; Kauffman, J. A.; Nicolaou, K. C.; Liu, A.; Brungs, P. H.; Fusetani, N. Molecular basis for the inhibition of human alpha-thrombin by the macrocyclic peptide cyclotheonamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 8048-8052.
194. Håkansson, K.; Tulinsky, A.; Abelman, M. M.; Miller, T. A.; Vlasuk, G. P.; Bergum, P. W.; Lim Wilby, M. S. L.; Brunk, T. K. Crystallographic structure of a peptidyl keto acid inhibitor and human alpha-thrombin. *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 1009-1017.
195. Greco, M. N.; Powell, E. T.; Hecker, L. R.; Andrade-Gordon, P.; Kauffman, J. A.; Lewis, J. M.; Ganesh, V.; Tulinsky, A.; Maryanoff, B. E. Novel thrombin inhibitors that are based on a macrocyclic tripeptide motif. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 2947-2952.
196. Cacciola, J.; Fevig, J. M.; Stouten, P. F. W.; Alexander, R. S.; Knabb, R. M.; Wexler, R. R. Synthesis and activity studies of conformationally restricted α -ketoamide Factor Xa inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1253-1256.
197. Semple, J. E.; Levy, O. E.; Minami, N. K.; Owens, T. D.; Siev, D. V. Novel, potent and selective chimeric FXa inhibitors featuring hydrophobic P1-ketoamide moieties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2305-2309.
198. Beevers, R.; Carr, M. G.; Jones, P. S.; Jordan, S.; Kay, P. B.; Lazell, R. C.; Raynham, T. M. Solution and solid-phase synthesis of potent

-
- inhibitors of hepatitis C virus NS3 proteinase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 641-643.
- 199 Bennett, J. M.; Campbell, A. D.; Campbell, A. J.; Carr, M. G.; Dunsdon, R. M.; Greening, J. R.; Hurst, D. N.; Jennings, N. S.; Jones, P. S.; Jordan, S.; Kay, P. B.; O'Brien, M. A.; King-Underwood, J.; Raynham, T. M.; Wilkinson, C. S.; Wilkinson, T. C. I.; Wilson, F. X. The identification of α -ketoamides as potent inhibitors of hepatitis C virus NS3-4A proteinase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 355-357.
200. Han, W.; Hu, Z.; Jiang, X.; Wasserman, Z. R.; Decicco, C. P. Glycine α -ketoamides as HCV NS3 protease inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1111-1114.
201. Arasappan, A.; Njoroge, F. G.; Parekh, T. N.; Yang, X.; Pichardo, J.; Butkiewicz, N.; Prongay, A.; Yao, N.; Girijavallabhan, V. Novel 2-oxoimidazolidine-4-carboxylic acid derivatives as Hepatitis C virus NS3-4A serine protease inhibitors: synthesis, activity, and X-ray crystal structure of an enzyme inhibitor complex. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5751-5755.
202. Han, W.; Jiang, X.; Hu, Z.; Wasserman, Z. R.; Decicco, C. P. Investigation of glycinea-ketoamide HCV NS3 protease inhibitors: Effect of carboxylic acid isosteres. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3487-3490.
203. Maltais, F.; Jung, Y. C.; Chen, M.; Tanoury, J.; Perni, R. B.; Mani, N.; Laitinen, L.; Huang, H.; Liao, S.; Gao, H.; Tsao, H.; Block, E.; Ma, C.; Shawgo, R. S.; Town, C.; Brummel, C. L.; Howe, D.; Pazhanisamy, S.; Raybuck, S.; Namchuk, M.; Bennani, Y. L. *In vitro* and *in vivo* isotope effects with Hepatitis C protease inhibitors: Enhanced plasma exposure of deuterated telaprevir versus telaprevir in rats. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 7993-8001.
204. Bogen, S. L.; Pan, W.; Ruan, S.; Nair, L. G.; Arasappan, A.; Bennett, F.; Chen, K. X.; Jao, E.; Venkatraman, S.; Vibulbhan, B.; Liu, R.; Cheng, K.

-
- C.; Guo, Z.; Tong, X.; Saksena, A. K.; Girijavallabhan, V.; Njoroge, F. G. Toward the back-up of Boceprevir (SCH 503034): Discovery of new extended P4-capped ketoamide inhibitors of Hepatitis C virus NS3 serine protease with improved potency and pharmacokinetic profiles. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3679-3688.
205. Nair, L. G.; Sannigrahi, M.; Bogen, S.; Pinto, P.; Chen, K. X.; Prongay, A.; Tong, X.; Cheng, K.-C.; Girijavallabhan, V.; Njoroge, F. G. P4 capped amides and lactams as HCV NS3 protease inhibitors with improved potency and DMPK profile. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 567-570.
206. Arasappan, A.; Padilla, A. I.; Jao, E.; Bennett, F.; Bogen, S. L.; Chen, K. X.; Pike, R. E.; Sannigrahi, M.; Soares, J.; Venkatraman, S.; Vibulbhan, B.; Saksena, A. K.; Girijavallabhan, V.; Tong, X.; Cheng, K. C.; Njoroge, F. G. Toward second generation Hepatitis C Virus NS3 serine protease inhibitors: Discovery of novel P4 modified analogues with improved potency and pharmacokinetic profile. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2806-2817.
207. Venkatraman, S.; Velazquez, F.; Wu, W.; Blackman, M.; Madison, V.; Njoroge, F. G. Potent ketoamide inhibitors of HCV NS3 protease derived from quaternized P1 groups. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 2151-2155.
208. Velázquez, F.; Sannigrahi, M.; Bennett, F.; Lovey, R. G.; Arasappan, A.; Bogen, S.; Nair, L.; Venkatraman, S.; Blackman, M.; Hendrata, S.; Huang, Y.; Huelgas, R.; Pinto, P.; Cheng, K. C.; Tong, X.; McPhail, A. T.; Njoroge, F. G. Cyclic sulfones as novel P3-Caps for Hepatitis C Virus NS3/4A(HCV NS3/4A) protease inhibitors: Synthesis and evaluation of inhibitors with improved potency and pharmacokinetic profiles. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 3075-3085.
209. Bondada, L.; Rondla, R.; Pradere, U.; Liu, P.; Li, C.; Bobeck, D.; McBrayer, T.; Tharnish, P.; Courcambeck, J.; Halfon, P.; Whitaker, T.; Amblard, F.; Coats, S. J.; Schinazi, R. F. Azetidines and spiro

