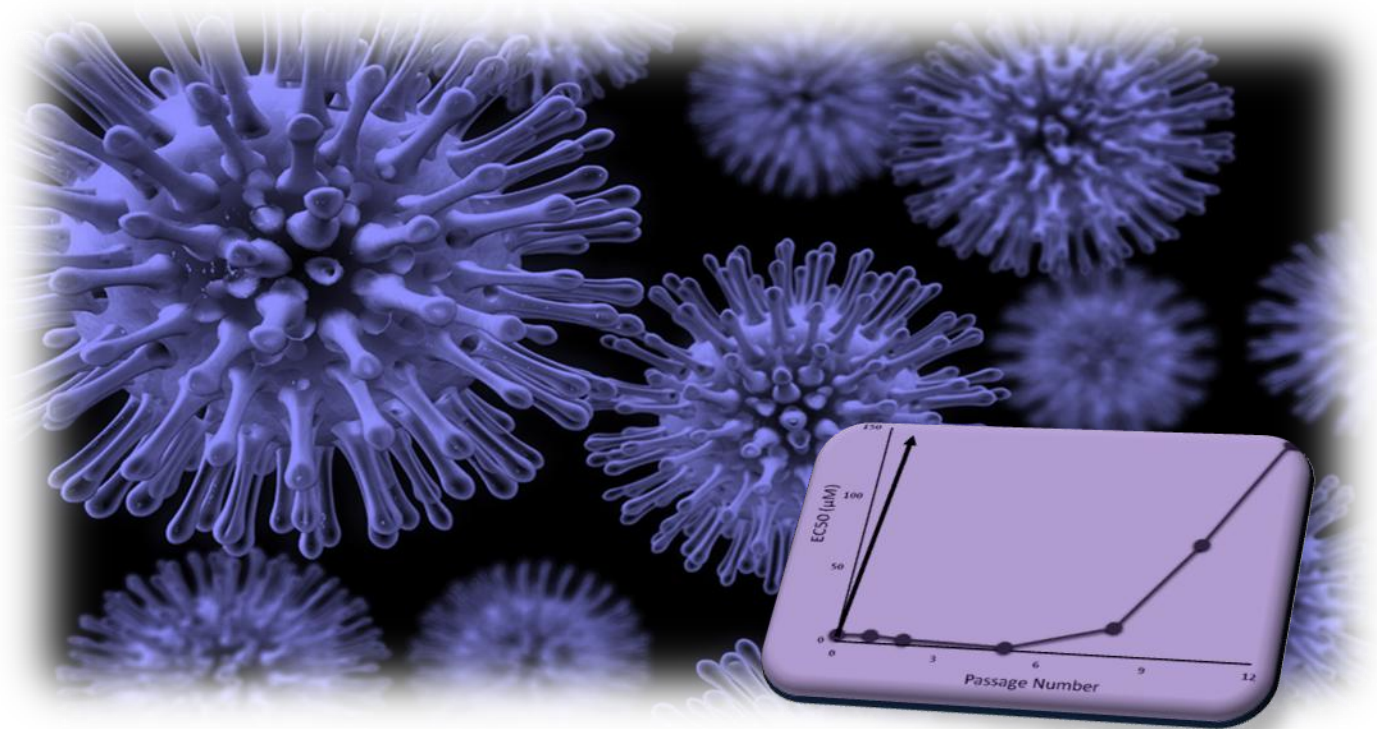




ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»

ΔΡΑΣΤΙΚΑ ΑΜΙΝΟΑΔΑΜΑΝΤΑΝΙΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΟΡΙΖΟΥΝ ΤΗΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ ΠΡΟΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΤΟΥ ΝΕΟΥ ΙΟΥ INFLUENZA A S31N



ΤΖΙΤΖΟΓΛΑΚΗ ΧΡΙΣΤΙΝΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2014
ΑΘΗΝΑ



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»

**ΔΡΑΣΤΙΚΑ ΑΜΙΝΟΑΔΑΜΑΝΤΑΝΙΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΟΡΙΖΟΥΝ ΤΗΝ
ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ ΠΡΟΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΤΟΥ ΝΕΟΥ ΙΟΥ
INFLUENZA A S31N**

**ΤΖΙΤΖΟΓΛΑΚΗ ΧΡΙΣΤΙΝΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2014
ΑΘΗΝΑ

Στην οικογένεια μου

A.M.: 1107-5

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Αντώνιος Κολοκούρης, Αναπληρωτής Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αντώνιος Κολοκούρης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής Ε.Κ.Π.Α. (Επιβλέπων)

Παναγιώτης Μαράκος, Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής Ε.Κ.Π.Α.

Ανδρέας Τσοτίνης, Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής Ε.Κ.Π.Α.

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

04/02/2014

ADAMANTANES WITH PERSISTENT IN VITRO EFFICACY AGAINST H1N1 (2009) INFLUENZA A

SUMMARY

A series of 2-adamantanamines with adducts of various lengths were examined for efficacy against strains of influenza A. The addition of as little as one CH₂ group to the methyl adduct of the amantadine/rimantadine analog, 2-methyl-2-aminoadamantane, led to activity in vitro against two M2 S31N viruses, A/PR/8/34 (H1N1) and A/Calif/04/2009 (H1N1). For one compound tested with the 2009 virus, 10 passages (~5 weeks) in the presence of drug were required before significant resistance developed. While proteoliposome assays, ssNMR data and MD simulations using fragments of M2 are consistent with a direct block of the S31N M2 transmembrane domain, electrophysiology using the whole S31N M2 protein showed no blockade. A wild type strain, A/Hong Kong/1/64 (H3N2) developed resistance to these drugs within one passage with mutations in M2 TM, but the strain of A/Calif/04/2009 S31N that developed resistance in vitro had no mutations in M2 TM. The results suggest that 2-adamantanamines with sufficient adducts can persistently block p2009 influenza A *in vitro*.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Σύνθεσης Φαρμάκων και Υπολογιστικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του πανεπιστημιακού προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών «Συνθετική Φαρμακευτική Χημεία» .

Θερμές ευχαριστίες προς τον αναπληρωτή καθηγητή, Αντώνιο Κολοκούρη για την ανάθεση του θέματος, την επίβλεψη, την συνεχή του βοήθειά και αδιάλειπτη συμπαράσταση καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας.

Ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω προς τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής , τους καθηγητές Π.Μαράκο και Α.Τσοτίνη για τις πολύτιμες επισημάνσεις τους στο κείμενο της εργασίας.

Επίσης ευχαριστώ τους καθηγητές Γ.Φυτά, Γ.Φώσκολο, Ε.Μικρό, κα Α.Κακουλίδου, Ν.Πουλή, Α.Κουρουνάκη και τον Λέκτορα Γ. Κωστάκη για τις γνώσεις που μου μετέδωσαν κατά την διάρκεια των μαθημάτων της μεταπτυχιακής μου εκπαίδευσης.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω τον γιατρό, ιολόγο Dr David Busath και την ερευνητική του ομάδα από το πανεπιστήμιο Brigham Young University (BYU) της πόλης Provo στην Utah για τον αντικό έλεγχο των ενώσεων.

Ευχαριστώ τον μεταπτυχιακό φοιτητή Χ.Ιωαννίδη για την πληροφορία που μου μετέφερε από τους υπολογισμούς στο σύστημα αμινοαδαμαντανικού προσδέτη-διαμεμβρανικής περιοχής της πρωτεΐνης M2.

Τέλος, αισθάνομαι ευτυχής για την χορηγία της εταιρείας Chiesi Hellas μέσω της οποίας έγινε δυνατή η ανακαίνιση του εργαστηριακού χώρου του τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών στον οποίο εργάζεται η ομάδα του κ. Α.Κολοκούρη.

**ΔΡΑΣΤΙΚΑ ΑΜΙΝΟΑΔΑΜΑΝΤΑΝΙΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΟΡΙΖΟΥΝ ΤΗΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ ΠΡΟΣ
ΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΤΟΥ ΝΕΟΥ ΕΠΙΔΗΜΙΚΟΥ ΙΟΥ INFLUENZA A S31N**

Περίληψη

Στη μεταπτυχιακή εργασία συντέθηκε μια σειρά από αμινοαδαμαντανικά παράγωγα με σταδιακή αύξηση του όγκου της ανθρακικής αλυσίδας στην 2-θέση του αδαμαντανίου, καρβοκυκλικά ανάλογα της ριμανταδίνης καθώς και ανάλογα 2-αλκυλο-2-αδαμανταναμινών που περιέχουν υποκαταστάτες στο C-2 άνθρακα του αδαμαντανίου σε σπειρανική μορφή. Εξετάστηκαν ως προς τη δράση τους στον ιό της γρίπης Α και παρατηρήθηκε πως δραστηριότητα έναντι ιών M2 S31N, A/PR/8/34 (H1N1) και A/Calif/074/2009 (H1N1), εμφανίζεται σε 2-αλκυλο-2-αμινοαδαμαντανικά ή ανάλογα όταν το μέγεθος του ανθρακικού υποκαταστάτη του αδαμαντανίου (π.χ. αλκύλιο) είναι μεγαλύτερο από δύο άνθρακες. Πειράματα δέσμευσης πρωτονίων από πρωτεολιποσωμάτια, πειράματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού στερεάς κατάστασης (ssNMR) και προσομοιώσεις MD, που περιλαμβάνουν μέρος της πρωτεΐνης M2 δηλ. μόνο τη διαμεμβρανική περιοχή (M2TM, M2 transmembrane domain) προτείνουν τον φραγμό του πόρου S31N M2TM. Ωστόσο τα αποτελέσματα των πειραμάτων ηλεκτροφυσιολογίας με ολόκληρη την πρωτεΐνη M2 δείχνουν πως τα μόρια δεν δρουν με φραγμό του πόρου της M2. Το στέλεχος WT H3N2, A/HongKong/1/64 ανέπτυξε ανθεκτικότητα στα παραπάνω αμινοαδαμαντανικά παράγωγα με ένα πέρασμα δραστηρικής ένωσης εμφανίζοντας μεταλλάξεις στην αλληλουχία M2TM που προτείνουν τη σύνδεση των μορίων με τον πόρο M2TM. Βρέθηκε πως όμως ανθεκτικότητα του ιού S31N H1N1(2009) παρουσία δραστικών μορίων και κοκτέιλ αυτών αναπτύσσεται μετά από 10 περάσματα (περίπου 5 εβδομάδες). Αντιθέτως στο στέλεχος S31N H1N1 A/Calif/074/2009 δεν παρατηρήθηκαν μεταλλάξεις στην περιοχή M2TM που προτείνουν ότι τα αμινοαδαμαντανικά παράγωγα δεν αποκλείουν τον πόρο M2TM σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της ηλεκτροφυσιολογίας. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι οι ενώσεις είναι δραστικές έναντι WT ιών αλλά και S31N ανθεκτικών στελεχών (PR/8/34 και A/California/07/2009) πιθανώς μέσω διαφορετικών μηχανισμών που οδηγούν στην αύξηση του pH του ενδοσωματίου (endosome neutralizers).

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. INFLUENZA A (ΓΡΙΠΗ).....	1
1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΑ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΟΥ ΒΙΡΙΟΥ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ.....	1
1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΙΟΥ.....	2
1.3 ΜΟΛΥΝΣΗ ΑΠΟ ΤΟΝ ΙΟ INFLUENZA A –ΕΠΙΔΗΜΙΕΣ ΓΡΙΠΗΣ	3
1.4 ΚΟΙΝΗ ΓΡΙΠΗ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟ 2012/2013	4
1.5 ΠΑΝΔΗΜΙΕΣ ΓΡΙΠΗΣ.....	5
1.6 ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΚΑΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ.....	8
1.7 ΣΤΕΛΕΧΗ ΤΟΥ ΙΟΥ INFLUENZA A ΜΕ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ S31N.....	9
2. ΔΙΑΥΛΟΙ ΠΡΩΤΟΝΙΩΝ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ M₂ ΤΟΥ ΙΟΥ INFLUENZA A.....	15
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	15
2.2 ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΜΑΝΤΑΔΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΡΙΜΑΝΤΑΔΙΝΗΣ ΣΤΟΝ ΙΟ WT.....	17
2.3 Η ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ S31N.....	19
3. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΝΕΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ.....	22
3.1 ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΚΟΙΝΗΣ ΓΡΙΠΗΣ ΚΑΙ ΔΡΑΣΤΙΚΑ ΑΝΑΛΟΓΑ ΑΜΑΝΤΑΔΙΝΗΣ ΚΑΙ ΡΙΜΑΝΤΑΔΙΝΗΣ.....	22
3.2 ΥΠΑΡΧΟΥΣΑ ΕΜΠΕΙΡΙΑ.....	23
3.2.1 Μη Δραστικά μόρια του ιού A /S31N	23
3.2.2 Αναστολείς του ιού A/S31N	24
3.3 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ.....	26
3.3.1 2-Αλκυλο-2-αμινοαδαμαντάνια και 1-(1-αδαμαντυλο) κυκλοπενταναμίνη/κυκλοεξαναμίνη	26
3.3.2 1'-Μέθυλο και 5-αιθυλοσπειρο[πυρρολιдино-2,2'-αδαμαντάνια]	27

**4. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΝΕΩΝ
ΕΝΩΣΕΩΝ.....27**

4.1 2-*n*-ΑΛΚΥΛΟ-2-ΑΔΑΜΑΝΤΑΝΑΜΙΝΕΣ.....27

4.2 ΚΑΡΒΟΚΥΚΛΙΚΑ ΑΝΑΛΟΓΑ ΤΗΣ ΡΙΜΑΝΤΑΔΙΝΗΣ.....36

4.2.1 Σύνθεση της 1-(1-αδαμαντανο)κυκλοπενταναμίνης.....36

4.2.2 Σύνθεση της 1-(1-αδαμαντανο)κυκλοεξαναμίνης.....37

4.3 ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΟΣ ΤΡΟΠΟΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΩΝ ΑΔΑΜΑΝΤΑΝΙΚΩΝ *tert*- ΑΛΚΑΝΑΜΙΝΩΝ ΜΕΣΩ
ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ RITTER.....38

**5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΑΜΙΝΟΑΔΑΜΑΝΤΑΝΙΚΩΝ
ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ-ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Α/Μ₂ ΑΝΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ..42**

5.1 ΓΕΝΙΚΑ.....42

5.2 ΒΙΟΦΥΣΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΑΜΙΝΟΑΔΑΜΑΝΤΑΝΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΕΤΗ-Μ₂.....44

5.2.1 Προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής.....44

5.2.2 Πειράματα φασματοσκοπίας (ssNMR και ¹⁵N-HSQC).....46

5.2.3 Αναστολή πρόσληψης πρωτονίων από την M2TM σε λιποσωμάτια.....49

5.2.4 Πειράματα ηλεκτροφυσιολογίας για το σύμπλοκο M2(1-98)-
Αμινοαδαμαντάνιο.....50

5.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΙΟΥ INFLUENZA A.....51

5.3.1 Προσδιορισμός τιμών EC₅₀ και κυτταροτοξικότητας σε κύτταρα MDCK των
αμινοαδαμαντανικών παραγώγων.....51

5.3.2. Μελέτη ανθεκτικότητας *in vitro*.....56

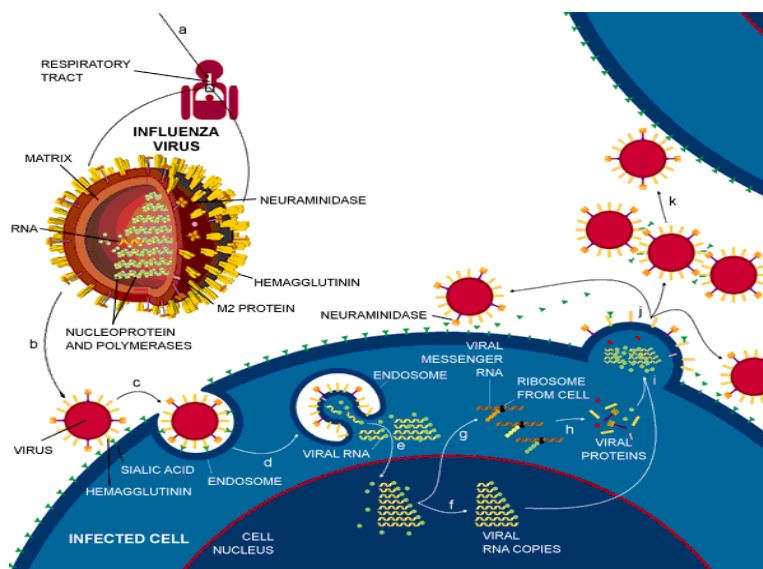
5.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ WT ΚΑΙ S31N ΕΝΑΝΤΙ ΑΜΑΝΤΑΔΙΝΗΣ
ΚΑΙ ΕΝΩΣΗΣ 6 ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΑ59

6. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....64

1. INFLUENZA A (ΓΡΙΠΗ)

1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΟΥ ΒΙΡΙΟΥ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ

Ο ιός influenza A, ανήκει στην οικογένεια των ορθομυξοϊών και είναι ιός RNA. Το εξωτερικό του βιρίου αποτελείται από μια λιπιδική διπλοστιβάδα στην οποία βρίσκονται οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες αιματογλουτίνη (HA) και νευραμινιδάση (NA) και ο πρωτεϊνικός διάυλος των ιόντων M2.¹ Στο εσωτερικό του βιρίου βρίσκεται το νουκλεοκαψίδιο το οποίο αποτελείται από το RNA του ιού που είναι συνδεδεμένο με τη νουκλεοπρωτεΐνη (NP), βρίσκεται δηλαδή ως σύμπλοκο RNP. Η νουκλεοπρωτεΐνη NP συνδέεται με τρεις μικρές πρωτεΐνες τις PB1, PB2 και PA. Οι πρωτεΐνες HA και NA είναι τα επιφανειακά αντιγόνα του ιού.^{1,2,3} Κατά τη μόλυνση, ο ιός influenza A συνδέεται με τα επιθηλιακά κύτταρα της αναπνευστικής οδού (ξενιστές) και εισέρχεται στο κύτταρο με ενδοκύτωση. Το χαμηλό pH του ενδοσώματος προκαλεί τη σύντηξη του περιβλήματος του ιού με τη μεμβράνη του ενδοσώματος και ενεργοποιεί τον ιοντικό διάυλο της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης M2 για να μεταφέρει πρωτόνια προς οξίνιση του εσωτερικού του ιού.⁴ Η οξίνιση καθιστά ασθενέστερη την ηλεκτροστατική σύνδεση μεταξύ της πρωτεΐνης M1 και του συμπλόκου RNP με αποτέλεσμα να απελευθερώνονται οι πρωτεΐνες RNP στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή. Στο κυτταρόπλασμα οι πρωτεΐνες RNP μεταφέρονται στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή όπου συντίθενται τα mRNA και vRNA (σχ. 1.1).⁵



Σχήμα 1.1 Σύσταση ιού της γρίπης και λειτουργικότητα της πρωτεΐνης A/M2. Η πρωτεΐνη M2 «οξινίζει» το εσωτερικό του ιού και προκαλεί την απελευθέρωση του ιικού RNA.⁶

1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΙΟΥ INFLUENZA A

Ο ιός της γρίπης διακρίνεται σε τρεις τύπους, την influenza A, B και C. Ο τύπος A προσβάλλει πολλά είδη θηλαστικών, όπως άλογα, χοίρους, πτηνά (πάπιες, κοτόπουλα) και ανθρώπους. Ο τύπος A είναι υπεύθυνος για τις επιδημίες και πανδημίες γρίπης. Ο τύπος B προσβάλλει αποκλειστικά τον άνθρωπο και προκαλεί ασθένεια, χωρίς όμως τις σοβαρές επιπλοκές του τύπου A. Ο τύπος C μολύνει και αυτός αποκλειστικά τον άνθρωπο, χωρίς όμως να προκαλεί ασθένεια. Επομένως, από τους παραπάνω τύπους του ιού influenza, ο τύπος A είναι αυτός που παρουσιάζει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον.⁷

Χαρακτηριστικό του ιού influenza A είναι η ικανότητα να μεταλλάσσεται, κυρίως ως προς τις πρωτεΐνες HA και NA. Ως αποτέλεσμα μεγάλων μεταλλάξεων (αντιγονικών μεταβολών) είναι η ύπαρξη διαφορετικών υποτύπων ιών με διαφορετικές μορφές αιματογλουτινίνης, δηλαδή H1, H2, H3 και νευραμινιδάσης, δηλαδή N1 και N2. Ο κάθε υπότυπος χαρακτηρίζεται από τις συγκεκριμένες μορφές των παραπάνω πρωτεϊνών, για παράδειγμα H1N1, H2N2 και H3N2. Για κάθε υπότυπο υπάρχουν παραπάνω από ένα στελέχη, εξαιτίας των μικρών σημειακών μεταλλάξεων (αντιγονικών μετατοπίσεων) που υφίστανται οι πρωτεΐνες αιματογλουτινίνη και νευραμινιδάση. Η αντιγονική μετατόπιση έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση επιδημίας. Παραδείγματα στελεχών παρουσιάζονται στο σχ. 1.2. Κάθε νέο στέλεχος χαρακτηρίζεται από τον τόπο και τον χρόνο απομόνωσης (σχ.1.2).⁸

Influenza A (H3N2)

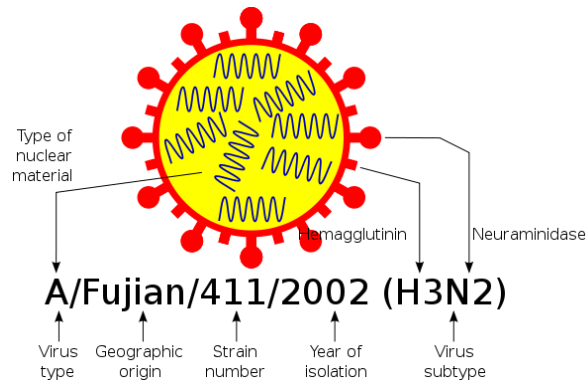
A/Philippines/2/82 (H3N2)

A/Fujian/411/2002 (H3N2)

A/Victoria/210/2009 (H3N2)

A/Victoria/361/2011 (H3N2)

Σχήμα 1.2 Παραδείγματα στελεχών του υποτύπου influenza A/H3N2



Σχήμα 1.3 Ανάλυση του συστήματος ονοματολογίας του ιού influenza

1.3 ΜΟΛΥΝΣΗ ΑΠΟ ΤΟΝ ΙΟ INFLUENZA A –ΕΠΙΔΗΜΙΕΣ ΓΡΙΠΗΣ

Η γρίπη που προκαλείται από τον ιό *influenza A* είναι ένα λοιμώδες νόσημα που εκδηλώνεται με εποχιακές επιδημίες, κατά προτίμηση το χειμώνα (κοινή γρίπη) και με τους διάφορους υποτύπους (subtypes) του (H3N2, H1N1, κ.λπ.) προκαλεί σημαντική νοσηρότητα και θνησιμότητα στους ανθρώπους δημιουργώντας, για το άμεσο μέλλον, μια αναπόφευκτη απειλή νέων πανδημιών στις οποίες οι μεταβολές στις πρωτεΐνες HA, NA είναι μεγάλες.^{9,10} Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, επιδημία γρίπης εκδηλώνεται όταν ο ιός υφίσταται σημειακή μετάλλαξη (αντιγονική μετατόπιση) στην HA ή στην NA, οπότε προκύπτει ένα νέο στέλεχος:

π.χ. *A/Victoria/210/2009 (H3N2)* ➡ *A/Victoria/361/2011 (H3N2)*.

- ❖ **Συμπτώματα:** Η επώαση διαρκεί δύο ή τρεις μέρες και δεν παρουσιάζει εμφανή συμπτώματα. Η ασθένεια αρχίζει απότομα. Μια γενική αδιαθεσία που συνοδεύεται από ρίγη προαναγγέλλει τη γρίπη. Ο ασθενής έχει υψηλό πυρετό, πονοκεφάλους και μερικές φορές ιλίγγους. Άλλα συμπτώματα είναι η μυαλγία και ο βήχας. Ο πυρετός διαρκεί τρεις με τέσσερις ημέρες και ακολούθως υποχωρεί. Τα συμπτώματα αρχίζουν να υποχωρούν μετά από την τέταρτη ημέρα, ενώ αυτά που διαρκούν περισσότερο είναι ο βήχας και ο πονόλαιμος.¹¹
- ❖ **Μεταδοτικότητα:** Η γρίπη είναι ιός που προσβάλλει το αναπνευστικό σύστημα και μέσω αυτού μεταδίδεται. Ο ιός της γρίπης παρουσιάζει μεγάλη μεταδοτικότητα. Μεταδίδεται με σταγονίδια μέσω της αναπνευστικής οδού. Η ικανότητα μετάδοσης του ιού μεταβάλλεται ανάλογα με το στάδιο στο οποίο βρίσκεται ο ασθενής. Τις πρώτες ημέρες και μέχρι να εκδηλωθούν έντονα τα συμπτώματα, η μεταδοτικότητα είναι μικρή ενώ τις επόμενες ημέρες αυξάνεται σημαντικά.¹¹

- ❖ **Νοσηρότητα:** Έχει παρατηρηθεί ότι οι ομάδες των ανθρώπων που πάσχουν περισσότερο, είναι παιδιά κάτω των 5 ετών και ενήλικες άνω των 65 ετών. Οι προαναφερθείσες ομάδες αποτελούν τους ασθενείς που συνήθως χρειάζονται νοσοκομειακή περίληψη. Η κατάσταση γίνεται δραματικότερη όταν η γρίπη μολύνει ηλικιωμένους με χρόνια καρδιακά προβλήματα ή πάσχοντες στους νεφρούς ή το αναπνευστικό σύστημα. Στην ομάδα υψηλού κινδύνου κατατάσσονται και άνθρωποι με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα.¹²
- ❖ **Επιπλοκές:** Η μόλυνση ηλικιωμένων ανθρώπων από τη γρίπη ενέχει τον κίνδυνο της επιπλοκής. Οι συνηθέστερες επιπλοκές είναι η βρογχίτιδα, η οποία είναι συχνότερη στους καρδιοπαθείς και στους διαβητικούς, και η πνευμονία. Σοβαρότερη επιπλοκή είναι η πνευμονία η οποία μπορεί να προκαλέσει το θάνατο σε ακραίες περιπτώσεις.¹²
- ❖ **Θνησιμότητα:** Η γρίπη είναι ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα υγείας στις αναπτυσσόμενες χώρες αφού αποτελεί μία από τις κύριες αιτίες θανάτου, με περισσότερους από 1000 θανάτους ανά εκατομμύριο πληθυσμού ιδιαίτερα σε άτομα ηλικίας άνω των 65 ετών.¹³ Τα στελέχη που προκαλούν εποχικές επιδημίες αντιστοιχούν στους υποτύπους H1N1, H2N2 και H3N2.

1.4 ΚΟΙΝΗ ΓΡΙΠΗ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟ 2012/2013

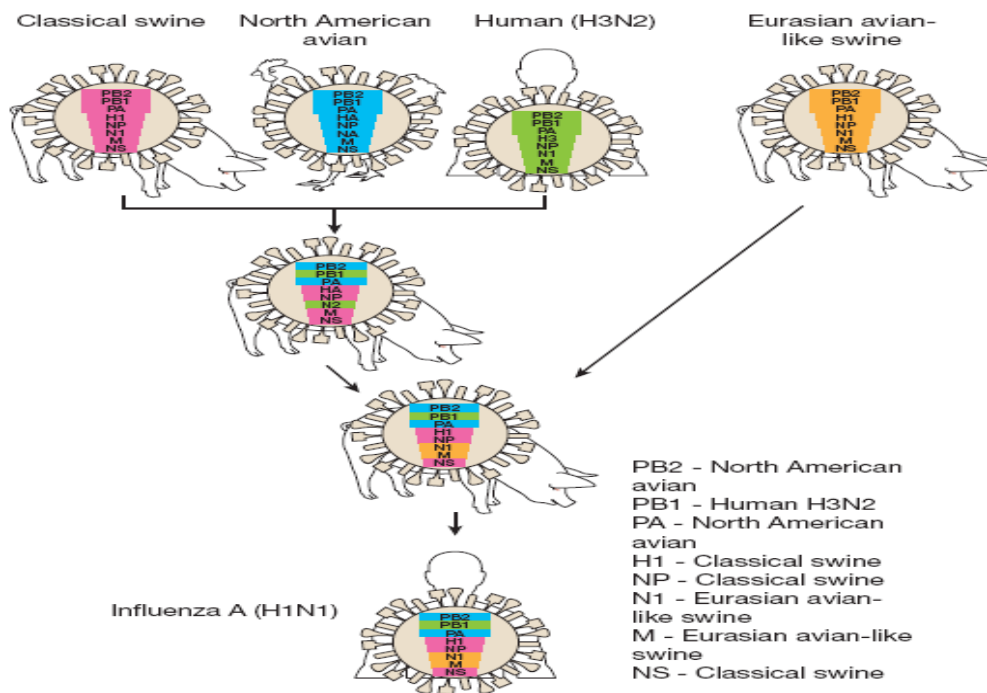
Η γρίπη στην χώρα μας: Σύμφωνα με τα στοιχεία του ΚΕΕΛΠΝΟ (Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων), την περίοδο 2012-2013 η δραστηριότητα της γρίπης στην Ελλάδα ήταν υψηλή. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι από το σύνολο των δειγμάτων γρίπης που εστάλησαν σε εργαστήρια, 95.3% αφορούν τον τύπο Α του ιού ενώ μόλις το 7% των περιστατικών αποδίδονται σε γρίπη τύπου Β. Κυρίαρχα στελέχη ήταν το πανδημικό στέλεχος H1N1 A/California/04/2009 το οποίο φέρει την μετάλλαξη S31N στην αλληλουχία της M2, αλλά και ο ιός H3N2 που είναι ιός WT. Ποσοστό 43.4% αντιστοιχεί στο στέλεχος H1N1 A/California/04/2009 ενώ ποσοστό 56.6% στο στέλεχος H3N2 A/Victoria/3/75. Από την τελευταία έκθεση του ΚΕΕΛΠΝΟ που εκδόθηκε για την περίοδο αυτή, προκύπτει ότι από το σύνολο των 108 κρουσμάτων που νοσηλεύτηκαν σε Μονάδες Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ), η πλειονότητα (61.5%) ασθένησε από τον H1N1 ενώ 32.7% ασθένησε από τον ιό H3N2. Μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί συνολικά 49 θάνατοι, πέντε εκ των οποίων αφορούσαν ασθενείς εκτός ΜΕΘ. Ο ιός γρίπης τύπου Β ταυτοποιήθηκε σε 2 (4.1%) από τους ασθενείς που κατέληξαν, ενώ από τους υπόλοιπους 47 (95.9%) ασθενείς απομονώθηκε ιός τύπου Α. Τα 32 (68.1%) από τα στελέχη τύπου Α ανήκαν στον υπότυπο Α H1N1 και τα 13 (27.6%) στον υπότυπο Α H3N2, ενώ σε 2 περιπτώσεις (4.3%) δεν ταυτοποιήθηκε ο τύπος του ιού.¹⁴

Η γρίπη στην Ευρώπη: Σύμφωνα με τα τελευταία στοιχεία του ECDC (European Center for Disease Prevention and Control) από τις 29 ευρωπαϊκές χώρες που παρείχαν δεδομένα για τη γρίπη στο ευρωπαϊκό κέντρο οι 19 ανέφεραν αυξημένη μετάδοση του ιού. Στα ευρωπαϊκά κράτη τα κρούσματα είναι μέχρι στιγμής μοιρασμένα μεταξύ του τύπου A και του τύπου B του ιού της γρίπης. Σε ότι αφορά πάντως τα στελέχη του τύπου A τα πρωτεία φαίνεται να έχει το πανδημικό στέλεχος H1N1 A/California/04/2009 παρά το στέλεχος H3N2.¹⁵

Η γρίπη στις ΗΠΑ: Στις ΗΠΑ πάλι, αντιθέτως με την Ευρώπη, το στέλεχος H3N2 φαίνεται να επικρατεί. Τα στοιχεία του CDC (Center for Disease Control and Prevention) αναφέρουν ότι ποσοστό 97% των κρουσμάτων που έχουν μολυνθεί με τον τύπο A του ιού της γρίπης αφορούν το συγκεκριμένο στέλεχος και μόλις 3% το στέλεχος H1N1. Συνολικά ο τύπος A της γρίπης εντοπίζεται στο 79% των κρουσμάτων ενώ ο τύπος B στο 21%. Η αιτία για την οποία η Ευρώπη και οι ΗΠΑ φαίνεται να πλήττονται από διαφορετικά στελέχη του ιού της γρίπης φαίνεται να οφείλεται στο γεγονός πως στις ΗΠΑ είχαν εμβολιαστεί περισσότερα άτομα για το πανδημικό στέλεχος H1N1 τα προηγούμενα χρόνια, με αποτέλεσμα να έχει αναπτυχθεί ανοσία στον πληθυσμό.¹⁶

1.5 ΠΑΝΔΗΜΙΕΣ ΓΡΙΠΗΣ

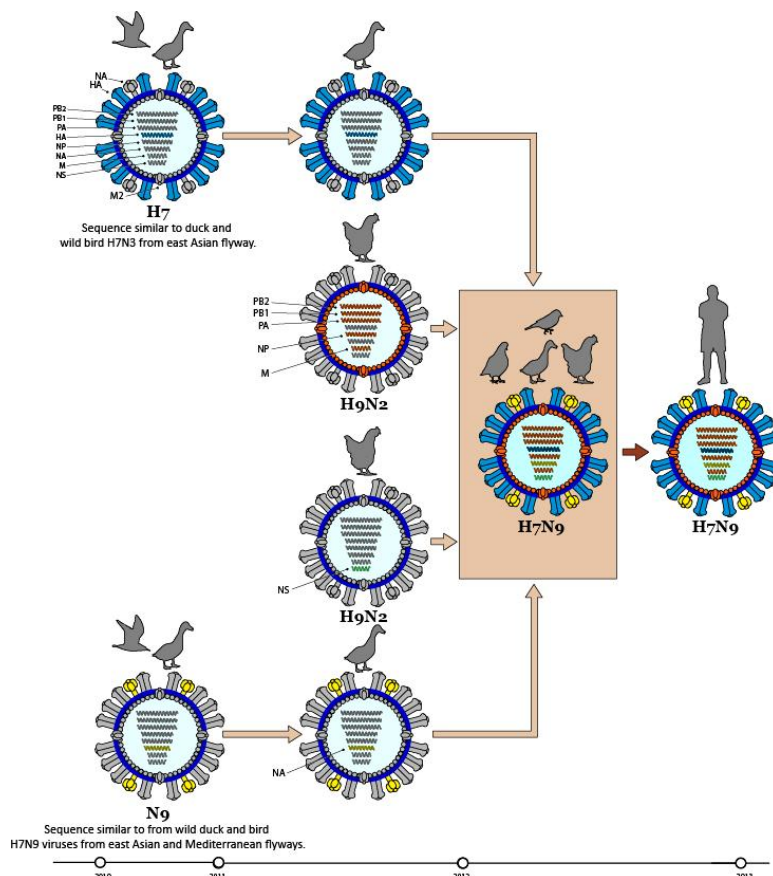
Η γρίπη μπορεί επίσης να εμφανιστεί με τη μορφή παγκόσμιων επιδημιών, τις πανδημίες, στις οποίες υπάρχει αντιγονική μεταβολή των αντιγόνων (HA,NA) του ιού τύπου A και είναι ανεξάρτητες από εποχές. Τέτοιες αντιγονικές μεταβολές συμβαίνουν περιστασιακά και τότε εμφανίζεται ένα νέο στέλεχος του ιού εναντίον του οποίου δεν υπάρχει ανοσία, προσβάλλοντας μεγάλα τμήματα του πληθυσμού και οδηγώντας σε πανδημία γρίπης. Για να υπάρξει αντιγονική μεταβολή απαιτείται μεγάλος γενετικός ανασυνδυασμός του ιού, ο οποίος επιτυγχάνεται όταν στο ίδιο κύτταρο ξενιστή παρασιτούν διαφορετικοί υποτύποι ιού influenza A.¹⁷ Ένα παράδειγμα φαίνεται στην δημιουργία του H1N1 στελέχους με γενετικό υλικό από 4 προϋπάρχουσες μορφές του ιού στο σχήμα 1.4.



Σχήμα 1.4 Παράδειγμα γενετικού ανασυνδυασμού του ιού που προκαλείται από την ταυτόχρονη προσβολή του ανθρώπου από 4 διαφορετικούς υποτύπους του ιού influenza A προκαλώντας την πανδημία του 2009 (H1N1).¹⁸

Κατά τον 20^ο αιώνα υπήρξαν 3 πανδημίες, η Ισπανική γρίπη το 1918-1920 η οποία προήλθε από το στέλεχος H1N1, και προκάλεσε το θάνατο σε περισσότερους από 40.000.000 ανθρώπους παγκοσμίως,^{19,20} η Ασιατική γρίπη το 1957 από το στέλεχος H2N2 που έλαβε χώρα κυρίως στην Κίνα, τις ΗΠΑ, τη Φιλανδία και την Ιαπωνία με 70.000 θύματα και η γρίπη του Hong Kong το 1968 από το στέλεχος H3N2 που προκάλεσε το θάνατο 30.000 ανθρώπων στις ΗΠΑ.²¹ Μία πιο πρόσφατη πανδημία που συνέβη το 2009, πρωτοπαρουσιάστηκε στο Μεξικό και από εκεί μεταδόθηκε στις ΗΠΑ και σε γειτονικές χώρες φτάνοντας στην Ευρώπη, Ασία, Αφρική και Ωκεανία. Πρόκειται για γρίπη των χοίρων που προκαλείται από ένα νέο στέλεχος γρίπης A, H1N1. Αποτελεί μετάλλαξη ιού influenza με γενετικό υλικό από 4 προϋπάρχουσες μορφές του ιού, 2 από γρίπη χοίρων, ένα από γρίπη πτηνών και ένα από την ανθρώπινη κοινή γρίπη (σχ.1.4). Αυτή είναι και η διαφορά σε σχέση με τον «τυπικό» ιό της γρίπης των χοίρων, ότι δηλαδή περιέχει και γονίδια από ιούς πτηνών και ανθρώπων, καθώς και ότι ο ιός H1N1 μεταδίδεται από άνθρωπο σε άνθρωπο, ενώ ο ιός της γρίπης των χοίρων μεταδίδεται μόνο μέσω άμεσης επαφής με χοίρους. Ο οργανισμός ΠΟΥ (Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας) κήρυξε αυτό το στέλεχος του ιού πανδημία στις 11/6/2009.¹⁸ Ειδικότερα, από την πανδημία του 2009 προσβλήθηκαν 1.632.258 άνθρωποι και πέθαναν σε όλο τον κόσμο περίπου 18.000 άτομα¹⁸ ενώ σύμφωνα με στοιχεία που δόθηκαν στο ΚΕΕΛΠΝΟ στην Ελλάδα ως τα τέλη Μαΐου επιβεβαιώθηκαν εργαστηριακά 18.230 κρούσματα από τον ιό της νέας γρίπης ενώ οι θάνατοι ανήλθαν σε 149.²²

Αν και δεν έλαβε τις διαστάσεις πανδημίας, ένα νέο στέλεχος, που αξίζει να αναφερθεί, εμφανίστηκε στην Κίνα την περίοδο Μαρτίου–Απριλίου 2013 και ήταν ιός H7N9 με ασυνήθιστα υψηλό ποσοστό θνησιμότητας, για μια νέα λοίμωξη, που έφτανε το 36%. Το γεγονός ότι δεν μεταδίδεται από άνθρωπο σε άνθρωπο απέκλιση την πιθανότητα πανδημίας, παρόλα αυτά υπάρχει μεγάλη ανησυχία γιατί μεταδίδεται πολύ εύκολα από τα πουλερικά στον άνθρωπο τα οποία δεν έχουν εμφανή συμπτώματα ώστε να αποφευχθεί η μετάδοση.^{23,24} Σχ. 1.5



Σχήμα 1.5 Σχηματικό διάγραμμα της νέας γρίπης influenza A.

Στον Πίνακα 1.1 παρουσιάζονται οι αντιγονικοί τύποι της γρίπης που προκάλεσαν πανδημίες από τις αρχές του 19^{ου} αιώνα μέχρι σήμερα.

Πίνακας 1.1 Οι κυριότεροι τύποι πανδημιών μέχρι σήμερα.

ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΓΡΙΠΗΣ	ΧΡΟΝΟΛΟΓΙΑ	ΘΑΝΑΤΟΙ	ΤΥΠΟΣ	ΕΚΤΑΣΗ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΗΣ	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΜΟΣ ΤΗΣ ΠΑΝΔΗΜΙΑΣ
Ασιατική /Ρωσική	1889-1890	1.000.000	H3N8 ή H2N2	H+++N?	ΜΕΤΡΙΑ
Ισπανική	1918-1920	20-100 εκ.	H1N1	H+++N+++	ΔΡΙΜΕΙΑ
Ασιατική	1957-1958	1-1.5εκ.	H2N2	H+++N+++	ΔΡΙΜΕΙΑ
Hong Kong	1968-1969	0.75-1εκ.	H3N2	H+++N-	ΜΕΤΡΙΑ
Ρωσική	1977-1978	?	H1N1	H+++N+++	ΗΠΙΑ
Γρίπη των χοίρων	2009-2010	18.000	H1N1	H-N-	ΜΕΤΡΙΑ
Εποχική Γρίπη	Κάθε χρόνο	250.000-500.000 ²²	H3N2 και H1N1		

+ = μικρή μεταβολή ++ = μέτρια +++ = μεγάλη - = καμία

1.6 ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΚΑΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Ο ιός influenza A προκάλεσε πανδημία λόγω ανεπαρκών επιλογών θεραπείας το 1918, 1957, 1968 και πιο πρόσφατα το 2009. Ανεπάρκεια θεραπείας αναπτύσσεται λόγω της ανθεκτικότητας του ιού σε εμβόλια και σε αντικά φάρμακα. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην ανάπτυξη μεταλλάξεων σε μόρια ή πρωτεΐνες που επιτρέπουν την είσοδο του ιού (πχ HA,N) και την μόλυνση του κυττάρου ξενιστή. Αυτές οι μεταλλάξεις μπορούν να προκαλέσουν μεγάλες γενετικές μετατοπίσεις (αντιγονικές μεταβολές) κάθε περίπου 20 με 30 χρόνια αυξάνοντας την ανάγκη για αποτελεσματικά φάρμακα έναντι στους ήδη υπάρχοντες μεταλλαγμένους επιδημικούς ιούς αλλά και σε μελλοντικούς ιούς που θα φέρουν μεγάλες μεταλλάξεις.^{25,26}

Λόγω μεγάλων μεταλλάξεων στους υποτύπους των ιικών στελεχών της influenza οι εποχικές επιδημίες έχουν εξελιχθεί σε πανδημίες προκαλώντας υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας. Αυτό συμβαίνει, όπως αναφέρθηκε, γιατί η αιματογλουτινίνη του νέου στελέχους διαφέρει ουσιωδώς από την αιματογλουτινίνη των εποχικών ιών influenza A με αποτέλεσμα το μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού να στερείται ανοσολογικής προστασίας και κατά συνέπεια την πρόκληση πανδημίας.¹⁷ Σύμφωνα με το CDC (Center for Disease Control and Prevention) στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, ο ιός της γρίπης και οι επιπλοκές της εξακολουθούν να αποτελούν σοβαρό κίνδυνο για την υγεία και την κύρια αιτία θανάτου έναντι οποιασδήποτε μολυσματικής ασθένειας.