-
- azetidines as novel P2 units in hepatitis C virus NS3 protease inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 6325-6330.
210. Perni, R. B.; Pitlik, J.; Britt, S. D.; Court, J. J.; Courtney, L. F.; Deininger, D. D.; Farmer, L. J.; Gates, C. A.; Harbeson, S. L.; Levin, R. B.; Lin, C.; Lin, K.; Moon, Y.-C.; Luong, Y.-P.; O'Malley, E. T.; Rao, B. G.; Thomson, J. A.; Tung, R. D.; van Drie, J. H.; Wei, Y. Inhibitors of hepatitis C virus NS3-4A protease 2. Warhead SAR and optimization. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1441-1446.
211. Chen, K. X.; Njoroge, F. G.; Vibulbhan, B.; Prongay, A.; Pichardo, J.; Madison, V.; Buevich, A.; Chan T.-M. Proline-based macrocyclic inhibitors of the Hepatitis C Virus: Stereoselective synthesis and biological activity. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7024-7028.
212. Chen, K. X.; Njoroge, F. G.; Pichardo, J.; Prongay, A.; Butkiewicz, N.; Yao, N.; Madison, V.; Girijavallabhan, V. Design, synthesis, and biological activity of m-Tyrosine-based 16- and 17-membered macrocyclic inhibitors of Hepatitis C Virus NS3 serine protease. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6229-6235.
213. Venkatraman, S.; Njoroge, F. G.; Girijavallabhan, V. M.; Madison, V. S.; Yao, N. H.; Prongay, A. J.; Butkiewicz, N.; Pichardo, J. Design and synthesis of depeptidized macrocyclic inhibitors of Hepatitis C NS3-4A protease using structure-based drug design. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5088-5091.
214. Chen, K. X.; Njoroge, F. G.; Pichardo, J.; Prongay, A.; Butkiewicz, N.; Yao, N.; Madison, V.; Girijavallabhan, V. Potent 7-Hydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid-based macrocyclic inhibitors of Hepatitis C Virus NS3 protease. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 567-574.
215. Venkatraman, S.; Njoroge, F. G.; Wu, W.; Girijavallabhan, V.; Prongay, A. J.; Butkiewicz, N.; Pichardo, J. Novel inhibitors of hepatitis C NS3-NS4A serine protease derived from 2-aza-bicyclo[2.2.1]heptane-3-carboxylic acid. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1628-1632.

-
216. Bogen, S. L.; Ruan, S.; Liu, R.; Agrawal, S.; Pichardo, J.; Prongay, A.; Baroudy, B.; Saksena, A. K.; Girijavallabhan, V.; Njoroge, F. G. Depeptidization efforts on P₃-P₂ α -ketoamide inhibitors of HCV NS3-4A serine protease: Effect on HCV replicon activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1621-1627.
217. Chen, K. X.; Njoroge, F. G.; Arasappan, A.; Venkatraman, S.; Vibulbhan, B.; Yang, W.; Parekh, T. N.; Pichardo, J.; Prongay, A.; Cheng, K.-C.; Butkiewicz, N.; Yao, N.; Madison, V.; Girijavallabhan, V. Novel potent Hepatitis C Virus NS3 serine protease inhibitors derived from proline-based macrocycles. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 995-1005.
218. Perni, R. B.; Chandorkar, G.; Cottrell, K. M.; Gates, C. A.; Lin, C.; Lin, K.; Luong, Y.-P.; Maxwell, J. P.; Murcko, M. A.; Pitlik, J.; Rao, G.; Schairer, W. C.; van Drie J.; Wei, Y. Inhibitors of hepatitis C virus NS3.4A protease. Effect of P4 capping groups on inhibitory potency and pharmacokinetics. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3406-3411.
219. Yip, Y.; Victor, F.; Lamar, J.; Johnson, R.; Wang, Q. M.; Barket, D.; Glass, J.; Jin, L.; Liu, L.; Venable, D.; Wakulchik, M.; Xie, C.; Heinz, B.; Villarreal, E.; Colacino, J.; Yumibe, N.; Tebbe, M.; Munroe, J.; Chen, S.-H. Discovery of a novel bicycloproline P2 bearing peptidyl-ketoamide LY514962 as HCV protease inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 251-256.
220. Victor, F.; Lamar, J.; Snyder, N.; Yip, Y.; Guo, D.; Yumibe, N.; Johnson, R. B.; Wang, Q. M.; Glass, J. I.; Chen, S.-H. P1 and P3 optimization of novel bicycloproline P2 bearing tetrapeptidyl-ketoamide based HCV protease inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 257-261.
221. Avolio, S.; Robertson, K.; Hernando, J. I. M.; DiMuzio, J.; Summa, V. Inhibitors of hepatitis C virus NS3/4A: α -Ketoamide based macrocyclic inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 2295-2298.
- 222 Reesink, H. W.; Zeuzem, S.; Weegink, C. J.; Forestier, N.; van Vilet, A.; Van de Wetering de Rooij, J.; McNair, L.; Purdy, S.; Kauffmann, R.;