Ένας από τους κύριους στόχους αντικών φαρμάκων για την αντιμετώπιση λοιμώξεων από τον ιό influenza A είναι η διαμεμβρανική πρωτεΐνη M2. Είναι ένας ιοντικός διάυλος και συνιστά ένα ομοτετραμερές σύστημα από α-έλικες σχηματίζοντας έναν πόρο.^{27,28} Φάρμακα όπως η αμανταδίνη και η ριμανταδίνη είχαν βρει ευρεία εφαρμογή τα τελευταία χρόνια με μηχανισμό δράσης φραγμό του πόρου πλησίον των αμινοξέων S31, V27, Ala30, G34.²⁹ Όμως, με την γρίπη των πτηνών το 2005 (H5N1) και μέχρι το 2006 πάνω από το 92% των στελεχών στις ΗΠΑ εμφάνισαν ανθεκτικότητα στην αμανταδίνη και ριμανταδίνη.³⁰ Ακολούθησε η γρίπη των χοίρων το 2009 (H1N1) με ανθεκτικότητα επίσης στην αμανταδίνη.¹⁸ Είναι γνωστό ότι και το στέλεχος H3N2 της ανθρώπινης γρίπης εμφάνισε ανθεκτικότητα και διαδόθηκε ταχύτατα από το 2005 και μέχρι σήμερα ξεπερνάει το 90% στις ΗΠΑ και τις Ασιατικές χώρες.³¹ Τρεις μεταλλάξεις αμινοξέων έχουν παρατηρηθεί να εμφανίζονται στον πόρο της M2 που προκαλούν την ανθεκτικότητα σε αμανταδίνη, είτε η καθεμία ξεχωριστά είτε σε συνδυασμό μεταξύ τους.

Η μετάλλαξη της σερίνης (S31) σε ασπαραγίνη (N), της βαλίνης (V27) σε αλανίνη (A) και της λευκίνης (L26) σε φαινυλαλαλίνη (F), όλες επηρεάζουν την πρόσδεση της αμανταδίνης και ριμανταδίνης στον πόρο, με την S31N να είναι η ευρύτερα διαδεδομένη προκαλώντας ανθεκτικότητα σε αυτά τα φάρμακα σε ποσοστό 90% των υποτύπων του ιού influenza A μέχρι 2011.³⁰ (Τα αμινοξέα S31 και V27 κατευθύνονται προς το κέντρο του πόρου του ιοντικού διαύλου M2TM ενώ το αμινοξύ L26 έχει πλευρική αλυσίδα βρίσκεται στον χώρο μεταξύ δύο α-ελίκων).

1.7 ΣΤΕΛΕΧΗ ΤΟΥ ΙΟΥ INFLUENZA A ΜΕ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ S31N

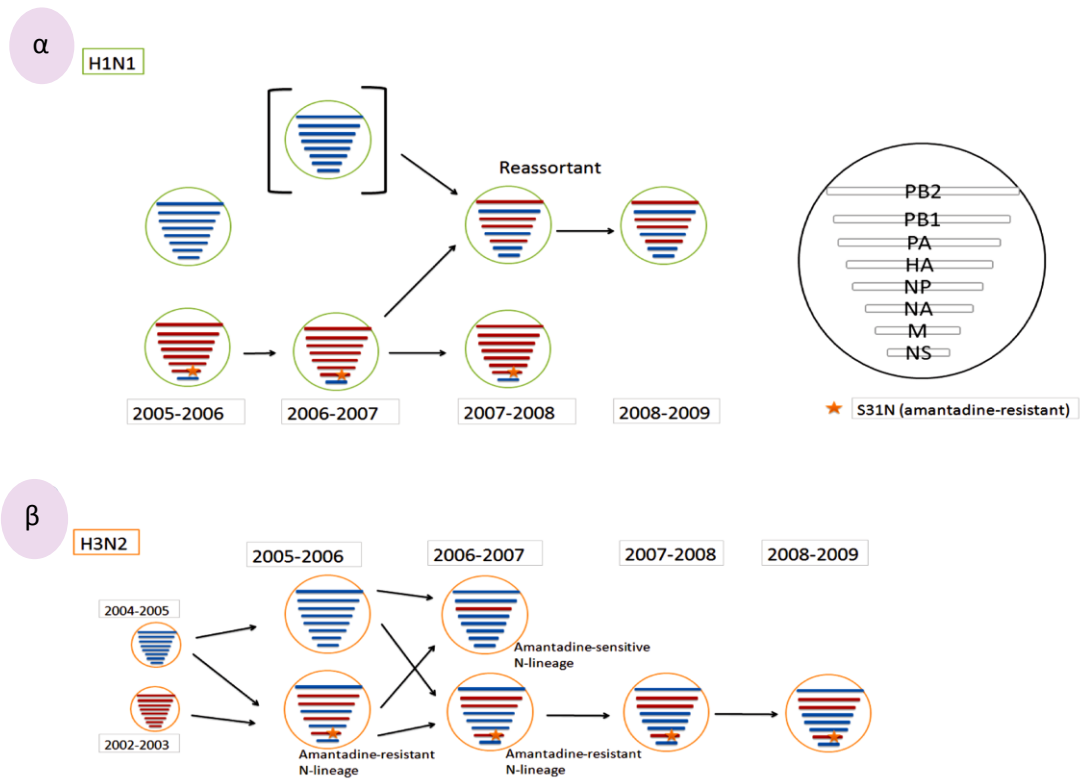
- **H3N2**

Μεταξύ των ανθεκτικών έναντι στην αμανταδίνη στελεχών του ιού influenza A που φέρουν μετάλλαξη S31N είναι και ο υπότυπος A/H3N2. Η ακριβής προέλευση του ιού influenza A/H3N2 που φέρει την μετάλλαξη S31N δεν έχει ακόμα χαρακτηριστεί, ιδιαίτερα στην νοτιοανατολική Ασία. Ενώ λιγότερο από 2% των ιών της γρίπης υποτύπου A/H3N2 ήταν ανθεκτικό στην αμανταδίνη και τη ριμανταδίνη, την περίοδο 1995-2002, ανιχνεύτηκε αύξηση ανθεκτικότητας στο 12,3% το έτος 2004. Απότομες αυξήσεις εμφανίστηκαν για πρώτη φορά στην Ασία και συγκεκριμένα στην Κίνα, όπου η ανθεκτικότητα έφτασε στο 73,8% καθώς επίσης και στο Hong Kong αγγίζοντας το 69,8% ενώ το 2002 ήταν μόλις 8,2%. Πρόσφατα η μετάλλαξη S31N ανιχνεύτηκε στο 100% της γρίπης σε χώρες της Ασίας. Στις ΗΠΑ η ανθεκτικότητα παρουσιάστηκε λίγο αργότερα συγκριτικά με την Ασία, με τα ποσοστά να αυξάνονται από 2% το 2003 σε 11% το 2004-2005 και πάνω από 90% κατά την διάρκεια της επιδημίας της περιόδου 2005-2006. Από το 2006 οι ΗΠΑ αποθαρρύνουν την χρήση των συγκεκριμένων φαρμάκων.^{30,31}

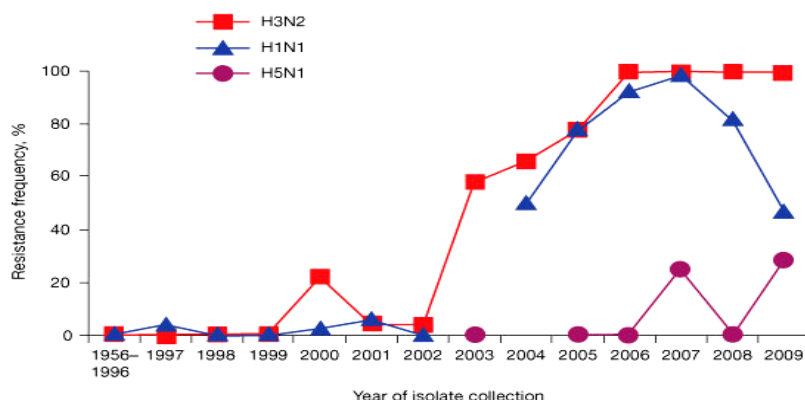
- **H1N1**

Αρχικά σημειώθηκε αύξηση ανθεκτικότητας του ιού H1N1 στην αμανταδίνη στην Κίνα το 2004-2005 και μετέπειτα το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε σε ολόκληρο τον κόσμο. Κατά την διάρκεια 2006-2007 περισσότερα από τα μισά στελέχη του H1N1 που βρέθηκαν σε Ασιατικές και Ευρωπαϊκές χώρες ήταν ανθεκτικά, ενώ τα ποσοστά ανθεκτικότητας στην Αυστραλία ήταν χαμηλά το 2007. Με ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στα στελέχη αυτά την περίοδο του 2005-2006, ένα στα τέσσερα είχαν την μετάλλαξη S31N στην M2. Ωστόσο, την επόμενη περίοδο 2006-2007 όλα τα στελέχη ήταν ανθεκτικά λόγω της μετάλλαξης S31N. Αυτό που επισημαίνεται είναι πως σε όλα τα ανθεκτικά στελέχη η κύρια μετάλλαξη που βρέθηκε στο γονίδιο της ανθεκτικότητας ήταν η S31N. Η γενετική αυτή ομάδα που περιέχει τα γονίδια αυτά της ανθεκτικότητας λέγεται N-γένος (N-lineage) και εξαπλώθηκε σε όλο τον κόσμο.³²

Αξίζει να σημειωθεί ότι στην Ιαπωνία, ενώ την περίοδο 2007-2008 βρέθηκαν και ανθεκτικά και ευαίσθητα στην αμανταδίνη στελέχη H1N1, την περίοδο 2008-2009 υπήρχαν μόνο ευαίσθητα στην αμανταδίνη στελέχη του ιού. Η ύπαρξη ευαίσθητων στελεχών το 2007 πιθανόν να οφείλεται σε ετεροσυνδυασμό στο γενετικό υλικό του ιού, ώστε το στέλεχος αυτό να μη φέρει γονίδια που είναι υπεύθυνα για την ανθεκτικότητα του, δηλαδή γονίδια που επιφέρουν μετάλλαξη S31N στην αλληλουχία της M2. Τα γονίδια αυτά δεν μεταβιβάζονται στην επόμενη περίοδο 2008-2009 με τελικό αποτέλεσμα να επικρατεί το ευαίσθητο στην αμανταδίνη στέλεχος χωρίς την ύπαρξη μεταλλάξεων στην αλληλουχία (σχ.1.6α). Συνεπώς η αύξηση της ευαισθησίας του ιού ορίζεται από την μεταβίβαση των αντίστοιχων γονιδίων στην επόμενη περίοδο 2008-2009. Αντίθετα στον ιό H3N2 όλα τα στελέχη αυτών των δύο περιόδων βρέθηκαν ανθεκτικά εξαιτίας της παρουσίας της μετάλλαξης S31N στο γονίδιο της M2, γεγονός που αποδεικνύει πως στην περίπτωση αυτή δεν υπήρξαν φαινόμενα ετεροσυνδυασμού στη δημιουργία των στελεχών αυτών (σχ.1.6β). Αυτό που είναι αντιληπτό από τα παραπάνω είναι ότι το νέο ανασυνδυασμένο ιικό στέλεχος του H1N1 (την περίοδο 2008-2009) δεν φέρει την μετάλλαξη S31N, σε αντίθεση με τον H3N2 και οι λόγοι είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι (σχ. 1.6, σχ. 1.7).³²



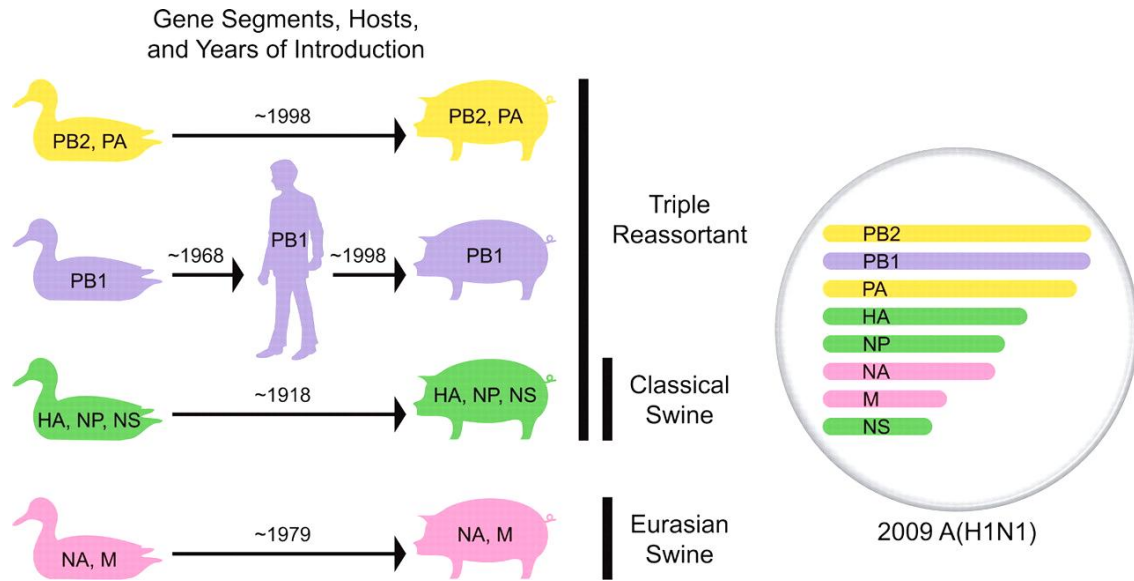
Σχήμα 1.6. Η επικράτηση των ευαίσθητων στελεχών στον ιό H1N1 και των ανθεκτικών στελεχών στον H3N2 στην αμανταδίνη κατά την περίοδο 2007-2009.³² Την περίοδο 2005-2006 η αλληλουχία στην M2 φέρει την μετάλλαξη S31N για τον H1N1 και για τον H3N2 ιό αυξάνοντας το ποσοστό των ανθεκτικών στελεχών στην αμανταδίνη. Στην περίπτωση του H1N1 (α) το ποσοστό των ανθεκτικών στελεχών μειώνεται στην επόμενη περίοδο (2007-2008) λόγω ετεροσυνδυασμού του γενετικού υλικού ιικών στελεχών με και χωρίς την S31N μετάλλαξη στην αλληλουχία. Έτσι την περίοδο 2008-2009 έχουμε ως αποτέλεσμα την δημιουργία νέου στελέχους H1N1 χωρίς την εμφάνιση μετάλλαξης S31N. Κάτι ανάλογο δεν παρατηρείται και για το στέλεχος H3N2 (β) που φέρει την μετάλλαξη S31N στην αλληλουχία της M2 σε όλες τις παραπάνω περιόδους με τελικό αποτέλεσμα την περίοδο 2008-2009 την ύπαρξη μόνο ανθεκτικών στελεχών.



Σχήμα 1.7 Μεταβολή της ανθεκτικότητας ιικών στελεχών στην αμανταδίνη κατά την περίοδο από 1956-2009.

- **H1N1 (2009)**

Το 2009 ένας νέος ιός της γρίπης H1N1 προκάλεσε πανδημία. Πρόκειται για μια μετάλλαξη της γρίπης με γενετικό υλικό από τέσσερις προϋπάρχουσες μορφές του ιού: δύο από τη γρίπη των χοίρων (ένα από Βόρεια Αμερική και ένα από Ευρασία), ένα από τη γρίπη των πτηνών, και ένα από την ανθρώπινη κοινή γρίπη. Πιο συγκεκριμένα φαίνεται πως ο H1N1 ιός A του 2009 περιέχει έναν συνδυασμό γονιδίων που προηγουμένως δεν έχουν αναφερθεί σε χοίρους ή ανθρώπινους ιούς της γρίπης στις ΗΠΑ ή και αλλού. 1) Τα γονίδια των πρωτεϊνών NA και M2 της Ευρασιατικής γρίπης των χοίρων μολύνθηκαν από τμήματα γονιδίου NA και M2 που προέρχονται εξ' ολοκλήρου από γονίδια του ιού της γρίπης των πτηνών που εισήλθαν στον Ευρασιατικό πληθυσμό των χοίρων το 1979 και συνέχισαν να κυκλοφορούν εντός των συνόρων της Ευρασίας, για αυτό δεν είχαν αναφερθεί ποτέ περιπτώσεις εκτός. 2) Τα τμήματα γονιδίου των HA, NP και NS προέρχονται από τα γονίδια της συνηθισμένης γρίπης των πτηνών που υπολογίζεται πως προϋπάρχουν από το 1918. 3) Τμήματα γονιδίου των υπομονάδων PB2 και PA των RNA πολυμερασών της γρίπης των πτηνών εισήλθαν στον πληθυσμό των χοίρων στη Βόρεια Αμερική το 1998 μετά από ετεροσυνδυασμό στο γενετικό τους υλικό. 4) Τέλος τα γονίδια της υπομονάδας PB1 της γρίπης των χοίρων μολύνθηκαν από τμήματα γονιδίου PB1 ανθρώπινης γρίπης το 1998 τα οποία εισήλθαν στον ανθρώπινο πληθυσμό το 1968 από γονίδια της γρίπης των πτηνών.³³



Σχήμα 1.8 Προέλευση και καταγωγή των γονιδίων στον H1N1 (2009) ³³

Τα τμήματα γονιδίου της M2 που συνδέεται πιο στενά με τον 2009 A(H1N1) είναι από το A/Hong Kong/ 1774/1999 (H3N2), το οποίο απομονώθηκε από ανθρώπινο περιστατικό της γρίπης των χοίρων (σχ. 1.8). Ο ιός αυτός είχε το γονίδιο M2 με μετάλλαξη S31N εμφανίζοντας ανθεκτικότητα στην αμανταδίνη και τη ριμανταδίνη. Η μετάλλαξη στην M2 σε συνδυασμό και με άλλες μεταλλάξεις στο γενετικό υλικό του ιού οδήγησαν στην αυξημένη ικανότητα του ιού A (H1N1) 2009 να αναπαράγεται και να μεταδίδεται ταχέως από άνθρωπο σε άνθρωπο.³³

- **H7N9 (2013)**

Τα πρώτα περιστατικά μόλυνσης από ιό A H7N9 εμφανίστηκαν στην Κίνα κατά την διάρκεια Φεβρουαρίου–Μαρτίου 2013. Είναι η πρώτη φορά που αυτό το στέλεχος του ιού προσέβαλλε ανθρώπους. Περίπου 132 άνθρωποι προσβλήθηκαν από τον ιό και 37 από αυτούς πέθαναν μέχρι τις 30/5/2013 (σχ. 1.9). Από μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην αλληλουχία των αμινοξέων, φάνηκε ότι και σε αυτήν την περίπτωση η μετάλλαξη που επικρατεί στον ιοντικό δίαυλο της M2 είναι η S31N με αποτέλεσμα την εμφάνιση ανθεκτικότητας του στελέχους στα φάρμακα του πόρου αμανταδίνη και ριμανταδίνη. Παρότι η θνησιμότητα είναι αυξημένη δεν υπάρχει ένδειξη μέχρι σήμερα μετάδοσης από άνθρωπο σε άνθρωπο και σε συνδυασμό με το ότι η γρίπη αυτή δεν προκαλεί τον θάνατο σε πουλερικά καθιστά πιο δύσκολη την παρακολούθηση και μελέτη του συγκεκριμένου υποτύπου. Η έρευνα όσον αφορά την μετάδοση του ιού είναι σε εξέλιξη³⁴.

	February		March		April		May		unknown month of onset		Total	
	cases	deaths	cases	deaths	cases	deaths	cases	deaths	cases	deaths	cases	deaths
Total	2	2	30	12	87	7	3	0	10	16	132	37

Σχήμα 1.9 Αριθμός περιστατικών που σημειώθηκαν στην Κίνα από τον 2/2013 έως τον 5/2013.³⁵

2. ΔΙΑΥΛΟΙ ΠΡΩΤΟΝΙΩΝ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ M2 ΤΟΥ ΙΟΥ INFLUENZA A

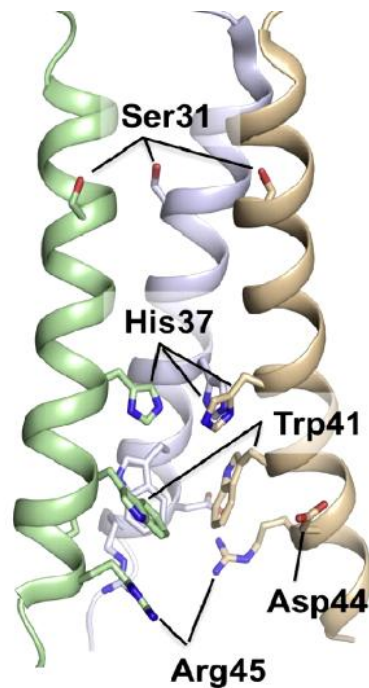
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ένας αποδεδειγμένος τρόπος αναστολής του ιού influenza A είναι ο φραγμός του πόρου της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης M2 που βρίσκεται στο μεμβρανικό περίβλημα του βιρίου. Αποτελεί διάυλο πρωτονίων των οποίων η κατεύθυνση μεταφοράς τους είναι από το N-τελικό άκρο στο C-τελικό άκρο. Η μεταφορά πρωτονίων είναι απαραίτητη για την οξίνιση του εσωτερικού του ιού με αποτέλεσμα α) τη διάσπαση του συμπλόκου M1-RNP που απελευθερώνει το RNA του ιού στο κύτταρο β) την αλλαγή της διαμόρφωσης της HA σε όξινη μορφή, η οποία γίνεται κατά την μεταφορά του ιού από το trans-Golgi δίκτυο και είναι απαραίτητη για την έξοδο του ιού από το κύτταρο μέσω σύντηξης με την κυτταρική μεμβράνη.

Η πρωτεΐνη M2 αποτελείται από τέσσερις έλικες 97 αμινοξέων η καθεμιά, με το N-τελικό της άκρο να κατευθύνεται έξω από τον ιό. Αποτελείται από τρία τμήματα: ένα εξωκυτταρικό N-τελικό άκρο (αμινοξέα 1-21) το διαμεμβρανικό τμήμα M2TM (M2 transmembrane domain) (22-46) και το C-τελικό άκρο(47-97) εντός του ιού ή του κυττάρου (κυτταροπλασματική περιοχή). Η πρωτεΐνη A/M2 ως διάυλος πρωτονίων μπορεί να βρεθεί σε δύο καταστάσεις ανάλογα με το pH. Σε υψηλό pH ($pH > 7.5$) η πρωτεΐνη M2 βρίσκεται στην κλειστή κατάσταση και δεν επιτρέπει τη διέλευση πρωτονίων. Σε χαμηλό pH ($pH < 5$) γίνεται πρωτονίωση των ιστιδινών-37 και λόγω ηλεκτροστατικής άπωσης των θετικά φορτισμένων ιμιδαζολίων η πρωτεΐνη M2 βρίσκεται στην ανοικτή κατάσταση επιτρέποντας τη διέλευση πρωτονίων που προκαλεί την απελευθέρωση ιικού RNA στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή. Μελέτες μετάλλαξης έχουν δείξει ότι δύο αμινοξέα είναι κρίσιμα για τη λειτουργία της πρωτεΐνης M2 ως ιοντικού διαύλου πρωτονίων: η ιστιδίνη-37 (His37) και η θρυπτοφάνη-41 (Trp41) (σχ.2.1).^{36,37}

SSDPLVVAASIIGILHLILWILDRL – amide (UDORN)

Σχήμα 2.1 Η διαμεμβρανική περιοχή της M2TM (25 αμινοξέα).

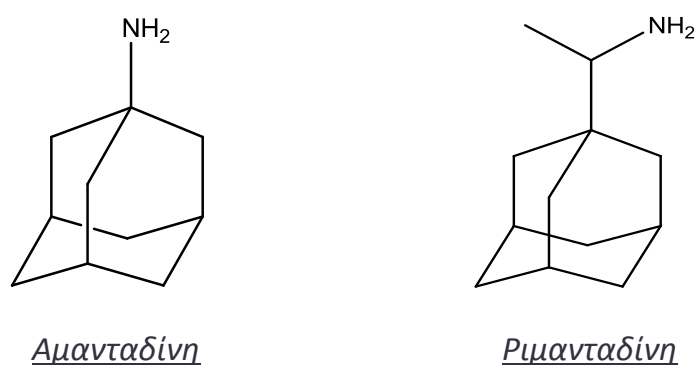


Σχήμα 2.2 Δίαυλος M2 .

Πολικά αμινοξέα που συμμετέχουν στη μεταφορά οξωνίων δια μέσου του διαύλου M2TM. Η μεταφορά των οξωνίων είναι δυνατή μέσω των *His-37* που δρουν ως οι αισθητήρες και των *Trp-41* που δρουν ως πύλη του διαύλου. Επιπλέον, η δευτεροταγής αμινομάδα του ινδολίου της θρυπτοφάνης της μιας υπομονάδας είναι σε απόσταση σχηματισμού δεσμού υδρογόνου με την καρβοξυλομάδα (COO^-) του ασπαρτικού οξέος-44 της απέναντι υπομονάδας. Πιθανώς αυτοί οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των υπομονάδων συμβάλλουν στο κλείσιμο της πύλης πρωτονίων του διαύλου. Η *αργινίνη-45* βρίσκεται επίσης στην κατάλληλη απόσταση για να σχηματίσει γέφυρες άλατος με το *ασπαρτικό οξύ-44* άλλης υπομονάδας. Το *ασπαρτικό οξύ-44* και η *αργινίνη-45* είναι τα μόνα πολικά αμινοξέα σε αυτό το υδρόφοβο κομμάτι του διαύλου. Συνεπώς, είναι πιθανόν να βοηθούν την έξοδο των πρωτονίων δεχόμενα τα οξόνια και να τα απελευθερώνουν στην υδρόφιλη περιοχή της μεμβράνης. Η *S31* ως πολικό αμινοξύ παίρνει μέρος στην υδάτωση του διαύλου ως προϋπόθεση για τη μεταφορά πρωτονίων (στο σχήμα φαίνονται μόνο οι τρεις από τις τέσσερις αλυσίδες του τετραμερούς).

2.2 ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΜΑΝΤΑΔΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΡΙΜΑΝΤΑΔΙΝΗΣ ΣΤΟΝ ΙΟ WT

Η αμανταδίνη και η ριμανταδίνη είναι αναστολείς της μεταφοράς πρωτονίων στην κοινή γρίπη (WT), δρώντας στο διάυλο της πρωτεΐνης M2^{38,39}, και πρόσφεραν έναν αποτελεσματικό τρόπο προφύλαξης κατά της influenza A πριν το 2005.^{40,30} Η έρευνα γύρω από την πρωτεΐνη M2 και τον πρωτεϊνικό διάυλο της διαμεμβρανικής περιοχής (M2TM) προήλθε αρχικά από την προσπάθεια εξήγησης του τρόπου αναστολής της πρωτεΐνης A/M2 από τα αντι-ικά φάρμακα αμανταδίνη και ριμανταδίνη και η περίπτωση είναι χαρακτηριστική.⁴

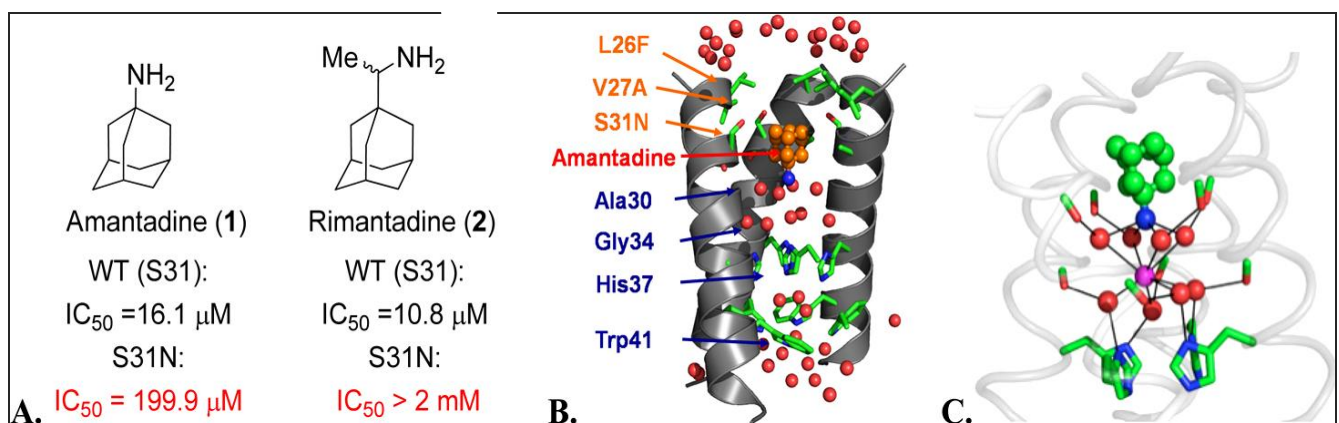


Σχήμα 2.2 Δομές φαρμάκων αμανταδίνη και ριμανταδίνη

Τα φάρμακα αυτά αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό του ιού WT σε μικρομοριακές συγκεντρώσεις (0.1-5μM).⁴ Είχε ήδη κατασκευαστεί από το 1993 ένα υποθετικό μοντέλο για την πρωτεΐνη M2 του ιού influenza A/Chicken/Germany/27 (H7N7) σύμφωνα με το οποίο θεωρείται ότι η θέση σύνδεσης του φαρμάκου αμανταδίνη είναι στο εσωτερικό του ιοντικού πόρου αλληλεπιδρώντας με τα αμινοξέα Ser31 και Val27.²⁹ Με βάση το γεγονός ότι στελέχη ιών influenza A, που είναι ανθεκτικά στα φάρμακα αυτά παρουσιάζουν συνήθως μεταλλάξεις στα αμινοξέα Val27, Ala30, Ser31, Gly34 προτάθηκε από νωρίς ότι η αμανταδίνη δρα φράζοντας το διάυλο A/M2 στη θέση που ορίζουν αυτά τα αμινοξέα αποκλείοντας έτσι τη μεταφορά των πρωτονίων (σχ.2.3).⁴¹ Ανθεκτικότητα στην αμανταδίνη αναπτύσσεται επίσης ταχέως σε κλινικό περιβάλλον⁴² και υπεύθυνες για την εμφάνιση ανθεκτικότητας αποτελούν οι μεταλλάξεις στα αμινοξέα 26, 27, 30, 31, ή 34, των οποίων οι πλευρικές αλυσίδες βρίσκονται εντός του πόρου του διαύλου M2TM πλησίον της θέσης σύνδεσης της αμανταδίνης, όπως βρέθηκε μόλις πρόσφατα χρησιμοποιώντας κρυσταλλογραφία ακτίνων-X και φασματοσκοπία NMR στερεάς κατάστασης για το σύμπλοκο M2TM-Am και M2TM-Am, M2TM-Rim αντίστοιχα.^{29,41,43-46}

Άμεση συνέπεια του φραγμού του πόρου της πρωτεΐνης M2 είναι α) η μη οξίνιση του εσωτερικού του βιρίου κατά την είσοδο του ιού στο κύτταρο με συνέπεια τη μη διάσπαση της πρωτεΐνης M1 με το σύμπλοκο RNP, έτσι η M1 πρωτεΐνη παραμένει ενωμένη με την RNP παγιδευόντάς την στο κυτταρόπλασμα και β) η ωρίμανση της HA στην όξινη της μορφή με αποτέλεσμα την αναστολή της εξόδου του ιού από το κύτταρο.⁴⁷

Συγκεκριμένα, τα φάρμακα αυτά φέρουν μία πολική ομάδα, την αμινική και ένα λιπόφιλο σκελετό, το αδαμαντάνιο. Οι παραπάνω ενώσεις εισέρχονται και προκαλούν το φραγμό του πόρου του πρωτεϊνικού διαύλου: α) η πρωτονιωμένη αμινική ομάδα της αμανταδίνης έχει κατεύθυνση προς το C-τελικό άκρο και συγκρατείται μέσω δικτύου δεσμών υδρογόνου μεταξύ των μορίων νερού που υπάρχουν μέσα στον πόρο και του ιμιδαζολίου της πλευρικής αλυσίδας της ιστοιδίνης (His-37) του C-τελικού άκρου β) ο αδαμαντανικός σκελετός προσαρμόζεται στη λιπόφιλη κοιλότητα που σχηματίζεται μεταξύ V27-G34. Ένα πρότυπο της παραπάνω αλληλεπίδρασης φαίνεται στο σχήμα 2.3.^{41,48}



Σχήμα 2.3 A) Δραστηριότητα της αμανταδίνης 1 και της ριμανταδίνης 2 στους ιούς WT και S31N B) Ο διάυλος της πρωτεΐνης M2. Επισημαίνονται οι μεταλλάξεις, στις οποίες οφείλεται η ανθεκτικότητα του ιού στην αμανταδίνη, L26F, V27A και S31N (συντομογραφίες με πορτοκαλί χρώμα), τα μόρια νερού (κόκκινες σφαίρες) και η αμανταδίνη (αδαμαντάνιο με πορτοκαλί σφαίρες) ως αποκλειστής του διαύλου. C) Η αμανταδίνη (πράσινο χρώμα) ως αποκλειστής του διαύλου M2TM WT. Τα μόρια νερού (κόκκινες σφαίρες) σχηματίζουν ένα δίκτυο δεσμών υδρογόνου μεταξύ τους και με το ιμιδαζόλιο της πλευρικής αλυσίδα της ιστοιδίνης (πράσινο-μπλε) που συγκρατεί την πρωτονιωμένη αμινομάδα της αμανταδίνης (μπλε σφαίρα).⁴⁸

Από τις μεταλλάξεις V27A, L26F και S31N, που έχουν παρατηρηθεί τις τελευταίες 8 δεκαετίες οι μεταλλάξεις που προκαλούν τη μεγαλύτερη μείωση της δράσης των φαρμάκων είναι αυτές που αυξάνουν την πολικότητα στην αλληλουχία των αμινοξέων στον πόρο, δηλαδή η V27A και η S31N, με την S31N να επικρατεί σε μεγαλύτερο ποσοστό.³⁰

Είναι πολύ ενδιαφέρον να βρεθεί πως με την μετάλλαξη S31N η αγωγιμότητα H⁺ παύει να αναστέλλεται από την αμανταδίνη και τη ριμανταδίνη. Φαίνεται, βεβαίως, πολύ πιθανό ότι αυτό συμβαίνει διότι η Am,Rim δεν δεσμεύεται πλέον αποτελεσματικά εντός του πόρου.

2.3 Η ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ S31N

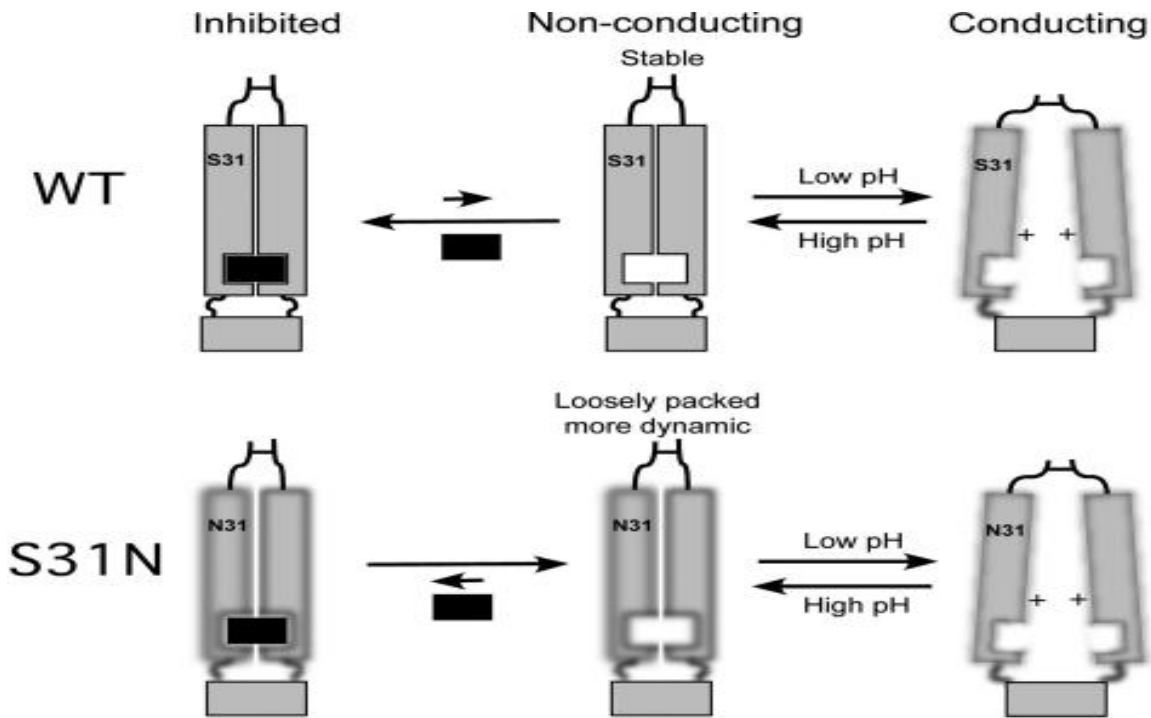
Η συγκεκριμένη μετάλλαξη αφορά την αλλαγή της σερίνης στη θέση 31 της διαμεμβρανικής περιοχής του πόρου με ασπαραγίνη όπως φαίνεται στο σχήμα 2.4



Σχήμα 2.4 Εμφάνιση μεταλλάξεων στην διαμεμβρανική περιοχή της M2

Η ενεργοποίηση του διαύλου πρωτονίων απαιτεί την πρωτονίωση των 4 ιστιδινών (His-37) σε χαμηλό pH. Η σχηματική αναπαράσταση παρακάτω απεικονίζει την αδυναμία αναστολής του πόρου M2TM στην περίπτωση της μετάλλαξης S31N. Στον WT οι έλικες TM σχηματίζουν μέσα στον κλειστό πόρο κατάλληλη θέση πρόσδεσης της αμανταδίνης και ριμανταδίνης. Έτσι το φάρμακο προσδέεται επαρκώς, το σύμπλοκο είναι θερμοδυναμικά σταθερό και η ανοιχτή μορφή του διαύλου που μεταφέρει H⁺ δεν ευνοείται.⁴⁹

Η μετάλλαξη S31N αποδυναμώνει τις έλξεις μεταξύ των ελίκων και έτσι διαταράσσεται η θέση πρόσδεσης του φαρμάκου και κατά συνέπεια το φάρμακο είναι αδύνατον να συγκρατηθεί μέσα στον πόρο. Σύμφωνα με υπολογιστικές μεθόδους φαίνεται πως κατά τη συγκεκριμένη μετάλλαξη η εισαγωγή ενός μεγαλύτερου, υδρόφιλου αμινοξέος, της ασπαραγίνης, στη γενικά υδρόφοβη N-τελική περιοχή του διαύλου έχει ως αποτέλεσμα οι πλευρικές αλυσίδες να απωθούνται στερεοχημικά μεταξύ τους διευρύνοντας τον πόρο του ιοντικού διαύλου, καθιστώντας θερμοδυναμικά ασταθή τη σύνδεση του με την αμανταδίνη.



Σχήμα 2.5 Διάνοιξη του πόρου στο στέλεχος του μεταλλαγμένου S31N ιού.⁴⁹

Για να σχηματιστεί η αγώγιμη αρο-μορφή σε όξινο pH πρέπει να υπάρχει σε ισορροπία με τη βασική αρο-μορφή. Για τον WT η βασική αρο-μορφή είναι μετατοπισμένη προς την δεσμευμένη μορφή. Στον ιό S31N η σύνδεση του φαρμάκου είναι ασθενής και η αρο-μορφή επικρατεί οδηγώντας σε όξινο pH στην αγώγιμη ανοιχτή μορφή.

Σύμφωνα με υπολογισμούς μοριακής δυναμικής (80ns) που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο μας η διεύρυνση του πόρου από την μετάλλαξη S31N έχει ως αποτέλεσμα την ασταθή δέσμευση του αδαμαντανίου στην περιοχή V27–Ala30. Συγχρόνως, το περιβάλλον γίνεται πιο υδρόφιλο στην περιοχή αυτή. Ως αποτέλεσμα, η θέση της αμανταδίνης με κατεύθυνση της αμινομάδας προς το C-τελικό άκρο είναι ασταθής. Το μόριο στρέφεται και η αμινομάδα κατευθύνεται προς το N-τελικό άκρο. Η αστάθεια σύνδεσης σε συγκεκριμένη θέση στη μοριακή δυναμική ή αλλιώς η μεγάλη κινητικότητα του μορίου συνηγορεί υπέρ της άποψης ότι πιθανώς η αμανταδίνη να μην εισέρχεται στον πόρο ή να εισέρχεται και να απομακρύνεται πολύ εύκολα ή να συνδέεται με τον πόρο χωρίς να προκαλεί φραγμό ώστε να υπάρχει χώρος για τη μεταφορά πρωτονίων μέσω του πόρου.

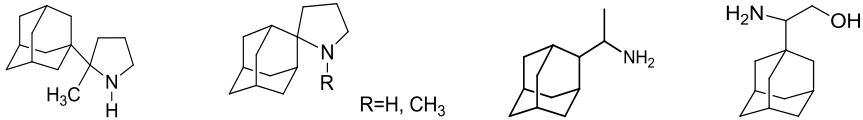
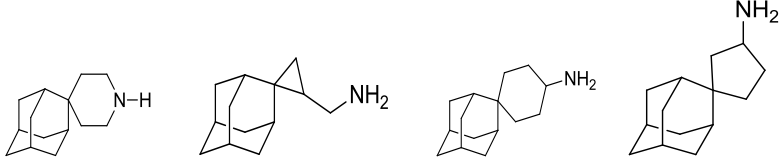

3. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

3.1 ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΚΟΙΝΗΣ ΓΡΙΠΗΣ ΚΑΙ ΔΡΑΣΤΙΚΑ ΑΝΑΛΟΓΑ ΑΜΑΝΤΑΔΙΝΗΣ ΚΑΙ ΡΙΜΑΝΤΑΔΙΝΗΣ

Η αμανταδίνη και ριμανταδίνη είναι φάρμακα τα οποία δεν χρησιμοποιούνται πλέον στην θεραπεία της γρίπης. Είναι γεγονός πως έχουν συντεθεί και έχουν φαρμακολογηθεί εκατοντάδες ανάλογα των παραπάνω φαρμάκων. Τα περισσότερα από αυτά τα ανάλογα είναι αμιγώς αμινικά παράγωγα, αλλά κάποια έχουν πολικές ομάδες όπως υδροξυλομάδα, αμινομάδα, ομάδα αμιδίνης, αιθερομάδα. Παρόλο που πολλές από αυτές τις ενώσεις εμφανίζουν αντική δραστηριότητα, παρόμοια με εκείνη της αμανταδίνης, παρουσιάστηκε γρήγορη ανάπτυξη μεταλλαγμένων ιών, που δεν αναστέλλονται από τα μόρια αυτά, όπως παρατηρείται με την αμανταδίνη και τη ριμανταδίνη, έτσι το θεραπευτικό ενδιαφέρον τους είναι μάλλον χαμηλό.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.1) απεικονίζονται παραδείγματα κάποιων δραστικών μορίων έναντι της κοινής γρίπης (WT, Wild Type).