-
- Alam, J.; Jansen, P. L. Rapid decline of viral RNA in hepatitis C patients treated with VX-950: A phase 1b placebo-controlled randomized study. *Gastroenterology* **2006**, *131*, 997-1002.
223. Perni, R. B.; Almquist, S. J.; Byrn, R. A.; Chandorkar, G.; Chaturvedi, P. R.; Courtney, L. F.; Decker, C. J.; Dinehart, K.; Gates, C. A.; Harbeson, S. L.; Heiser, A.; Kalkeri, G.; Kolaczowski, E.; Lin, K.; Luong, Y.-P.; Rao, B. G.; Taylor, W. P.; Thomson, J. A.; Tung, R. D.; Wei, Y.; Kwong, A. D.; Lin, C. Preclinical profile of VX-950, a potent, selective, and orally bioavailable inhibitor of hepatitis C virus NS3-4A serine protease. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 899-909.
224. Chen, S. H.; Tan, S. L. Discovery of small-molecule inhibitors of HCV NS3-4A protease as potential therapeutic agents against HCV infection. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 2317-2342.
225. Perni, R. B.; Kwong, A. D. Inhibitors of hepatitis C virus NS3/4A protease: an overdue line of therapy. *Prog. Med. Chem.* **2002**, *39*, 215-255.
226. Mani, N.; Rao, B. G.; Kieffer, T. L.; Kwong, A. D. Recent progress in the development of HCV protease inhibitors in antiviral drug strategies (ed. De Clercq, e.), Wiley-VCH, Weinheim, Germany, **2011**, 307-328.
227. Grillot, A. *et al.* Discovery and development of telaprevir in Antiviral Drugs: from basic discovery through clinical trials (ed., Kazmierski, W.), John Wiley & Sons, **2010**, 209-224.
228. Lin, C.; Kwong, A. D.; Perni, R. B. Discovery and development of VX-950, a novel, covalent, and reversible inhibitor of hepatitis C virus NS3/4A serine protease. *Infect. Disord. Drug Targets* **2006**, *6*, 3-16.
229. Perni, R. B.; Britt, S. D.; Court, J. J.; Courtney, L. F.; Deininger, D. D.; Farmer, L. J.; Gates, C. A.; Harbeson, S. L.; Kim, J. L.; Landro, J. A.; Levin, R. B.; Luong, Y. P.; O'Malley, E. T.; Pitlik, J.; Rao, G.; Schairer, W. C.; Thomson, J. A.; Tung, R. D.; Van Drie, J.; Wei, Y. Inhibitors of

-
- hepatitis C virus NS3-4A protease 1. Non-Charged tetrapeptide variants. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 4059-4063.
230. Perni, R. B.; Farmer, L. C.; Cottrell, K. M.; Court, J. J.; Courtney, L. F.; Deininger, D. D.; Gates, C. A.; Harbeson, S. L.; Kim, J. L.; Lin, C.; Lin, K.; Luong, Y. P.; Maxwell, J. P.; Murko, M. A.; Pitlik, J.; Rao, G.; Schairer, W. C.; Tung, R. D.; Van Drie, J.; Wilson, K.; Thomson, J. A.; Inhibitors of hepatitis C virus NS3-4A protease 3. P2 proline variants. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1939-1942.
231. Perni, R. B.; Pitlik, J.; Britt, S. D.; Court, J. J.; Courtney, L. F.; Deininger, D. D.; Farmer, L. J.; Gates, C. A.; Harbeson, S. L.; Levin, R. B.; Lin, C.; Lin, K.; Moon, Y. C.; Luong, Y. P.; O'Malley, E. T.; Rao, B. G.; Thomson, J. A.; Tung, R. D.; Van Drie, J.; Wei, Y. Inhibitors of hepatitis C virus NS3-4A protease 2. Warhead SAR and optimization. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1441-1446.
232. Perni, R. B.; Chandorkar, G.; Cottrell, K. M.; Gates, C. A.; Lin, C.; Lin, K.; Luong, Y. P.; Maxwell, J. P.; Murko, M. A.; Pitlik, J.; Rao, G.; Schairer, W. C.; Van Drie, J.; Wei, Y. Inhibitors of hepatitis C virus NS3/4A protease. Effect of P4 capping groups on inhibitory potency and pharmacokinetics. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3406-3411.
233. Kwong, A. D.; Kauffman, R. S.; Hurter, P.; Mueller, P. Discovery and development of telaprevir: an NS3-4A protease inhibitor for treating genotype 1 chronic hepatitis C virus. *Nat. Biotech.* **2011**, *29*, 993-1003.
234. Zeuzem, S.; Sarrazin, C.; Rouzier, R.; Tarral, A.; Brion, N.; Forestier, N.; Gupta, S.; Deckman, D.; Fellows, K.; Hussain M.; Cutler, D.; Zhang, J. In 56th annual meeting of AASLD, San Francisco, CA, 2005.
235. Njoroge, F. G.; Chen, K. X.; Shih, N.-Y.; Piwinski, J. J. Challenges in modern drug discovery: A case study of Boceprevir, an HCV protease inhibitor for the treatment of Hepatitis C virus infection. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 50-59.

-
236. Malcolm, B. A.; Liu, R.; Lahser, F.; Agrawal, S.; Belanger, B.; Butkiewicz, N.; Chase, R.; Gheyas, F.; Hart, A.; Hesk, D.; Ingravallo, P.; Jiang, C.; Kong, R.; Lu, J.; Pichardo, J.; Prongay, A.; Skelton, A.; Tong, X.; Venkatraman, S.; Xia, E.; Girijavallabhan, V.; Njoroge, F. G. SCH 503034, a mechanism-based inhibitor of Hepatitis C virus NS3 protease, suppresses polyprotein maturation and enhances the antiviral activity of alpha interferon in replicon cells *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 1013-1020.
237. Venkatraman, S.; Bogen, S. L.; Arasappan, A.; Bennett, F.; Chen, K.; Jao, E.; Liu, Y.-T.; Lovey, R.; Hendrata, S.; Huang, Y.; Pan, W.; Parekh, T.; Pinto, P.; Popov, V.; Pike, R.; Ruan, S.; Santhanam, B.; Vibulbhan, B.; Wu, W.; Yang, W.; Kong, J.; Liang, X.; Wong, J.; Liu, R.; Butkiewicz, N.; Chase, R.; Hart, A.; Agrawal, S.; Ingravallo, P.; Pichardo, J.; Kong, R.; Baroudy, B.; Malcolm, B.; Guo, Z.; Prongay, A.; Madison, V.; Broske, L.; Cui, X.; Cheng, K.-C.; Hsieh, Y.; Brisson, J.-M.; Prelusky, D.; Korfmacher, W.; White, R.; Bogdanowich-Knipp, S.; Pavlovsky, A.; Bradley, P.; Saksena, A. K.; Ganguly, A.; Piwinski, J.; Girijavallabhan, V.; Njoroge, F. G. Discovery of (1R,5S)-N-[3-Amino-1-(cyclobutylmethyl)-2,3-dioxopropyl]-3-[2(S)-[[[(1,1-dimethylethyl)amino]carbonyl]amino]-3,3-dimethyl-1-oxobutyl]-6,6-dimethyl-3-azabicyclo[3.1.0]hexan-2(S)-carboxamide (SCH 503034), a selective, potent, orally bioavailable Hepatitis C virus NS3 protease inhibitor: A potential therapeutic agent for the treatment of Hepatitis C infection. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6074-6086.
238. Arasappan, A.; Bennett, F.; Bogen, S. L.; Venkatraman, S.; Blackman, M.; Chen, K. X.; Hendrata, S.; Huang, Y.; Huelgas, R. M.; Nair, L.; Padilla, A. I.; Pan, W.; Pike, R.; Pinto, P.; Ruan, S.; Sannigrahi, M.; Velazquez, F.; Vibulbhan, B.; Wu, W.; Yang, W.; Saksena, A. K.; Girijavallabhan, V.; Shin, N.-Y.; Kong, J.; Meng, T.; Jin, Y.; Wong, J.; McNamara, P.; Prongay, A.; Madison, V.; Pinwiski, J. J.; Cheng, K.-c.; Morrison, R.; Malcolm, B.; Tong, X.; Ralston, R.; Njoroge, F. G.

-
- Discovery of Narlaprevir (SCH 900518): A potent, second generation HCV NS3 serine protease inhibitor. *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 64-69.
239. Snyder, D. W.; Bach, N. J.; Dillard, R. D.; Draheim, S. E.; Carlson, D. G.; Fox, N.; Roehm, N. W.; Armstrong, C. T.; Chang, C. H.; Hartley, L. W.; Johnson, L. M.; Roman, C. R.; Smith, A. C.; Song, M.; Fleisch, J. H. Pharmacology of LY315920/S-5920, [[3-(aminooxiacetyl)-2-ethyl-1-(phenylmethyl)-1H-indol-4-yl]oxy]acetate, a potent and selective secretory phospholipase A2 inhibitor: A new class of anti-inflammatory drugs, SPI. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *288*, 1117-1124.
240. Hagishita, S.; Yamada, M.; Shirahase, K.; Okada, T.; Murakami, Y.; Ito, Y.; Matsuura, T.; Wada, M.; Kato, T.; Ueno, M.; Chikazawa, Y.; Yamada, K.; Ono, T.; Teshirogi, I.; Ohtani, M. Potent inhibitors of secretory phospholipase A2: synthesis and inhibitory activities of indolizine and indene derivatives. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3636-3658.
241. Singer, A. G.; Ghomashchi, F.; Le Calvez, C.; Bollinger, J.; Bezzine, S.; Rouault, M.; Sadilek, M.; Nguyen, E.; Lazdunski, M.; Lambeau, G.; Gelb, M. H. Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X and XII secreted phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 48535-48549.
242. Smart, B. P.; Pan, Y. H.; Weeks, A. K.; Bollinger, J. G.; Bahnson, B. J.; Gelb, M. H. Inhibition of the complete set of mammalian secreted phospholipases A₂ by indole analogues: a structure-guided study. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 1737-1749.
243. Oslund, R. C.; Cermak, N.; Gelb, M. H. Highly Specific and Broadly Potent Inhibitors of Mammalian Secreted Phospholipases A₂. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4708-4714.
244. Kokotos, G.; Kotsovolou, S.; Six, D. A.; Constantinou-Kokotou, V.; Beltzner, C. C.; Dennis, E. A. Novel 2-oxoamide inhibitors of human group IVA phospholipase A₂. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2891-2893.