Πίνακας 3.1 Ενδεικτικές δομές μορίων που αναστέλλουν την κοινή γρίπη (WT).⁵⁰

ΣΤΕΛΕΧΟΣ ΙΟΥ	ΔΡΑΣΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ
	1- και 2-ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΑ ΑΔΑΜΑΝΤΑΝΙΑ ^{51,52,53,54}
H2N2/ H3N2	
	ΣΠΕΙΡΑΝΙΚΑ ΑΜΙΝΟΑΔΑΜΑΝΤΑΝΙΑ ^{52,55,56}
H2N2	
	ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΕΝΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΑΔΑΜΑΝΤΑΝΙΟΥ ΣΕ ΘΕΣΕΙΣ 1,2 ⁵⁷
H3N2	

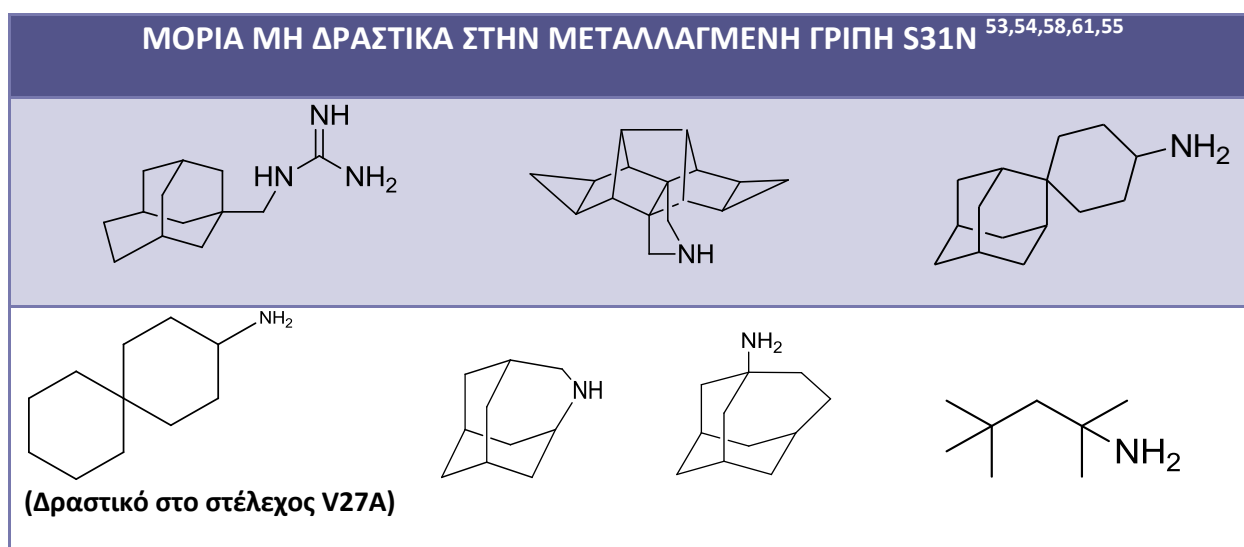
3.2 ΥΠΑΡΧΟΥΣΑ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Ενώ η αμανταδίνη και ριμανταδίνη ήταν σε κλινική χρήση για πολλά χρόνια και εκατοντάδες ανάλογα αυτών των μορίων έχουν συντεθεί και δοκιμαστεί ως αναστολείς της γρίπης, τα αποτελέσματα που έχουν επιτευχθεί μέχρι στιγμής δεν είναι τα προσδοκώμενα. Έχουν βρεθεί αρκετές δραστικές ενώσεις κατά καιρούς, με ίση ή και πολύ μεγαλύτερη δραστικότητα από την αμανταδίνη και την ριμανταδίνη, όμως η ανθεκτικότητα του ιού ως προς τα δύο αυτά φάρμακα είναι ακόμα ένα άλυτο ζήτημα. Παρόλα αυτά πολύ πρόσφατα, βασιζόμενοι σε μελέτες που έχουν γίνει στον δίαυλο της M2, έχουν συντεθεί νέοι αναστολείς με δραστικότητα έναντι των ανθεκτικών στελεχών V27A.^{54,57,58} Όμως από το 2005³⁰ τα στελέχη με S31N μετάλλαξη είναι πρωτίστης σημασίας, καθώς αποτελούν το 90% των στελεχών του ιού influenza A μέχρι σήμερα,^{59,60} και λόγω της δυσκολίας ανακάλυψης νέων αναστολέων για τον μεταλλαγμένο ιό S31N. Ωστόσο έχει ανακαλυφθεί ένας περιορισμένος αριθμός μικρών μορίων που αναστέλλουν τόσο την κοινή γρίπη όσο και τον ιό S31N.

3.2.1 Μη Δραστικά μόρια του ιού A /S31N

Τα μόρια που βρέθηκαν δραστικά στον ιό S31N είναι περιορισμένα παρότι έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες για τη σύνθεση αναστολέων του μεταλλαγμένου ιού, που όμως δεν απέδωσαν τα προσδοκώμενα αποτελέσματα. Οι προσπάθειες αυτές περιλαμβάνουν μια ποικιλία διαφορετικών μεταξύ τους μορίων, τόσο στο μέγεθος όσο και στην δομή τους που αν και δραστικά στην κοινή γρίπη, παραμένουν αδρανή έναντι της συγκεκριμένης μετάλλαξης.⁵⁰ Μερικά τέτοια παραδείγματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (3.2).

Πίνακας 3.2 Μη δραστικά μόρια στην μεταλλαγμένη γρίπη S31N⁵⁰



3.2.2 Αναστολείς του ιού A/S31N

Αναφέρονται παρακάτω οι σημαντικότερες συνεισφορές:

α) Η ομάδα του Vázquez S. το 2011 ερεύννησε τη σχέση δράσης-μεγέθους φαρμάκων για τον ιό S31N. Διατηρήθηκε ο βασικός αδαμαντανικός σκελετός αφαιρώντας ένα άτομο C και έτσι παρασκευάστηκε μια σειρά από ανάλογα νοραμανταδίνης και δις-νοραδαμαντίνης. Μόνο μία (ΕΝΩΣΗ **I**) από τις 21 ενώσεις που συντέθηκαν βρέθηκε δραστική στον μεταλλαγμένο ιό.⁶¹

β) Η ομάδα του Hu W. μελέτησε τον σκελετό πιναναμίνης, αντί της αδαμαντίνης, με N-υποκαταστάτες ιμιδαζολυλμεθύλιο, γουανιδίνη και αμιδίνη, σημειώνοντας αυξημένη αναστολή του ιού ιδιαίτερα λόγω ύπαρξης του ιμιδαζολίου.⁶² (ΕΝΩΣΗ **II**).

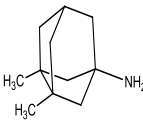
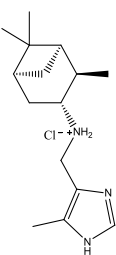
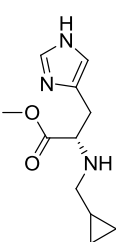
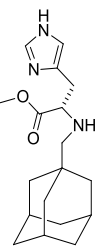
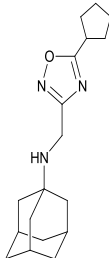
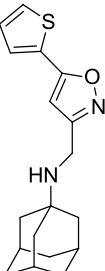
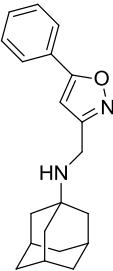
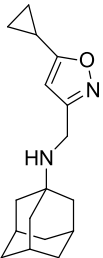
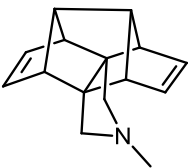
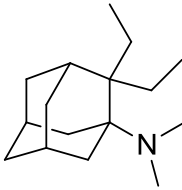
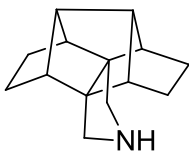
γ) Η ομάδα του Zhang W. με βάση τα προηγούμενα αποτελέσματα χρησιμοποίησε αμανταδίνη, αντί πιναναμίνης, που έδωσε παρόμοια αποτελέσματα με τους Zhao et al.⁶² Εξετάστηκαν ετεροδιμερή ως υβρίδια αμανταδίνης και ιστιδίνης με διάφορες τροποποιήσεις. Δύο από τις παρασκευασθείσες αυτές ενώσεις βρέθηκαν δραστικές (ΕΝΩΣΕΙΣ **III** ΚΑΙ **IV**) και μάλιστα η μία από αυτές (**IV**) περισσότερο δραστική από όλες τις ενώσεις που έχουν συντεθεί ως αναστολείς του S31N εμφανίζοντας το χαμηλότερο IC₅₀. Τα μόρια πιθανώς να προκαλούν φραγμό του πόρου S31N. Ενώ το μεγάλο υδροφοβικό μέρος του μορίου (ο αδαμαντανικός σκελετός) αλληλεπιδρά με το N-τελικό άκρο, αποτρέποντας την εισροή μορίων νερού, το ιμιδαζόλιο πιθανόν να αλληλεπιδρά με την ασπαραγίνη (N31) μέσω δεσμών H σταθεροποιώντας το μόριο εντός του πόρου.⁶³

δ) Το 2013 η ομάδα του DeGrado W.F., χρησιμοποιώντας τη δομή των δραστικών μορίων των Zhang et al, σύνθεσε ένα ευρύ φάσμα μορίων με σύνδεση της αμινομάδας της αμανταδίνης (αντί πιναναμίνης) με ετεροκυκλικά συστήματα (οξαδιαζολίου, ισοξαζολίου) μέσω γέφυρας -CH₂ πετυχαίνοντας μόρια δραστικά τόσο στη κοινή γρίπη όσο και στον S31N (ΕΝΩΣΕΙΣ **V**, **VI**, **VII**, **VIII**).^{48,63,64}

ε) Μια σειρά από 1-αμινο-2,2-διαλκυλοαδαμαντάνια συντέθηκε από την ομάδα του Vázquez S. το 2012. Αρκετές από τις νέες αμίνες εμφανίζουν δραστικότητα σε πολλά στελέχη του ιού H1N1 συμπεριλαμβανομένου και του ανθεκτικού στελέχους στην αμανταδίνη, που φέρει δύο μεταλλάξεις V27A και S31N (A/PR/8/34). Παρόλα αυτά δεν εμφανίζουν αξιόλογη δράση έναντι του ιού WT. Αξιοσημείωτη δράση στο μεταλλαγμένο στέλεχος S31N είχαν οι ενώσεις **IX**, **X** και **XI**.⁶⁵⁻⁶⁷

Στον πίνακα 3.3 απεικονίζονται παραδείγματα δραστικών μορίων έναντι της γρίπης S31N που συντέθηκαν από τις προηγούμενες ομάδες.

Πίνακας 3.3 Δραστικά μόρια στην μεταλλαγμένη S31N γρίπη

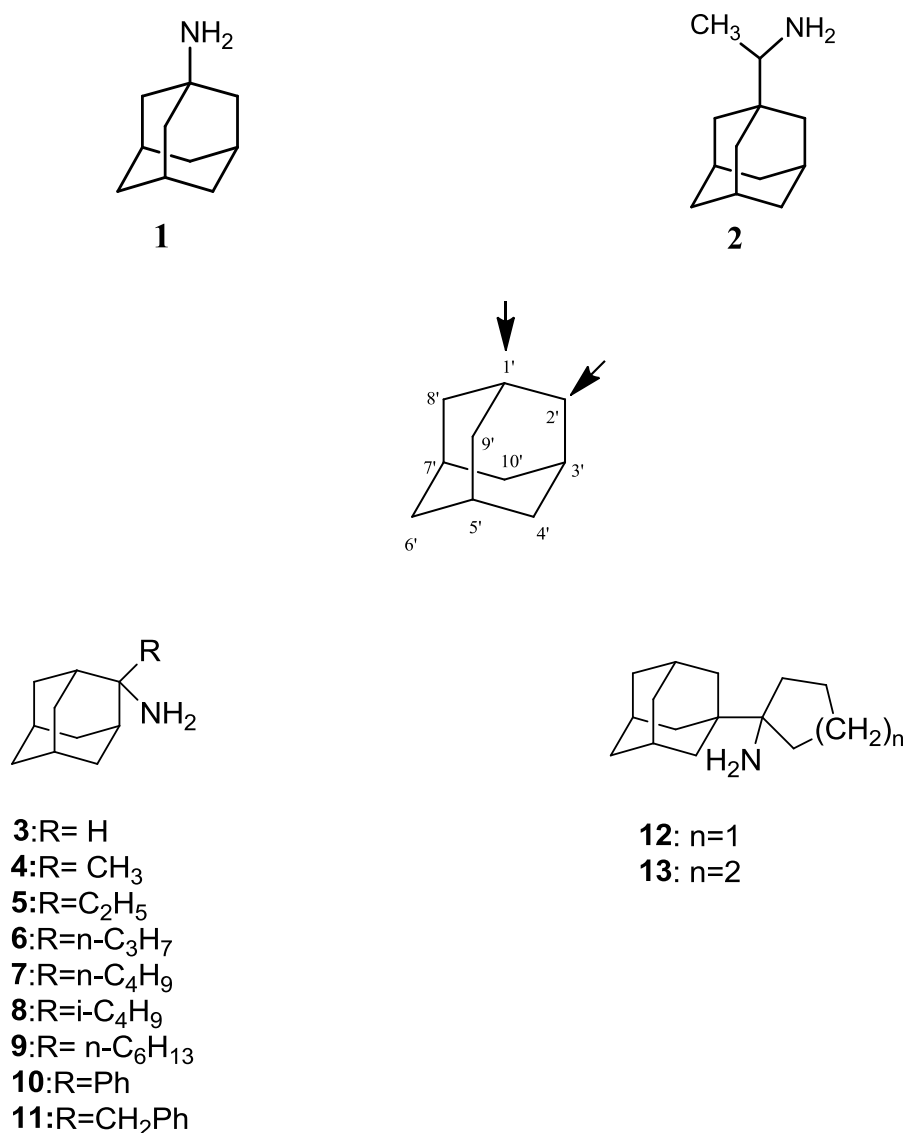
ΕΝΩΣΗ								
#	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
IC₅₀ (μM)	252.2 ⁶¹	80.0 ⁶²	465 ⁶³	10 ⁶³	17 ⁶⁴	16 ⁶⁴	14 ⁶⁴	19 ⁶⁴
ΕΝΩΣΗ								
#	IX		X			XI		
EC₅₀ (μM)	75 ⁶⁷		28 ⁶⁷			11 ⁶⁷		

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα άλλων ερευνητικών ομάδων, τον περιορισμένο αριθμό δραστικών μορίων για τον S31N, κρίθηκε απαραίτητη η ανάγκη ανάπτυξης νέων μορίων με κριτήριο την αύξηση του μεγέθους.

3.3 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

3.3.1 2-Αλκυλο-2-αμινοαδαμαντάνια και 1-(1-αδαμαντυλο)κυκλοπενταναμίνη/κυκλοεξαναμίνη

Γνωρίζοντας ότι η μετάλλαξη S31N προκαλεί διεύρυνση του μεγέθους του πόρου στην περιοχή της V27 συντέθηκαν, στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, μόρια στοχεύοντας σε μεγαλύτερο λιπόφιλο όγκο από την αμανταδίνη. Βασιζόμενοι στην ανάγκη εύρεσης ενός μεγαλύτερου σε όγκο δραστικού μορίου, ώστε να υπάρχει επαρκής αλληλεπίδραση με τον πόρο της πρωτεΐνης M2, σχεδιάστηκαν, συντέθηκαν και μελετήθηκαν αμινοαδαμαντάνια με C-υποκατάσταση σε θέσεις 1- ή 2- του αδαμαντανίου όπως φαίνεται στο σχ. 3.1.

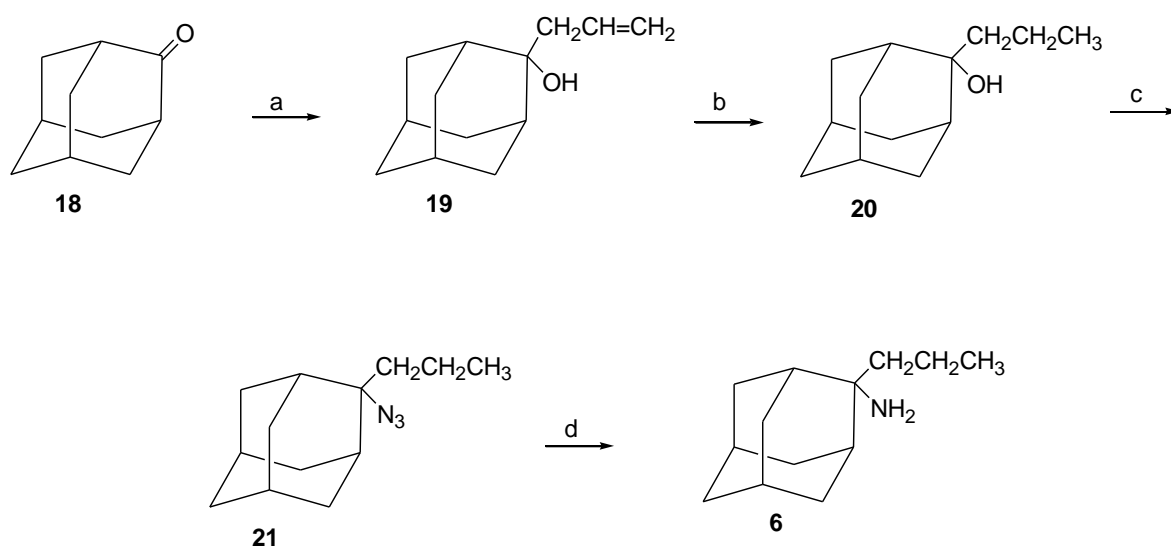


Σχήμα 3.1 Αμανταδίνη 1, ριμανταδίνη 2, 2-αλκυλο-2-αμινοαδαμαντάνια (3-11), 1-(1-αδαμαντυλο)κυκλοπενταναμίνη(12) και 1-(1-αδαμαντυλο)κυκλοεξαναμίνη(13) με δράση έναντι του μεταλλαγμένου ιού S31N.

4. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

4.1 2-n-ΑΛΚΥΛΟ-2-ΑΔΑΜΑΝΤΑΝΑΜΙΝΕΣ

Η τριτοταγής αλκοόλη **19** ελήφθη από την αντίδραση της αδαμαντανόνης **18** με αλλυλομαγνησιοβρωμίδιο. Η ακόρεστη αλκοόλη **19** μετατράπηκε στην συνέχεια στην αλκοόλη **20** μέσω καταλυτικής υδρογόνωσης υπεράνω PtO₂. Η μετατροπή στο αζίδιο **21** έγινε χρησιμοποιώντας NaN₃/TFA 1M σε διαλύτη CH₂Cl₂. Η αμίνη **6** παρασκευάστηκε έπειτα από αναγωγή του αζιδίου **21** μέσω LiAlH₄ με βρασμό σε αιθέρα για 5 ώρες (σχ.4.1).



Σχήμα 4.1

Αντιδραστήρια και συνθήκες:

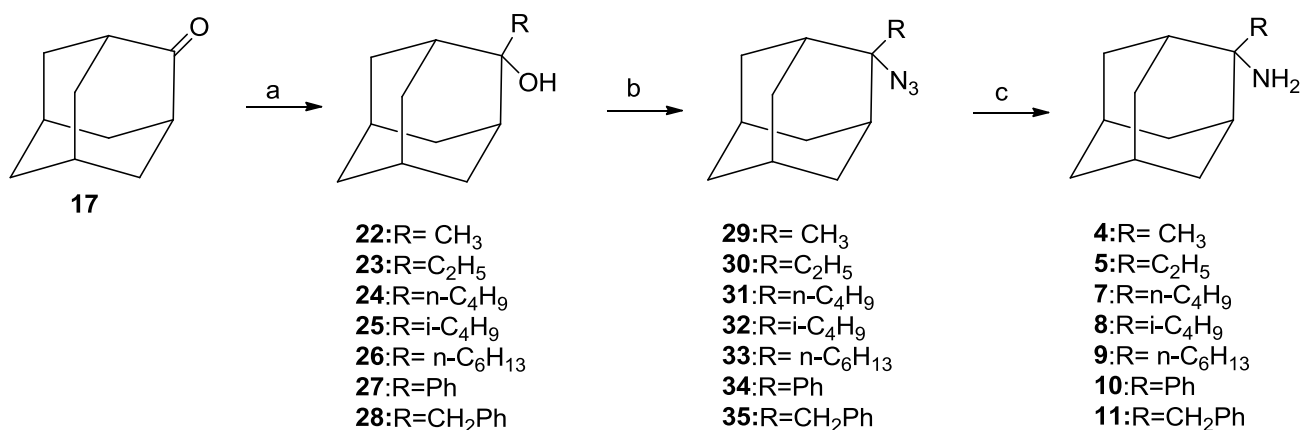
(a) CH₂=CHCH₂MgBr, αιθέρας, THF, r.t. 2 h, NH₄Cl/H₂O (89%)

(b) H₂/PtO₂

(c) NaN₃, TFA, CH₂Cl₂, 0 °C 5h, r.t. 24 h (77%)

(d) LiAlH₄, άνυδρος αιθέρας, βρασμός 5 h, H₂O, NaOH 10% (74%)

Τα αμινοαδαμαντανικά παράγωγα **4,5** και **7-11** συντέθηκαν σύμφωνα με το σχήμα 4.2. Οι τριτοταγείς αλκοόλες **22-28** ελήφθησαν με αντίδραση της αδαμαντανόνης **17** με οργανολιθικά αντιδραστήρια (R= *n*-Bu, *i*-Bu, *n*-Hex, R=C₂H₅) ή οργανομαγνησιακά αντιδραστήρια (R= CH₃, R= Ph, R= CH₂Ph) (Σχ. 4.2).



Σχήμα 4.2

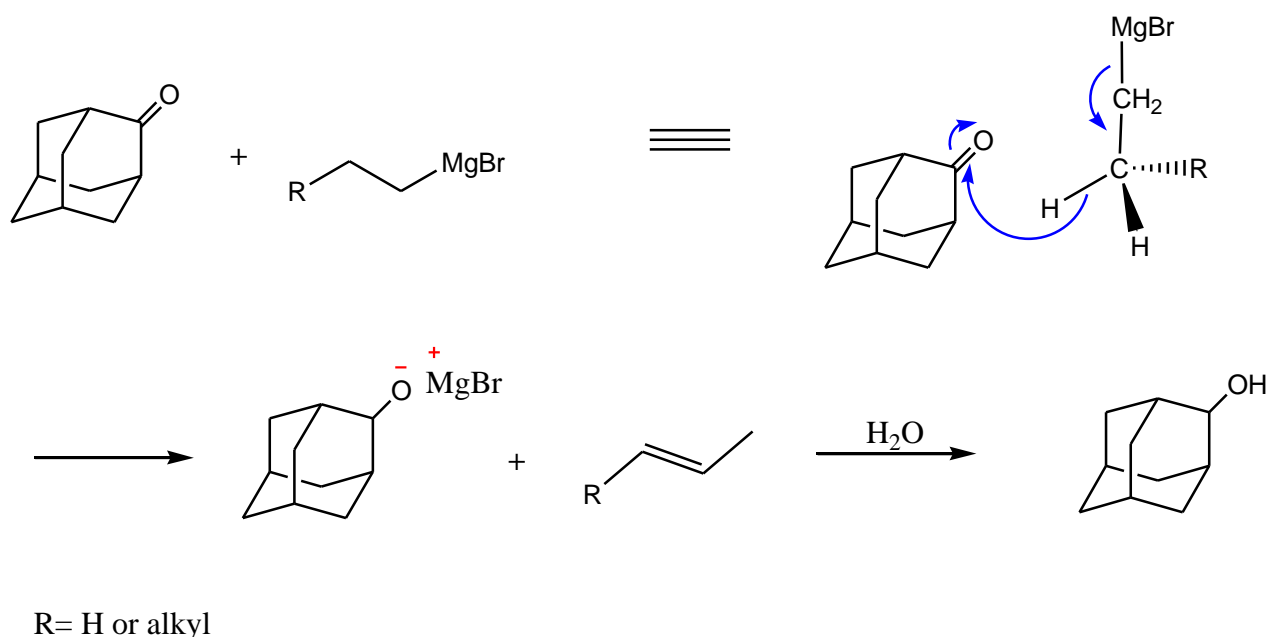
Αντιδραστήρια και συνθήκες:

(a) RLi σε εξάνιο ή RMgBr σε άνυδρο αιθέρα, NH₄Cl(κορ.), (**22**:85%, **23**:94%, **24**:96%, **25**:85%, **26**:97%, **27**:95%, **28**:95%)

(b) NaN₃, TFA, CH₂Cl₂, 0 °C, 5h, r.t. 24 h.(**29**:88%, **30**:80%, **31**:96%, **32**:95%, **33**:91%, **34**:95%, **35**:50%)

(c) LiAlH₄, άνυδρος αιθέρας, βρασμός, 5 h, H₂O, NaOH 10% (**4**:85%, **5**:71%, **7**:23%, **8**:65%, **9**:14%, **10**:55%, **11**:45%)

Για τη σύνθεση των αλκοολών (**23,24,25,26**), ήταν αποδοτικά μόνο τα οργανολιθιακά αντιδραστήρια γιατί, ενώ, στην περίπτωση της αλκοόλης **22** η αντίδραση Grignard έδωσε το επιθυμητό προϊόν, η αντίδραση Grignard για την αλκοόλη **23** έδωσε σημαντικό ποσοστό προϊόντος αναγωγής της 2-αδαμαντανόνης, μέσω β-απόσπασης υδριδίου του μαλακού οργανομαγνησιακού αντιδραστηρίου που ευνοείται με αύξηση του όγκου γύρω από το καρβονύλιο (ηλεκτρονιόφιλο κέντρο), με αποτέλεσμα να λαμβάνεται μίγμα δευτεροταγούς και τριτοταγούς αλκοόλης. Όπως προκύπτει και από το φάσμα ^{13}C του μίγματος, το ποσοστό της δευτεροταγούς αλκοόλης, 2-αδαμαντανόλης, ήταν 25% (Σχ.4.3).

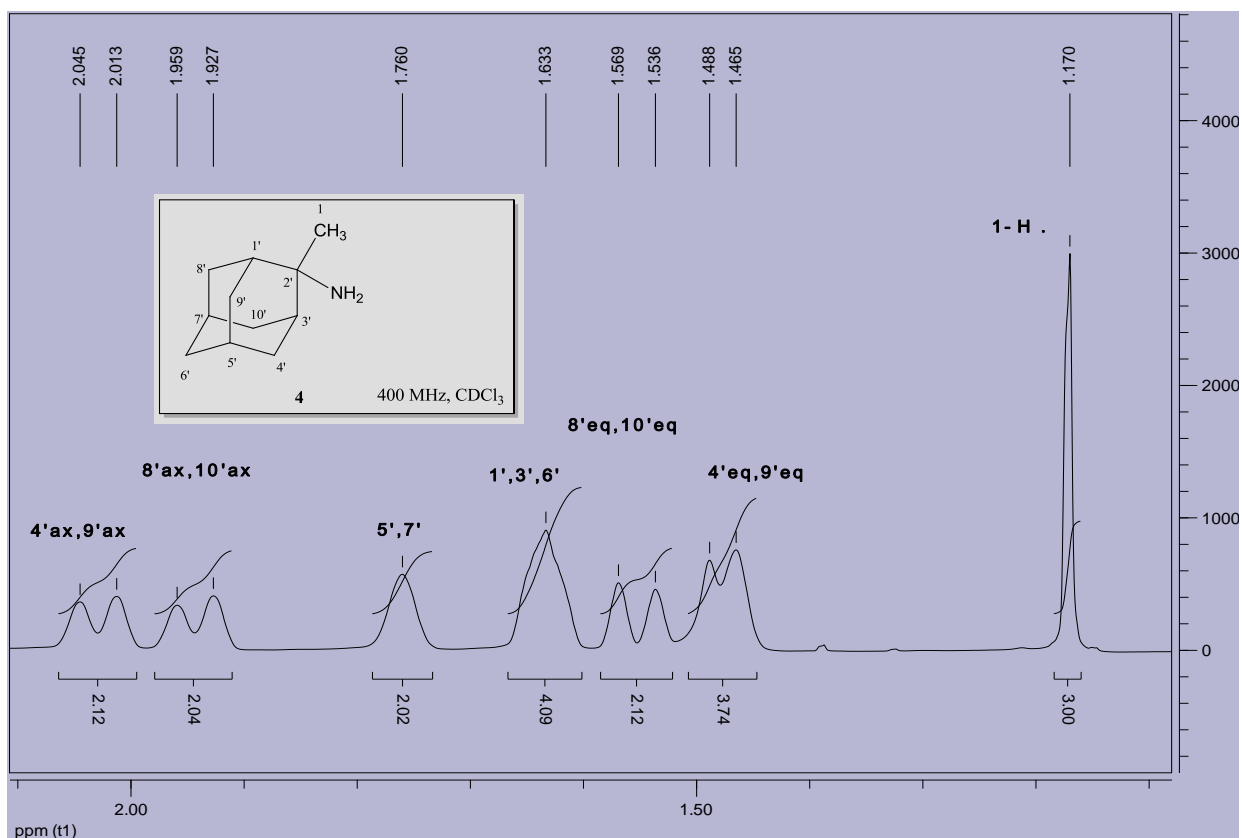


Σχήμα 4.3

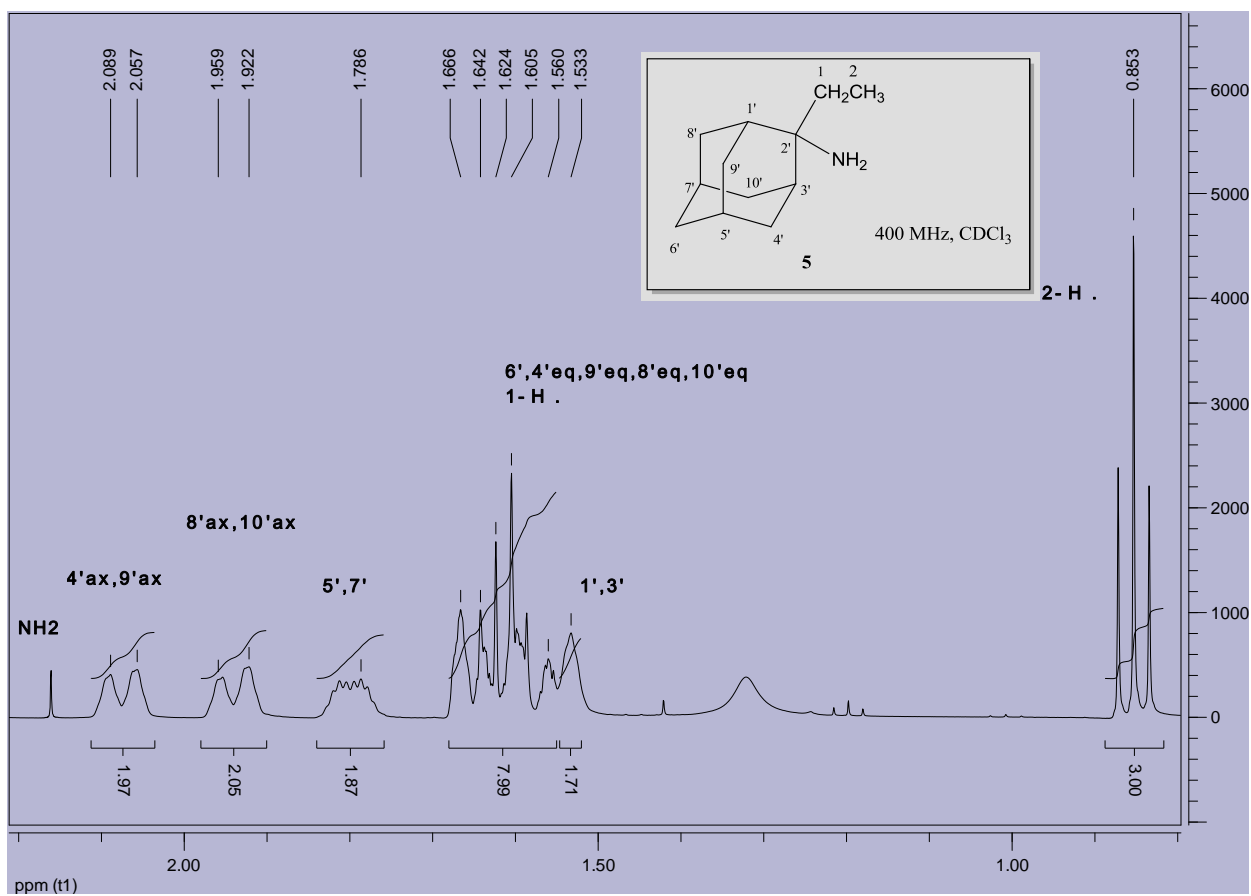
Η μετατροπή των τριτοταγών αλκοολών (**22-28**) προς τα αντίστοιχα αζίδια (**29-35**) επιτεύχθηκε αποτελεσματικά μέσω αντίδρασης με NaN_3/TFA 1M σε διχλωρομεθάνιο ή διχλωροαιθάνιο. Στην περίπτωση όμως της μετατροπής της αλκοόλης **28** στο αζίδιο **35**, ελήφθη μίγμα αζιδίου/αλκοόλης σε ποσοστό 28% :72% σύμφωνα με την ολοκλήρωση στο φάσμα ^{13}C .

Οι τριτοταγείς αλκαναμίνες (**4,5** και **7-11**) παρασκευάστηκαν από τα αζίδια (**29-35**) μέσω αναγωγής με LiAlH_4 και βρασμό σε αιθέρα για 5h.

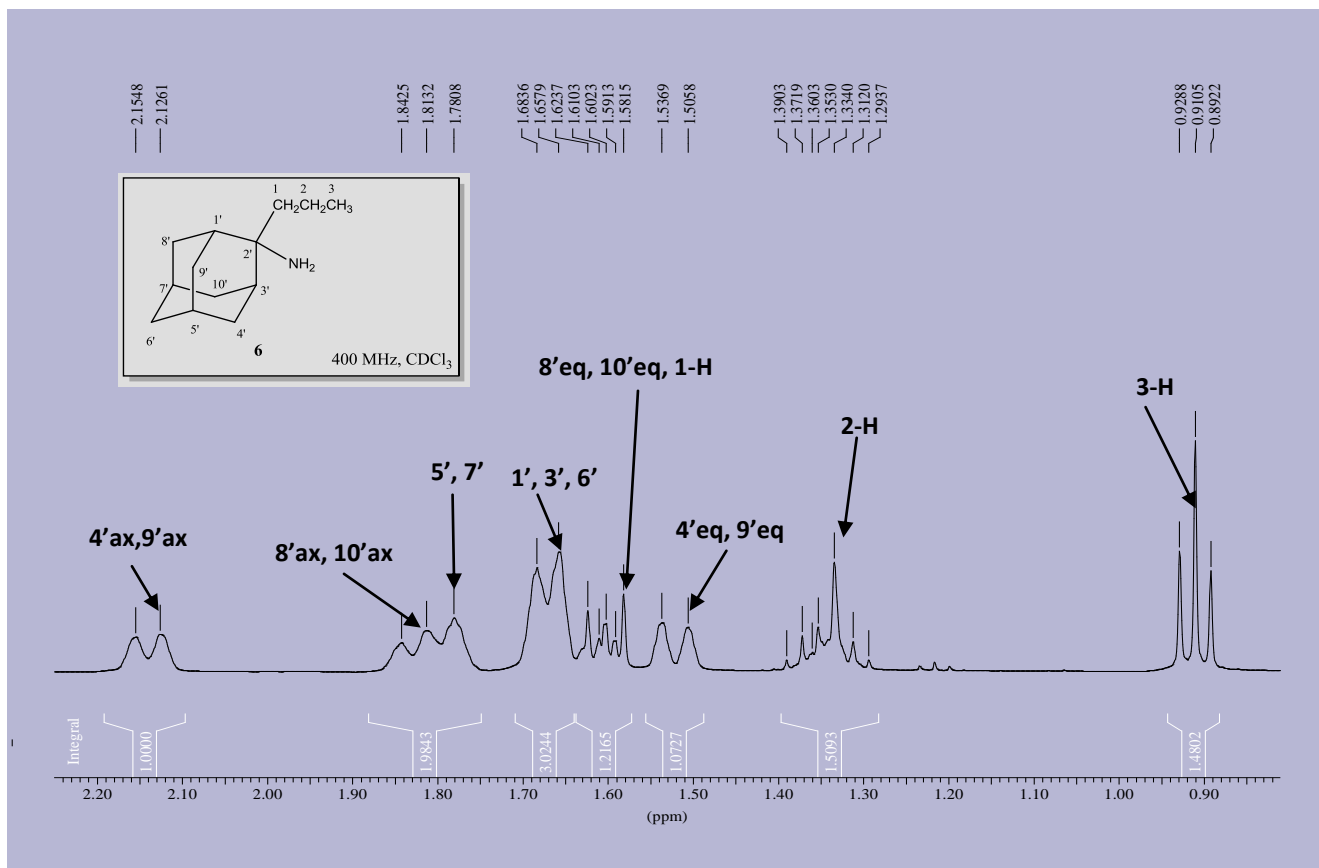
Στα σχήματα 4.4-4.11 φαίνονται τα φάσματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ^1H των ενώσεων **4** έως **11** αντίστοιχα.