-
245. Kokotos, G.; Six, D. A.; Loukas, V.; Smith, T.; ConstantinouKokotou, V.; Hadjipavlou-Litina, D.; Kotsovolou, S.; Chiou, A.; Beltzner, C. C.; Dennis, E. A. Inhibition of group IVA cytosolic phospholipase A₂ by novel 2-oxoamides *in vitro*, in cells and *in vivo*. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3615-3628.
246. Constantinou-Kokotou, V.; Peristeraki, A.; Kokotos, C. G.; Six, D. A.; Dennis, E. A. Synthesis and activity of 2-oxoamides containing long chain β -amino acids. *J. Pept. Sci.* **2005**, *11*, 431-435.
247. Stephens, D.; Barbayianni, E.; Constantinou-Kokotou, V.; Peristeraki, A.; Six, D. A.; Cooper, J.; Harkewicz, R.; Deems, R. A.; Dennis, E. A.; Kokotos, G. Differential inhibition of group IVA and group VIA phospholipases A₂ by 2-oxoamides. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2821-2828.
248. Six, D. A.; Barbayianni, E.; Loukas, V.; Constantinou-Kokotou, V.; Hadjipavlou-Litina, D.; Stephens, D.; Wong, A. C.; Magrioti, V.; Moutevelis-Minakakis, P.; Baker, S. F.; Dennis, E. A.; Kokotos, G. Structure-activity relationship of 2-oxoamide inhibition of group IVA cytosolic phospholipase A₂ and group V secreted phospholipase A₂. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 4222-4235.
249. Yaksh, T. L.; Kokotos, G.; Svensson, C. I.; Stephens, D.; Kokotos, C. G.; Fitzsimmons, B.; Hadjipavlou-Litina, D.; Hua, X. Y.; Dennis, E. A. Systemic and intrathecal effects of a novel series of phospholipase A₂ inhibitors on hyperalgesia and spinal prostaglandin E-2 release. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, *316*, 466-475.
250. Burke, J. E.; Babakhani, A.; Gorfe, A. A.; Kokotos, G.; Li, S.; Woods, V. L., Jr.; McCammon, J. A.; Dennis, E. A. Location of inhibitors bound to group IVA phospholipase A₂ determined by molecular dynamics and deuterium exchange mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8083-8091.

-
251. Moutevelis-Minakakis, P.; Neokosmidi, A.; Filippakou, M.; Stephens, D.; Dennis, E. A.; Kokotos, G. Synthesis of lipophilic 2-oxoamides based on γ -aminobutyric and δ -aminovaleric analogues and their activity against phospholipase A₂. *J. Pept. Sci.* **2007**, *13*, 634-641.
252. Antonopoulou, G.; Magrioti, V.; Stephens, D.; Constantinou-Kokotou, V.; Dennis, E. A.; Kokotos, G. Synthesis of 2-oxoamides based on sulfonamide analogs of γ -amino acids and their activity on phospholipase A₂. *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 1111-1120.
253. Jongejan, A.; de Graaf, C.; Vermeulen, N. P. E.; Leurs, R.; de Esch, I. J. P. The role and applications of *in silico* docking in chemical genomics research. *Chemical Genomics: Methods in molecular biology. Humana Press*, **2005**, *310*, 63-91.
254. Taylor, R. D.; Jewsbury, P. J.; Essex, J. W. A review of protein-small molecule docking methods. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2002**, *16*, 151-166.
255. Bohm, H. J.; Stahl, M. The use of scoring functions in drug discovery applications. *Rev. Comp. Chem.* **2002**, *18*, 41-87.
256. Hou, T. J.; Xu, X. J. Recent development and application of virtual screening in drug discovery: An overview. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10*, 1011-1033.
257. Bissantz, C.; Folkers, G.; Rognan, D. Protein-based virtual screening of chemical databases. 1. Evaluation of different docking/scoring combinations. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4759-4767.
258. Paul, N.; Rognan, D. ConsDock: A new program for the consensus analysis of protein-ligand interactions. *Proteins: Struct. Funct. Gen.* **2002**, *47*, 521-533.
259. Carlson, H. A.; McCammon, J. A. Accommodating protein flexibility in computational drug design. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *57*, 213-218.

-
260. McConkey, B. J.; Sobolev, V.; Edelman, M. The performance of current methods in ligand-protein docking. *Curr. Sci.* **2002**, *83*, 845-856.
261. Whitley, D. A genetic algorithm tutorial. *Stat. Comput.* **1994**, *4*, 65-85.
262. Brown, R. D.; Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C. Matching two-dimensional chemical graphs using genetic algorithms. *J. Chem. Inform. Comput. Sci.* **1994**, *34*, 63-70.
263. Fountain, E. Application of genetic algorithms in the field of constitutional similarity. *J. Chem. Inform. Comput. Sci.* **1992**, *32*, 748-752.
264. Clark, D. E.; Jones, G.; Willett, P.; Kenny, P. W.; Glen, R. C. Pharmacophoric pattern matching in files of three-dimensional chemical structures: Comparison of conformational-searching algorithms for flexible searching. *J. Chem. Inform. Comput. Sci.* **1994**, *34*, 197-206.
265. Payne, A. W. R.; Glen, R. C. Molecular recognition using a binary genetic search algorithm. *J. Mol. Graph.* **1993**, *11*, 74-91.
266. Judson, R. S.; Jaeger, E. P.; Treasurywala, A. M.; Peterson, M. L. Conformational searching methods for small molecules: II. Genetic algorithm approach. *J. Comput. Chem.* **1993**, *14*, 1407-1414.
267. Blommers, M. J.; Lucasius, C. B.; Kateman, G.; Kaptein, R. Conformational analysis of a dinucleotide photodimer with the aid of a genetic algorithm. *Biopolymers* **1992**, *32*, 45-52.
268. Dandekar, T.; Argos, P. Folding the main chain of small proteins with the genetic algorithm. *J. Mol. Biol.* **1993**, *236*, 844-861.
269. Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C. Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *J. Mol. Biol.* **1995**, *245*, 43-53.
270. Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 727-748.

-
271. Allen, F. H.; Davies, J. E.; Galloy, J. J.; Johnson, O.; Kennard, O.; Macrae, C. F.; Mitchell, E. M.; Mitchell, G. F.; Smith, J. M.; Watson, D. G. The development of versions 3 and 4 of the Cambridge Structural Database system. *J. Chem. Inform. Comput. Sci.* **1991**, *31*, 187-204.
272. Baxter, C. A.; Murray, C. W.; Clark, D. E.; Westhead, D. R.; Eldridge, M. D. Flexible docking using Tabu search and an empirical estimate of binding affinity. *Proteins* **1998**, *33*, 367-382.
273. Eldridge, M. D.; Murray, C. W.; Auton, T. R.; Paolini, G. V.; Mee, R. P. Empirical scoring functions: 1. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *J. Comput-Aided Mol. Des.* **1997**, *11*, 425-445.
274. Verdonk, M. L.; Cole, J. C.; Hartshorn, M. J.; Murray, C. W.; Taylor, R. D. Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **2003**, *52*, 609-623.
275. McQuarrie, D. A. *Statistical Mechanics*. University Science Books: Mill Valley, CA, **1973**.
276. Swails, J. M. Free energy simulations of complex biological systems at constant pH. University of Florida, PhD Thesis, **2013**.
277. Bayly, C. I.; Cieplak, P.; Cornell, W. D.; Kollman, P. A. A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: The RESP model. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 10269-10280.
278. Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Kollmann, P. A. Application of RESP charges to calculate conformational energies, hydrogen bond energies, and free energies of salvation. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9620-9631.
279. Cieplak, P.; Cornell, W. D.; Bayly, C.; Kollman, P. A. Application of the multimolecule and multiconformational RESP methodology to

-
- biopolymers: Charge derivation for DNA, RNA, and proteins. *J. Comput. Chem.* **1995**, *16*, 1357-1377.
280. Levitt, M.; Lifson, S. Refinement of protein conformations using a macromolecular energy minimization procedure. *J. Mol. Biol.* **1969**, *46*, 269-279.
281. Case, D. A.; Darden, T.; Cheatham, T. E., III; Simmerling, C. L.; Wang, J.; Duke, R. E.; Luo, R.; Walker, R. C.; Zhang, W.; Merz, K. M.; Roberts, B. P.; Hayik, S.; Roitberg, A.; Seabra, G.; Swails, J.; Goetz, A. W.; Kolossvai, I.; Wong, K. F.; Paesani, F.; Vanicek, J.; Wolf, R. M.; Liu, J.; Wu, X.; Brozell, S. R.; Steinbrecher, T.; Gohlke, H.; Cai, Q.; Ye, X.; Wang, B.; Hsieh, M. J.; Cui, G.; Roe, D. R.; Mathews, D. H.; Seetin, M. G.; Salomon-Ferrer, R.; Sagui, C.; Babin, V.; Luchko, T.; Gusarov, S.; Kovalenko, A.; Kollman, P. A. AMBER 12; University of California: San Francisco, **2012**.
282. Weiner, P. K.; Kollman, P. A. AMBER: Assisted model building with energy refinement. A general program for modeling molecules and their interactions. *J. Comput. Chem.* **1981**, *2*, 287-303.
283. Pearlman, D. A.; Case, D. A.; Caldwell, J. W.; Ross, W. S.; Cheatham III, T. E.; De Bolt, S.; Ferguson, D.; Seibel, G.; Kollman, P. AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules. *Comput. Phys. Commun.* **1995**, *91*, 1-41.
284. Salomon-Ferrer, R.; Case, D. A.; Walker, R. C. An overview of the Amber biomolecular simulation package. *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2012** doi: 10.1002/wcms.11.
285. <http://ambermd.org/doc12/Amber14.pdf> (Πρόσβαση Αύγουστος 7, 2015)
286. nVIDIA CUDA Home Page. http://www.nvidia.com/object/cuda_home_new.html (Πρόσβαση Αύγουστος 7, 2015)

-
287. Honig, B.; Nicholls, A. Classical electrostatics in biology and chemistry. *Science* **1995**, *268*, 1144-1149.
288. Sitkoff, D.; Sharp, K. A.; Honig, B. Accurate calculation of hydration free energies using macroscopic solvent models. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 1978-1988.
289. Roe, D. R.; Cheatham, T. E. III. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9*, 3084-3095.
290. GOLD 5.2, CCDC, Cambridge, UK, **2013**.
291. Lee, L. K.; Bryant, K. J.; Bouveret, R.; Lei, P.-W.; Duff, A. P.; Harrop, S. J.; Huang, E. P.; Harvey, R. P.; Gelb, M. H.; Gray, P. P.; Curmi, P. M.; Cunningham, A. M.; Church, W. B.; Scott, K. F. Selective inhibition of human group IIA secreted phospholipase A2 (hGIIA) signaling reveals arachidonic acid metabolism is associated with colocalization of hGIIA to vimentin in rheumatoid synoviocytes. *J. Bio. Chem.* **2013**, *288*, 15269-15279.
292. SYBYL, molecular modeling software packages, version 8.0, **2007**, Tripos Inc., 1699 South Hanley Rd., St. Louis, MO 63144-2917.
293. Powell, D. J. M. Restart procedures for the Conjugate Gradient method. *Math Program* **1977**, *12*, 241-254.
294. Clark, M.; Crammer III, D. R.; Van Opdenbosch N. Validation of the general purpose tripos 5.2 force field. *J. Comput. Chem.* **1989**, *10*, 982-1012.
295. Schrödinger Suite 2009 Protein Preparation Wizard; Epik version 2.0, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2009; Impact version 5.5, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2009; Prime version 2.1, Schrödinger, LLC, New York, NY, **2009**.
296. Eldridge, M. D.; Murray, C. W.; Auton, T. R.; Paolini, G. V.; Mee, R. P. Empirical scoring functions: 1. The development of a fast empirical