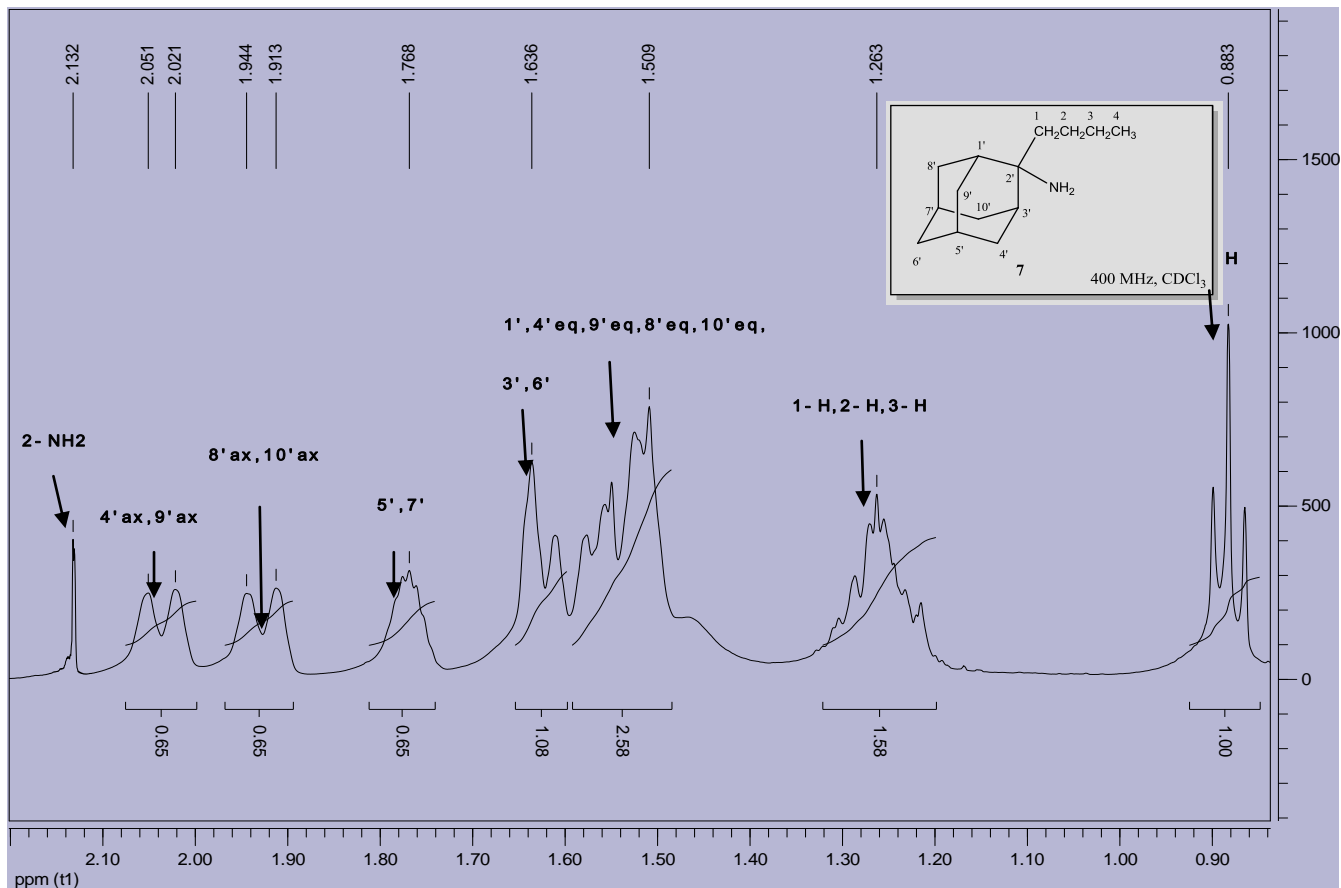
Σχήμα 4.4



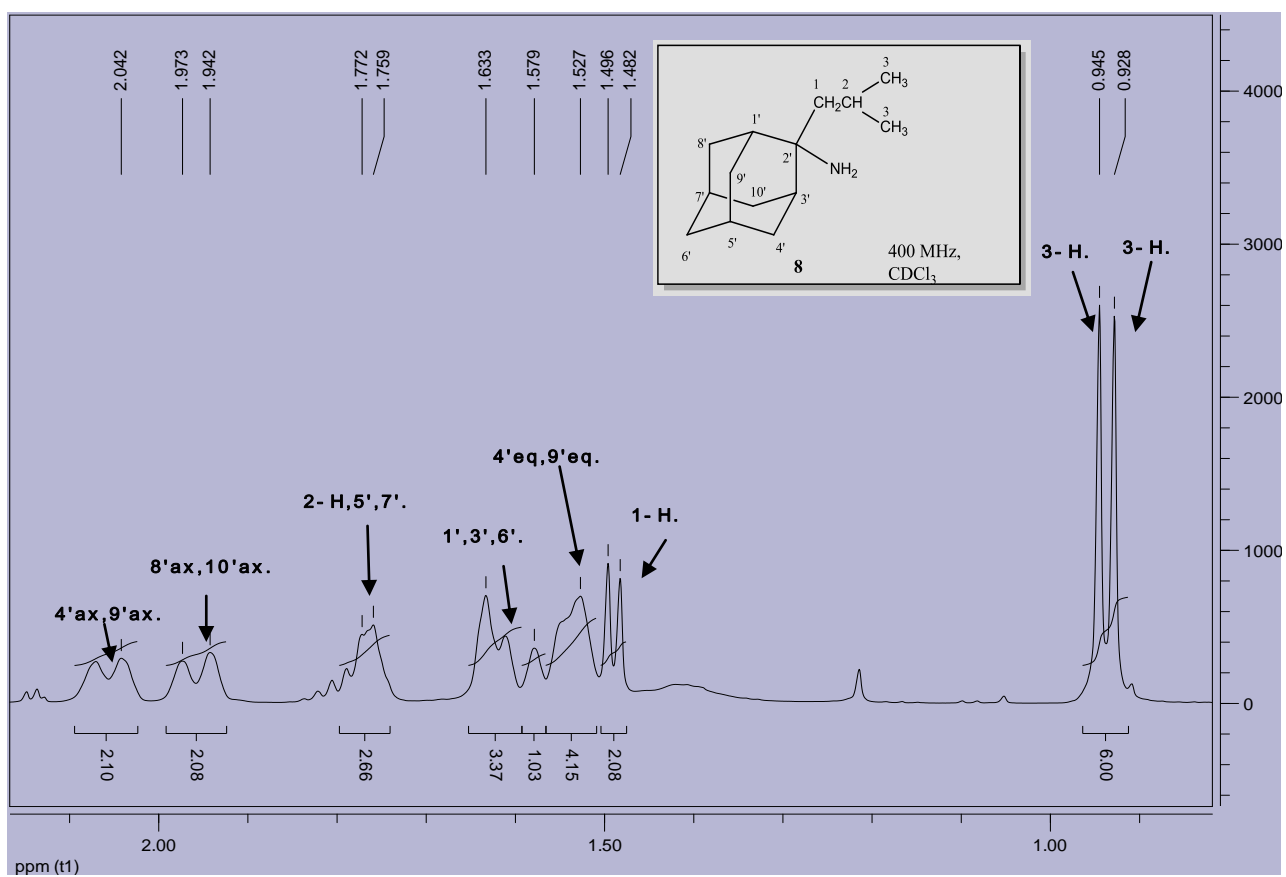
Σχήμα 4.5



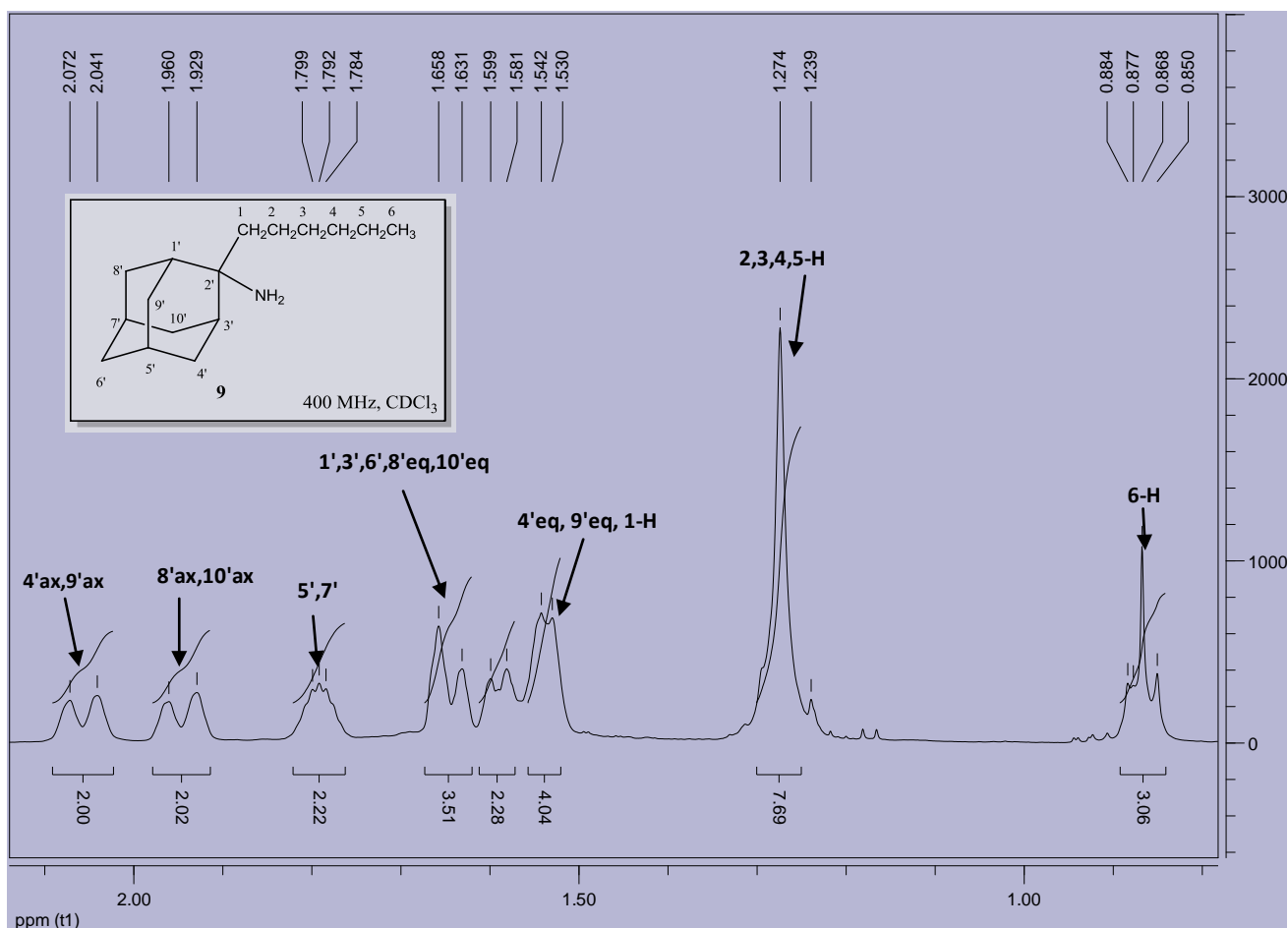
Σχήμα 4.6



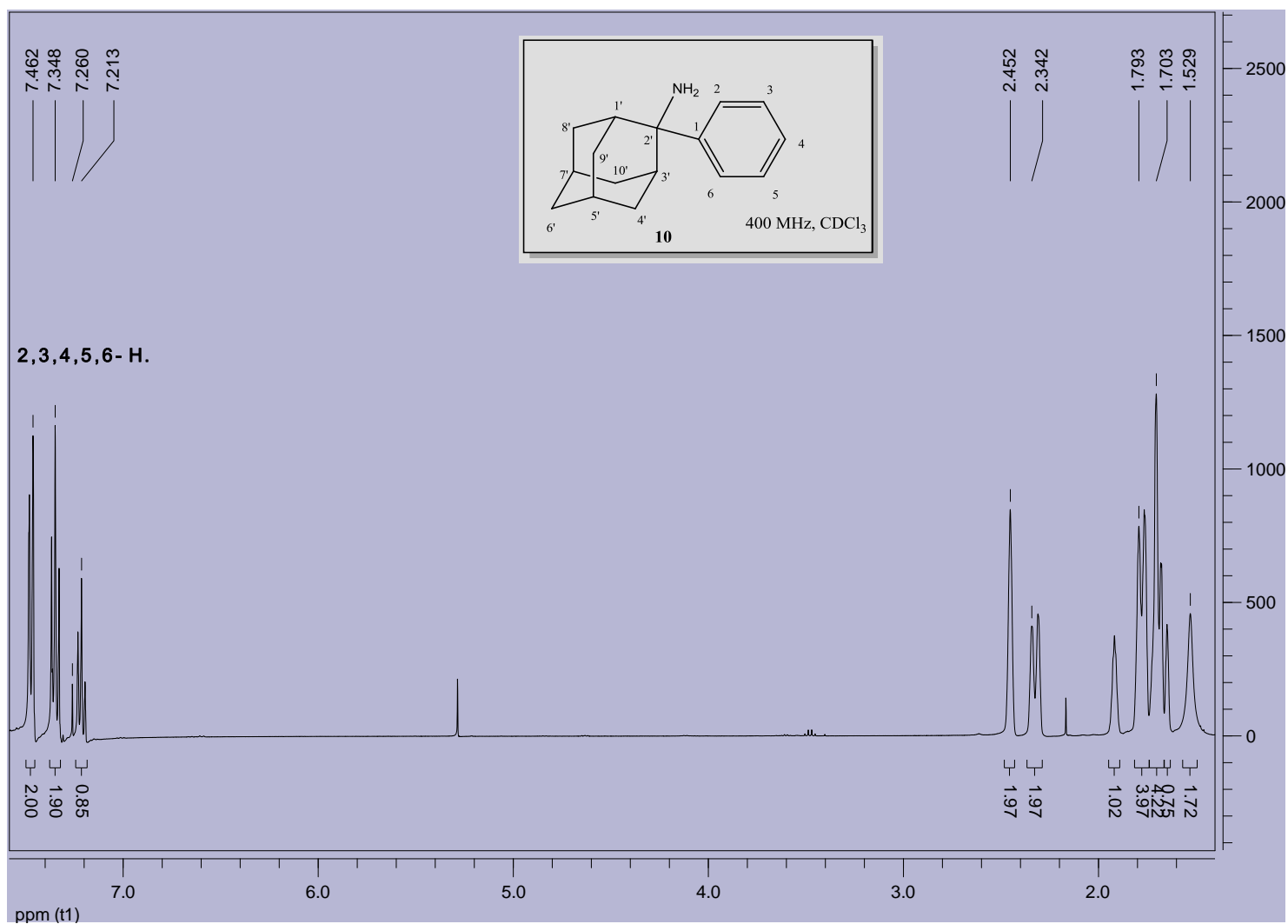
Σχήμα 4.7



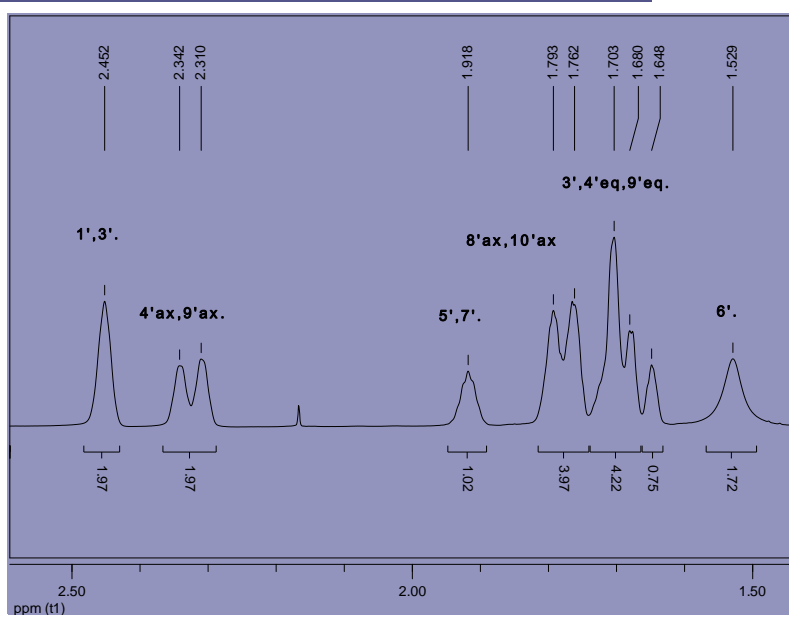
Σχήμα 4.8

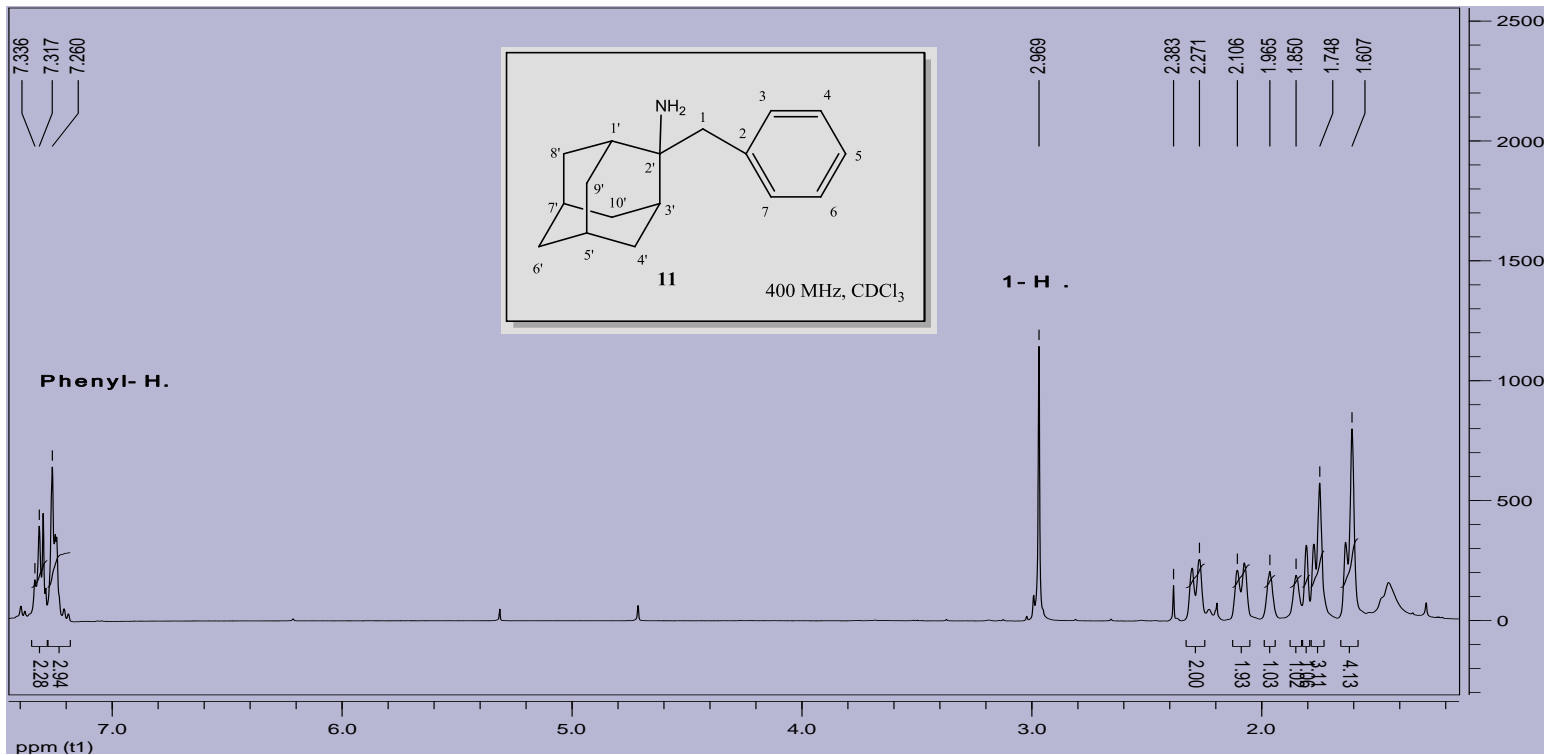


Σχήμα 4.9

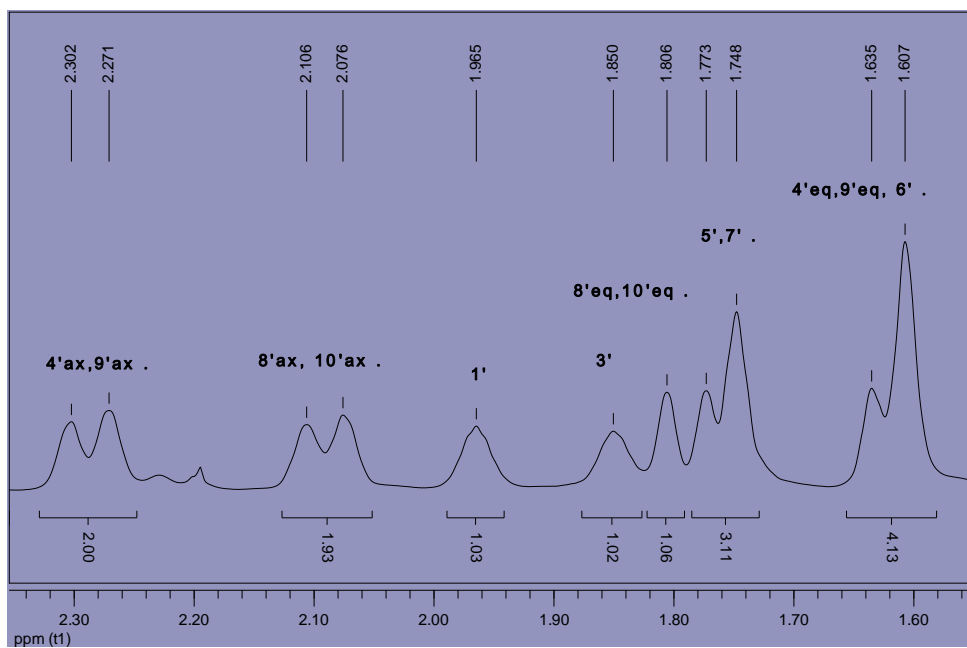


Σχήμα 4.10





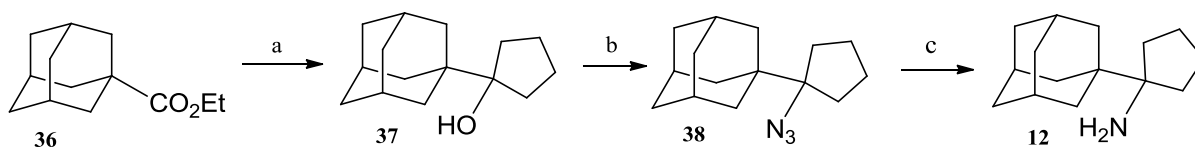
Σχήμα 4.11



4.2 ΚΑΡΒΟΚΥΚΛΙΚΑ ΑΝΑΛΟΓΑ ΤΗΣ ΡΙΜΑΝΤΑΔΙΝΗΣ

4.2.1 Σύνθεση της 1-(1-αδαμαντανο)κυκλοπενταναμίνης

Για την σύνθεση της αλκοόλης **37** εφαρμόστηκε η δημοσιευμένη μέθοδος των G.Fytas et al⁶⁸, μέσω αντίδρασης του 1-αδαμαντανοκαρβοξυλικού αιθυλεστέρα **36** με το 1,4-δισ(βρωμομαγνησιοβουτάνιο). Η τριτοταγής αλκοόλη **37** μετατράπηκε με NaN_3/TFA 1M / CH_2Cl_2 στο αζίδιο **38**. Αναγωγή του αζιδίου **38** οδήγησε στην 1-(1-αδαμαντυλο)κυκλοπενταναμίνη **12** (σχ.4.12).



Σχήμα 4.12

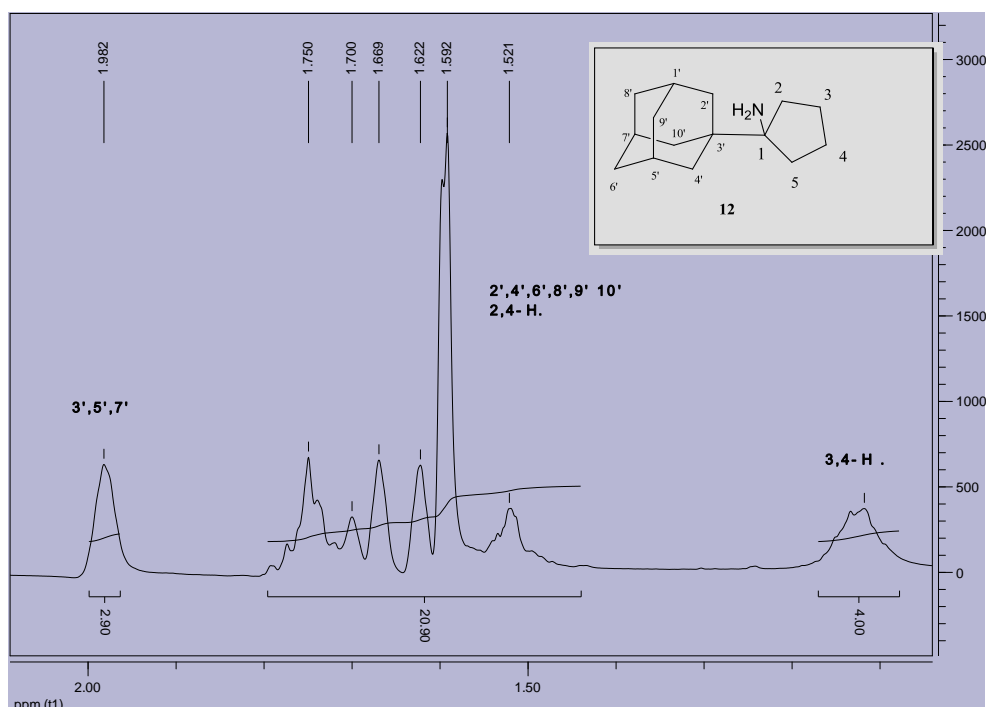
Αντιδραστήρια και συνθήκες:

(a) $\text{BrMg}(\text{CH}_2)_4\text{MgBr}$, αιθέρα, NH_4Cl (κορ.) (70%)

(b) NaN_3 , TFA 1M, CH_2Cl_2 , 0 °C 5h, r.t. 24 h (88%)

(c) LiAlH_4 , άνυδρος αιθέρας, βρασμός 5 h, H_2O , NaOH 10% w/v (65%)

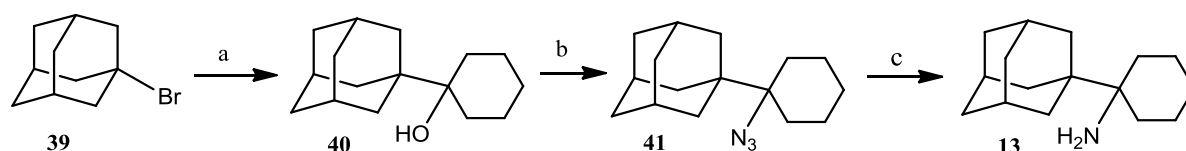
Στο σχήμα 4.13 φαίνεται το φάσμα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ^1H της ένωσης **12**.



Σχήμα 4.13

4.2.2 Σύνθεση της 1-(1-αδαμαντανο)κυκλοεξαναμίνης

Για τη σύνθεση της αμίνης **13** η αντίστοιχη αλκοόλη **40** παρασκευάστηκε σύμφωνα με δημοσιευμένη μέθοδο⁶⁹, μέσω αντίδρασης του 1-αδαμαντανολιθίου (1-βρωμοαδαμαντάνιο **39** και σύρμα λιθίου) με την κυκλοεξανόνη. Αντίδραση της αλκοόλης **40** με NaN_3/TFA 1M/ CH_2Cl_2 έδωσε το αντίστοιχο αζίδιο **41** το οποίο με LiAlH_4 /αιθέρα/βρασμός 5h ανάγεται προς την αμίνη **13** (48%) (σχ. 4.14).

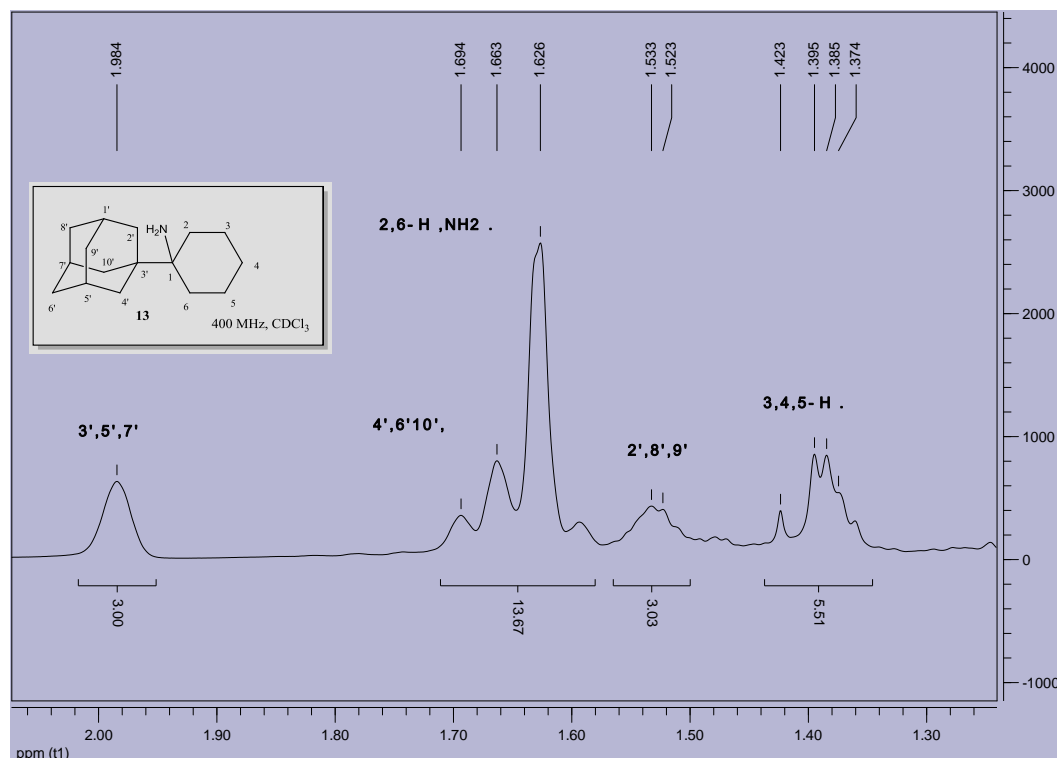


Σχήμα 4.14

Αντιδραστήρια και συνθήκες:

- (a) Li, άνυδρο THF, κυκλοεξανόνη, υπέρηχοι, 0° C 5h (70%)
- (b) NaN_3 , TFA, CH_2Cl_2 , 0 °C 5h, r.t. 24 h (60%)
- (c) LiAlH_4 , άνυδρος αιθέρας, βρασμός 5 h, H_2O , NaOH 10% (30%)

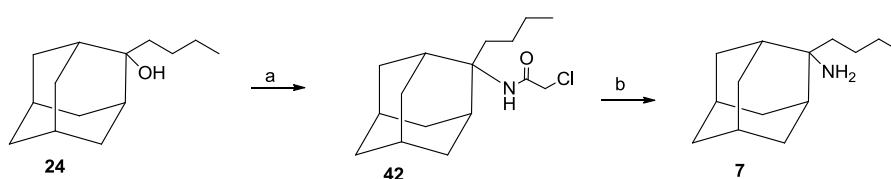
Στο σχήμα 4.15 απεικονίζεται το φάσμα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ^1H της ένωσης **13**.



Σχήμα 4.15

4.3 ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΟΣ ΤΡΟΠΟΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΩΝ ΑΔΑΜΑΝΤΑΝΙΚΩΝ *tert*-ΑΛΚΑΝΑΜΙΝΩΝ ΜΕΣΩ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ RITTER

Με στόχο την αύξηση στην απόδοση της σύνθεσης αμινών από τις αντίστοιχες αλκοόλες, εφαρμόστηκε μία τροποποιημένη αντίδραση Ritter⁷⁰ επί της αλκοόλης **24**, σύμφωνα με τη συνθετική πορεία του σχήματος 4.16. Η έκδοση αυτής της μεθόδου θεωρείται βελτιωμένη διότι εξαιτίας της ομάδας CH₂Cl αυξάνεται η ηλεκτρονιόφιλη δραστηριότητα του κατιόντος νιτριλίου ώστε η πυρηνόφιλη προσβολή του νερού να γίνεται υπό ήπιες συνθήκες συγκριτικά με τις συνθήκες αυτόκλειστου (κλασική Ritter, 200° C). Επίσης, η παρουσία του χλωρίου στο ακεταμίδιο που παράγεται καθιστά δυνατή την υδρόλυση προς αμίνη, μέσω της σχηματιζόμενης θειουρίας, υπό ήπιες συνθήκες.

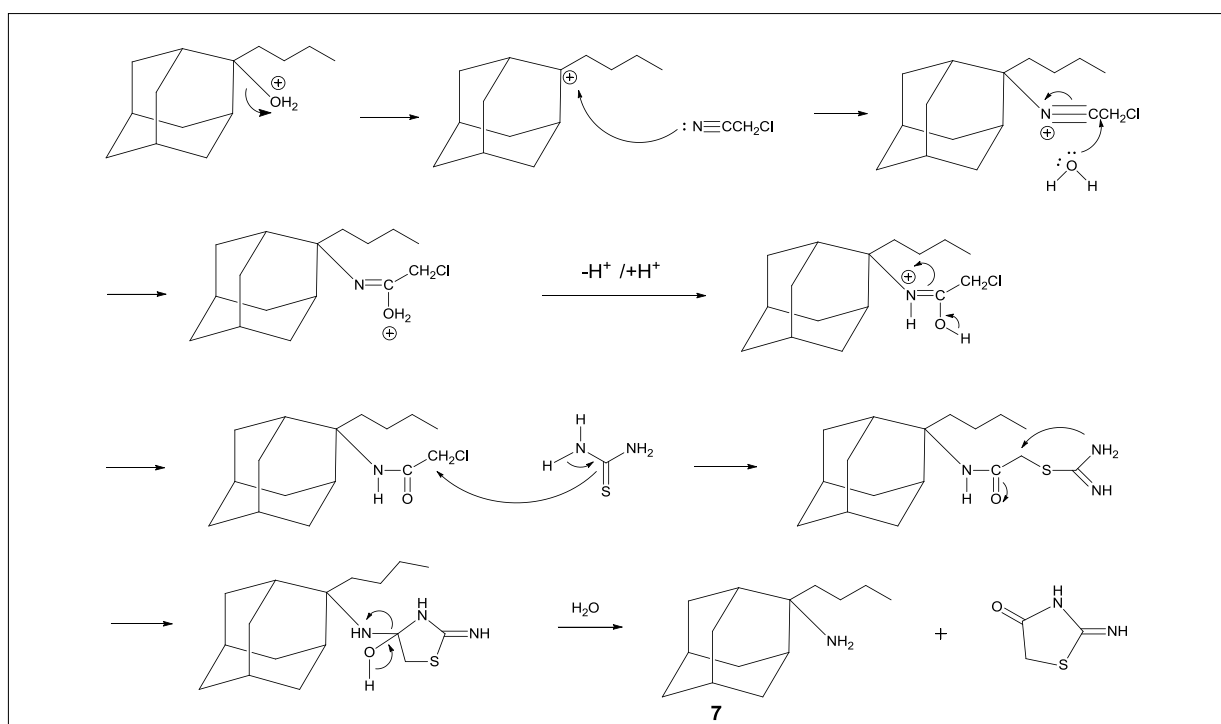


Σχήμα 4.16

Αντιδραστήρια και συνθήκες:

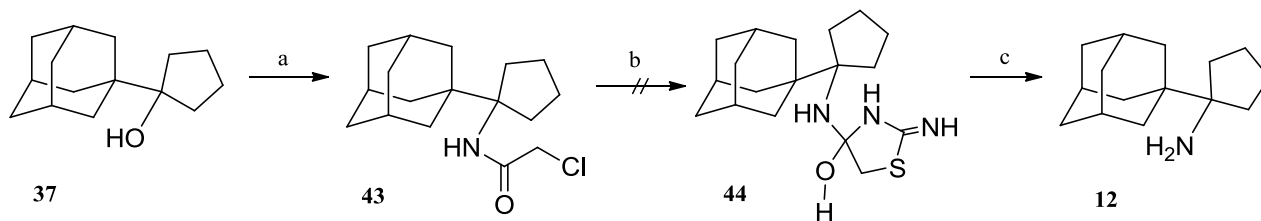
- ClCH₂CN, AcOH/H₂SO₄, r.t 24h, παγόνερο (51%)
- H₂NC=SNH₂, AcOH/EtOH, reflux 15h, H₂O, NaOH 20% (39%)

Ο μηχανισμός της αντίδρασης Ritter φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (4.17):



Σχήμα 4.17

Η παραπάνω αντίδραση εφαρμόστηκε και για τη σύνθεση της αμίνης **12**, που, όμως, δεν απέφερε τα προσδοκώμενα αποτελέσματα, πιθανώς λόγω δυσκολίας σχηματισμού του ενδιάμεσου **44** στο οποίο οι στεreoχημικές απώσεις μεταξύ των τριών δακτυλίων είναι μεγάλες (σχ. 4.18).



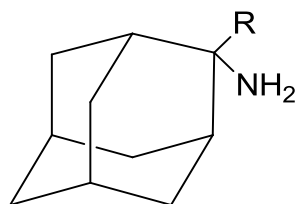
Σχήμα 4.18

Αντιδραστήρια και συνθήκες:

- ClCH_2CN , $\text{AcOH}/\text{H}_2\text{SO}_4$, r.t 24h, παγόνερο (37%)
- $\text{H}_2\text{NC}=\text{SNH}_2$, AcOH/EtOH , reflux 15h
- H_2O και NaOH 20% w/v (ίχνη αμίνης)

Από τα παραπάνω φαίνεται πως η κλασική πορεία σύνθεσης ογκωδών αμινών μέσω μετατροπής της αλκοόλης σε αζίδιο με NaN_3/TFA 1M/DCM και αναγωγής του αζιδίου με LiAlH_4 έχει γενικό χαρακτήρα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.1 Παράγωγα του γενικού τύπου Α



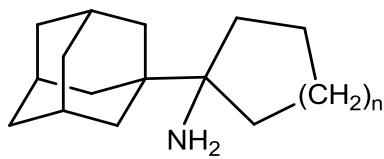
Α

No	R	Σ.τ (°C)	Απόδ. (%)	Μορ.Τύπος
4	-CH ₃	>250° C ²	85%	C ₁₁ H ₂₀ ClN
5	-CH ₂ CH ₃	>250° C ²	71%	C ₁₂ H ₂₂ ClN
6	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	>250° C ²	74%	C ₁₃ H ₂₄ ClN
7	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	220° C ¹	23%	C ₁₈ H ₂₉ NO ₄
8	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	225° C ¹	65%	C ₁₈ H ₂₉ NO ₄
9	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	235° C ¹	14%	C ₂₀ H ₃₃ NO ₄
10	-CH ₂ C ₆ H ₅	>265° C ²	55%	C ₁₆ H ₂₂ ClN
11	-C ₆ H ₅	205° C ¹	45%	C ₂₁ H ₂₇ NO ₄

¹ Σημείο τήξεως φουμαρικού άλατος , Προϊόν ανακρυστάλλωσης από αιθανόλη-αιθέρα.

² Σημείο τήξεως υδροχλωρικού άλατος , Προϊόν ανακρυστάλλωσης από αιθανόλη-αιθέρα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.2 Παράγωγα γενικού τύπου Β

**B**

No	n	Σ.τ. (°C)	Απόδ. (%)	Μορ.Τύπος
12	n=1	255 ⁰ C ²	65%	C ₁₉ H ₂₉ NO ₄
13	n=2	264 ⁰ C ¹	48%	C ₂₀ H ₃₁ NO ₄

¹ Σημείο τήξεως φουμαρικού άλατος, Προϊόν ανακρυστάλλωσης από μεθανόλη-αιθέρα.

² Σημείο τήξεως φουμαρικού άλατος, Προϊόν ανακρυστάλλωσης από αιθανόλη-αιθέρα.

5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΑΜΙΝΟΑΔΑΜΑΝΤΑΝΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ-ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Α/Μ2 ΑΝΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

5.1 ΓΕΝΙΚΑ

Για τον έλεγχο της αντιικής δράσης in-vitro των νέων αμινοαδαμαντανικών παραγώγων αλλά και την κατανόηση του μηχανισμού δράσης αυτών, πραγματοποιήθηκαν μία σειρά από πειράματα όπως:

α) Μέτρηση της ανασταλτικής συγκέντρωσης των ενώσεων in-vitro έναντι διαφόρων στελεχών ιών influenza A.

β) Μελέτες ανθεκτικότητας ιών influenza A WT και S31N έναντι των δραστικών μορίων αλλά και κοκτέιλ των μορίων. Η αμανταδίνη ως φάρμακο πριν το 2005 έναντι των ιών WT είχε το μειονέκτημα της ανάπτυξης γρήγορης ανθεκτικότητας. Η εμφάνιση μικρής ανθεκτικότητας από τον ιό S31N στα νέα μόρια είναι πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό.

γ) Μέτρηση της αναστολής αγωγιμότητας H^+ από το τετραμερές M2TM (22-62).

δ) Έλεγχος της σύνδεσης των δραστικών αμινοαδαμαντανικών παραγώγων με το S31N M2TM με πειράματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού στερεάς κατάστασης (ssNMR).

ε) Προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής του συμπλόκου αμινοαδαμαντανικού προσδέτη- S31N M2TM.

στ) Ηλεκτροφυσιολογικές μετρήσεις των ρευμάτων H^+ από το σύμπλοκο της πλήρους πρωτεΐνης M2 με αμινοαδαμαντανικούς προσδέτες (και όχι τμήματος M2TM). Η πρωτεΐνη εκφράστηκε σε ωκύτταρα Xenopus.

η) Ανάλυση της αλληλουχίας της πρωτεΐνης M2 σε ιούς WT και S31N μετά την εμφάνιση ανθεκτικότητας για να ελεγχθούν τα αμινοξέα που πιθανόν συμμετέχουν στην σύνδεση με το φάρμακο.

Από τον αντιικό έλεγχο βρέθηκε ότι οι ενώσεις **5,6,7,8,9,10,11,12** και **13** είναι δραστικές ενώ οι ενώσεις **3** και **4** δεν εμφάνισαν δραστηριότητα. Προσδιορίστηκαν οι καμπύλες δόσης απόκρισης και οι τιμές EC_{50} για τις ενώσεις έναντι του πανδημικού στελέχους 2009 H1N1 που φέρει την μετάλλαξη S31N στην M2 πρωτεΐνη, καθώς είναι υψίστης σημασίας, του ιού A/PR/8/34 που φέρει τις μεταλλάξεις S31N και V27T, αλλά και των στελεχών της κοινής γρίπης WT των υποτύπων H1N1, H2N2 και H3N2.

Η μέτρηση της αγωγιμότητας H^+ από το τετραμερές M2TM(22-62) σε λιπώματα έδειξαν ότι ο μηχανισμός δράσης των μορίων αυτών επί της A/M2TM(22-62) είναι ο φραγμός του ιοντικού διαύλου S31N M2TM(22-62). Πειράματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού στερεάς κατάστασης (ssNMR) υποδεικνύουν ότι οι ενώσεις συνδέονται με το διαμεμβρανικό τομέα του πεπτιδίου S31N M2TM (αμινοξέα 22-46) κάτι που φαίνεται και από τα πειράματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού υγρής φάσης (^{15}N -HSQC) σε μικύλλια που έγιναν για το πεπτίδιο S31N M2TM (αμινοξέα 21-61).

Επίσης τα αποτελέσματα της προσομοίωσης MD του συμπλόκου Am-S31N M2TM και **11**(R=CH₂Ph)-S31N M2TM προτείνουν ότι ενώ η σύνδεση της Am με τον πόρο S31N M2TM είναι ασταθής, ένα δραστικότερο μόριο όπως το **11** έχει σταθερή σύνδεση με τον πόρο S31N M2TM.

Όμως τα αποτελέσματα από τις ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες του συμπλόκου M2-αμινοαδαμαντανικός προσδέτης που μετρούν την αγωγιμότητα H⁺ από όλη την M2 πρωτεΐνη (αμινοξέα 1-98) έρχονται σε αντίθεση με τα παραπάνω αποτελέσματα των βιοφυσικών μελετών καθώς φαίνεται ότι παρουσία των μορίων δεν αναστέλλεται η μεταφορά H⁺ και πιθανώς τα μόρια δεν δρουν με φραγμό της πρωτεΐνης M2.

Επιπλέον το ανθεκτικό στέλεχος που αναπτύσσεται μετά από δέκα περάσματα της ένωσης **6** από τον ιό H1N1 A/California/07/2009 δεν περιέχει μεταλλάξεις μέσα στον πόρο της M2 (M2TM) αλλά αρκετές μεταλλάξεις στην αιματογλουτινίνη, HA η οποία είναι πιθανό να συμμετέχει εμμέσως στον τρόπο δράσης.

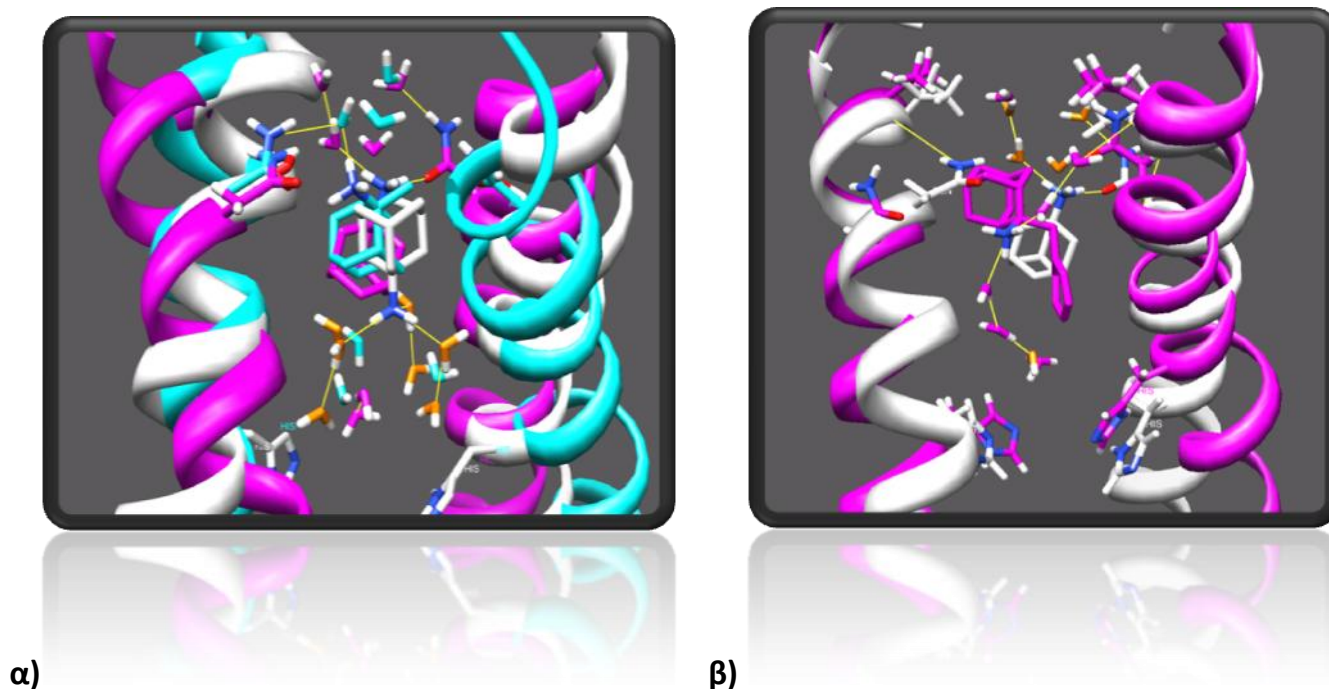
Τελικά, τα μόρια έχουν δράση κατά των S31N ανθεκτικών στελεχών PR/8/34 και A/California/07/2009. Φαίνεται ότι ο μηχανισμός δράσης των μορίων είναι πολύπλοκος. Όμως τα μόρια έχουν σημαντική βιολογική δράση και η ανθεκτικότητα του ιού S31N εμφανίζεται πολύ μειωμένη.

5.2 ΒΙΟΦΥΣΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΑΜΙΝΟΑΔΑΜΑΝΤΑΝΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΕΤΗ-Μ2

5.2.1 Προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής

Με την βοήθεια της μοριακής προσομοίωσης (*molecular modelling*) εφαρμόστηκε μοριακή δυναμική (*molecular dynamic*) 80ns με προσθήκη των μικρότερων μορίων, της αμανταδίνης και του 2-μέθυλο-2-αμινοαδαμαντανίου **4**, στον πόρο της S31N M2TM στην πειραματικά καθορισμένη θέση σύνδεσης της αμανταδίνης με το πόρο WT M2TM. Τα φάρμακα δημιούργησαν μια περιοχή χωρίς μόρια νερού εντός του πόρου, απομακρύνοντας τα μόρια νερού κοντά στο N31 (σχ. 5.1^α). Επιπλέον φαίνεται πως είναι εφικτό τα μικρά αυτά μόρια να περιστρέφονται μέσα στον πόρο M2TM λόγω επαρκούς χωρητικότητας εξαιτίας της διεύρυνσης του πόρου που προκαλείται από τη μετάλλαξη S31N (σχ. 5.1^β). Προσομοιώσεις MD έδειξαν ότι μετά τα 5ns η αμανταδίνη και η ένωση **4** περιστρέφονται αλλάζοντας την κατεύθυνση της αμινομάδας. Ενώ στην WT M2TM η αμινομάδα κατευθύνεται προς το C-τελικό άκρο, στον πόρο S31N M2TM κατευθύνεται προς το N-τελικό άκρο. Επίσης υπολογισμοί που έγιναν για μεγαλύτερο μόριο της σειράς, την ένωση **11** (R=CH₂Ph), έδειξαν πως το φάρμακο παρέμεινε σταθερά τοποθετημένο στην αρχική του διαμόρφωση με κατεύθυνση της αμινομάδας προς το C-τελικό άκρο, πιθανώς λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης για περιστροφή. Η υψηλή κινητικότητα των μικρών μορίων **1** και **4** σχετίζεται με ασθενέστερη σύνδεση που έχει ως αποτέλεσμα έναν υψηλότερο ρυθμό εξόδου από το κανάλι.

Τα αποτελέσματα των προσομοιώσεων είναι σύμφωνα με τα πειράματα ssNMR και μέτρησης αγωγιμότητας H⁺ σε σύμπλοκα M2TM(22-62)-αμινοαδαμαντανικός προσδέτης σε λιποσωμάτια (§ 5.2.2, 5.2.3).



Σχήμα 5.1 Αρχικές και τελικές θέσεις για την αμανταδίνη και τις ενώσεις 4 και 11 από υπολογισμούς μοριακής δυναμικής στα 80ns .

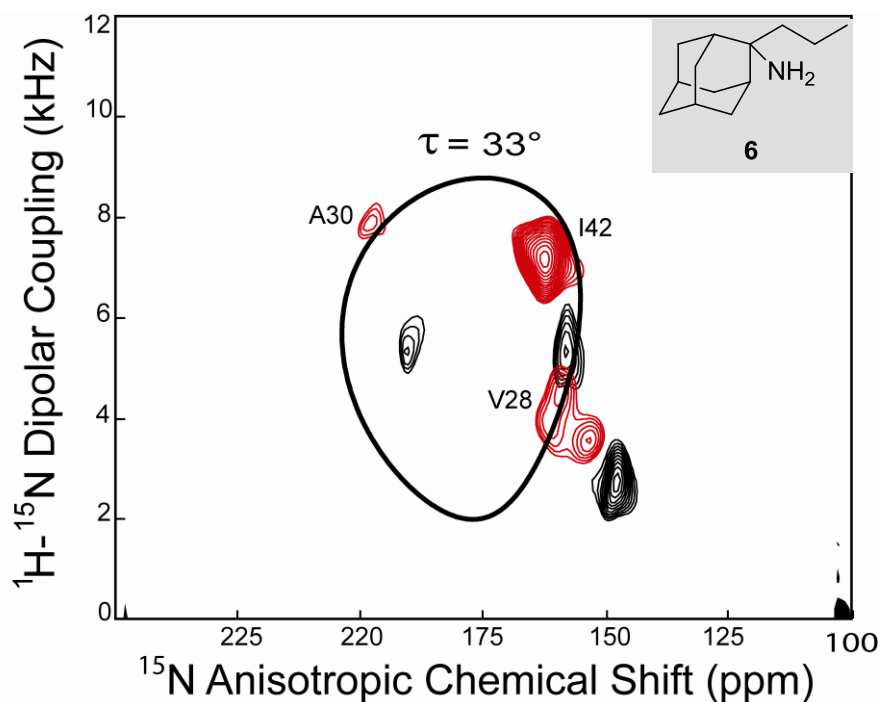
α) Αμανταδίνη 1 (ένωση με λευκό χρώμα στο αδαμαντάνιο: αρχική θέση, χρώμα **magenta** :τελική θέση) και για την ένωση 4 (ένωση με **γαλάζιο** χρώμα στο αδαμαντάνιο: **τελική θέση**). Οι λευκές κορδέλες αναπαριστούν την αρχική δομή του πεπτιδίου M2TM (PDBID: 2KQT) και η His37 φαίνεται με την μορφή ράβδων. Για την τελική δομή του M2TM μετά από την προσομοίωση μοριακής δυναμικής χρησιμοποιήθηκε για το σύμπλοκο της αμανταδίνης ροζ κορδέλες και για το σύμπλοκο της ένωσης 11 γαλάζιες κορδέλες. Οι πλευρικές αλυσίδες της Asn31 χρωματίζονται όπως η σπονδυλική στήλη της πρωτεΐνης. Οι δεσμοί υδρογόνου φαίνονται με κίτρινες γραμμές και τα νερά θέτονται ως : για την αμανταδίνη 1 τα οξυγόνα του νερού με **χρυσό** για την αρχική διαμόρφωση της πρωτεΐνης, **magenta** για τη τελική διαμόρφωση, και για την ένωση 4, με **γαλάζιο** για τη τελική διαμόρφωση μετά το πέρας της προσομοίωσης. Τα υπόλοιπα μέρη του συστήματος στην προσομοίωση της πρωτεΐνης (πλευρικές αλυσίδες, πρώτη και τρίτη αλυσίδα της M2TM, τα λιπίδια, ηλεκτρολύτες) παραλείπονται για μεγαλύτερη ευκρίνεια. Αρχίζοντας την προσομοίωση με την αμινομάδα προς το C-τελικό άκρο (πειραματική δομή συμπλόκου Am-M2TM) οι ενώσεις περιστράφηκαν κατά την διάρκεια της μοριακής δυναμικής προς το N-τελικό άκρο. Αυτός ο προσανατολισμός έμεινε σταθερός μετά τα 5ns και οι αμινομάδες σχημάτισαν δεσμούς υδρογόνου με τα οξυγόνα του αμιδίου N31 της πλευρικής αλυσίδας. Αυτό αποδεικνύει ότι και τα δύο αυτά φάρμακα είναι ευκίνητα μέσα στον πόρο και καθιστούν πιθανή την έξοδο τους από το κανάλι.

β) Τελική διαμόρφωση μετά από το πέρας της μοριακής δυναμικής της ένωσης 11 (χρώμα **magenta**) σε σύγκριση με την τελική θέση της αμανταδίνης 1 (λευκό χρώμα στο αδαμαντάνιο και **χρυσό** χρώμα στα οξυγόνα των νερών) που φαίνεται και στο α με χρώμα **magenta**. Η βένζυλομάδα της ένωσης 11 κατευθύνεται στο C-τελικό άκρο κατά την διάρκεια του υπολογισμού. Το αφυδατωμένο στρώμα κοντά στο N31 καθώς και ο προσανατολισμός παρέμειναν σταθερά καθ' όλη την διάρκεια της προσομοίωσης των 80ns. Υπολογισμοί ελευθέρως ενέργειας πρέπει να εφαρμοστούν για να διαπιστωθεί η σημασία της κινητικότητας και της προτίμησης διαμόρφωσης. Προτείνεται ότι η στερεοχημική παρεμπόδιση για περιστροφή είναι αυτή που διατηρεί την ικανότητα αποτελεσματικής σύνδεσης των δραστικών ενώσεων σε συμφωνία με τα πειράματα ssNMR και αγωγιμότητας H⁺ σε πρωτεολιποσώματα (§ 5.2.2, 5.2.3) .

5.2.2 Πειράματα φασματοσκοπίας (ssNMR και ^{15}N -HSQC)

Για την λήψη των φασμάτων το πεπτίδιο (M2TM) του μεταλλαγμένου στελέχους (S31N) είναι επισημασμένο με ^{15}N σε δύο θέσεις στο N-τελικό άκρο (στο σχήμα 5.2^α και 5.2^β αμινοξέα 28 και 30) και σε μία θέση στο C-τελικό άκρο (αμινοξύ 42) της έλικας M2TM. Τα φάσματα προτείνουν ότι υπάρχουν σημεία σύνδεσης της ένωσης **6** (σχ. 5.2) επειδή τα μόρια προκάλεσαν μετατόπιση των χημικών μετατοπίσεων τρεις αμιδικούς δεσμούς του κορμού της έλικας.

Η πρόσδεση της αμανταδίνης με το επισημασμένο πεπτίδιο της M2TM της κοινής γρίπης WT προκαλεί στρέβλωση 11° στο αμινοξύ G34 σε κάθε έλικα του τετραμερούς.⁷⁹ Η γωνία που σχηματίζει το μισό C-τελικό άκρο της α-έλικας με το επίπεδο της μεμβράνης (αμινοξέα 35-46) αλλάζει από 32° σε 22° .⁸⁰ Οι επαγόμενες αλλαγές από την πρόσδεση της ένωσης **6** στη διαμόρφωση της πεπτιδικής αλυσίδας M2TM, στις συχνότητες συντονισμού των ανώτερων τριών αμινοξέων, δείχνουν ότι η γωνία που σχηματίζει η συνολική M2TM έλικα με το επίπεδο της μεμβράνης αλλάζει σε 33° , ενώ δεν παρατηρείται καμία στρέβλωση της αλυσίδας M2TM στο G34 αμινοξύ (δηλ είναι γραμμική). Επιπλέον, το εύρος των κορυφών συντονισμού των αμινοξέων της M2TM μειώνεται στο σύμπλοκο υποδηλώνοντας μια σταθεροποιημένη διαμόρφωση (και όχι ισορροπίες μεταξύ πολλών διαμορφώσεων που προκαλεί διεύρυνση των κορυφών συντονισμού).

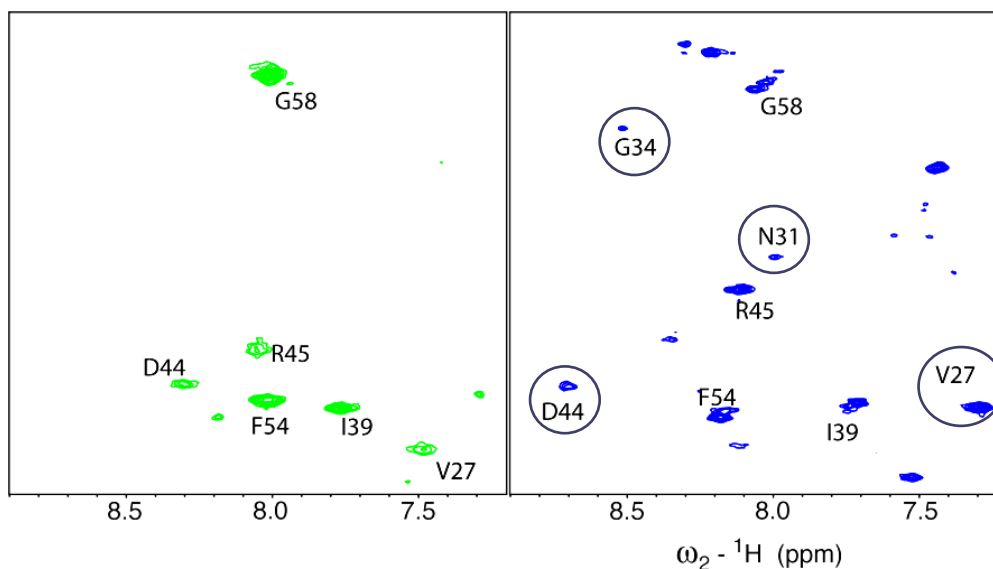


Σχήμα 5.2

Τμήμα φασμάτων ssNMR συμπλόκου ένωσης 6-S31N M2TM. Τμήμα φασμάτων ssNMR της S31N M2TM (αμινοξέα 22-46), με επισήμανση ^{15}N στα αμινοξέα 28, 30 και 42, σε διπλοστιβάδες διμυριστοϋλοφωσφατιδυλοχολίνης (*dimyristoylphosphatidylcholine, DMPC*) ομοιόμορφα καταναμημένες σε γυάλινες πλάκες παρουσία της ένωσης 6 (σχ.5.2^β) (κόκκινο) και απουσία ένωσης 6 (μαύρο). Οι χημικές μετατοπίσεις προσδιορίστηκαν με βάση την γνωστή δομή και τα φάσματα του WT M2TM.⁸¹ Τα προσδιορισθέντα σημεία παρουσία φαρμάκου έγιναν με βάση τον περιστροφικό προσανατολισμό των ελίκων.

Ανακεφαλαιώνοντας, η γωνία που σχηματίζει ο άξονας του τετραμερούς WT και S31N με το επίπεδο της μεμβράνης είναι περίπου 32° .^{80,82} Κατά την σύνδεση των μορίων 6 με το S31N M2TM η γωνία αυτή αλλάζει σε 33° αντίστοιχα. Κατά την σύνδεση της αμανταδίνης με την WT M2TM παρουσιάζεται στρέβλωση (kink) σε κάθε πεπτιδική αλυσίδα μονομερούς M2TM στο G34, η γωνία αλλάζει για το C-τελικό άκρο (35-46) από 32° σε 22° ενώ με το πεπτίδιο S31N δεν υπάρχει στρέβλωση. Κατά την σύνδεση της ένωσης 6 δεν παρουσιάζεται στρέβλωση στο G34 και η γωνία που σχηματίζει ο άξονας του τετραμερούς με το επίπεδο της μεμβράνης είναι ομοιόμορφη για όλη την δέσμη του τετραμερούς (32°). Τούτο δηλώνει διαφορετική διαμόρφωση του M2TM στα σύμπλοκα WT και S31N με αμινοαδαμαντανικό προσδέτη.

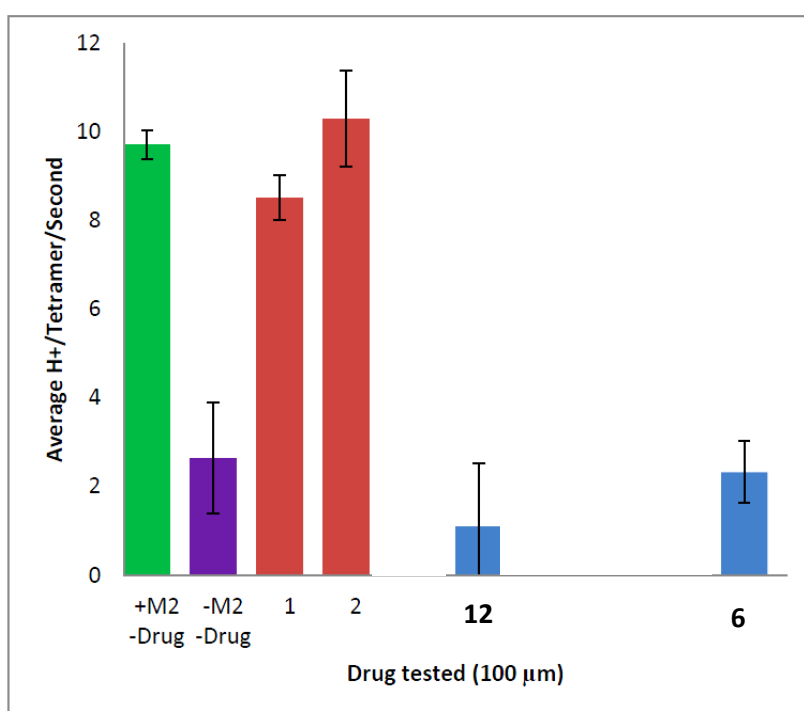
Ακόμη, έγιναν πειράματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού υγρής φάσης (^{15}N -HSQC) για την ένωση **6** με επισημασμένο πεπτίδιο S31N M2TM (21-61). Η μετατόπιση των χημικών μετατοπίσεων άλλων αμινοξέων δείχνει ότι υπάρχει πρόσδεση της ένωσης **6** με το πεπτίδιο (σχ.5.3).



Σχήμα 5.3 ^{15}N -HMOC φάσμα του M2-S31N (21-61) με και χωρίς πρόσδεση της ένωσης **6**. Το αριστερό φάσμα δείχνει τις χημικές μετατοπίσεις χωρίς την πρόσδεση του φαρμάκου και το δεξί φάσμα δείχνει αλλαγές στις χημικές μετατοπίσεις αμινοξέων μετά από την προσθήκη 2.6eq. της ένωσης **6** στο σύστημα M2TM-μικύλλια. Το M2-S31N πεπτίδιο συντέθηκε με τα αμινοξέα στις θέσεις V27, A30, N31, G34, I39, L46, F54 και το G58 επιλεκτικά επισημασμένα με ^{13}C και ^{15}N .

5.2.3 Αναστολή πρόσληψης πρωτονίων από την M2TM σε λιποσωμάτια

Πειράματα που έγιναν για τις ενώσεις **12**, και **6**, (και την αμανταδίνη (**1**) και ριμανταδίνη (**2**) ως ενώσεις αναφοράς) έδειξαν ότι η πρόσληψη πρωτονίων από τα πρωτεολιποσωμάτια της S31N M2TM (22-62) αναστέλλεται πλήρως με την παρουσία των ενώσεων **12** και **6** προτείνοντας ότι η S31N M2 πρωτεΐνη αποτελεί πιθανώς τον στόχο των αδαμαντανικών παραγώγων ως αντικών αναστολέων (σχ. 5.4). Από το σχήμα φαίνεται πως οι ενώσεις προκαλούν φραγμό στον διάυλο της M2TM (μπλε ράβδοι) έτσι ώστε να ελαχιστοποιείται η αρχική ροή πρωτονίων μέσω της M2TM (πράσινη ράβδος), ενώ η αμανταδίνη (**1**) και ριμανταδίνη (**2**) δεν προκαλούν καμία μείωση ροής H⁺ (κόκκινες ράβδους).



Σχήμα 5.4 Αρχικός ρυθμός πρόσληψης πρωτονίων με λιποσωμάτια, χωρίς την M2-απουσία φαρμάκου (μωβ) ή με την M2 22-62 (S31N) -απουσία φαρμάκου(πράσινο) ή παρουσία 100 μM φαρμάκου για τις επιλεγμένες ενώσεις (κόκκινο, μπλε). Στις δραστικές ενώσεις (μπλε) η ροή H⁺ είναι μειωμένη σε σχέση με το σύστημα πρωτεΐνης-απουσία φαρμάκου (πράσινη ράβδος). Το εύρος σφάλματος μέτρησης φαίνεται σε όλες τις ράβδους.

5.2.4 Πειράματα ηλεκτροφυσιολογίας για το σύμπλοκο M2(1-98)-Αμινοαδα-μαντάνιο

Τα αποτελέσματα που συζητήθηκαν στις παραγράφους §5.2.1-5.2.3 προτείνουν ότι ο πόρος S31N M2TM της M2 πρωτεΐνης αποτελεί τον στόχο των αμινοαδαμαντανικών παραγώγων και με την βοήθεια των υπολογισμών μοριακής δυναμικής που πραγματοποιήθηκαν από το εργαστήριο μας επιβεβαιώνεται η θεωρία περί αύξησης μεγέθους του πόρου και ανάγκη κάλυψης του από κατάλληλα μεγαλύτερα μόρια. Παρόλα αυτά φαίνεται πως τα παραπάνω δεδομένα δεν συμφωνούν με τα πειράματα ηλεκτροφυσιολογίας που έγιναν για τις ενώσεις αυτές στην πλήρης S31N M2 πρωτεΐνη (πίνακας 5.1), πράγμα που δεν αναιρεί την δραστικότητα των μορίων αλλά πιθανόν προτείνει διαφορετικό μηχανισμό δράσης των ενώσεων.

Πίνακας 5.1 Αποτελέσματα ηλεκτροφυσιολογίας μέσω προσδιορισμού της τάσης των ηλεκτροδίων (TEVC) στον δίαυλο της M2 που εκφράστηκε σε ωκύτταρα *Xenopus*¹

Compound	M2 –WT (H1N1) ^{2α}		M2-S31N (H1N1) ^{2β}	
	IC ₅₀ ² (N) ³	%Block (n) ⁵	IC ₅₀	%Block @100μM
1	2.5±0.5 μM (2)	95±8% (10μM) (2)	800±200 μM (2)	13±3% (2)
6	7±2 μM (2)	63±5% (10μM) (2)	ND	0±5% (2)
12	10±2 μM (2)	48±4% (10μM) (2)	ND	4±4% (2)
5	N.D ⁶	75.8% (100 μM) (2)	N.D	4.7%(2)
7	N.D	77.6% (100 μM) (2)	N.D	11.4%(2)

Επεξηγήσεις:

¹ Κύτταρα βατράχου που αποτελούν το σύστημα μέσω του οποίου μπορούμε να μελετήσουμε μεταφορά ιόντων και την φυσιολογία του διαύλου.

^{2α} Το στέλεχος για το M2 –WT πεπτιδίο που χρησιμοποιήθηκε είναι το H1N1 A/England/195/2009 και ^{2β} για το M2-S31N το H1N1 A/California /04/2009 (Genbank ACP44153.1).

³ Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (IC₅₀) ή η συγκέντρωση που απαιτείται για να γίνει φραγμός του πόρου κατά 50%.

⁴ Το N είναι ο αριθμός των μετρήσεων. Η αμανταδίνη μετρήθηκε με τα παραπάνω στελέχη ως ένωση αναφοράς.

⁵ Το n είναι ο αριθμός των πειραμάτων.

⁶ N.D: Δεν έγινε πέρασμα.

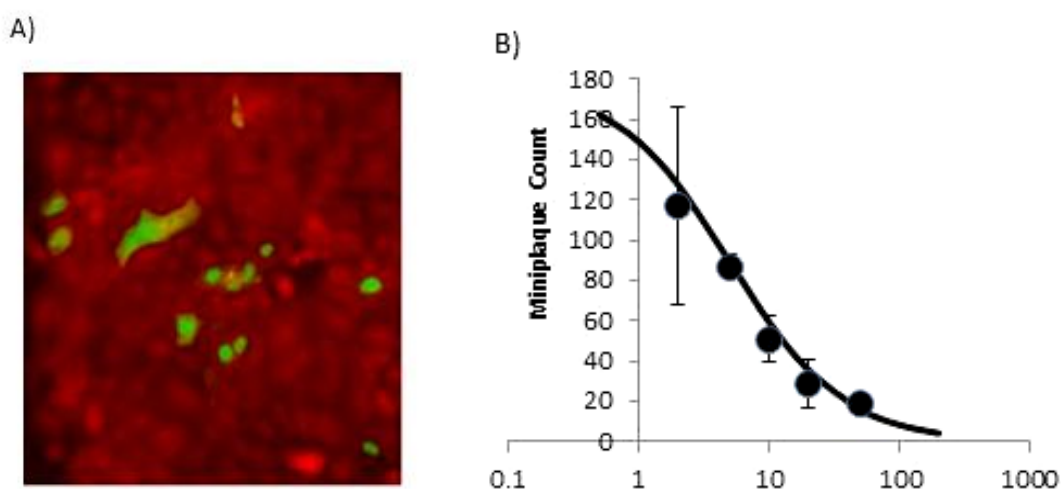
Στα πειράματα ηλεκτροφυσιολογίας μετράται η αλλαγή τάσης ή ροής του ηλεκτρικού ρεύματος στον δίαυλο της πρωτεΐνης M2, μετρήσεις που εφαρμόζονται σε ολόκληρη την πρωτεΐνη (αμινοξέα 1-98) και όχι μόνο μέρος αυτής όπως γίνεται στα πειράματα πρωτεολιποσωματίων (M2TM: αμινοξέα 22-62). Τα αποτελέσματα του πίνακα 5.1 δείχνουν ότι όλες οι ενώσεις αναστέλλουν τη ροή ρεύματος H⁺ κατά ποσοστό >50% για την πρωτεΐνη WT-M2. Δεν προκαλούν όμως φραγμό της πρωτεΐνης S31N- M2.

Τα αντίθετα αποτελέσματα από τη μελέτη ροής H^+ μέσω του M2TM σε λιποσωμάτια συγκριτικά με τα αποτελέσματα της ηλεκτροφυσιολογίας με όλη την πρωτεΐνη M2 δείχνουν για πρώτη φορά για το σύστημα αυτό τη σημασία της ακεραιότητας της πρωτεΐνης και πιθανόν και του περιβάλλοντός της (ίσως η ύπαρξη λιπιδίων να επηρεάζουν την διαμόρφωση της πρωτεΐνης). Το M2TM δεν μπορεί να θεωρείται πάντα μοντέλο της M2.

5.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΙΟΥ INFLUENZA A

5.3.1 Προσδιορισμός τιμών EC_{50} και κυτταροτοξικότητας σε κύτταρα MDCK των αμινοαδαμαντανικών παραγώγων.

Στο σχήμα 5.5 φαίνεται η καμπύλη δόσης-απόκρισης για την ένωση 6.



Σχήμα 5.5 A) Επισημασμένος ιός influenza A με FITC (Fluorescein isothiocyanate, πράσινο) μετά από σύντομη μόλυνση των MDCK κυττάρων από τον ιό H1N1 influenza A. B) Καμπύλη δόσης-απόκρισης για την ένωση 6. Η τυπική απόκλιση είναι $SD=\pm 1$.

Εκτιμήθηκε η αναστολή που προκαλούν οι ενώσεις **1-13** (σχ.5.6) έναντι των στελεχών S31N **H1N1 A/California/04/2009**, **H1N1 A/PR/8/34** και έναντι ιών WT **H2N2 A2/Taiwan/1/64**, **H3N2 A/Victoria/3/75**. Οι τιμές EC_{50} 's δίνονται στον πίνακα 5.2 όπου περιλαμβάνονται και τα EC_{50} 's της αμανταδίνης (**1**) και της ριμανταδίνης (**2**) που είναι γνωστό ότι είναι ανενεργές ενώσεις έναντι του μεταλλαγμένου ιού H1N1 (2009). Προσδιορίστηκε επίσης η ελάχιστη κυτταροτοξική συγκέντρωση (CC_{50}) δηλαδή η συγκέντρωση η οποία απαιτείται για να προκαλέσει μικροσκοπικά ανιχνεύσιμη αλλοίωση στο 50% της μορφολογίας των φυσιολογικών κυττάρων (Πίνακας 5.2).

Πίνακας 5.2 Δράση και κυτταροτοξικότητα *in vitro* έναντι του ιού influenza A των αμινοαδαμαντανικών παραγώγων του σχήματος 5.6 σε κύτταρα MDCK¹

#	H1N1 ^{2α} EC ₅₀ ±SE (μM) ³ (N) ⁴	H1N1 ^{2β} EC ₅₀ ±SE (μM) (N)	H2N2 ^{2γ} EC ₅₀ ±SE (μM) (N)	H3N2 ^{2δ} EC ₅₀ ±SE (μM) (N)	MCC ₅₀ (uM) ⁵
M2	S31N	V27T/S31N	WT	WT	
1	240 ± 90 (13)	24.1 ± 3.5 (21)	0.34 ± 0.01 (21)	2.77 ± 0.29 (16)	>100
2	110 ± 40 (13)	3.3 ± 0.5 (2)	1.6 ± 0.3 (2)	0.53 ± 0.07 (18)	>50
3	150 ± 30 (20)	3.8 ± 1.0 (2)	0.8 ± 0.3 (2)	3.3 ± 0.9 (2)	>50
4	54 ± 2 (20)	0.4 ± 0.4 (2)	0.5 ± 0.5 (2)	2.0 ± 0.4 (2)	>50
5	25±3 (21)	1.8 ± 0.9 (2).	0.8 ± 0.3 (2)	2.0 ± 0.4 (2)	>50
6	4.71±0.92 (20)	0.5 ± 0.2 (2)	<0.24 (2)	23 ± 8 (2)	>50
7	8.5±0.6 (20)	<0.3 ± 0.3 (2)	1.5 ± 0.3 (2)	4 ± 1 (2)	>50
8	8.0± 0.3 (21)	0.3 ± 0.5 (2)	0.4 ± 0.1 (2)	13 ± 2 (2)	>50
9	5.4±0.9 (2)	N.D.	N.D.	N.D.	>50
10	20.8±1.7 (21)	<0.3 ± 0.5 (2)	0.2 ± 0.2 (2)	8 ± 1 (21)	>50
11	8.6±0.8 (21)	1.2 ± 1.1 (2)	0.2 ± 0.3 (2)	18 ± 2 (21)	>50
12	0.79± 0.14 (18)	N.D.	N.D.	N.D.	>50
13	3.62±0.49 (20)	<0.3 ± 0.5 (2)	4 ± 1 (2)	2.3 ± 0.4 (2)	>50

Επεξηγήσεις:

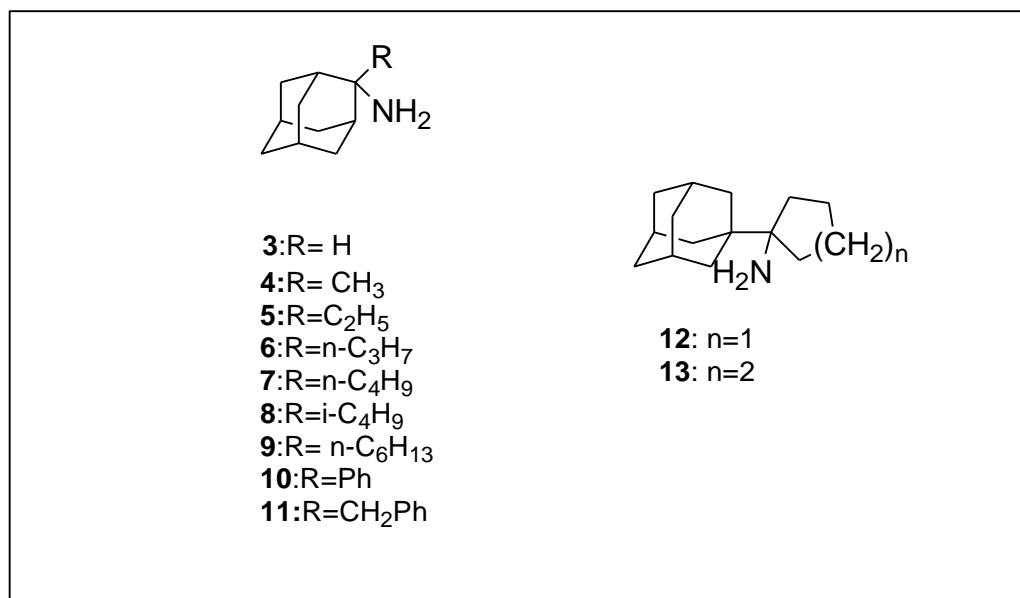
¹ MDCK : κύτταρα Madin-Darby από νεφρά σκύλου.

² Ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα προσβεβλημένα από τον ιό ^{2α} influenza H1N1 A/California/04/2009, ^{2β} H1N1 A/PR/8/34, ^{2γ} H2N2 A2/Taiwan/1/64, ^{2δ} H3N2 A/Victoria/3/75

³ Μέγιστη αποτελεσματική συγκέντρωση (EC₅₀). Αναγράφεται και το τυπικό σφάλμα που προκύπτει για την κάθε ένωση από τις μετρήσεις δόσης-απόκρισης με την μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων.

⁴ Το N είναι ο αριθμός των μετρήσεων. Η αμανταδίνη και ριμανταδίνη μετρήθηκαν με τα παραπάνω στελέχη ως ενώσεις αναφοράς.

⁵ Ελάχιστη κυτταροτοξική συγκέντρωση ή συγκέντρωση που απαιτείται για να προκαλέσει μικροσκοπικά ανιχνεύσιμη αλλοίωση στο 50% της μορφολογίας των φυσιολογικών κυττάρων



Σχήμα 5.6

Από τα παραπάνω φαίνεται πως οι ενώσεις 5-13 (εκτός των ενώσεων **3** και **4**) βρέθηκαν να είναι ισχυροί αναστολείς του στελέχους S31N H1N1 A/California/04/2009 in vitro αλλά οι μετρήσεις δείχνουν πως αναστολή παρατηρείται και σε άλλα στελέχη του ιού influenza A.

Τη μεγαλύτερη δράση, σε σχέση με την αμανταδίνη και ριμανταδίνη για τον ιό H1N1 (2009) που φέρει την μετάλλαξη S31N, την έχει η ένωση **12** (0.79 ± 0.14) μ M και η **13** (3.62 ± 0.49) μ M και ακολουθούν οι ενώσεις **6** (4.71 ± 0.92) μ M και οι ενώσεις **7**, **8** και **11** με παραπλήσια δραστηκότητα μεταξύ τους ($\sim 8\mu$ M). Σε αντίθεση με τις υπόλοιπες ενώσεις οι ενώσεις **3** και **4** παρουσιάζουν δραματική μείωση δραστηκότητας στο μεταλλαγμένο στέλεχος.

Επίσης, τα μόρια **3-8**, **10**, **11**, **13**, είναι δραστικά και σε μία εκ των περιπτώσεων (H1N1 A/PR/8/34) που φέρει διπλή μετάλλαξη στην αλληλουχία της M2 πρωτεΐνης V27T και S31N. Δραστηκότητα παρατηρήθηκε και για του ιούς WT που δε φέρουν μετάλλαξη στον πόρο, H2N2 A2/Taiwan/1/64, H3N2 A/Victoria/3/75. Τα μόρια του πίνακα 5.2 με υποκατάστατη στη θέση 2 εμφανίζουν ανάλογη δραστηκότητα μεταξύ τους πολύ μεγαλύτερης της αμανταδίνης (24.1 ± 3.5) μ M, με δραστικότερη τις ενώσεις **7** και **8**.

Θεωρώντας ότι ο πόρος της Μ2 πρωτεΐνης αποτελεί τον υποδοχέα των παραπάνω μορίων φαίνεται πως, στο σημείο πρόσδεσης, έχει δημιουργηθεί ένας «κενός» χώρος μεταξύ των αλυσίδων της Μ2 πρωτεΐνης, προς προσαρμογή μεγαλύτερων, σε όγκο, μορίων. Για τον λόγο αυτό παρατηρείται μια βαθμιαία αύξηση της δραστηριότητας κατά τη μετάβαση από τα αδρανή μόρια, 2-αμανταδίνη **3** και 2'-μεθυλο-2-αδαμανταναμίνη **4** στις δραστικές ενώσεις **5** και **6** που έχουν στην θέση 2 του αδαμαντανίου μεγαλύτερο αλκύλιο δηλαδή μία αιθύλο και μία η-πρόπυλο ομάδα αντίστοιχα. Προκύπτει ότι αύξηση του 2-αλκυλίου των 2-άλκυλο-2-αμινοαδαμαντάνιων κατά ένα CH₂ οδηγεί από το αδρανές 2-μέθυλο-2-αμινοαδαμαντάνιο σε δραστικά παράγωγα. Ενώ από τις υψηλές δραστηριότητες των ενώσεων **12** και **13** φαίνεται πως η ύπαρξη ενός ογκωδέστερου υποκατάστατη όπως είναι το κυκλοεξάνιο και κυκλοπεντάνιο προσδέονται καλύτερα στον πόρο του διαύλου Μ2ΤΜ το οποίο λόγω της αλλαγής του αμινοξέος σερίνη στην μεγαλύτερη σε όγκο ασπαραγίνη έχει διευρυνθεί.

5.3.2. Μελέτη ανθεκτικότητας in vitro

Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές ανθεκτικότητας για την αμανταδίνη στον ιό H3N2 WT, και για την ένωση **6** στον ιό H1N1 A/California/04/2009 (S31N).

Πίνακας 5.3 Δοκιμές ανθεκτικότητας in vitro έναντι του ιού influenza A (WT και S31N) των αμινοαδαμαντανικών παραγώγων **1**, και **6** σε κύτταρα MDCK¹.

Passage #	1 (5 μM) H3N2 ^{2α} EC ₅₀ ± S.E.(μM) ³ N ⁶	6 (5 μM) H1N1 ^{2β} EC ₅₀ ± S.E. (μM)
0	2.77 ± 0.29	4.71 ± 0.92
1	Ανενεργό ⁵	5.4 ± 1.4
2	Ανενεργό	3.7 ± 0.5
5	N.D. ⁴	2.1 ± 1.6
6		-
8		18.5 ± 1.0
10		76 ± 9
12		149 ± 115
Drug 13		10.2 ± 1.7

Επεξηγήσεις:

¹ MDCK : κύτταρα Madin-Darby από νεφρά σκύλου.

² Ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα προσβεβλημένα από τον ιό ^{2α} influenza H3N2: Influenza A Victoria/3/75 ^{2β} H1N1 A/California/04/2009.

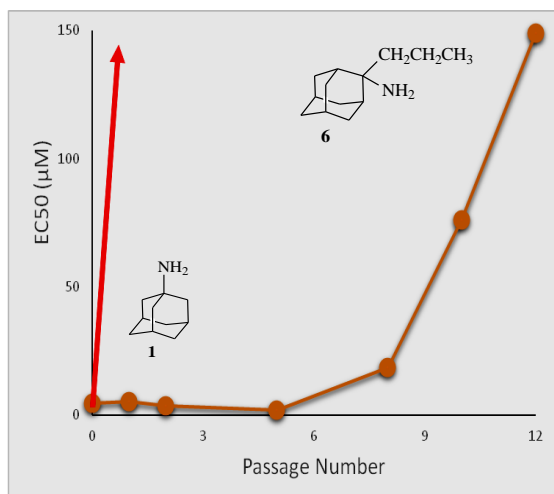
³ Μέγιστη αποτελεσματική συγκέντρωση (EC₅₀).

⁴N.D: δεν έγινε πέρασμα.

⁵Ανενεργό: δεν είχαμε μείωση στις πλάκες επώασης με 50μM αμανταδίνης

⁶ N(ο αριθμός των μετρήσεων) =21 .Η αμανταδίνη **1** μετρήθηκε με τα παραπάνω στελέχη ως ένωση αναφοράς.

Στο σύστημα αμανταδίνη-H3N2 ιός WT, αντοχή του ιού στην αμανταδίνη εμφανίστηκε μόλις μετά από ένα πέρασμα 50μM αμανταδίνης οπότε ο ιός αναπτύσσει μετάλλαξη χωρίς ανιχνεύσιμη δραστηριότητα της ένωσης στον «απόγονο» ιό (ιός μετά την μετάλλαξη). Αντιθέτως, για το σύστημα ένωση **6**-H1N1 (S31N), οι ιοί που παράγονται με την παρουσία του φαρμάκου **6** σε 1-5 περάσματα διατήρησαν πλήρη ευαισθησία στην ένωση αυτή (EC₅₀ 2.1 έως 5.4 μM). Ανθεκτικότητα στην ένωση **6** αναπτύχθηκε μεταξύ περάσματος 6 -12.



Σχήμα 5.8 Εμφάνιση ανθεκτικότητας του στελέχους H3N2 (WT) μετά το πρώτο πέρασμα της αμανταδίνης (κόκκινη ευθεία) και διατήρηση ευαισθησίας του στελέχους H1N1(S31N) σε 1-5 περάσματα της ένωσης **6** (πορτοκαλί καμπύλη) και βαθμιαία απώλεια δράσης της ένωσης **6** μετά από 6-12 περάσματα.

Με το 12^ο πέρασμα εμφανίστηκε ανθεκτικότητα στην ένωση **6** για τον ιό S31N (H1N1(2009)). Δηλαδή εμφανίζεται κάποιος μεταλλαγμένος απόγονος ιός έναντι του οποίου η ένωση **6** είναι αδρανής. Ο απόγονος αυτός ιός δοκιμάστηκε στη συνέχεια και βρέθηκε ότι αναστέλλεται με την προσθήκη της ένωσης **13**, αλλά το EC₅₀ μειώθηκε στα 10.2 μΜ σε σύγκριση με το 3.62(πίνακας 5.3 κατά του H1N1). Επειδή οι ενώσεις **6** και **13** είναι και οι δύο δραστικές έναντι του WT ιού, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι το σύστημα ένωση **6**-ανθεκτική μετάλλαξη του ιού S31N, δεν αποτελεί μια επαναφορά σε WT, και ότι η **13** είναι δραστική έναντι σε τουλάχιστον 3 τύπους του ιού.

Έλεγχος που έγινε στην αλληλουχία των αμινοξέων του πόρου της M2 στον ανθεκτικό ιό που αναπτύχθηκε μετά το 12^ο πέρασμα της ένωσης **6** έδειξε ότι δεν υπήρχαν μεταλλάξεις εντός του πόρου M2TM του στελέχους A/California/07/2009. Αυτό όμως προτείνει ότι ο μηχανισμός δράσης της ένωσης **6** έναντι του ιού S31N A/California/07/2009 δεν είναι ο φραγμός του διαύλου M2TM.

Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές ανθεκτικότητας και για τις δραστικές ενώσεις **4** και **6** στον ιό H3N2 A/HongKong/1/1968(WT). Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το συγκεκριμένο στέλεχος εμφάνισε ανθεκτικότητα με το 1^ο πέρασμα των ενώσεων **4** και **6** λόγω κυρίως της αλλαγής του αμινοξέος Ala30 στην πολύ ογκωδέστερη Thr (πίνακας 5.4). Κάτι που υποδηλώνει ότι τα μόρια αυτά φράζουν την WT M2TM πρωτεΐνη αλλά δεν φράζουν τη μεταλλαγμένη A30T M2TM.

Αντιθέτως τα αποτελέσματα ανθεκτικότητας της ένωσης **6** (πίνακας 5.3) και η μη εμφάνιση μεταλλάξεων στον πόρο στελέχους S31N M2TM του H1N1(2009) δείχνουν ότι οι ενώσεις δρουν στον ιό S31N ακολουθώντας πιθανώς ένα διαφορετικό τρόπο δράσης από το φραγμό του διαύλου M2TM στον ιό WT.

Πίνακας 5.4 Εμφάνιση μεταλλάξεων του ιού H3N2 (WT)¹ παρουσία των ενώσεων **4** και **6**

	ΕΝΩΣΗ ²	4	6
Passage ³ #	Plaque #	1 μg/ml	5 μg/ml
2	1	WT	A30T
	2	WT	A30T
	3	WT	A30T
5	1	A30T	A30T
	2	A30V	A30T
	3	A30T	A30T
		2 μg/ml	5 μg/ml
10	1	A30T	A30T
	2	A30T	A30T
	3	A30T	A30T

¹Στέλεχος influenza H3N2 A/Hong Kong/1/1968 (WT).

²Αριθμός ένωσης από το σχήμα 5.6

³Αριθμός περασμάτων.

Χρησιμοποιήθηκαν τρεις πλάκες επώασης και μελετήθηκε για την κάθε μία ξεχωριστά η αλληλουχία των αμινοξέων στο 2^ο, στο 5^ο και στο 10^ο πέρασμα των ενώσεων σε κύτταρα MDCK.

5.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ WT ΚΑΙ S31N ΕΝΑΝΤΙ ΑΜΑΝΤΑΔΙΝΗΣ ΚΑΙ ΕΝΩΣΗΣ 6 ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΑ

Για την περαιτέρω διερεύνηση του μηχανισμού έγινε ανάλυση της αλληλουχίας των ανθεκτικών S31N ιών A/California/04/2009, που προέκυψαν μετά από 10 περάσματα της ένωσης **6** και της ένωσης **12**. Η μελέτη είχε ως στόχο να ελεγχθούν ποια αμινοξέα αλλάζουν στους ανθεκτικούς ιούς και προκαλούν την ανθεκτικότητα (απώλεια δράσης) και πιθανώς συμμετέχουν στη σύνδεση των ενώσεων, συγκεκριμένα αν οι μεταλλάξεις αναφέρονται σε αμινοξέα της M2TM. Όλα τα στελέχη απέτυχαν να παρουσιάσουν οποιαδήποτε μετάλλαξη στην αλληλουχία M2TM προτείνοντας έναν άλλο πιθανό στόχο των φαρμακομορίων αυτών, όπως είναι η άμεση ή έμμεση συμμετοχή της πρωτεΐνης αιματογλουτινίνης (HA) διότι βρέθηκαν μεταλλάξεις στην αλληλουχία της HA και μάλιστα τέτοιες που πιθανόν να επηρεάζουν την ευαισθησία της πρωτεΐνης HA ως προς την αλλαγή διαμόρφωσης της σε όξινο pH η οποία είναι απαραίτητη για την έξοδο του ιού από το κύτταρο.

Ως αναφέρθη και στο κεφάλαιο 2 μία από τις λειτουργίες της HA είναι, όταν ο ιός βρεθεί στα όψιμα ενδοσωμάτια το pH μειώνεται στο κυτταρόπλασμα⁷⁷ γεγονός που αλλάζει την διαμόρφωση της HA στην όξινη μορφή της οπότε και απελευθερώνεται έναν πολύ υδρόφοβο τμήμα της το οποίο συνδέεται (συντήκεται) με την κυτταροπλασματική μεμβράνη στόχο, προκαλώντας την συνένωση-σύντηξη της ιικής μεμβράνης με την μεμβράνη του ενδοσώματος.⁷⁸ Στην συνέχεια μέσω της M2 πρωτεΐνης οξινίζεται το εσωτερικό του ιού απελευθερώνοντάς το ικό γονιδίωμα στο κυτταρόπλασμα. Κατά την έξοδο του ιού από το κύτταρο η πρωτεΐνη M2 δρώντας ως διάλυλος πρωτονίων μειώνει την οξύτητα από το εσωτερικό του ενδοσωματίου επιτρέποντας στην HA να βρίσκεται στην ουδέτερη μορφή που είναι απαραίτητη για την έξοδο του ιού από το κύτταρο.

Προγενέστερη έρευνα για τον ρόλο της HA στον μηχανισμό δράσης πολυκυκλικών αμινών που είναι δραστικές έχοντας όμως περιορισμένη ικανότητα στο να δρουν μέσω φραγμού της M2 είχε γίνει από την ερευνητική ομάδα του Vazquez το 2013.⁶⁶ Από την έρευνα αυτή, ενώ είχε διαπιστωθεί η δραστικότητα των ενώσεων στο ανθεκτικό στην αμανταδίνη στέλεχος A/PR/8/34 (που φέρει τις μεταλλάξεις V27T και S31N) δεν είχε παρατηρηθεί δραστικότητα στο δραστικό στην αμανταδίνη, στέλεχος A/HK/7/87 (WT). Υπενθυμίζεται ότι για τις ενώσεις **1-13** ελέγχθηκε η αντική δράση έναντι του H1N1 A/WS/1933 (ο οποίος φέρει την μετάλλαξη S31N) βρέθηκε ότι η αμανταδίνη και οι ενώσεις **4, 5** έχουν μέτρια δραστικότητα ενώ οι υπόλοιπες έχουν πολύ χαμηλή δραστικότητα (Πίνακα 5.2). Το γεγονός ότι οι ενώσεις είναι δραστικές στον ιό S31N A/California/04/2009 αλλά όχι στον S31N A/WS/1933 υποδηλώνει ότι ο πόρος M2TM πιθανώς να μην είναι ο στόχος των δραστικών ενώσεων.