-
- scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1997**, *11*, 425-455.
297. LigPrep, version 2.3, Schrödinger, LLC, New York, NY, **2009**.
298. Epik, version 2.0, Schrödinger, LLC, New York, NY, **2009**.
299. Friesner, R. A.; Murphy, R. B.; Repasky, M. P.; Frye, L. L.; Greenwood, J. R.; Halgren, T. A.; Sanschagrin, P. C.; Mainz, D. T. Extra Precision Glide: Docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6177-6196.
300. Dess, D. B.; Martin, J. C. A useful 12-I-5 triacetoxyperiodinane (the Dess-Martin periodinane) for the selective oxidation of primary or secondary alcohols and a variety of related 12-I-5 species. *J. Am. Chem. Soc.* 1991, *113*, 7277-7287.
301. Wadsworth, W. S.; Emmons, W. D. Jr The utility of phosphonate carbanions in olefin synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 1733-1738.
302. O'Kennedy, R.; Thornes, R. D. Coumarins: Biology, applications and mode of action. Eds.; John Wiley & Sons: Chichester, **1997**.
303. Kamal, A.; Adil, S. F.; Tamboli, J. R.; Siddardha, B.; Murthy, U. S. N. Synthesis of coumarin linked naphthalimide conjugates as potential anticancer and antimicrobial agents. *Lett. Drug Des. Discovery* **2009**, *6*, 201-209.
304. Kontogiorgis, C. A.; Savvoglou, K.; Hadjipavlou-Litina, D. J. Antiinflammatory and antioxidant evaluation of novel coumarin derivatives. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2006**, *21*, 21-9.
305. Kontogiorgis, C. A.; Hadjipavlou-Litina, D. J. Synthesis and antiinflammatory activity of coumarin derivatives. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6400-6408.
306. Grimm, E. L.; Brideau, C.; Chauret, N.; Chan, C.-C.; Delorme, D.; Ducharme, Y.; Ethier, D.; Falguyret, J.-P.; Friesen, R. W.; Guay, J.;

-
- Hamel, P.; Riendeau, D.; Soucy-Breau, C.; Tagari, P.; Girard, Y. Substituted coumarins as potent 5-lipoxygenase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2528-2531.
307. Piazzzi, L.; Cavalli, A.; Colizzi, F.; Belluti, F.; Bartolini, M.; Mancini, F.; Recanatini, M.; Andrisano, V.; Rampa, A. Multi-target-directed coumarin derivatives: hAChE and BACE1 inhibitors as potential anti-Alzheimer compounds. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 423-426.
308. Pescatori, L.; Metifiot, M.; Chung, S.; Masoaka, T.; Crucitti, G. C.; Messori, A.; Puro, G.; Madia, V. N.; Saccoliti, F.; Scipione, L.; Tortorella, S.; Di Leva, F. S.; Cosconati, S.; Marinelli, L.; Novellino, E.; Le Grice, S. F. J.; Pommier, Y.; Marchand, C.; Costi, R.; Di Santo, R. *N*-Substituted quinolinonyl diketo acid derivatives as HIV integrase strand transfer inhibitors and their activity against RNase H function of reverse transcriptase. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 4610-4623.
309. Vandurm, P.; Guiguen, A.; Cauvin, C.; Georges, B.; Le Van, K.; Michaux, C.; Cardona, C.; Mbemba, G.; Mouscadet, J.-F.; Hevesi, L.; Van Lint, C.; Wouters, J. Synthesis biological evaluation and molecular modeling studies of quinolonoyl diketo acid derivatives: New structural insight into the HIV-1 integrase inhibition. *Euro. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 1749-1756.
310. Schrödinger, LLC, New York, NY, **2009**.
311. Wang, J.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Development and testing of a general amber force field. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1157-1174.
312. Jakalian, A.; Jack, D. B.; Bayly, C. I. Fast, efficient generation of highquality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation. *J. Comput. Chem.* **2002**, *23*, 1623-1641.
313. Cheatham, T. E.; Cieplak, P.; Kollman, P. A. A modified version of the Cornell *et al.* force field with improved sugar pucker phases and helical repeat. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1999**, *16*, 845-862.