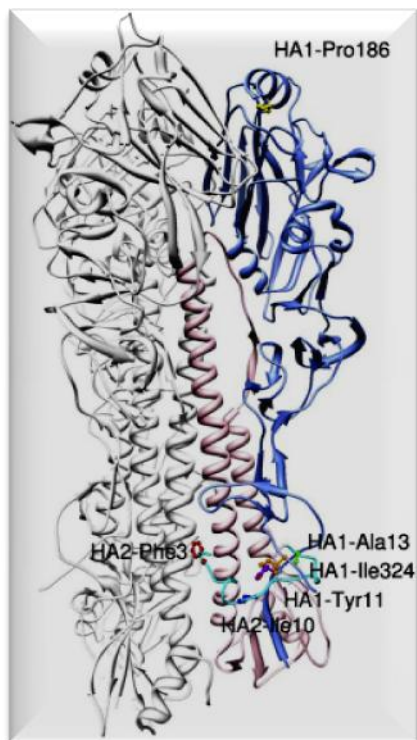
Από την μελέτη της δραστηριότητας των πολυκυκλικών αμινών των Torres et al. 2013 έναντι στελεχών A/H1N1, είτε είναι WT είτε είναι στέλεχος S31N προτάθηκε η αιματογλουτινίνη HA ως πιθανός αντικός στόχος επειδή βρέθηκαν σχετικές μεταλλάξεις επί του πεπτιδίου σύντηξης. Σύμφωνα με την έρευνα αυτή υποστηρίζεται πως οι ενώσεις μπορούν να έχουν ένα συνδυασμό δράσης. Αφενός φράζοντας τον πόρο στην M2 και αφετέρου έχοντας ανασταλτική επίδραση στην αλλαγή διαμόρφωσης της HA που είναι απαραίτητη για την σύντηξη των μεμβρανών. Προτάθηκε ότι η δραστηριότητα των ενώσεων στο ανθεκτικό στην αμανταδίνη στέλεχος A/PR/8/34 οφείλεται πιθανόν σε αύξηση του pH του ενδοσώματος επειδή είναι αμίνες οπότε αναστέλλεται η αλλαγή της HA στην όξινη της μορφή και η σύντηξη της με την μεμβράνη. Ανάλογο τρόπο δράσης με την αμανταδίνη που όμως δρα σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (100μM).

Ανθεκτικότητα του στελέχους A/PR/8/34 παρουσία των ενώσεων παρουσιάστηκε μετά από κάποια περάσματα λόγω εμφάνισης μεταλλάξεων στην αλληλουχία της HA (σχ.5.9). Μεταλλάξεις οι οποίες επιτρέπουν την αλλαγή της διαμόρφωσης της HA δηλαδή την απελευθέρωση του υδρόφοβου πεπτιδίου προς σύντηξη σε υψηλότερο pH. Το συμπέρασμα είναι πως αυτά τα νέα μεταλλαγμένα στελέχη προσαρμόζονται στην αλλαγή της HA σε αυξημένο pH.⁶⁶

Από τις 5 μεταλλάξεις που φαίνονται στο σχήμα 5.9, οι 3, **HA1-P186S**, **HA1-I324T** και **HA2-I10V** φαίνεται πως δεν σχετίζονται με δράση των ενώσεων Torres et al. και η εμφάνισή τους πιθανόν να οφείλεται σε πολυμορφικές αλλαγές του ιού.⁶⁶

Η μετάλλαξη όμως **HA2-F3L**, (Phe→Leu) που έγινε παρουσία μίας εκ των ενώσεων τους (2^ο πέραςμα) είναι μετάλλαξη που βρίσκεται στην υδρόφοβη περιοχή του πεπτιδίου σύντηξης της HA. Αντικατάσταση των Phe-3 από μικρότερες Leu μειώνει πιθανώς τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται με τα γειτονικά αμινοξέα, κάτι που μπορεί να διευκολύνει την απελευθέρωση του πεπτιδίου σύντηξης στη θέση σύνδεσής του με την κυτταροπλασματική μεμβράνη σε υψηλότερο pH, δικαιολογώντας με τον τρόπο αυτό την δραστηριότητα του ιού σε αυξημένο pH (pH =5.5).⁶⁶

Η επόμενη μετάλλαξη, **HA1-A13T**, (Ala→Thr) έγινε εμφανής παρουσία μίας από τις ενώσεις των Torres et al. 2013 (8^ο πέραςμα).⁶⁶ Σε ουδέτερο pH η Tyr11, που είναι γειτονική με την HA1-A13, αλληλεπιδρά με το πεπτίδιο σύντηξης HA2 με 2 δεσμούς υδρογόνου σταθεροποιώντας τη δομή της HA.⁷⁹ Η αλληλεπίδραση αυτή διαταράσσεται και η σταθερότητα της HA ελαττώνεται μέσω της αλλαγής της HA1-Ala13 με θρεονίνη. Η αλλαγή αυτή διαταράσσει του δεσμούς υδρογόνου της Tyr11 με το πεπτίδιο σύντηξης μειώνοντας την σταθερότητα της HA και επιτρέποντας την απελευθέρωση του πεπτιδίου σύντηξης σε υψηλότερο pH (pH =5.7).⁶⁶

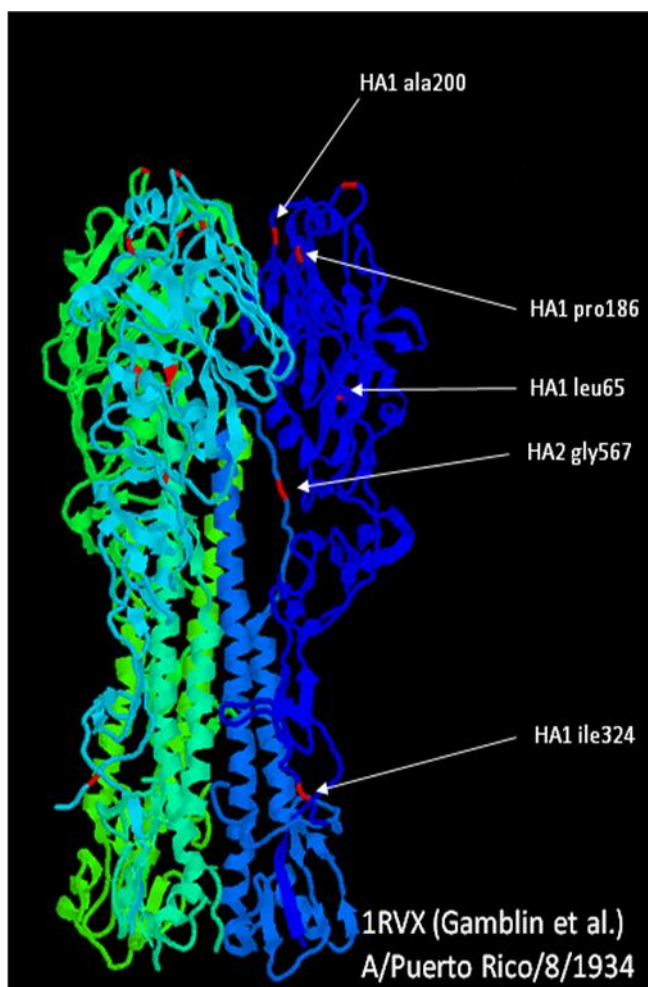


Σχήμα 5.9 Επισήμανση των παρατηρούμενων μεταλλάξεων στην HA του στελέχους A/PR/8/34.⁶⁶ Η HA1 είναι χρωματισμένη με μπλε και η HA2 είναι χρωματισμένη με ροζ. Τα άλλα δύο μονομερή είναι με χρώμα γκρι και το πεπτίδιο σύντηξης είναι χρωματισμένο κυανό. Τα σημεία μετάλλαξης επισημαίνονται ως εξής: HA1-Ala13 με πράσινο, HA1-Pro186 με κίτρινο, HA1-Ile324 με πορτοκαλί, HA2-Phe3 με κόκκινο, HA1-Tyr11 με μωβ και HA2-Ile10 με μπλε. Εκτός από την HA1-Pro186 μετάλλαξη, όλες οι άλλες βρίσκονται κοντά ή μέσα στο πεπτίδιο σύντηξης.⁶⁶

Από τα αποτελέσματα της ερευνητικής ομάδας του Vasquez φαίνεται τα νέα αυτά μεταλλαγμένα στελέχη της HA είναι ικανά να υπόκεινται σε σύντηξη σε συνθήκες υψηλότερου pH από 4.9 σε 5.7 που προκαλείται από τις ενώσεις.⁶⁶

Με σκοπό να μελετηθεί ο ρόλος της αιματογλουτίνης (HA) στον μηχανισμό δράσης (ως πιθανό αντικό στόχο των ενώσεων) πραγματοποιήθηκε ανάλυση αλληλουχίας αμινοξέων του ανθεκτικού στελέχους στην ένωση **6** για αυτήν την πρωτεΐνη. Ο ιός εμφάνισε μεταλλάξεις στην HA και μερικές από αυτές φάνηκαν να είναι σε θέση που θα μπορούσαν να επηρεάσουν την ευαισθησία της HA (σχ. 5.8) καθώς η μία (*HA2-gly567ser*) βρίσκεται πάνω στο πεπτίδιο σύντηξης του τριμερούς και οι υπόλοιπες (*HA1-ala200thr*, *HA1-leu65thr*) είναι στην σφαιρική κεφαλή.

Πιο συγκεκριμένα φαίνεται πως η **I324S** (Ile→Ser) και το **P186S** (Pro → Ser) είναι μεταλλάξεις που συμπίπτουν με την μελέτη αλληλουχίας από τους Torres et al 2013 (σχ. 5.10) αλλά αφορούν μεταλλάξεις που συμβαίνουν συχνά και δεν οφείλονται στην παρουσία ενώσεων.⁶⁶ Παρόλα αυτά η ύπαρξη των υπόλοιπων μεταλλάξεων είναι πιθανό να είναι καθοριστικής σημασίας και να προσδίδουν ανθεκτικότητα στον ιό σε αυξημένο pH σύντηξης αν και είναι στην σφαιρική κεφαλή και δεν φαίνεται να συμπίπτουν με την περιοχή μεταλλάξεων των Torres et al. που θεωρείται καθοριστικό σημείο για την διατήρηση της σταθερότητας της αιματογλουτινίνης. Προϋπόθεση βέβαια για κάτι τέτοιο είναι τα μόρια να έχουν την δυνατότητα να αλκαλοποιούν το pH του ενδοσωματίου (*endosome neutralizers*) στη δραστική συγκέντρωση ώστε να εμποδίζουν την αλλαγή της διαμόρφωσης της HA σε όξινο pH.



Σχήμα 5.10 Μελέτη αλληλουχίας στην HA και επισήμανση των παρατηρούμενων μεταβολών στο στέλεχος A/Puerto Rico/8/1934. Η HA1 είναι χρωματισμένη με μπλε και η HA2 είναι χρωματισμένη με γαλάζιο. Τα σημεία μετάλλαξης επισημαίνονται με χρώμα κόκκινο ως εξής: HA1-ala200 (Ala→Thr), HA1-pro186 (pro→Ser), HA1-leu65(Leu→Thr), HA2-gly567 (Gly→Ser) και η HA1-ile324 (Ile→Ser).

Περαιτέρω έρευνα για τον μηχανισμό δράσης των ενώσεων και για την διερεύνηση αν αποτελούν *endosome neutralizers*, έγινε ελέγχοντας την δραστικότητα της ένωσης **6** και **12** (ενδεικτικές ενώσεις με υποκατάσταση στη θέση 1- και 2- του αδαμαντανίου) έναντι του DNA ιού BPV συγκρινόμενη με την δραστικότητα των *endosome neutralizers*: **chlorpromazine, ammonium, chloroquine**, και **bafilamycin A1**, που αποτελούν καλούς αναστολείς για τον ιό αυτόν (BPV) δρώντας σε συγκεντρώσεις >100μM. Από τον πίνακα 5.5 είναι ξεκάθαρο ότι δεν υπήρχε αναστολή δράσης του ιού, κάτι που ήταν αναμενόμενο εφόσον οι ενώσεις αυτές δρουν σε αρκετά χαμηλές συγκεντρώσεις για να δρουν ως *neutralizers*. Συμπεραίνεται ότι οι ενώσεις **1-13** δεν προκαλούν αύξηση στο pH του ενδοσώματος και δεν είναι δυνατό ακόμα να εξηγηθεί η μεγάλη αυτή διαφορά δραστικότητας μεταξύ των δύο στελεχών S31N (A/California/04/2009 και A/ Wilson Smith/1933) μέσω της πρωτεΐνης HA ως στόχο δράσης των μορίων.

Πίνακας 5.5 Δραστικότητα των ενώσεων 6 και 12 έναντι του BPV ιού και σε σύγκριση με αναστολείς αυτού.

ΕΝΩΣΗ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	Μετρήσεις miniplaques
6	20μM	99
	10 μM	101
	5 μM	100
	2 μM	91
	0(έλεγχος)	88
12	20μM	132
	10 μM	135
	5 μM	117
	2 μM	121
	0(έλεγχος)	116
		EC50s
Cloropromazine	>100μM	2.5 μM
Ammonium chloride	>100μM	400 μM
Chloroquinone	>100μM	2.2 μM
Bafilamycin A1	>100μM	0.06 μM

6. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Χημεία

Τα σημεία τήξεως ελήφθησαν σε συσκευή Buchi και δεν είναι διορθωμένα. Τα φάσματα υπερύθρου ελήφθησαν σε φασματοφωτόμετρο Perkin-Elmer 833. Οι στοιχειακές αναλύσεις έγιναν στο εργαστήριο οργανολογίας του ινστιτούτου φυσικοχημείας του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Θετικών Επιστημών (ΕΚΕΘΕ) Δημόκριτος στην Αθήνα. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων είχαν μέγιστη απόκλιση $\pm 0.4\%$. Η ερμηνεία των φασμάτων Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ^1H και ^{13}C έγινε με την χρήση των φασμάτων δύο διαστάσεων 2D COSY, HMQC και οι πολλαπλότητες των φασμάτων ^{13}C βρέθηκαν από τα πειράματα DEPT.

Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

Τα φάσματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ελήφθησαν σε φασματογράφο NMR Bruker DRX 400 και AC 200. Τα φάσματα ^1H ελήφθησαν στα 400MHz και τα φάσματα ^{13}C και DEPT στα 50MHz. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3).

2-Μεθυλο-τρικυκλο[3.3.1.1^{3,7}]δεκαν-2-αμίνη (4) :

Η τριτοταγής αλκοόλη **22** λήφθηκε μετά από κατεργασία διαλύματος της 2-αδαμαντανόνης **18** σε άνυδρο THF (30% διάλυμα w/v) με διμοριακή περίσσεια μέθυλομαγνησιοιωδιδίου (που λήφθηκε από μέθυλοιωδίδιο, 1.2 μοριακή περίσσεια Mg σε 20 mL άνυδρου αιθέρα/g μεθυλοιωδιδίου) και ανάδευση για 15h; Ακολουθεί υδρόλυση του μίγματος με κορεσμένο NH_4Cl υπό ψύξη στους 0°C . Η οργανική στοιβάδα διαχωρίζεται και η υδατική εκχυλίζεται με αιθέρα. Τα συνενωμένα αιθερικά εκχυλίσματα πλένονται με νερό και κορεσμένο διάλυμα NaCl , ξηραίνονται υπεράνω Na_2SO_4 και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό οπότε λαμβάνεται η αλκοόλη **22**; Απόδοση 85% ; IR (Nujol) $\nu(\text{OH})$ 2923 cm^{-1} ; ^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 27.16-27.5 ($5',7'-\text{C}$), 27.4 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 33.1 ($8',10'-\text{C}$), 35.2 ($4',9'-\text{C}$), 38.4 ($1',3'-\text{C}$), 39.3 ($6'-\text{C}$), 74.0 ($2'-\text{C}$).

Στο αναδευόμενο μίγμα NaN_3 (0.187g, 2.88 mmol) και άνυδρο διχλωρομεθάνιο (5 mL) στους 0°C , προστίθεται TFA (1.09g, 9.6mmol). Στην συνέχεια, στο αναδευόμενο μίγμα προστίθεται ένα διάλυμα της τριτοταγούς αλκοόλης **22** (0.160g, 0.96mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (5mL) και η ανάδευση διατηρείται στους 0°C για 4 ώρες. Το μίγμα αναδύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 24 ώρες και στη συνέχεια κατεργάζεται με 12% NH_3 (30 mL) 0°C . Η οργανική φάση διαχωρίζεται και η υδατική εκχυλίζεται δύο φορές με ίσο όγκο διχλωρομεθανίου. Οι συνενωμένες οργανικές φάσεις πλένονται με νερό και άλμη και ξηραίνονται (Na_2SO_4), εξατμίζεται ο διαλύτης οπότε παραλαμβάνεται το ελαιώδες αζίδιο **29**. IR (Nujol) $\nu(\text{N}_3)$ 2913 cm^{-1} ; Απόδοση 0.161g (88%).

Σε αναδευόμενο εναιώρημα LiAlH_4 (0.127g, 3.35mmol) σε άνυδρο αιθέρα (10 mL) προστίθεται στάγδην στους 0°C , διάλυμα του αζιδίου **29** (0.160g, 0.84mmol) σε άνυδρο αιθέρα (5 mL). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται υπό βρασμό για 5 ώρες (παρακολουθήση με TLC) και στη συνέχεια υδρολύεται με νερό και NaOH (15%) υπό ψύξη με πάγο. Το ανόργανο ίζημα διηθείται και πλένεται με αιθέρα και το διήθημα εκχυλίζεται με HCl (6%). Η αλκαλική στιβάδα αλκαλοποιείται με στερεό Na_2CO_3 και το μίγμα εκχυλίζεται με αιθέρα. Τα συνενωμένα εκχυλίσματα αιθέρα πλένονται με νερό και άλμη και ξηραίνονται (Na_2SO_4). Μετά την εξάτμιση του διαλύτη λαμβάνεται η ελαιώδης αμίνη **4**; IR (Nujol) $\nu(\text{NH}_2)$ 2925cm^{-1} ;

Απόδοση 117mg (85%) ; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 1.17 (br s, 3H, CH_3), 1.46-1.48 (d, J 9Hz 2H, 4'eq, 9'eq-H), 1.54 (d, J 12Hz, 2H, 8'eq, 10'eq -H), 1.63 (br m, 3H, 1',3'6'-H), 1.76 (br s, 2H, 5',7'-H), 1.93 (d, J ~ 12 Hz, 2H, 8'ax, 10'ax-H), 2.01 (d, J ~ 12 Hz, 2H, 4'ax, 9'ax-H);

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ (ppm) 27.3 (7'-C), 27.7 (5'-C), 27.9 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 33.2 (4',9'-C), 34.7 (8',10'-C), 38.9(6'-C), 39.6 (1',3'-C), 52.9 (2'-C). Υδροχλωρικό άλας: σ.τ > 250°C ($\text{EtOH-Et}_2\text{O}$);

Αναλ. ($\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{NCl}$) C, H, N.

% Υπολ.	C: 65.49	H: 9.99	N: 6.94
---------	----------	---------	---------

% Ευρ.	C: 65.05	H: 10.21	N: 7.05
--------	----------	----------	---------

2-Αιθυλο-τρικυκλο[3.3.1.1^{3,7}]δεκαν-2-αμίνη (5) :

Η τριτοταγής αλκοόλη ελήφθη μετά από προσθήκη στάγδην διαλύματος 2-αδαμαντανόνης **18** σε άνυδρο THF (30% διάλυμα w/v) σε διάλυμα n-αιθυλολιθίου (25mL, 0.5M σε βενζόλιο) στους 0°C (τριμοριακή περίσσεια). Το μίγμα αναδεύεται για 15 ώρες. Ακολουθεί υδρόλυση του μίγματος με κορεσμένο NH_4Cl υπό ψύξη στους 0°C . Η οργανική στοιβάδα εξατμίζεται υπό κενό και το υπόλειμμα διαλύεται σε αιθέρα. Η οργανική φάση εκχυλίζεται με νερό και άλμη. Τα συνενωμένα αιθερικά εκχυλίσματα πλένονται με νερό και κορεσμένο διάλυμα NaCl , ξηραίνονται υπεράνω Na_2SO_4 και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό οπότε λαμβάνεται η αλκοόλη **23**; Απόδοση : 94%; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 0.86 (t, J ~ 7 Hz, CH_2CH_3), 1.40-1.70 (m, 10 H, 1',3'-H, 4'eq, 9'eq-H, 6'-H, 8'eq,10'eq-H, CH_2CH_3), 1.75-1.83 (m, 2H, 5',7'-H), 1.94 (d, J ~ 12 Hz, 2H, 8'ax, 10'ax-H), 2.07 (d, J ~ 12 Hz, 2H, 4'ax, 9'ax-H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 6.4 (CH_2CH_3), 27.4, 27.5 (5',7'-C), 30.6 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_3$), 33.0 (8',10'-C), 34.6 (4',9'-C), 36.6 (1',3'-C), 38.5 (6'-C), 74.9 (2'-C).

Σε αναδευόμενο μίγμα NaN_3 (0.195g, 3.0 mmol) και άνυδρου διχλωρομεθανίου (5 mL) στους 0°C , προστίθεται TFA (1.14g, 10.0mmol). Στην συνέχεια, στο αναδευόμενο μίγμα προστίθεται ένα διάλυμα της τριτοταγούς αλκοόλης **23**(0.180g, 1.0mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (5mL) και η ανάδευση διατηρείται στους 0°C για 4 ώρες. Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 24 ώρες και στην συνέχεια υποβάλλεται σε κατεργασία με 12% NH_3 (30 mL) 0°C . Η οργανική φάση διαχωρίζεται και η υδατική εκχυλίζεται δύο φορές με ίσο όγκο διχλωρομεθανίου. Οι συνενωμένες οργανικές φάσεις πλένονται με νερό και άλμη, ξηραίνονται (Na_2SO_4) και εξατμίζεται ο διαλύτης οπότε λαμβάνεται το ελαιώδες αζίδιο **30**. IR (Nujol) $\nu(\text{N}_3)$ 2100 cm^{-1} ; Απόδοση 0.160g (80%).

Σε αναδευόμενο εναιώρημα LiAlH_4 (0.120g, 3.12mmol) σε άνυδρο αιθέρα (10 mL) προστίθεται, στάγδην στους 0°C , διάλυμα του αζιδίου **30** (0.160g, 0.78mmol) σε άνυδρο αιθέρα (5 mL). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται υπό βρασμό για 5 ώρες (παρακολούθηση με TLC) και στη συνέχεια υδρολύεται με νερό και NaOH (15%) υπό ψύξη με πάγο. Το ανόργανο ίζημα διηθείται και πλένεται με αιθέρα και το διήθημα εκχυλίζεται με HCl (6%). Η αλκαλική στιβάδα αλκαλοποιείται με στερεό Na_2CO_3 και το μίγμα εκχυλίζεται με αιθέρα. Τα συνενωμένα εκχυλίσματα αιθέρα πλένονται με νερό και άλμη και ξηραίνονται (Na_2SO_4). Μετά την εξάτμιση του διαλύτη ελήφθη η ελαιώδης αμίνη (**5**) ; Απόδοση 100mg (71%) ; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 0.85 (t, $J \sim 7\text{ Hz}$, 3H, CH_3), 1.55 (br s, 2H, 1',3'-H), 1.58-1.68 (m, 6H, 4'eq, 9'eq-H, 8'eq 6'-H), 1.78 (br s, 1H, 5'-H), 1.81 (br s, 1H, 7'-H), 1.93 (d, $J \sim 12\text{ Hz}$, 2H, 8'ax, 10'ax-H), 2.06 (d, $J \sim 12\text{ Hz}$, 2H, 4'ax, 9'ax-H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 6.5 (CH_2CH_3), 27.2, 27.6 (5',7'-C), 30.7 (CH_2CH_3), 33.0 (4',9'-C), 33.8 (8',10'-C), 36.6 (1',3'-C), 38.5 (6'-C), 74.9 (2'-C). Υδροχλωρικό άλας: σ.τ > 250°C ($\text{EtOH-Et}_2\text{O}$);

Αναλ. ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{NCl}$) C, H, N.

% Υπολ.	C: 66.80	H: 10.28	N: 6.49
% Ευρ.	C: 66.93	H: 10.42	N: 6.87

2-n-Προπυλο- τρικυκλο[3.3.1.1^{3,7}]δεκαν-2-αμίνη (6) :

Η τριτοταγής αλκοόλη **19** λήφθηκε μετά από προσθήκη στάγδην διαλύματος 2-αδαμαντανόνης **18** σε άνυδρο THF (30% διάλυμα w/v) σε εναιώρημα $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2\text{MgBr}$ σε άνυδρο αιθέρα σε αναλογία 1:2 (που λήφθηκε από αλλυλομαγνησιοβρωμίδιο, 1.05 μοριακή περίσσεια Mg σε 10mL άνυδρου αιθέρα/g αλλυλοβρωμιδίου); Ακολουθεί υδρόλυση του μίγματος με κορεσμένο NH_4Cl υπό ψύξη στους 0°C . Η οργανική στοιβάδα διαχωρίζεται και η υδατική εκχυλίζεται με αιθέρα. Τα συνενωμένα οργανικά εκχυλίσματα πλένονται με νερό και κορεσμένο διάλυμα NaCl , ξηραίνονται υπεράνω Na_2SO_4 και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό οπότε λαμβάνεται η αλκοόλη **19**; Απόδοση 89%: δ 1.52 (d, $J \sim 12$ Hz, 2H, 4'eq, 9'eq-H), 1.53-1.90 (m, 10H, αδαμαντανίου-H), 2.15 (d, $J \sim 12$ Hz, 1H, 4'ax, 9'ax-H), 2.40 (d, $J \sim 6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.05-5.15 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.75-6.0 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$); Η ακόρεστη αλκοόλη (**17**)(300mg, 1.56mmol) υπεβλήθη σε υδρογόνωση με καταλύτη PtO_2 (15mg) (χρησιμοποιήθηκε το 1/20 του βάρους της ακόρεστης αλκοόλης) οπότε ελήφθη η 2-n-πρόπυλο-αδαμαντανάλκοόλη **20**; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 0.92 (t, $J \sim 7$ Hz, 3H, CH_3), 1.30-1.40 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.52 (d, $J \sim 12$ Hz, 2H, 4'eq, 9'eq-H), 1.58-1.61 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.68 (d, $J \sim 12$ Hz, 2H, 8'eq, 10'eq-H), 1.67 (~ br s, 2H, 6'-H), 1.68 (~ br s, 2H, 1', 3'-H), 1.79 (m, 2H, 5', 7'-H), 1.83 (d, $J \sim 12$ Hz, 2H, 8'ax, 10'ax-H), 2.16 (d, $J \sim 12$ Hz, 2H, 4'ax, 9'ax-H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 14.9 (CH_3), 15.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 27.4, 27.6 (5', 7'-C), 33.1 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) 34.7 (4', 9'-C), 37.1 (8', 10'-C), 38.5 (1', 3'-C), 40.9 (6'-C), 75.2 (2'-C).

Στο αναδευόμενο μίγμα NaN_3 (0.640g, 9.83 mmol) και άνυδρο διχλωρομεθάνιο (20mL) στους 0°C , προστίθεται TFA (3.7g, 32.7mmol). Στην συνέχεια, στο αναδευόμενο μίγμα προστίθεται ένα διάλυμα της τριτοταγούς αλκοόλης **20** (0.636g, 3.27mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (10mL) και η ανάδευση διατηρείται στους 0°C για 4 ώρες. Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 24 ώρες και στην συνέχεια υποβάλλεται σε κατεργασία με 12% NH_3 (30 mL) 0°C . Η οργανική φάση διαχωρίζεται και η υδατική εκχυλίζεται δύο φορές με ίσο όγκο διχλωρομεθανίου. Οι συνενωμένες οργανικές φάσεις πλένονται με νερό και άλμη ξηραίνονται (Na_2SO_4) και εξατμίζεται ο διαλύτης οπότε

λαμβάνεται το ελαιώδες αζίδιο **21**; Απόδοση 0.490g (77%): ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 0.96 (t, $J \sim 7$ Hz, 3H, CH_3), 1.42 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.59 (d, $J \sim 12$ Hz, 2H, 4'eq, 9'eq-H), 1.68 – 2.03 (m, 12H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, adamantane-H), 2.10 (d, $J \sim 12$ Hz, 1H, 4'ax, 9'ax-H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 14.7 (CH_3), 16.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 27.2, 27.4 (5', 7'-C), 33.8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) 34.4 (4', 9'-C), 37.9 (8', 10'-C), 38.5 (1', 3'-C), 40.0 (6'-C), 69.7 (2'-C).

Σε αναδευόμενο εναιώρημα LiAlH_4 (0.390g, 10.3mmol) σε άνυδρο αιθέρα (20 mL) προστίθεται, στάγδην στους 0°C , διάλυμα του αζιδίου **21** (0.490g, 2.57mmol) σε άνυδρο αιθέρα (10 mL). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται υπό βρασμό για 5 ώρες (παρακολουθήση με TLC) και στη συνέχεια υδρολύεται με νερό και NaOH (15%) υπό ψύξη με πάγο. Το ανόργανο ίζημα διηθείται και πλένεται με αιθέρα και το διήθημα εκχυλίζεται με HCl (6%). Η αλκαλική σιβάδα αλκαλοποιείται με στερεό Na_2CO_3 και το μίγμα εκχυλίζεται με αιθέρα. Τα συνενωμένα εκχυλίσματα αιθέρα πλένονται με νερό και άλμη και ξηραίνονται (Na_2SO_4). Μετά την εξάτμιση του διαλύτη ελήφθη η ελαιώδης αμίνη **6**; Απόδοση 350mg (74%) ; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 0.92 (t, $J \sim 7$ Hz, 3H, CH_3), 1.29-1.40 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.52 (d, $J \sim 12$ Hz, 2H, 4'eq, 9'eq-H), 1.58-1.61 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.67 (d, $J \sim 12$ Hz, 2H, 8'eq, 10'eq-H), 1.66 (~ br s, 2H, 6'-H), 1.68 (~ br s, 2H, 1', 3'-H), 1.78 (br s, 2H, 5', 7'-H), 1.83 (d, $J \sim 12$ Hz, 2H, 8'ax, 10'ax-H), 2.16 (d, $J \sim 12$ Hz, 1H, 4'ax, 9'ax-H); Υδροχλωρικό άλας ;στ > 250°C ($\text{EtOH-Et}_2\text{O}$);

Αναλ.. ($\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{NCl}$) C, H.

% Υπολ.	C: 67.95	H: 10.53	N: 6.10
---------	----------	----------	---------

% Ευρ.	C: 68.02	H: 10.63	N: 5.95
--------	----------	----------	---------

2-n-Βουτυλο-τρικυκλο[3.3.1.1^{3,7}]δεκαν-2-αμίνη (7) :

Η τριτοταγής αλκοόλη **24** ελήφθη μετά από προσθήκη στάγδην διαλύματος 2-αδαμαντανόνης **18** σε άνυδρο THF (30% διάλυμα w/v) σε διάλυμα n-βουτυλολιθίου (19mL, 1.6M σε εξάνιο) στους 0°C (σε τριμοριακή περίσσεια). Το μίγμα αναδεύεται για 15 ώρες. Ακολουθεί υδρόλυση του μίγματος με κορεσμένο NH_4Cl υπό ψύξη στους 0°C . Η οργανική σιβάδα διαχωρίζεται και η υδατική εκχυλίζεται με αιθέρα. Τα συνενωμένα αιθερικά εκχυλίσματα πλένονται με νερό και κορεσμένο διάλυμα NaCl , ξηραίνονται υπεράνω Na_2SO_4 και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό οπότε λαμβάνεται η αλκοόλη **24**; Απόδοση 96%; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 0.91 (t, $J \sim 7$ Hz, 3H, CH_3), 1.25-1.38 (m, 4H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.54 (d, $J \sim 12$ Hz, 2H, 4'eq, 9'eq-H), 1.58-1.72 (m, 8H, 1',3',5',7',8'eq,10'eq-H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.78-1.90 (m, 4H, 8'ax,10'ax-H, 5',7'-H), 2.16 (d, $J \sim 12$ Hz, 1H, 4'ax, 9'ax-H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 14.3 (CH_3), 23.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 24.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 27.4, 27.6 (5',7'-C), 34.7 (4',9'-C), 33.1 (8',10'-C), 37.1 (1',3'-C), 38.2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 38.5 (6'-C), 75.2 (2'-C).

Στο αναδευόμενο μίγμα NaN_3 (4.32 mmol) και ξηρό διχλωρομεθάνιο (20 mL) στους 0°C , προστίθεται TFA (14.4mmol). Στην συνέχεια, στο αναδευόμενο μίγμα προστίθεται ένα διάλυμα της τριτοταγούς αλκοόλης **24** (1.44mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (10 mL) και η ανάδευση διατηρείται στους 0°C για 4 ώρες. Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 24 ώρες και στην συνέχεια υποβάλλεται σε κατεργασία με 12% NH_3 (30 mL) 0°C . Η οργανική φάση διαχωρίζεται και η υδατική εκχυλίζεται δύο φορές με ίσο όγκο διχλωρομεθανίου. Οι συνενωμένες οργανικές φάσεις πλένονται με νερό και άλμη ξηραίνονται (Na_2SO_4) και εξατμίζεται ο διαλύτης οπότε λαμβάνεται το ελαιώδες αζίδιο **31**; Απόδοση (96%); IR (Nujol) $\nu(\text{N}_3)$ 2088 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 0.96 (t, $J \sim 7$ Hz, 3H, CH_3), 1.32-1.42 (m, 4H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.62 (d, $J \sim 12$ Hz, 2H, 4'eq, 9'eq-H), 1.70-1.93 (m, 12H, αδαμαντανίου-H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.14 (d, $J \sim 12$ Hz, 2H, 4'ax, 9'ax-H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 14.2 (CH_3), 23.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 24.9 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 27.2, 27.4 (5',7'-C), 33.8 (4',9'-C), 33.7 (8',10'-C), 34.4 (1',3'-C), 35.2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 38.5 (6'-C), 69.7 (2'-C).

Σε αναδευόμενο εναιώρημα LiAlH_4 (0.163g, 4.29mmol) σε άνυδρο αιθέρα (15 mL) προστίθεται, στάγδην στους 0°C , διάλυμα του αζιδίου **31** (0.250g, 1.07mmol) σε άνυδρο αιθέρα (10 mL). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται υπό βρασμό για 5 ώρες (παρακολούθηση με TLC) και στη συνέχεια υδρολύεται με νερό και NaOH (15%) υπό ψύξη με πάγο. Το ανόργανο ίζημα διηθείται και πλένεται με αιθέρα και το διήθημα εκχυλίζεται με HCl (6%). Η αλκαλική σιβάδα αλκαλοποιείται με στερεό Na_2CO_3 και το μίγμα εκχυλίζεται με αιθέρα. Τα συνενωμένα εκχυλίσματα αιθέρα πλένονται με νερό και άλμη και ξηραίνονται (Na_2SO_4). Μετά την εξάτμιση του διαλύτη ελήφθη η ελαιώδης αμίνη **7**; Απόδοση 50mg (23%); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 0.88 (t, $J \sim 7$ Hz, 3H, CH_3), 1.18-1.32 (m, 4H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.45-1.65 (m, 10H, αδαμαντανίου-H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.77 (br s, 2H, 5',7'-H), 1.93 (d, $J \sim 12$ Hz, 2H, 8'ax, 10'ax-H), 2.03 (d, $J \sim 12$ Hz, 2H, 4'ax, 9'ax-H), 2.13 (~ br s, 2H, NH_2); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 14.3 (CH_3), 23.7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 24.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 27.5, 27.8 (5',7'-C), 34.1 (4',9'-C), 33.2 (8',10'-C), 37.5 (1',3'-C), 38.6 (6'-C), 39.1 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 54.5 (2'-C). Φουμαρικό άλας ; σ.τ : 220°C ($\text{EtOH-Et}_2\text{O}$);

Αναλ.. ($\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{NO}_4$) C, H, N.

% Υπολ.	C: 66.84	H: 9.04	N: 4.33
---------	----------	---------	---------

% Ευρ.	C: 66.86	H: 9.26	N: 4.32
--------	----------	---------	---------

2-Ισοβουτυλοτρικυκλο[3.3.1.1^{3,7}]δεκαν-2-αμίνη (8) :

Η τριτοταγής αλκοόλη **25** ελήφθη μετά από προσθήκη στάγδην διαλύματος 2-αδαμαντανόνης **18** σε άνυδρο THF (30% διάλυμα w/v) σε διάλυμα ι-βουτυλολιθίου (30mL, 1.6M σε εξάνιο) στους 0°C (τριμοριακή περίσσεια). Το μίγμα αναδεύεται για 15 ώρες. Ακολουθεί υδρόλυση του μίγματος με κορεσμένο NH₄Cl υπό ψύξη στους 0°C. Η οργανική στοιβάδα διαχωρίζεται και η υδατική εκχυλίζεται με αιθέρα. Τα συνενωμένα αιθερικά εκχυλίσματα πλένονται με νερό και κορεσμένο διάλυμα NaCl, ξηραίνονται υπεράνω Na₂SO₄ και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό οπότε λαμβάνεται η αλκοόλη **25**; Απόδοση 85%; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 0.96 (d, *J* ~ 7 Hz, 6H, 2 x CH₃), 1.52 (d, *J* ~ 12 Hz, 2H, 4'eq, 9'eq-H), 1.57 (d, *J* ~ 6 Hz, 2H, CH₂CHMe₂), 1.66 (1',3',6'-H), 1.68-1.74 (m, 2H, 8'eq,10'eq-H), 1.78 (br s, 2H, 5',7'-H), 1.76-1.87 (m, 1H, CH₂CHMe₂), 1.82 (d, *J* ~ 12 Hz, 2H, 8'ax,10'ax-H), 2.16 (d, *J* ~ 12 Hz, 2H, 4'ax,9'ax-H); ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 23.2 (2 x CH₃), 25.3 (CH₂CHMe₂), 27.5 (5',7'-C), 35.1 (4',9'-C),33.1 (8',10'-C), 37.6 (1',3'-C),38.5 (6'-C), 46.5 (CH₂CHMe₂), 75.9 (2'-C).

Το αντίστοιχο αζίδιο **32** ελήφθη με την ίδια διαδικασία όπως και παραπάνω για το αζίδιο **31** χρησιμοποιώντας CH₂Cl₂/NaN₃/TFA; Απόδοση 95%; IR (Nujol) ν(N₃) 2095 cm⁻¹; ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) 23.4 (2 x CH₃), 24.5(CH₂CHMe₂), 27.3 (5',7'-C), 33.9 (4',9'-C), 33.6 (8',10'-C), 34.7 (1',3'-C), 38.5 (6'-C), 43.0 (CH₂CHMe₂), 69.7 (2'-C).

Η ελαιώδης αμίνη **8** παρασκευάστηκε μέσω αναγωγής με LiAlH₄ σε αιθέρα υπό βρασμό για 5 ώρες ακολουθώντας την ίδια πορεία με την αμίνη **7**; Απόδοση 65%; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 0.94 (d, *J* ~ 7 Hz, 6H, 2 x CH₃), 1.49 (d, *J* ~ 6 Hz, 2H, CH₂CHMe₂), 1.52-1.65 (m, 2H, 1',3',6',4'eq,9'eq-H), 1.73-1.83 (m, 1H, CH₂CHMe₂), 1.75 (br s, 2H, 5',7'-H), 1.95 (d, *J* ~ 12 Hz, 2H, 8'ax, 10'ax-H), 2.05 (d, *J* ~ 12 Hz, 2H, 4'ax, 9'ax-H); ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 23.4 (2 x CH₃), 25.7 (CH₂CHMe₂), 27.6 (5',7'-C), 34.3 (4',9'-C), 33.1 (8',10'-C), 38.0 (1',3'-C), 39.1 (6'-C), 47.4 (CH₂CHMe₂), 55.4 (2'-C). Φουμαρικό άλας; σ.τ 225°C (EtOH-Et₂O);

Αναλ. (C₁₈H₂₉NO₄) C, H, N.

% Υπολ.	C: 66.84	H: 9.04	N: 4.33
---------	----------	---------	---------

% Ευρ.	C: 66.91	H: 9.30	N: 4.29
--------	----------	---------	---------

2-n-Εξυλο-τρικυκλο[3.3.1.1^{3,7}]δεκαν-2-αμίνη (9) :

Η τριτοταγής αλκοόλη **26** ελήφθη μετά από προσθήκη στάγδην διαλύματος 2-αδαμαντανόνης **18** σε άνυδρο THF (30% διάλυμα w/v) σε διάλυμα n-εξανολιθίου(12mL, 2.47M σε εξάνιο) στους 0°C (τριμοριακή περίσσεια). Το μίγμα αναδεύεται για 12 ώρες. Ακολουθεί υδρόλυση του μίγματος με κορεσμένο NH₄Cl υπό ψύξη στους 0°C. Η οργανική στοιβάδα διαχωρίζεται και η υδατική εκχυλίζεται με αιθέρα. Τα συνενωμένα αιθερικά εκχυλίσματα πλένονται με νερό και κορεσμένο διάλυμα NaCl, ξηραίνονται υπεράνω Na₂SO₄ και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό οπότε λαμβάνεται η αλκοόλη **26**; Απόδοση 97% ;IR (Nujol) ν(OH) 3391 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 0.87 (t, J ~ 7 Hz, 3H, CH₃), 1.24-1.33 (m, 8H, CH₂(CH₂)₄CH₃), 1.51-154 (d, J ~ 12 Hz, 2H, 4'eq, 9'eq-H), 1.60-1.64(m, 2H CH₂(CH₂)₄CH₃) 1.66-1.69 (m, 6H, 1',3',6', 5',7'-H), 1.78-1.81(d, J ~ 11 Hz, 2H, 8'ax, 10'ax-H), 2.14-2.17 (d, J ~ 12 Hz, 2H, 4'ax, 9'ax-H);¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 14.2 ((CH₂)₅CH₃), 22.14 ((CH₂)₄CH₂CH₃), 22.7 ((CH₂)₃CH₂CH₂CH₃), 27.4-27.6(5',7'-C), 30.1 (CH₂CH₂CH₂(CH₂)₂CH₃), 32.0 (CH₂CH₂(CH₂)₃CH₃), 33.1 (4',9'-C), 34.7 (8',10'-C), 37.1 (1',3'-C), 38.4 (CH₂(CH₂)₄CH₃), 38.5 (6'-C), (), 75.1 (2'-C).

Το αντίστοιχο αζίδιο **33** ελήφθη με την ίδια διαδικασία όπως και παραπάνω για το αζίδιο **31** χρησιμοποιώντας CH₂Cl₂/NaN₃/TFA; Απόδοση 91%; IR (Nujol) ν(N₃) 2088 cm⁻¹; ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 14.2 ((CH₂)₅CH₃), 22.6 ((CH₂)₄CH₂CH₃), 22.7 ((CH₂)₃CH₂CH₂CH₃), 27.2-27.4(5',7'-C), 29.9 (CH₂CH₂CH₂(CH₂)₂CH₃), 31.9 (CH₂CH₂(CH₂)₃CH₃), 33.7 (4',9'-C), 33.8 (8',10'-C), 34.4 (1',3'-C), 35.4 (CH₂(CH₂)₄CH₃), 38.5 (6'-C), 69.7 (2'-C).

Η ελαιώδης αμίνη **9** παρασκευάστηκε μέσω αναγωγής του αζιδίου **33** (0.400g, 1.53mmol) με LiAlH₄ (0.233g , 6.13mmol) σε αιθέρα υπό βρασμό για 5 ώρες ακολουθώντας την ίδια πορεία με την αμίνη **34**; Απόδοση: 0.050g (14%) ; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 0.87 (t, J ~ 7 Hz, 3H, CH₃), 1.24-1.30 (m, 4H, CH₂(CH₂)₄CH₃), 1.51-156 (m, 4H, 4'eq, 9'eq-H, CH₂(CH₂)₄CH₃), 1.57-1.67 (m, 6H, 1',3',6',8'eq,10'eq-H), 1.79 (br s, 2H, 5',7'-H), 1.93 (d, J ~ 12 Hz, 2H, 8'ax, 10'ax-H), 2.04 (d, J ~ 12 Hz, 2H, 4'ax, 9'ax-H);¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 14.2 ((CH₂)₅CH₃), 22.3 ((CH₂)₄CH₂CH₃), 22.8 ((CH₂)₃CH₂CH₂CH₃), 27.4-27.8(5',7'-C), 30.3 (CH₂CH₂CH₂(CH₂)₂CH₃), 32.0 (CH₂CH₂(CH₂)₃CH₃), 33.1 (4',9'-C), 34.1 (8',10'-C), 37.4 (1',3'-C), 38.8(CH₂(CH₂)₄CH₃), 39.1 (6'-C), 54.6 (2'-C). Φουμαρικό άλας; σ.τ 225° C (EtOH-Et₂O);

Αναλ. (C₁₈H₂₉NO₄) C, H, N.

% Υπολ.	C: 66.64	H: 9.51	N: 3.89
---------	----------	---------	---------

% Ευρ.	C: 66.59	H: 9.84	N: 4.12
--------	----------	---------	---------

2-Φαινυλοτρικυκλο[3.3.1.1^{3,7}]δεκαν-2-αμίνη (10) :

Η τριτοταγής αλκοόλη **27** ελήφθη μετά από προσθήκη στάγδην διαλύματος της 2-αδαμαντανόνης **18** σε άνυδρο THF (30% διάλυμα w/v) σε εναιώρημα φαινυλομαγνησιοβρωμιδίου σε άνυδρο αιθέρα (που λήφθηκε από βρωμοβενζόλιο, 1.5 μοριακή περίσσεια Mg σε 20 mL αιθέρα/g βρωμοβενζολίου) σε διμοριακή περίσσεια και ανάδευση όλη νύχτα; Ακολουθεί υδρόλυση του μίγματος με κορεσμένο NH₄Cl υπό ψύξη στους 0°C. Η οργανική στοιβάδα διαχωρίζεται και η υδατική εκχυλίζεται με αιθέρα. Τα συνενωμένα αιθερικά εκχυλίσματα πλένονται με νερό και κορεσμένο διάλυμα NaCl, ξηραίνονται υπεράνω Na₂SO₄ και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό οπότε λαμβάνεται η αλκοόλη **27**; Απόδοση 95% ; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.67-1.77 (m, 8H, αδαμαντανίου-H), 1.89 (br s, 2H, 5',7'-H), 2.14 (s, 1H, OH), 2.40 (d, *J* ~ 12 Hz, 1H, 4'ax, 9'ax-H), 2.56 (br s, 2H, 1',3'-H), 7.20-7.60 (m, 5H, φαινυλίου-H); ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 27.0, 27.5 (5',7'-C), 33.1 (4',9'-C), 34.9 (8',10'-C), 35.7 (1',3'-C), 37.8 (6'-C), 75.8 (2'-C), 125.5, 127.1, 127.2, 128.8, 143.0 (C₆H₅).

Το αντίστοιχο αζίδιο **34** ελήφθη με την ίδια διαδικασία όπως και παραπάνω για το αζίδιο **31** χρησιμοποιώντας CH₂Cl₂/NaN₃/TFA; Απόδοση 95% ; IR (Nujol) ν(N₃) 2098 cm⁻¹; ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 26.8, 27.4 (5',7'-C), 33.1 (4',9'-C), 33.4 (8',10'-C), 34.1 (1',3'-C), 37.7 (6'-C), 70.3 (2'-C), 125.6, 127.3, 127.8, 128.9, 140.3 (Ph).

Η ελαιώδης αμίνη **10** παρασκευάστηκε μέσω αναγωγής με LiAlH₄ σε αιθέρα υπό βρασμό για 5 ώρες ακολουθώντας την ίδια πορεία με την αμίνη **9**; Απόδοση 55%; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.53 (br s, 2H, 6'-H), 1.61-1.80 (m, 6H, αδαμαντανίου-H), 1.90 (br s, 2H, 5',7'-H), 2.33 (d, *J* ~ 12 Hz, 1H, 4'ax, 9'ax-H), 2.45 (br s, 2H, 1',3'-H), 7.18-7.25 (m, 5H φαινυλίου-H); ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 27.2, 27.6 (5',7'-C), 32.9 (4',9'-C), 34.6 (8',10'-C), 35.8 (1',3'-C), 38.2 (6'-C), 57.8 (2'-C), 125.2, 126.2, 128.8, 148.7 (C₆H₅). Υδροχλωρικό άλας; σ.τ > 265°C (EtOH-Et₂O);

Αναλ.(C₁₆H₂₂NCl) C, H, N

% Υπολ.	C: 72.85	H: 8.41	N: 5.31
---------	----------	---------	---------

% Ευρ.	C: 72.81	H: 8.63	N: 5.29
--------	----------	---------	---------

2-Βενζυλο-τρικυκλο[3.3.1.1^{3,7}]δεκαν-2-αμίνη (11) :

Η τριτοταγής αλκοόλη **28** ελήφθη μετά από προσθήκη στάγδην διαλύματος της 2-αδαμαντανόνης **18** σε άνυδρο THF (30% διάλυμα w/v) σε εναιώρημα βενζυλομαγνησιοβρωμιδίου σε άνυδρο αιθέρα (που λήφθηκε από βρωμοβενζόλιο, 1.5 μοριακή περίσσεια Mg σε 20 mL αιθέρα/g βρωμοβενζολίου) σε διμοριακή περίσσεια και ανάδευση όλη νύχτα; Ακολουθεί υδρόλυση του μίγματος με κορεσμένο NH₄Cl υπό ψύξη στους 0°C. Η οργανική στοιβάδα διαχωρίζεται και η υδατική εκχυλίζεται με αιθέρα. Τα συνενωμένα αιθερικά εκχυλίσματα πλένονται με νερό και κορεσμένο διάλυμα NaCl, ξηραίνονται υπεράνω Na₂SO₄ και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό οπότε λαμβάνεται η αλκοόλη **28**; Απόδοση 95%; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.51 (d, *J* ~ 12 Hz, 2H, 4'eq, 9'eq-H), 1.65 (br s, 1H, 6'-H), 1.69 (br s, 1H, 5',7'-H), 1.77 (d, *J* ~ 12 Hz, 2H, 8'eq, 10'eq-H), 1.78 (br s, 1H, 3'-H), 1.90 (br s, 1H, 1'-H), 2.07 (d, *J* ~ 12 Hz, 1H, 8'ax, 10'ax-H), 2.12 (d, *J* ~ 12 Hz, 1H, 4'ax, 9'ax-H), 2.97 (s, 2H, CH₂Ph), 7.10-7.32 (m, 5H, C₆H₅); ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 27.4, 27.5 (5',7'-C), 33.1 (4',9'-C), 34.7 (8',10'-C), 36.9 (1',3'-C), 38.5 (6'-C), 43.9 (CH₂Ph), 74.7 (2'-C), 126.5, 128.3, 130.7, 137.4 (C₆H₅).

Το αντίστοιχο αζίδιο **35** ελήφθη με την ίδια διαδικασία όπως και παραπάνω για το αζίδιο **31** χρησιμοποιώντας CH₂Cl₂/NaN₃/TFA; Απόδοση 50%; IR (Nujol) ν(N₃) 2096 cm⁻¹; ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 27.1, 27.4 (5',7'-C), 33.7 (4',9'-C), 33.8 (8',10'-C), 34.1 (1',3'-C), 38.4 (6'-C), 41.4 (CH₂Ph), 69.8 (2'-C), 126.7, 128.2, 130.3, 136.6 (C₆H₅).

Η ελαιώδης αμίνη **11** παρασκευάστηκε μέσω αναγωγής με LiAlH₄ σε άνυδρο αιθέρα υπό βρασμό για 5 ώρες ακολουθώντας την ίδια πορεία με την αμίνη **10**; Απόδοση 45%; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.61 (d, *J* ~ 12 Hz, 2H, 4'eq, 9'eq-H), 1.61 (br s, 1H, 6'-H), 1.73 (br s, 1H, 5',7'-H), 1.78 (d, *J* ~ 12 Hz, 2H, 8'eq, 10'eq-H), 1.87 (br s, 1H, 3'-H), 1.97 (br s, 1H, 1'-H), 2.09 (d, *J* ~ 12 Hz, 1H, 8'ax, 10'ax-H), 2.29 (d, *J* ~ 12 Hz, 1H, 4'ax, 9'ax-H), 2.97 (s, 2H, CH₂Ph), 7.10-7.32 (m, 5H, C₆H₅); ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 27.6, 27.8 (5',7'-C), 33.2 (4',9'-C), 34.3 (8',10'-C), 37.3 (1',3'-C), 39.2 (6'-C), 44.2 (CH₂Ph), 55.1 (2'-C), 126.3, 128.1, 130.7, 138.4 (C₆H₅). Φουμαρικό άλας ; σ.τ 205°C (EtOH-Et₂O);

Αναλ. (C₂₁H₂₇NO₄) C, H, N

% Υπολ.	C: 70.56	H: 7.61	N: 3.92
---------	----------	---------	---------

% Ευρ.	C: 70.99	H: 8.36	N: 3.89
--------	----------	---------	---------

1-(1-Αδαμαντυλ)κυκλοπενταναμίνη (12)

Η αντίστοιχη κυκλοπεντανόλη **36** παρασκευάστηκε από την προσθήκη στάγδην διαλύματος 1-αδαμαντανοκαρβοξυλικοαιθυλεστέρα **36** σε άνυδρο THF σε εναιώρημα 1,4-δισ(βρωμομαγνησιοβουτανίου) σε άνυδρο THF (που λήφθηκε από δισβρωμοβουτάνιο, 2.3 μοριακή περίσσεια Mg σε 10 mL THF/g δισβρωμοβουτανίου) σε 1.1 μοριακή περίσσεια σύμφωνα με δημοσιευμένη μέθοδο⁴⁵ και ανάδευση όλη νύχτα; Ακολουθεί υδρόλυση του μίγματος με κορεσμένο NH₄Cl υπό ψύξη στους 0°C. Η οργανική στοιβάδα διαχωρίζεται και η υδατική εκχυλίζεται με αιθέρα. Τα συνενωμένα αιθερικά εκχυλίσματα πλένονται με νερό και κορεσμένο διάλυμα NaCl, ξηραίνονται υπεράνω Na₂SO₄ και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό οπότε λαμβάνεται η αλκοόλη **37**; Απόδοση 70%) ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.30-1.40 (m, 2H, κυκλοπεντανικά-H), 1.50-1.80 (m, 18H, αδαμαντανικά-H, κυκλοπεντανικά-H), 1.98 (br s, 3H, 3',5',7'-H), 2.16 (s, 1H, OH); ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 24.2 (3,4-κυκλοπεντανικοί-C), 28.6 (3',5',7'-C), 33.8 (2,5-κυκλοπεντανικοί -C), 37.1 (4',6',10'-C), 37.3 (2',8',9'-C), 39.5 (1'-C), 87.6 (1-κυκλοπεντανικοί -C).

Στο αναδευόμενο μίγμα NaN₃ (0.270g, 4.08 mmol) και άνυδρο διχλωρομεθάνιο (40mL) στους 0° C, προστίθεται TFA (13.6mmol). Στην συνέχεια, στο αναδευόμενο μίγμα προστίθεται ένα διάλυμα της τριτοταγούς αλκοόλης **37** (0.300g, 1.36mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (20mL) και η ανάδευση διατηρείται στους 0° C για 4 ώρες. Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 24 ώρες και στην συνέχεια υποβάλλεται σε κατεργασία με 12% NH₃ (30mL) 0° C. Η οργανική φάση διαχωρίζεται και η υδατική εκχυλίζεται δύο φορές με ίσο όγκο διχλωρομεθανίου. Οι συνενωμένες οργανικές φάσεις πλένονται με νερό και άλμη ξηραίνονται (Na₂SO₄) και εξατμίζεται ο διαλύτης οπότε λαμβάνεται το ελαιώδες αζίδιο **38**. Απόδοση 0.290g (90%); IR (Nujol) ν(N₃) 2097 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.50-1.80 (m, 20H, αδαμαντανικά-H, κυκλοπεντανικά-H), 1.99 (br s, 3H, 3',5',7'-H); ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 24.2 (3,4-κυκλοπεντανικοί -C), 28.6 (3',5',7'-C), 30.7 (2,5-κυκλοπεντανικοί -C), 37.1 (4',6',10'-C), 36.7 (2',8',9'-C), 41.8 (1'-C), 81.2 (1-κυκλοπεντανικοί -C).

Σε αναδευόμενο εναιώρημα LiAlH₄ (161mg, 4.24mmol) σε άνυδρο αιθέρα (20mL) προστίθεται, στάγδην στους 0° C, διάλυμα του αζιδίου **38** (260mg, 0,425mmol) σε ξηρό αιθέρα (10mL). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται υπό βρασμό για 5 ώρες (παρακολούθηση με TLC) και στη συνέχεια υδρολύεται με νερό και NaOH (15%) υπό ψύξη με πάγο. Το ανόργανο ίζημα διηθείται και πλένεται με αιθέρα και το διήθημα εκχυλίζεται με HCl (6%). Η αλκαλική σιβάδα αλκαλοποιείται με στερεό Na₂CO₃ και το μίγμα εκχυλίζεται με αιθέρα. Τα συνενωμένα εκχυλίσματα αιθέρα πλένονται με νερό και άλμη και ξηραίνονται (Na₂SO₄). Μετά την εξάτμιση του διαλύτη ελήφθη η ελαιώδης αμίνη **12**;

Απόδοση 151mg (56%); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 1.08-1.18 (m, 4H, 3,4-κυκλοπεντανικά-H), 1.50-1.80 (m, 18H, αδαμαντανικά-H, κυκλοπεντανικά-H, NH_2), 1.98 (br s, 3H, 3',5',7'-H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 24.9 (3,4-κυκλοπεντανικοί-C), 28.8 (3',5',7'-C), 34.4 (2,5-κυκλοπεντανικοί-C), 37.0 (4',6',10'-C), 37.4 (2',8',9'-C), 39.0 (1'-C), 66.8 (1-κυκλοπεντανικοί-C). Φουμαρικό άλας: σ.τ : 255°C (EtOH-Et₂O);

Αναλ. ($\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{NO}_4$) C, H, N.

% Υπολ. C: 68.03 H: 8.71 N: 4.18

% Ευρ. C: 67.99 H: 8.93 N: 4.21

1-(1-Αδαμαντυλ)κυκλοεξαναμίνη (13)

Η τριτοταγής αλκοόλη **40** ελήφθη από την προσθήκη στάγδην της κυκλοεξανόνης σε άνυδρο THF σε διάλυμα 1-αδαμαντυλολιθίου σε άνυδρο αιθέρα (που σχηματίζεται από το 1-βρωμοαδαμαντάνιο **39**, πενταμοριακή περίσσεια λιθίου σε 5mL άνυδρου αιθέρα/g βρωμοαδαμαντανίου με την επίδραση υπερήχων) σε διμοριακή περίσσεια και σύμφωνα με δημοσιευμένη πορεία⁵⁹ και ανάδευση για 5 ώρες; Ακολουθεί υδρόλυση του μίγματος με νερό υπό ψύξη στους 0°C. Η οργανική στοιβάδα διαχωρίζεται και η υδατική εκχυλίζεται με αιθέρα. Τα συνενωμένα αιθερικά εκχυλίσματα πλένονται με νερό και κορεσμένο διάλυμα NaCl, ξηραίνονται υπεράνω Na_2SO_4 και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό οπότε λαμβάνεται η αλκοόλη **40**; Απόδοση 70%).

Στο αναδευόμενο μίγμα NaN_3 (0.179g, 2.61 mmol) και άνυδρο διχλωρομεθάνιο (20mL) στους 0°C, προστίθεται TFA (8.70mmol). Στην συνέχεια, στο αναδευόμενο μίγμα προστίθεται ένα διάλυμα της τριτοταγούς αλκοόλης (0.204g, 0.87mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (10mL) και η ανάδευση διατηρείται στους 0°C για 4 ώρες. Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 24 ώρες και στην συνέχεια υποβάλλεται σε κατεργασία με 12% NH_3 (30mL) 0°C. Η οργανική φάση διαχωρίζεται και η υδατική εκχυλίζεται δύο φορές με ίσο όγκο διχλωρομεθανίου. Οι συνενωμένες οργανικές φάσεις πλένονται με νερό και άλμη ξηραίνονται (Na_2SO_4) και εξατμίζεται ο διαλύτης οπότε παραλαμβάνεται το ελαιώδες αζίδιο **41**. Απόδοση 0.140g (60%); IR (Nujol) $\nu(\text{N}_3)$ 2101 cm^{-1} ; ^{13}C NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 21.9 (4-κυκλοεξανικοί-C), 25.6 (3,5-κυκλοεξανικοί-C), 28.8 (3',5',7'-C), 30.8 (2,6-κυκλοεξανικοί-C), 35.7 (4',6',10'-C), 37.2 (2',8',9'-C), 42.0 (1'-C), 70.1 (1-κυκλοεξανικοί-C).

Σε αναδευόμενο εναιώρημα LiAlH_4 (65mg, 1.70mmol) σε ξηρό αιθέρα (7mL) προστίθεται, στάγδην στους 0°C, διάλυμα του αζιδίου **41** (110mg, 0.425mmol) σε άνυδρο αιθέρα (5mL). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται υπό βρασμό για 5 ώρες (παρακολούθηση με TLC) και στη συνέχεια υδρολύεται με νερό και NaOH (15%) υπό ψύξη με πάγο. Το ανόργανο ίζημα διηθείται και πλένεται με αιθέρα και το διήθημα εκχυλίζεται με HCl (6%). Η αλκαλική στιβάδα αλκαλοποιείται με στερεό Na_2CO_3 και το μίγμα εκχυλίζεται με αιθέρα. Τα συνενωμένα εκχυλίσματα αιθέρα πλένονται με νερό και άλμη

και ξηραίνονται (Na_2SO_4). Μετά την εξάτμιση του διαλύτη ελήφθη η ελαιώδης αμίνη **13**; Απόδοση 50mg (48%); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 1.35-1.42 (m, 6H, 3,4,5- κυκλοεξανικά-H), 1.48-1.55 (m, 3H, 2',8',9'-H), 1.56-1.70 (m, 12H, 2,6- κυκλοεξανικά-H, 4',6',10'-H, NH_2), 1.98 (br s, 3H, 3',5',7'-H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 22.1 (4- κυκλοεξανικοί-C), 26.4 (3,5-κυκλοεξανικοί-C), 29.0 (3',5',7'-C), 30.5 (2,6-κυκλοεξανικοί-C), 35.7 (4',6',10'-C), 37.5 (2',8',9'-C), 38.7 (1'-C), 54.5 (1- κυκλοεξανικοί-C). Φουμαρικό άλας: σ.τ 264°C (MeOH-Et₂O);

Αναλ. ($\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{NO}_4$) C, H, N.

% Υπολ.	C: 68.37	H: 9.35	N: 4.19
% Ευρ.	C: 68.74	H: 8.94	N: 4.01

ΣΥΝΟΨΗ

Ο ιός της γρίπης φέρει πλέον τη μετάλλαξη A/M2TM/S31N και είναι ανθεκτικός στην αμανταδίνη και τη ριμανταδίνη καταργώντας τα φάρμακα αυτά από την κλινική χρήση.

Εάν η αντικατάσταση του αμινοξέος Ser31 M2TM με το μεγάλο σε όγκο αμινοξύ Asp μεγαλώνει τη διάμετρο του πόρου του τετραμερούς M2TM στο σημείο πρόσδεσης του φαρμάκου, όπως προτείνεται από μελέτες Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού υγρής φάσης, μεγαλύτεροι προσδέτες από την αμανταδίνη, ριμανταδίνη μπορεί να είναι αποτελεσματικοί αναστολείς του ιού influenza A/S31N. Κάποιες αρχικές προσπάθειες με μεγαλύτερα μόρια δεν ήταν πετυχημένες. Τα τελευταία 2 χρόνια αναφέρθηκαν αμινοαδαμαντανικά παράγωγα ως δραστικοί αναστολείς. Ένα σύνολο αμινοαδαμαντανικών παραγώγων με σταδιακή αύξηση του όγκου της ανθρακικής αλυσίδας συντέθηκε με σκοπό η βιολογική δράση να δώσει πληροφορία για την αλληλεπίδραση τους με τον διευρυμένο πόρο του ιοντικού διαύλου της S31N M2TM.

Για τη σύνθεση των τριτοταγών αδαμανταμινών **4-11**, πραγματοποιήθηκε η παρασκευή των αντίστοιχων αλκοολών με οργανολιθιακό αντιδραστήριο ή αντιδραστήριο Grignard. Ακολούθησε η σύνθεση των αντίστοιχων αζιδίων με προσθήκη NaN_3/TFA 1M/DCM ή DCE. Η χρήση διαλύτη χαμηλότερης διηλεκτρικής σταθεράς οδήγησε σε μίγμα αζιδίου και πρώτης ύλης αλκοόλης. Οι τελικές αμίνες ελήφθησαν από τα αζίδια με αναγωγή με LiAlH_4 σε διαλύτη αιθέρα υπό βρασμό.

Για τη σύνθεση της αμίνης **12** εφαρμόστηκε μία παλαιότερα δημοσιευμένη μέθοδος που βασίζεται στην αντίδραση του 1-αδαμαντανοκαρβοξυλικού αιθυλεστέρα με το 1,4-δισ(βρωμομαγνησιοβουτάνιο) προς παραλαβή της αντίστοιχης τριτοταγής κυκλοπεντανόλης που μετατρέπεται στην αντίστοιχη κυκλοπενταμίνη μέσω μετατροπής σε αζίδιο με NaN_3/TFA 1M/ CH_2Cl_2 το οποίο με αναγωγή (LiAlH_4 /αιθέρα/βρασμός) οδηγεί στην αμίνη **12**.

Για την παρασκευή της πρόδρομης αλκοόλης της αμίνης **13** πραγματοποιήθηκε αντίδραση του 1-αδαμαντανολιθίου με την κυκλοεξανόνη. Η αντίδραση με NaN_3/TFA 1M/ CH_2Cl_2 οδηγεί στο ενδιάμεσο αζίδιο το οποίο με αναγωγή (LiAlH_4 /αιθέρα/βρασμός) οδηγεί στην αμίνη **13**.

Οι ενώσεις **4-11** ανήκουν στην κατηγορία των 2-ακυλο-2-αμινοαδαμανταμινών, που φέρουν υποκατάσταση στον C2 άνθρακα του αδαμαντανίου. Οι ενώσεις **12, 13** είναι ογκώδη καρβοκυκλικά ανάλογα ριμανταδίνης που φέρουν υποκατάσταση στον C1 άνθρακα του αδαμαντανίου.

Στην εργασία αυτή αξιολογήθηκε η βιολογική δράση των ενώσεων **1-13** για τα ανθεκτικά στελέχη που φέρουν μετάλλαξη S31N αλλά και έναντι στελεχών WT. Υποκατάσταση του αδαμαντανίου με μικρά σε μέγεθος αλκύλια κοντά στην αμινομάδα φαίνεται να οδηγεί σε δραστικά παράγωγα κατά του WT, αλλά όχι για το μεταλλαγμένο στέλεχος (π.χ 2-μεθυλο-2-αμινοαδαμαντάνιο **4**), ενώ ελαφρώς μεγαλύτερα αλκύλια δίνουν ενώσεις αποτελεσματικές έναντι και των δύο στελεχών. Συγκεκριμένα, τα μόρια **5-13** είναι δραστικά στα στελέχη που φέρουν την μετάλλαξη S31N H1N1 A/California/04/2009 και H1N1 A/Puerto Rico /8/1934 (η δεύτερη εκ των περιπτώσεων φέρει διπλή μετάλλαξη στην αλληλουχία της M2 πρωτεΐνης V27T και S31N). Δραστικότητα παρατηρήθηκε και για του ιούς WT που δε φέρουν μετάλλαξη στον πόρο, H2N2 A2/Taiwan/1/64 , H3N2 A/Victoria/3/75.

α) Ο φραγμός της M2TM 22-61 (S31N) από αντιπροσωπευτικές ενώσεις επιβεβαιώθηκε χρησιμοποιώντας δοκιμασίες δέσμησης πρωτονίων με πρωτεολιποσωμάτια. β) Φάσματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού στερεάς κατάστασης (ssNMR) δείχνουν ότι υπάρχει σύνδεση των μορίων από τις αλλαγές στις χημικές μετατοπίσεις αμινοξέων του πόρου S31N M2TM (22-46). γ) Πολύ σημαντικό είναι ότι η ανθεκτικότητα του ιού S31N H1N1 στο μόριο **6** περιορίστηκε δραματικά σε σύγκριση με τη γρήγορη ανάπτυξη ανθεκτικότητας στην αμανταδίνη στον WT του στελέχους H3N2. δ) Σε αντίθεση με τα παραπάνω έρχονται τα αποτελέσματα των ηλεκτροφυσιολογικών μελετών με ολόκληρη την πρωτεΐνη M2 που δείχνουν πως τα μόρια δεν δρουν με φραγμό του πόρου της M2. ε) Επιπλέον έλεγχος στην αλληλουχία των αμινοξέων στον πόρο του στελέχους S31N H1N1(2009) που γίνεται ανθεκτικό στην δραστική ένωση **6** (μετά από 12 περάσματα) δεν εμφάνισε μεταλλάξεις στην M2 αλλά στην αιματογλουτινίνη HA, κάτι που ίσως να μας παραπέμπει σε έναν άλλον μηχανισμό δράσης. στ) Τέλος, για το στέλεχος A/Wilson Smith/1933(H1N1) που φέρει S31N στην αλληλουχία του, ότι οι ενώσεις δεν είναι δραστικές. Παρόλα αυτά η εμφάνιση δραστικότητας των ενώσεων αυτών στο γενετικά τροποποιημένο N31S του αντίστοιχου στελέχους προτείνει ότι ο διάυλος M2TM της M2 είναι ο στόχος των μορίων.

Τελικά, τα περισσότερα μόρια βρέθηκαν να έχουν δράση κατά των WT ιών αλλά και των S31N ανθεκτικών στελεχών PR/8/34 και A/California/07/2009 σε συνδυασμό με μικρή ανθεκτικότητα του ιού χωρίς όμως να έχει κατανοηθεί πλήρως ο μηχανισμός δράσης του.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Choppin P.W. *The gene structure and replication of influenza virus*. *Ann. Rev. Biochem.*, **52**, 467-506, (1983).
2. Lamp R.A. *The gene and proteins of influenza viruses*. In *"The influenza Viruses"*, R. M.Krug, ed., Plenum Publishing Corp., N.Y., (1989).
3. Mandel G.L.; Douglas R.G.; and Bennett J.E. *Principles and Practice of Infectious Diseases, 3rd ed.*, John Wiley & sons, New York, N.Y., (1990).
4. Hay A. J.; Wolstenholme A. J.; Skehel J. J.; Smith, M. H. The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *EMBO J.*, **4**, 3021–3024, (1985).
5. Lakadamyali M.; Rust M. J.; Babcock H. P.; Zhuang X. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 9280–9285 (2003).
6. Van-Tam J.; Sellwood C.;. *Introduction to Pandemic Influenza*. Oxfordshire, UK: CABI, 18-21 (2010).
7. Wright P. F.; Webster R. G., *Orthomyxoviruses, in Fields Virology 4th edn.*, Knipe, D.M., and Howley, P. M. (Eds.), Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia (USA), 1533,(2001).
8. Bouvier N. M.; Palese P. *The biology of influenza viruses*. *P.Vaccine*, **26S**, D49-D53, (2008).
9. Taubenberger JK.; Reid A.H.; Krafft AE.; Bijwaard KE.; Fanning TG. *Initial Genetic Characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus*. *Science*, **275**, 1793-96, (1997).
10. Taubenberger JK.; Reid A.H.; Fanning TG. *The 1918 influenza Virus: A Killer Comes Into View*. *Virology*, **274**, 241-245 (2000).
11. Cox P.J. ; Subarao K. *Influenza*. *Lancet*, **354**, 1277 (1999).
12. Simonsen L.; Schonberger L.B.; Stroup D.F.; Arden N.H. and Cox N.J. The impact of influenza on mortality in USA. In: L. B. Brown, A. W. Hampson, R. G. Webster, eds. *Options for the control of the influenza III*. Amsterdam: Elsevier Science BV, 26-33, (1996).
13. *Influenza (Seasonal)*, World Health Organization, Fact sheet N°211, April 2009. Retrieved 13 February 2010.
14. Ετήσια Έκθεση Επιδημιολογικής Επιτήρησης της Γρίπης για την περίοδο 2012-2013. ΚΕΕΛΠΝΟ(Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων), 1-10, Αθήνα, (2013).
15. *Seasonal influenza 2012/13 in Europe (EU/EEA countries)*. February 2013 European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC Stockholm, (2013).

16. Gubareva L.; Okomo-Adhiambo M.; Deyde V.; Fry AM.; Sheu TG.; Garten R.; Smith C.; Barnes J.; Myrick A.; Hillman M.; Shaw M.; Bridges C.; Klimov A.; Cox N. *Drug Susceptibility of Swine-Origin Influenza A (H1N1) Viruses. Influenza Div, National Center for Infectious and Respiratory Diseases. Coordinating Center for Infectious Diseases, CDC, 58, 1-3 (2009).*
17. Palese P. *Influenza: old and new strains. Nature Med. 10, S82-S87, (2004).*
18. Neumann G.; Noda T.; Kawaoka Y. *Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. Nature, 459, 931-939, (2009).*
19. Reid A. H.; Taubenberger J.K. *The 1918 Spanish influenza: integrating history and biology. Microbes Infect., 3, 81, (2001).*
20. Johnson N. P.; Mueller J. *Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic. Bull. Hist. Med., 76, 105, (2002).*
21. Kilbourne, E. D., *Influenza Pandemics of the 20th Century. Emerging Infect. Dis., 12, 9, (2006).*
22. *Εβδομαδιαία Έκθεση Επιδημιολογικής Επιτήρησης της Γρίπης 26 Μαΐου 2010. ΚΕΕΛΠΝΟ (2010).*
23. *Εβδομαδιαία Έκθεση Επιδημιολογικής Επιτήρησης της Γρίπης Εβδομάδα 5/2013 (28/1/2013-2/2/2013).*
24. Butler D. Urgent search for flu source. *Nature 496, 145-146, (2013).*
25. Das, K. *Antivirals Targeting Influenza A Virus. J. Med. Chem., 55, 6263–6277, (2012).*
26. Chowell G.; Bertozzi S. M.; Colchoner A.; López-Gatell H.; Alpuche-Aranda C.; Hernández M.; Miller M. A. Severe respiratory disease concurrent with the circulation of H1N1 influenza. *N. Engl. J. Med., 361, 674, (2009).*
27. Lamb R. A.; Zebedee S. L.; Richardson C. D. Influenza virus M2 protein is an integral membrane protein expresses on the infected-cell surface. *Cell, 40, 627-633, (1985).*
28. Sakaguchi T.; Leser G.P.; Lamp R.A. The ion channel activity of the influenza virus M2 protein affects transport through the Golgi apparatus. *Cell Bio, 133, 733-747, (1996).*
29. Sansom M. S.; Kerr I. D. *Influenza virus M2 protein: a molecular modeling study of the ion channel. Protein Eng., 6, 65-74 (1993).*
30. Bright R.A.; Medina M.J.; Xu X.; Perez-Oronoz G.; Wallis T.R.; Davis X.M.; Povinelli L.; Cox N.J.; Klimov A.I. *Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. Lancet. 366, 1175-1181, (2005).*

31. Simonsen L.; Viboud C.; Grenfell B.T.; Dushoff J.; Jennings L.; Smit M.; Macken C.; Hatta M.; Gog J.; Miller M.A.; Holmes E.C. *The Genesis and Spread of Reassortment Human Influenza A/H3N2 Viruses Conferring Adamantane Resistance. Molecular biology and evolution.* **24**, 1811-1820 (2007).
32. Furuse Y.; Suzuki A.; Shimizu M.; Kishi M.; Sawayama R.; Saito M.; Fuji N.; Nukiwa N.; Oshitani H. *Reassortment between amantadine-resistant and -sensitive H1N1 influenza A viruses generated an amantadine-sensitive virus during the 2007-2008 season. The Journal of infectious diseases.* **200**, 1766-1773 (2009).
33. Garten R. J.; Davis C. T.; Russell C. A.; Shu B.; Lindstrom S.; Balish, A.; Deyde. *Antigenic and Genetic Characteristics Influenza Viruses Circulating in Humans. Science,* **325**, 197-201 (2009).
34. M.Zhou et al. *Preliminary Report: Epidemiology of the Avian Influenza A (H7N9) Outbreak in China. The New England journal of medicine,* 1-11 (2013).
35. *Report 8-data in WHO/HO. Number of confirmed human cases of avian influenza A (H7N9) reported to WHO. (May 2013).*
36. Wang C.; Lamb R. A.; Pinto L. H. *Activation of the M2 ion channel of influenza virus: a role for the transmembrane domain histidine residue. Biophys. J.,* **69**, 1363–1371,(1995).
37. Tang Y.; Zaitseva F.; Lamb R. A.; Pinto L. H. *Membrane transport structure function and biogenesis. J. Biol. Chem.,* **277**, 39880–39886, (2002).
38. Chizhnikov I. V.; Geraghty F. M.; Ogden D. C.; Hayhurst A.; Antoniou M.; Hay A. J.; *Selective proton permeability and pH regulation of the influenza virus M2 channel expressed in mouse erythrocyte cells. J Physiol.,* **494** (Pt 2), 329-336 (1996).
39. Wang C.; Takeuchi K.; . Pinto L. H; Lamb R. A.; *Ion channel activity of influenza A virus M2 protein: characterization of the amantadine block. J Virol.,* **67**, 5585-5594 (1993).
40. Hayden F. G.; *Clinical applications of antiviral agents for chemoprophylaxis and therapy of respiratory viral infections. Antiviral Res., Suppl 1,* 229-239 (1985).
41. Stouffer A.L.; Acharya R.; Salom D.; Levine A. S. Di Costanzo L.; Soto C. S.; Tereshko V.; Nanda V.; Stayrook S.; DeGrado W. F. *Structural basis for the function and inhibition of an influenza virus proton channel. Nature,* **451**, 596-599, (2008).
42. Hayden F. G.; Sperber S. J.; Belshe R. B.; Clover R. D.; Hay A. J.; Pyke S. *Recovery of drug-resistant influenza A virus during therapeutic use of rimantadine. Antimicrob. Agents Chemother.,* **35**, 1741-1747 (1991).
43. Balannik V.; Carnevale V.; Fiorin G.; Levine B. G.; Lamb R. A.; Klein M. L.; Degrado W. F.; Pinto L. H.; *Functional studies and modeling of pore-lining residue mutants of the influenza a virus M2 ion channel. Biochemistry,* **49**, 696-708 (2010).
44. Cady S. D.; Schmidt-Rohr K.; Wang J.; Soto C. S.; Degrado W. F.; Hong M. *Structure of the amantadine binding site of influenza M2 proton channels in lipid bilayers. Nature,* **463**, 689-692 (2010).

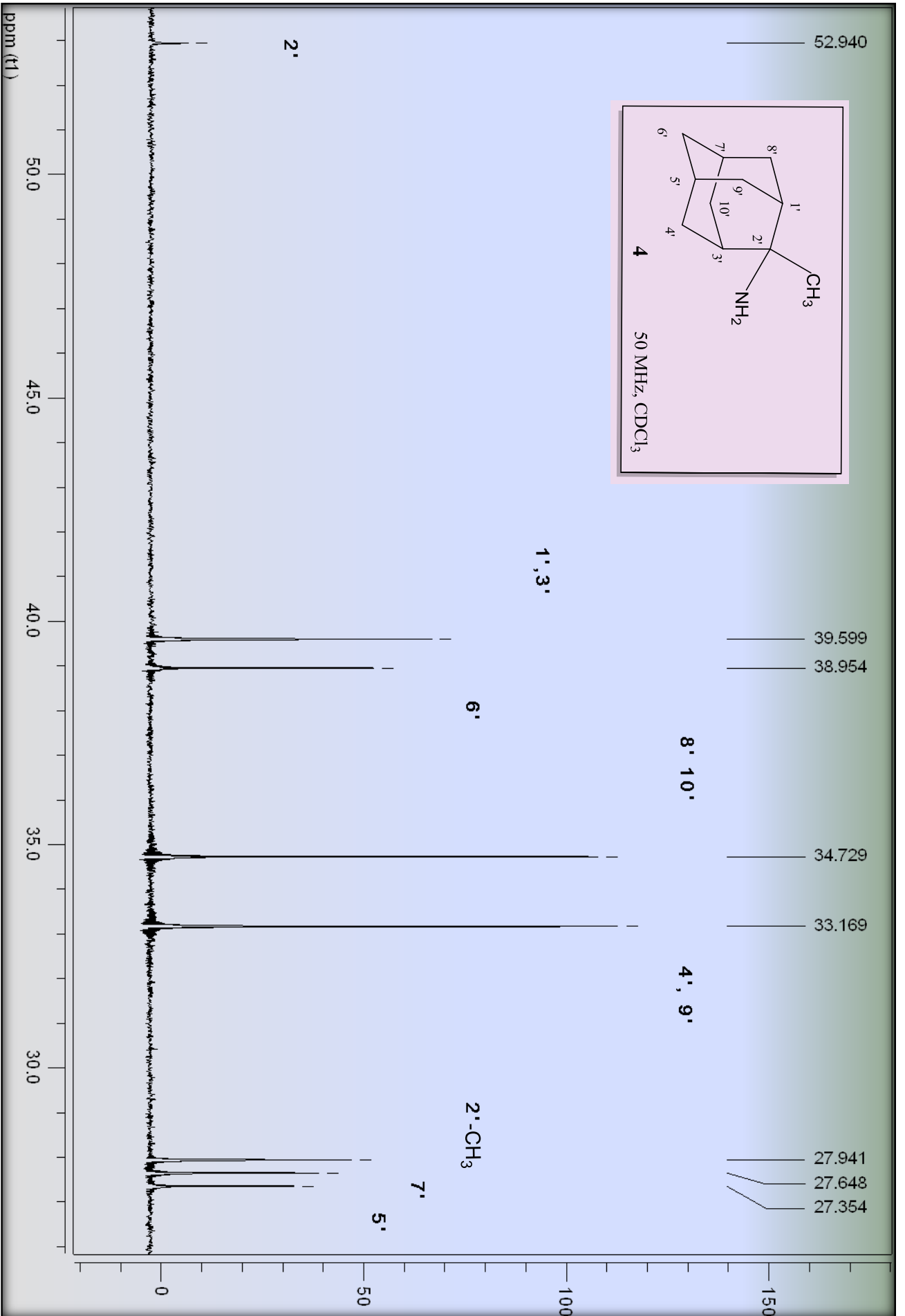
45. Pielak R. M.; Oxenoid K. Chou J. J. *Structural investigation of rimantadine inhibition of the AM2-BM2 chimera channel of influenza viruses. Structure*, **19**, 1655–1663 (2011).
46. Cady S. D.; Wang J.; Wu Y.; DeGrado W. F.; Hong M. *Specific binding of adamantane drugs and direction of their polar amines in the pore of the influenza M2 transmembrane domain in lipid bilayers and dodecylphosphocholine micelles determined by NMR spectroscopy. J Am. Chem. Soc.*, **133**, 4274–4284 (2011).
47. Hay A.J. *The action of adamantanamines against influenza A viruses: inhibition of the M2 ion channel protein. Semin.Virol.* **3**, 21-30, (1992).
48. Wang J.; Ma C.; Wang Ju.; Jo H.; Canturk B.; Fiorin G.; Pinto L. H.; Lamb R. A.; Klein M. L. and DeGrado W. F. *Discovery of Novel Dual Inhibitors of the Wild-Type and the Most Prevalent Drug-Resistant Mutant, S31N, of the M2 Proton Channel from Influenza A Virus. J.Med.Chem.*, **56**, 2804-2812, (2013).
49. Pielak R.M.; Schnell J.R.; Chou J.J. *Mechanism of drug inhibition and drug resistance of influenza A M2 channel. PNAS*, **106**, 7379-7384, (2009).
50. Duque M.D.; Torres E.; Valverde E.; Barniol M.; Guardiola S.; Rey M.; Vasquez S. *Inhibitors of the M2 channel of influenza A virus. Recent Advances in Pharmaceutical Sciences.* **661**, 35-64 (2011).
51. Fytas G.; Stamatiou G., Foscolos G. B., Kolocouris A., Kolocouris N., Witvrouw M., Pannecouque C., De Clercq E. *Bioorg. Med. Chem.*, **7**, 1887, (1997).
52. Kolocouris N.; Foscolos G. B.; Kolocouris A.; Marakos P.; Pouli N.; Fytas G.; Ikeda S.; De Clercq E. *Synthesis and antiviral activity evaluation of some aminoadamantane derivatives. J. Med. Chem.*, **37**, 2896-2902 (1994).
53. Zoidis G.; Kolocouris N.; Foscolos G. B.; Kolocouri, A.; Fytas G.; Karayannis P.; Padalko E.; Neyts J.; De Clercq E. *Antiviral Chem. Chemother.*, **14**, 153,(2003).
54. Wang J.; Ma C.; Balannik V.; Pinto L. H.; Lamb R. A.; DeGrado W. F. *Exploring the requirements for the hydrophobic scaffold and polar amine in inhibitors of M2 from influenza A virus. ACS Med. Chem. Lett.*, **2**, 307,(2011).
55. Wang J.; Ma C.; Fiorin G.; Carnevale V.; Wang T.; Hu F.; Lamp R. A.; Pinto L. H.; Hong M.; Klein M. L.; DeGrado W. F. *Molecular Dynamics Simulation Directed Rational Design of Inhibitors Targeting Drug-Resistant Mutants of Influenza A Virus M2 J. Am. Chem. Soc.*, **133**,12834–12841, (2011).
56. Van H. R.; Smit A.; Kralt T.; Peers A. *Synthesis and antiviral activities of adamantane spiro compounds, J. Med. Chem.*, **15**, 132, (1972).