-
314. Wang, J. M.; Cieplak, P.; Kollman, P. A. How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *J. Comput. Chem.* **2000**, *21*, 1049-1074.
315. Perez, A.; Marchan, I.; Svozil, D.; Spomer, J.; Cheatham, T. E.; Laughton, C. A.; Orozco, M. Refinement of the AMBER force field for nucleic acids: Improving the description of alpha/gamma conformers. *Biophys. J.* **2007**, *92*, 3817-3829.
316. Zgarbova, M.; Otyepka, M.; Spomer, J.; Mladek, A.; Banas, P.; Cheatham, T. E.; Jurecka, P. Refinement of the Cornell et al. nucleic acids force field based on reference quantum chemical calculations of glycosidic torsion profiles. *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7*, 2886-2902.
317. Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926-935.
318. Salomon-Ferrer, R.; Case, D. A.; Walker, R. C. An overview of the AMBER biomolecular simulation package. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2012**, DOI: 10.1002/wcms.1121.
319. Case, D. A.; Cheatham, T. E., 3rd; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz, K. M., Jr; Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R. J. The Amber biomolecular simulation programs. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1668-1688.
320. Case, D. A.; Darden, T.; Cheatham, T. E., III, Simmerling, C. L.; Wang, J.; Duke, R. E.; Luo, R.; Walker, R. C.; Zhang, W.; Merz, K. M.; Roberts, B. P.; Wang, B.; Hayik, S.; Roitberg, A.; Seabra, G.; Kolossvai, I.; Wong, K. F.; Paesani, F.; Vanicek, J.; Liu, J.; Wu, X.; Brozell, S. R.; Steinbrecher, T.; Gohlke, H.; Cai, Q.; Ye, X.; Wang, J.; Hsieh, M.-J.; Cui, G.; Roe, D. R.; Mathews, D. H.; Seeting, M. G.; Sagui, C.; Babin, V.;

-
- Luchko, T.; Gusarov, S.; Kovalenko, A.; Kollman, P. A. AMBER 11; University of California: San Francisco, **2010**.
321. Izaguirre, J. A.; Catarello, D. P.; Wozniak, J. M.; Skeel, R. D. Langevin stabilization of molecular dynamics. *J. Chem. Phys.* **2001**, *114*, 2090-2098.
322. Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle mesh Ewald: An N·log(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 10089-10092.
323. Ryckaert, J. P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: Molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comp. Phys.* **1977**, *23*, 327-341.
324. Nakanishi, M.; Rosenberg, D. W. Multifaceted roles of PGE2 in inflammation and cancer. *Semin. Immunopathol.* **2013**, *35*, 123-137.
325. Gross, S.; Tilly, P.; Hentsch, D.; Vonesch, J.-L.; Fabre, J.-E. Vascular wall-produced prostaglandin E2 exacerbates arterial thrombosis and atherothrombosis through platelet EP3 receptors. *J. Exp. Med.* **2007**, *204*, 311-320.
326. Wang, D.; DuBois, R. Eicosanoids and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 181-193.
327. Strong, V. E.; Mackrell, P. J.; Concannon, E. M.; Naama, H. A.; Schaefer, P. A.; Shaftan, G. W. Blocking prostaglandin E2 after trauma attenuates pro-inflammatory cytokines and improves survival. *Shock* **2000**, *14*, 374-379.
328. Amadio, P.; Baldassarre, D.; Tarantino, E.; Zacchi, E.; Gianellini, S.; Squellerio, I.; Amato, M.; Weksler, B. B.; Tremoli, E.; Barbieri, S. S. Production of prostaglandin E2 induced by cigarette smoke modulates tissue factor expression and activity in endothelial cells. *FASEB J* **2015**, *29*, 4001-4010.

-
329. Gomez, I.; Foudi, N.; Longrois, D.; Norel, X. The role of prostaglandin E₂ in human vascular inflammation. *PLEFA* **2013**, *89*, 55-63.
330. Linton, M. F.; Fazio, S. Cyclooxygenase products and atherosclerosis. *Drug Discov. Today Ther. Strateg.* **2008**, *5*, 25-36.
331. Cipollone, F.; Cicolini, G.; Bucci, M. Cyclooxygenase and prostaglandin synthases in atherosclerosis: Recent insights and future perspectives *Pharmacol. Ther.* **2008**, *118*, 161-180.
332. Rastogi, P.; Beckett, C. S.; McHowat, J. Prostaglandin production in human coronary artery endothelial cells is modulated differentially by selective phospholipase A₂ inhibitors. *PLEFA* **2007**, *76*, 205-212.
333. van der Helm, H. A.; Aarsman, A. J.; Janssen, M. J.; Neys, F. W.; van den Bosch, H. Regulation of the expression of group IIA and group V secretory phospholipases A₂ in rat mesangial cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **2000**, *12*, 215-224.
334. Huwiler, A.; Feuerherm, A. J.; Sakem, B.; Pastukhov, O.; Filipenko, I.; Nguyen, T.; Johansen, B. The ω ₃-polyunsaturated fatty acid derivatives AVX001 and AVX002 directly inhibit cytosolic phospholipase A₂ and suppress PGE₂ formation in mesangial cells. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *167*, 1691-701.
335. Magrioti, V.; Nikolaou, A.; Smyrniotou, A.; Shah, I.; Constantinou-Kokotou, V.; Dennis, A. E.; Kokotos, G. New potent and selective polyfluoroalkyl ketone inhibitors of G_vIA calcium-independent phospholipase A₂. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 5823-5829.
336. Nicolaou, K. C.; Reingruber, R.; Sarlah, D.; Bräse, S. Enantioselective intramolecular Friedel-Crafts-type alpha-arylation of aldehydes. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2086-2087.
337. Gribble, A. D.; Dolle, R. E.; Shaw, A.; McNair, D.; Novelli, R.; Novelli, C. E.; Slingsby, B. P.; Shah, V. P.; Tew, D.; Saxty, B. A.; Allen, M.; Groot, P. H.; Pearce, N.; Yates, J. ATP-citrate lyase as a target for

hypolipidemic intervention. Design and synthesis of 2-substituted butanedioic acids as novel, potent inhibitors of the enzyme. *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 3569-3584.

338. Bethesda Pharmaceuticals INC. Patent: WO 2005/009437 A1, **2005**.