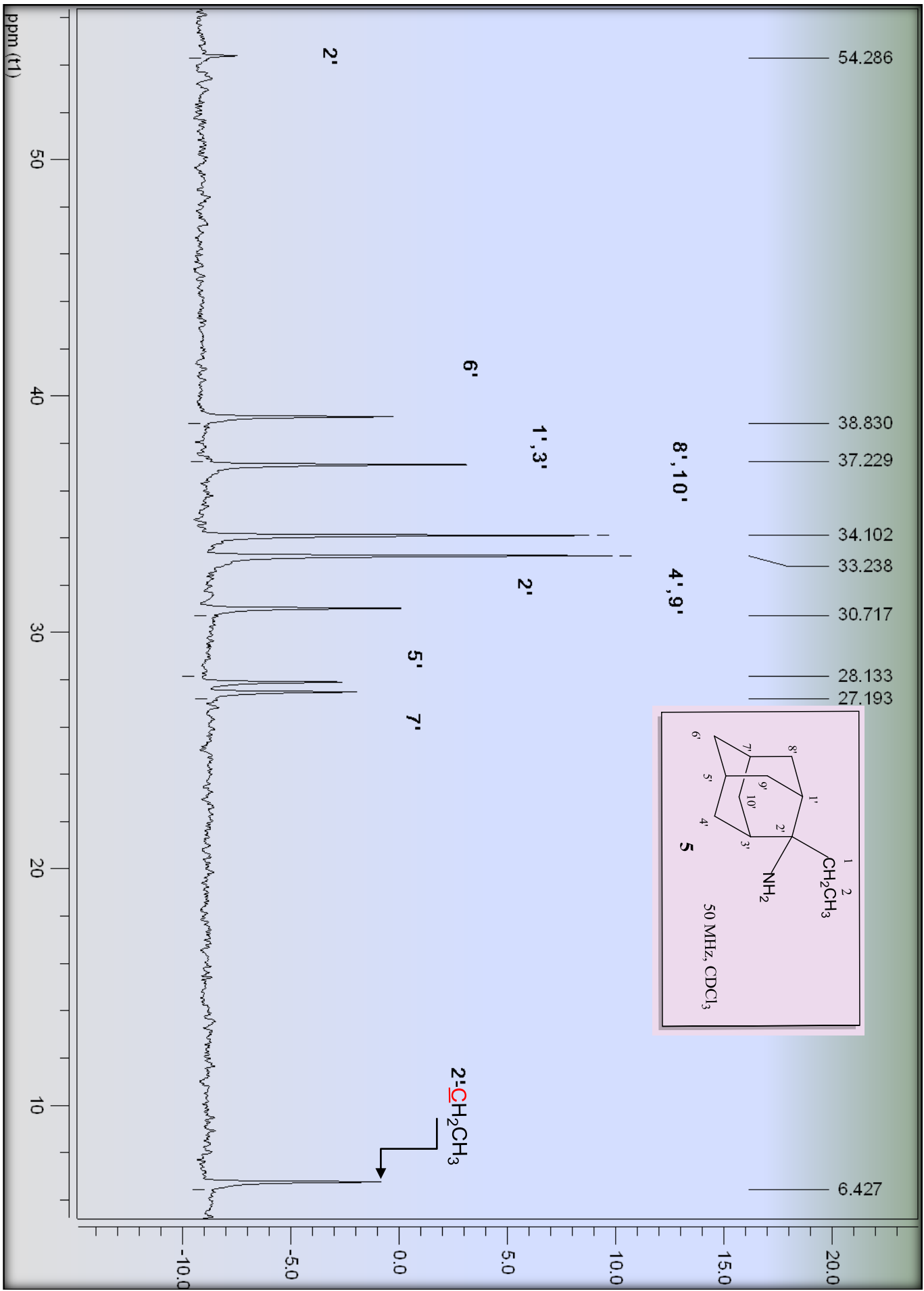
57. Wang J.; Cady S. D.; Balannik V.; Pinto L. H.; DeGrado W. F.; Hong M. Discovery of Spiro-Piperidine Inhibitors and Their Modulation of the Dynamics of the M2 Proton Channel from Influenza A Virus *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 8066, (2009).
58. Balannik V.; Wang J.; Ohigashi Y.; Jing X.; Magavern E.; Lamb R. A.; De Grado W. F.; Pinto L. H. *Design and Pharmacological Characterization of Inhibitors of Amantadine-Resistant Mutants of the M2 Ion Channel of Influenza A Virus. Biochemistry*, **48**, 11872–11882(2009).
59. Bright R.A.; Shay D.K.; Shu B.; Cox N.J.; Klimov A.I. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005–2006 influenza season in the United States. *J Am. Med. Assoc.*, **295**, 891–894, (2006).
60. Lan Y.; Zhang Y.; Dong L.; Wang D.; Huang W.; Xin L.; Yang L.; Zhao X.; Li Z.; Wang W.; Li X.; Xu C.; Guo J.; Wang M.; Peng Y.; Gao Y.; Guo Y.; Wen L.; Jiang T.; Shu Y. A comprehensive surveillance of adamantane resistance among human influenza A virus isolated from mainland China between 1956 and 2009. *Antivir. Ther.*, **15**, 853-859 (2010).
61. Duque M. D.; Ma C.; Torres E.; Wang J.; Naesens L.; Juarez-Jimenez J.; Camps P.; Javier Luque F.; DeGrado W. F.; Lamb R. A.; Pinto L. H.; Vazquez S. *Exploring the Size Limit of Templates for Inhibitors of the M2 Ion Channel of Influenza A Virus. J. Med. Chem.*, **54**, 2646–2657,(2011).
62. Zhao X.; Jie Y.; Rosenberg M. R.; Wan J.; Zeng S.; Cui W.; Xiao Y.; Li Z.; Tu Z.; Casarotto M. G.; Hu W. *Design and Synthesis of Pinanamine Derivatives as Anti-Influenza A M2 Ion Channel Inhibitors. Antiviral Res.*, **96**, 91–99,(2012).
63. Zhang W. *Heterodimers of histidine and amantadine as inhibitors for wild type and mutant M2 channels of influenza A. Chin. J. Chem.*, **28**, 1417–1423, (2010).
64. Wang J.; Wu Y.; Ma C.; Fiorin G.; Wang J.; Pinto L. H.; Lamb R. A.; Klein M. L.; and DeGrado W. F. *Structure and inhibition of the drug-resistant S31N mutant of the M2 ion channel of influenza A virus. PNAS*, **110**, 1315-1320 (2013).
65. Torres E.; Fernández R.; Miquet S. p.; Font-Bardia M.; Vanderlinden E.; Naesens L.; Vázquez S. *Synthesis and anti-influenza A virus activity of 2,2-dialkylamantadines and related compounds. ACS Med Chem Lett* ., **3**, 1065–1069 (2012).
66. Torres E.; Duque M. D.; Vanderlinden E.; Ma C.; Pinto L. H.; Camps P.; Froeyen M.; Vazquez S.; Naesens L. *Role of the viral hemagglutinin in the anti-influenza virus activity of newly synthesized polycyclic amine compounds. Antiviral Research*, **99**,281-291, (2013).

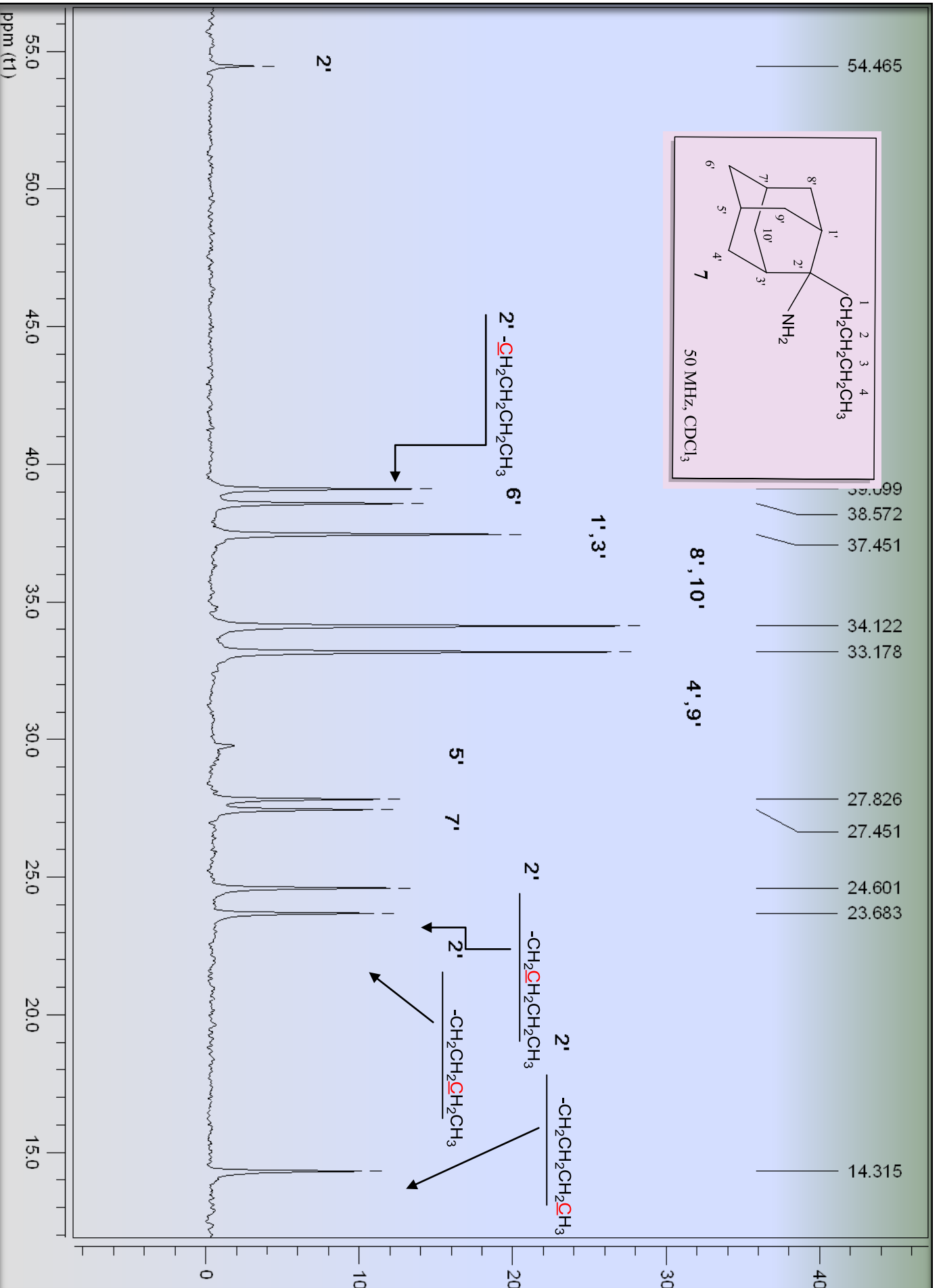
67. Torres E. *Synthesis of polycyclic compounds with antiviral activity. PhD Thesis, University of Barcelona. Barcelona 2013.*
68. Fytas G.; Kolocouris N.; Foscolos G. B.; Vamvakides A. *Synthesis and pharmacological study of some adamantylcyclopentanamines. European Journal of Medicinal Chemistry* **26**, 563-566 (1991).
69. Kraus G. A.; Siclovan T. M.; *Bridgehead intermediates in organic synthesis. A reproducible synthesis of adamantane-containing compounds. J Org. Chem.*, **59**, 922-923 (1994).
70. Jirgensons A.; Kauss V.; Kalvinsh I.; Markus R.; Gold A. *Practical Synthesis of tert-Alkylamines via the Ritter Reaction with Chloroacetonitrile. Synthesis*, **12**, 1709-1712 (2000).
71. Majerski Z.; Hameršar Z.; *Rearrangement of bridgehead alcohols to polycyclic ketones by fragmentation-cyclization: 4-protoadamantanone (tricyclo[4.3.1.0^{3,8}]decan-4-one). Org. Synth.*, **6**, 958-962 (1988).
72. Janjatovic J.; Majerski Z. *Synthesis of adamantanoid ketones from bridgehead alcohols by the hypiodite thermolysis-cyclization sequence. J. Org. Chem.*, **45**, 4892-4898 (1980).
73. P. V. R. Schleyer, D. Lenoir, R. Glaser, P. Mison, *Synthesis of 1,2- and 2,4-disubstituted adamantanes. The protoadamantane route. J Org Chem* **36**, 1821-1826 (1971).
74. Κολοκούρης Α. *Διδακτορική Διατριβή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, Ελλάδα (1995).*
75. Iffland D. C.; Criner G. X.; *Preparation of nitro compounds from oximes. II. The improved synthesis of nitrocycloalkanes. J Am. Chem. Soc.*, **75**, 4047-4048 (1953).
76. Στυλιανάκης Ι. *Σύνθεση Και Στοιχεία Διαμόρφωσης C,N-Υποκατεστημενων Σπειρο[Πυρρολιдино-2,2'-Αδαμαντανίων Με Αντικη Δραση. Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης . ΑΘΗΝΑ 2002*
77. Sieczkarski S. B.; Whittaker G.R. *Viral entry. Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **285**, 1-23, (2005).
78. Cross K.J.; Burleigh L.M.; Steinhauer D.A. *Mechanisms of cell entry by influenza virus. Exp. Rev. Mol. Med.*, **3**, 1-18, (2001a)
79. Gamblin S.J.; Haire L.F.; Russell R.J.; Stevens D.J.; Xiao B.; Ha, Y.; Vasisht, N.; Steinhauer, D.A.; Daniels, R.S.; Elliot, A.; Wiley, D.C.; Skehel J.J.; *The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin. Science*, **303**, 1838-1842, (2004).
80. Zhang W. *Heterodimers of histidine and amantadine as inhibitors for wild type and mutant M2 channels of influenza A. Chin. J. Chem.*, **28**, 1417-1423, (2010).
81. J. Wang, S. Kim, F. Kovacs, T. A. Cross, *Structure of the transmembrane region of the M2 protein H(+) channel. Protein Sci.*, **10**, 2241-2250 (2001).

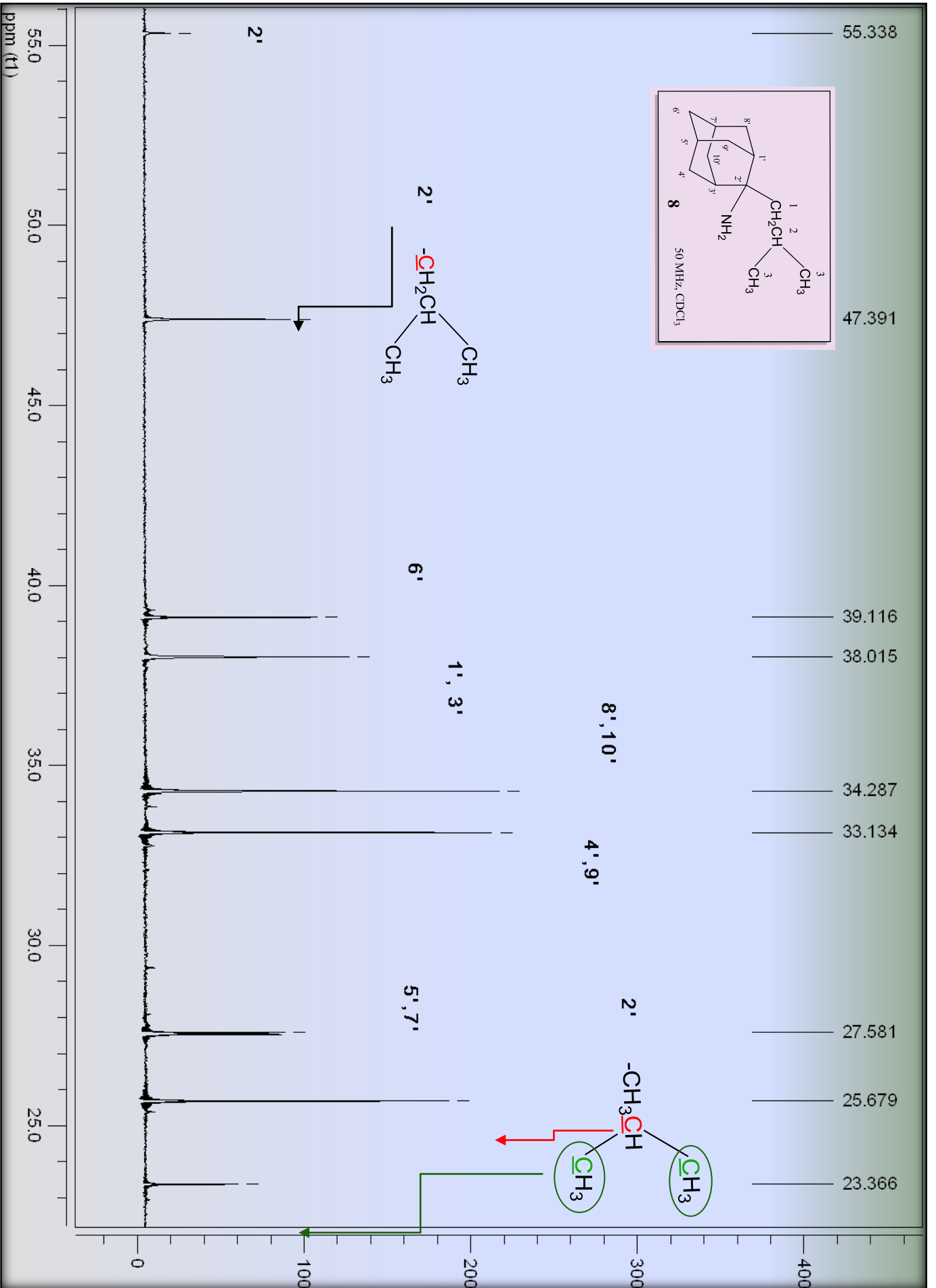
ΠΡΟΣΑΡΤΗΜΑ

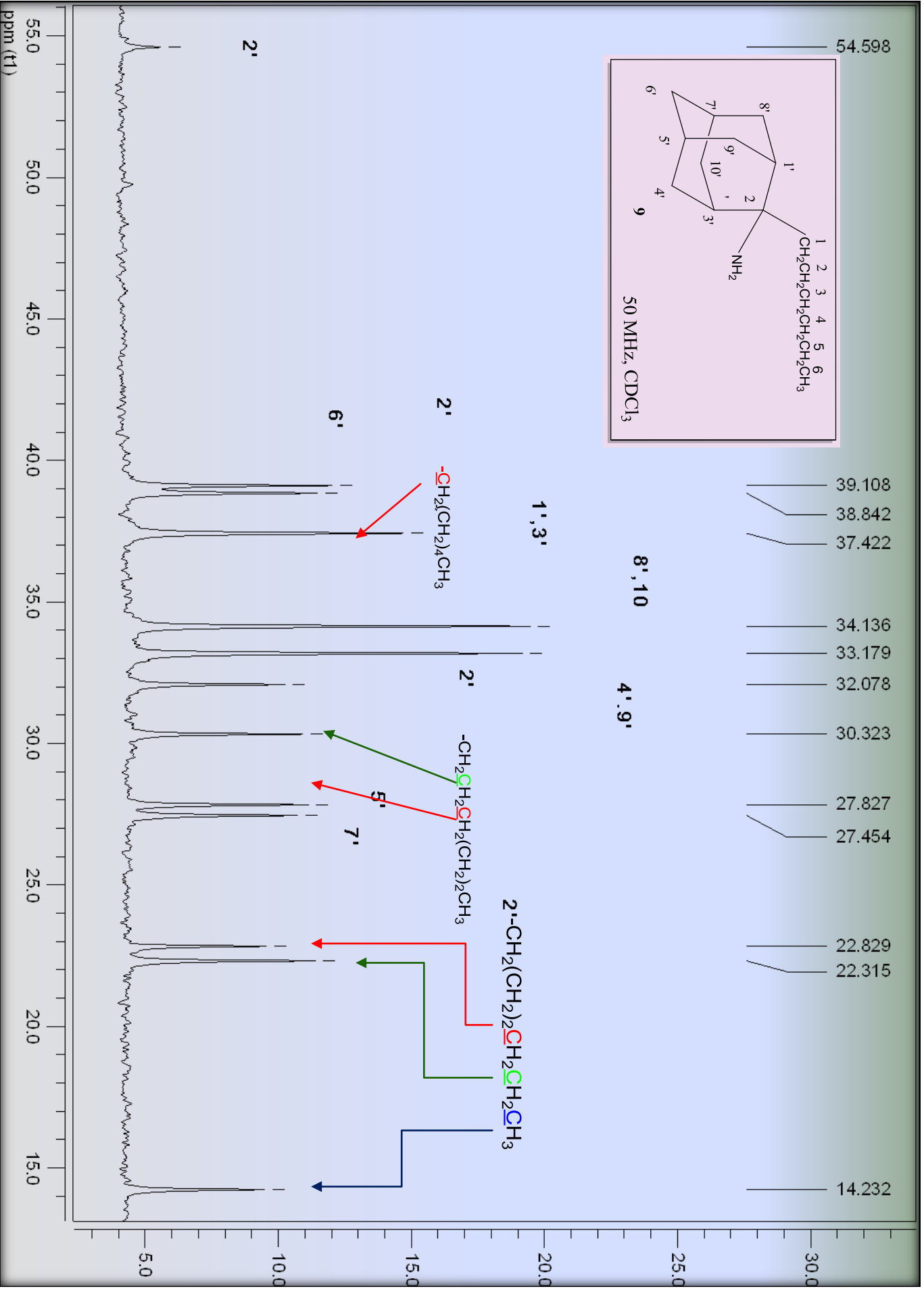
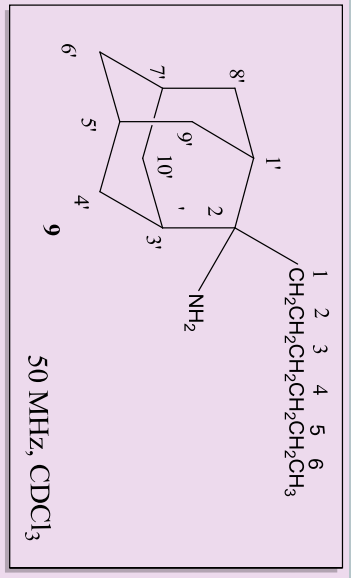
- **ΦΑΣΜΑΤΑ NMR ^{13}C ΤΟΥ 1'-ΜΕΘΥΛΟ ΚΑΙ ΤΟΥ 5-ΑΙΘΥΛΟ ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΩΝ ΣΠΕΙΡΟ [ΠΥΡΡΟΛΙΔΙΝΟ-2,2'-ΑΔΑΜΑΝΤΑΝΙΩΝ]**
- **ΦΑΣΜΑΤΑ NMR ^{13}C ΤΩΝ 1- ΚΑΙ 2- ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΩΝ ΑΔΑΜΑΝΤΑΝΙΩΝ.**
- **ΦΑΣΜΑΤΑ NMR ^{13}C ΤΗΣ 1 1-(1-ΑΔΑΜΑΝΤΑΝΟ) ΚΥΚΛΟΠΕΝΤΑΝΑΜΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ 1-(1-ΑΔΑΜΑΝΤΑΝΟ) ΚΥΚΛΟΕΞΑΝΑΜΙΝΗΣ**
- **ΦΑΣΜΑΤΑ Ms**

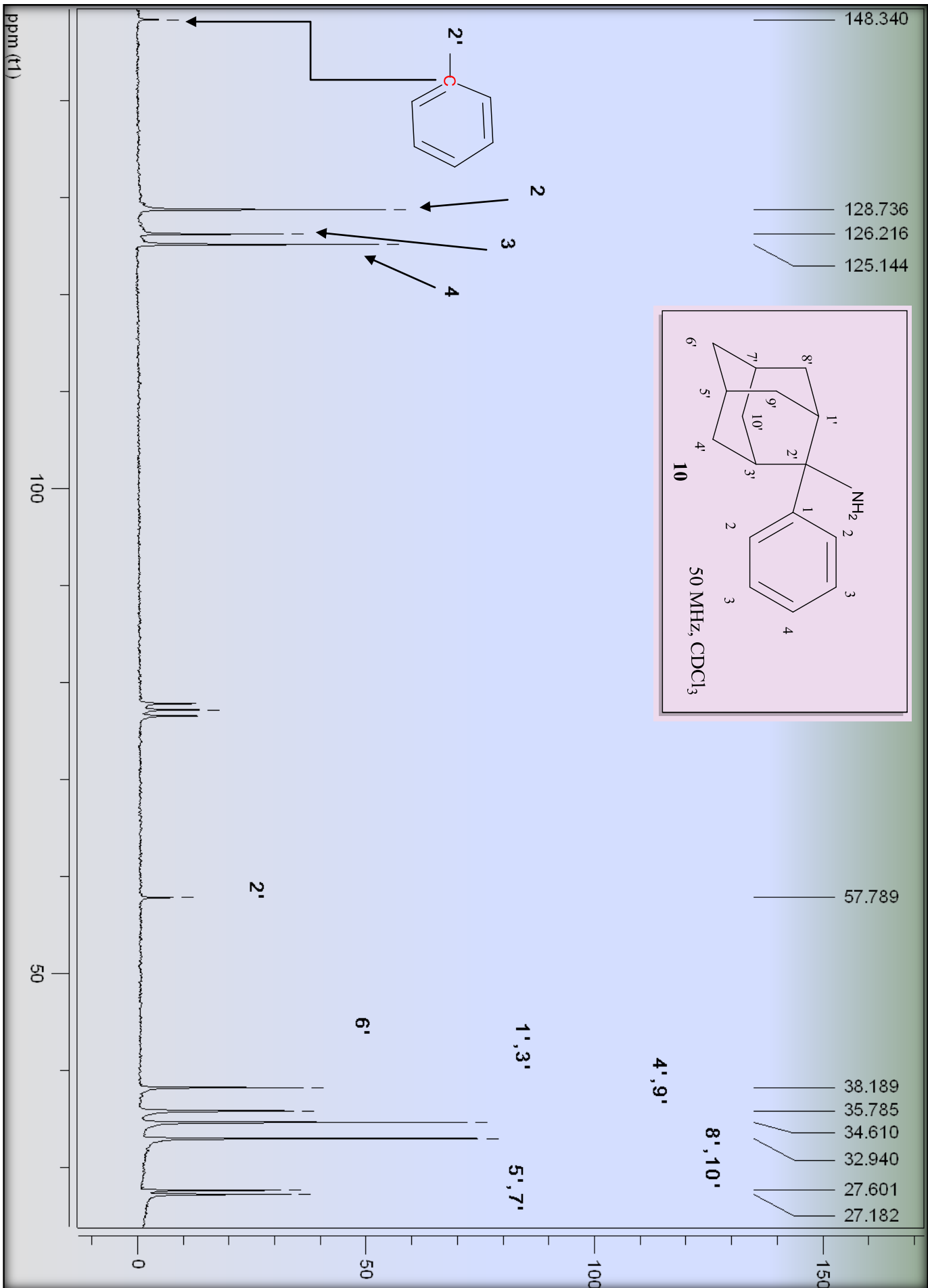


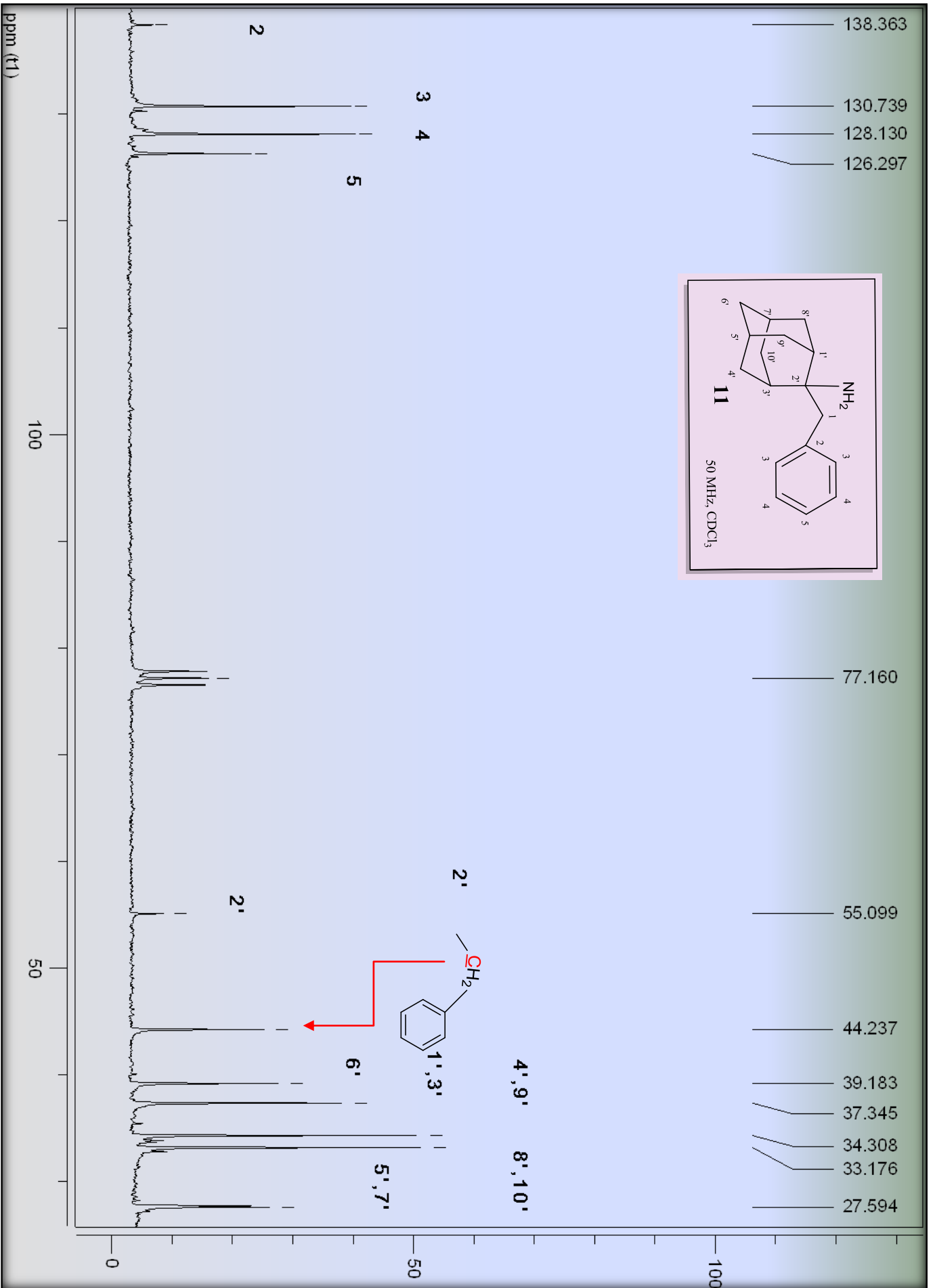


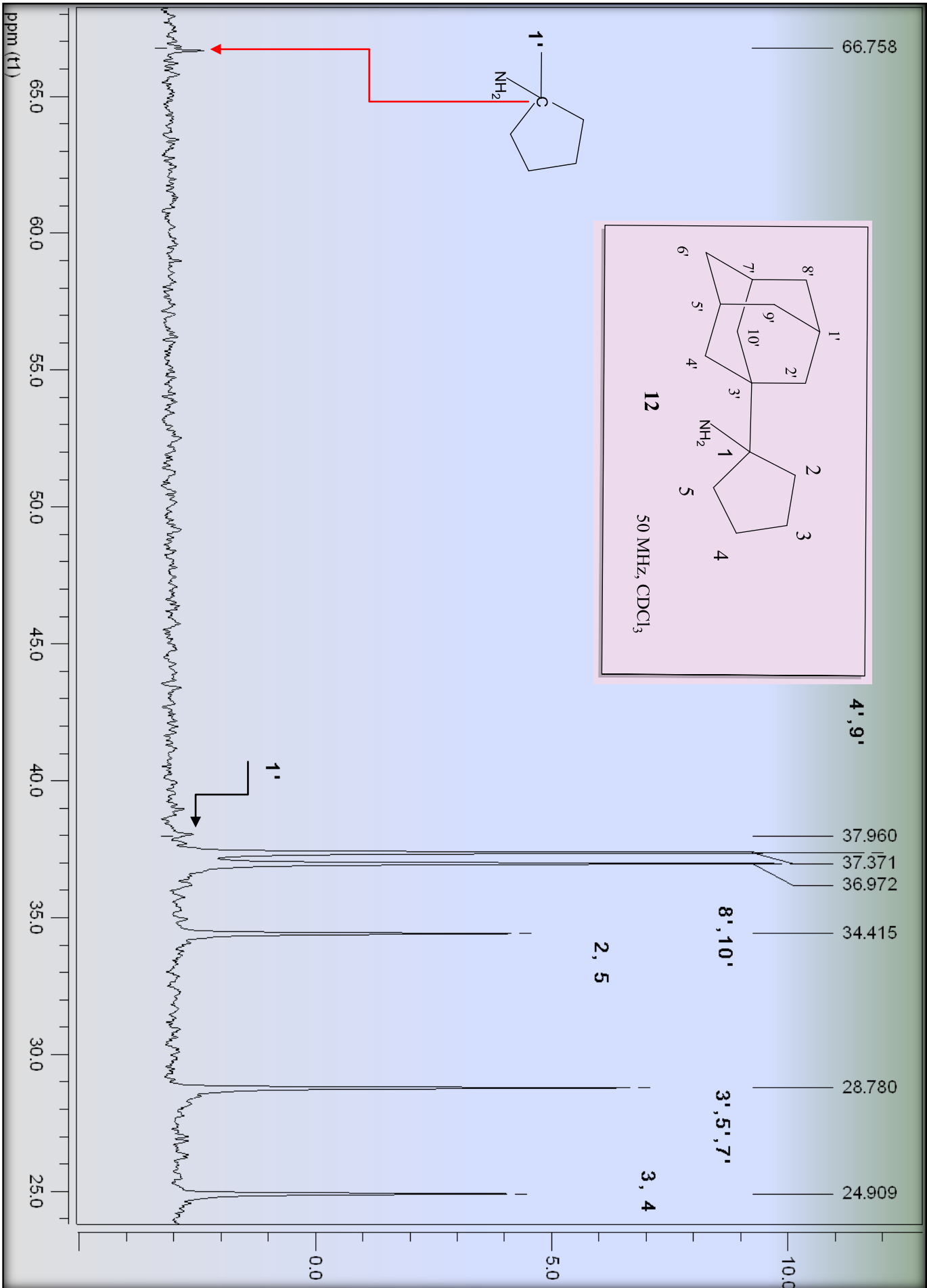


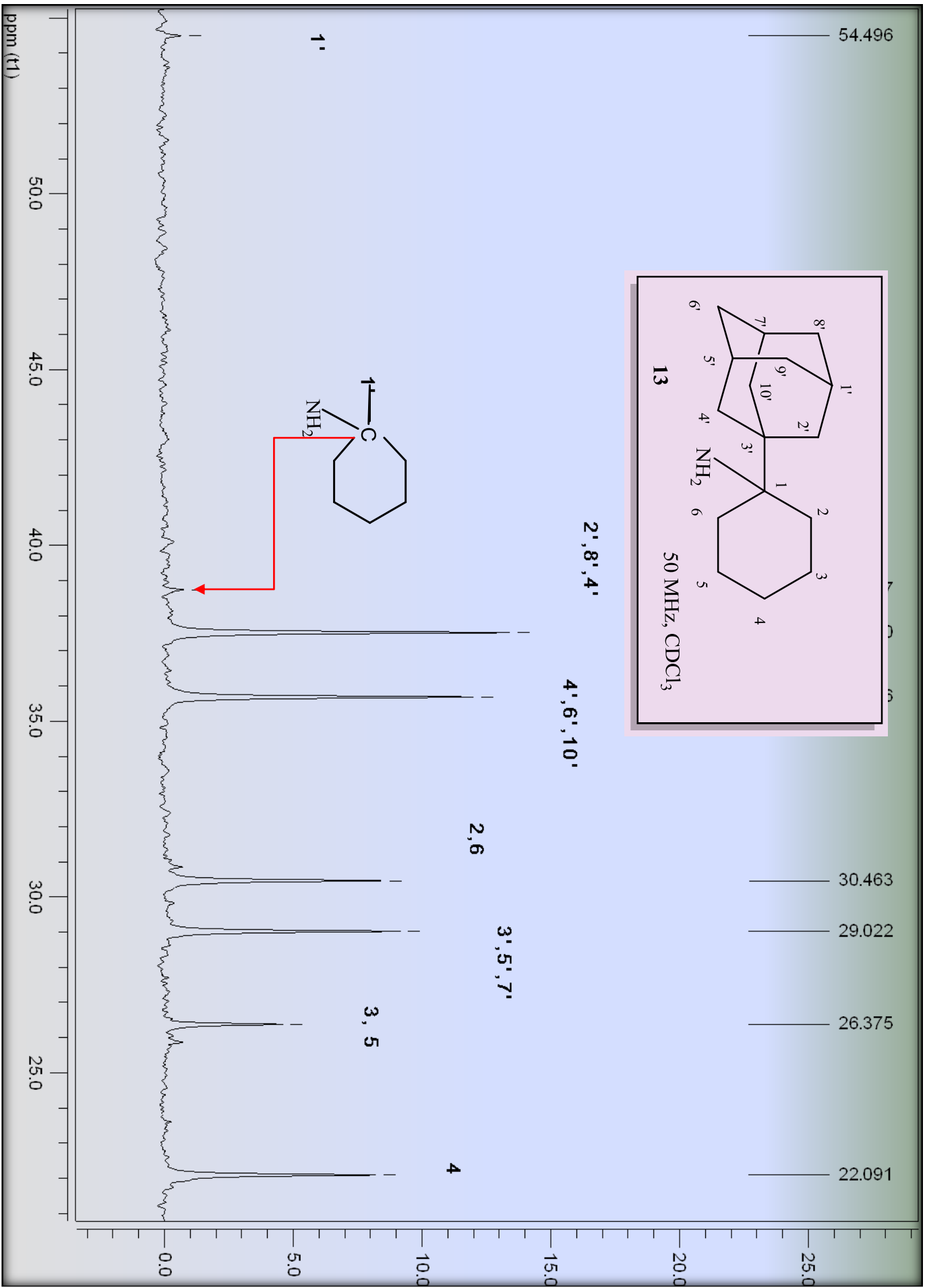
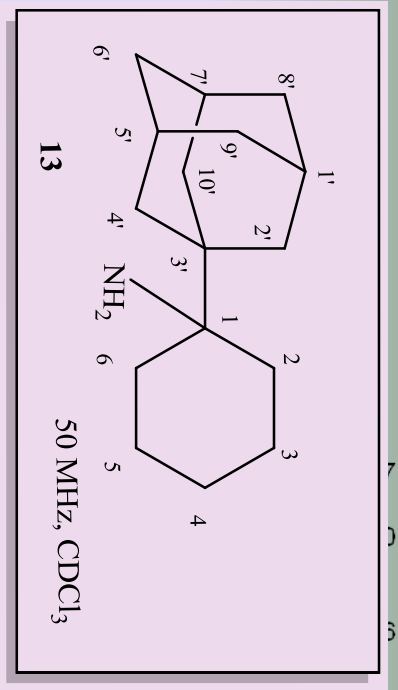










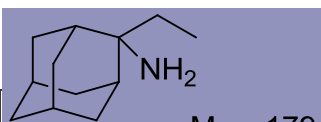


ΦΑΣΜΑΤΑ ΜΑΖΑΣ ΤΩΝ 2' ΑΛΚΥΛΟ-
ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΩΝ ΑΔΑΜΑΝΤΑΝΑΜΙΝΩΝ

ΚΑΙ

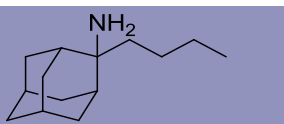
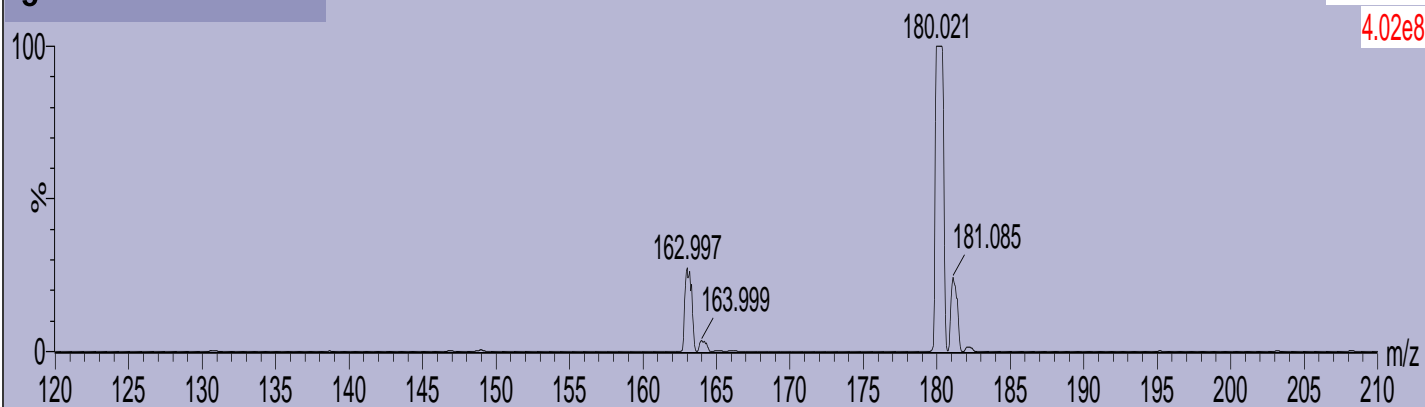
1-(1'-ΑΔΑΜΑΝΤΑΝΟ) ΚΥΚΛΟΞΑΝΑΜΪΝΗΣ

1-(1'-ΑΔΑΜΑΝΤΑΝΟ) ΚΥΚΛΟΠΕΝΤΑΝΑΜΪΝΗΣ



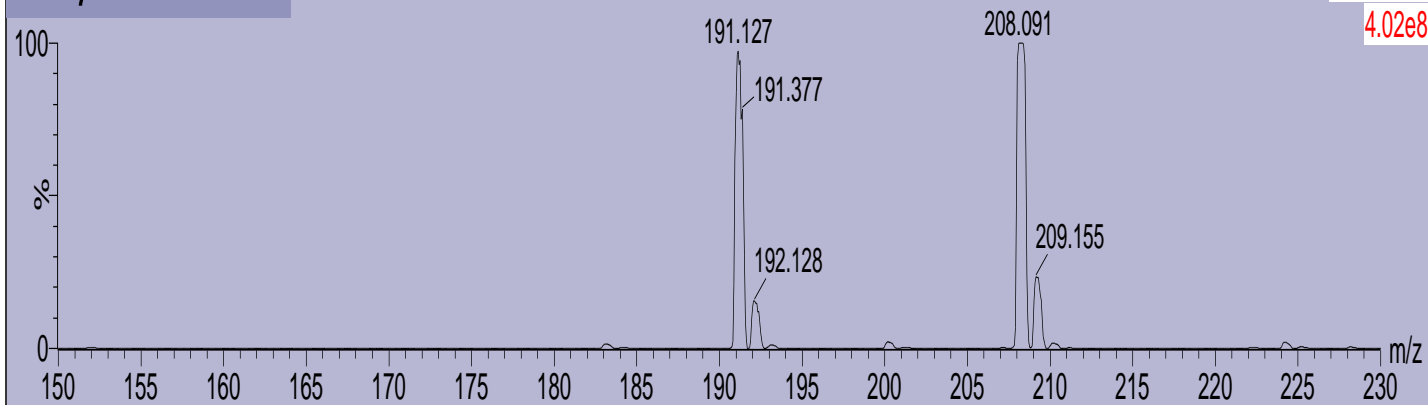
Mw= 179

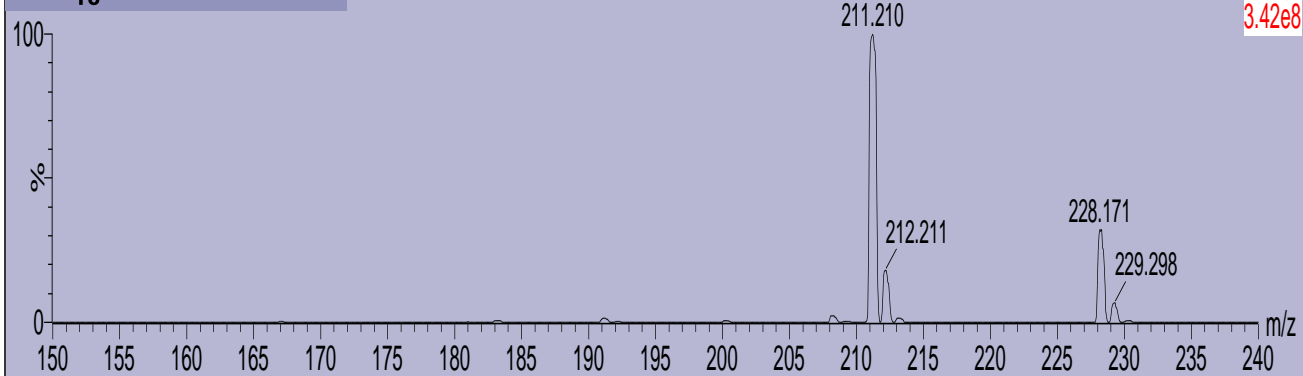
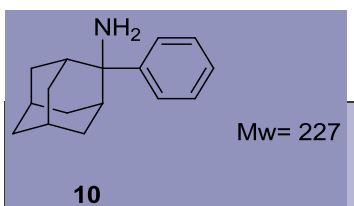
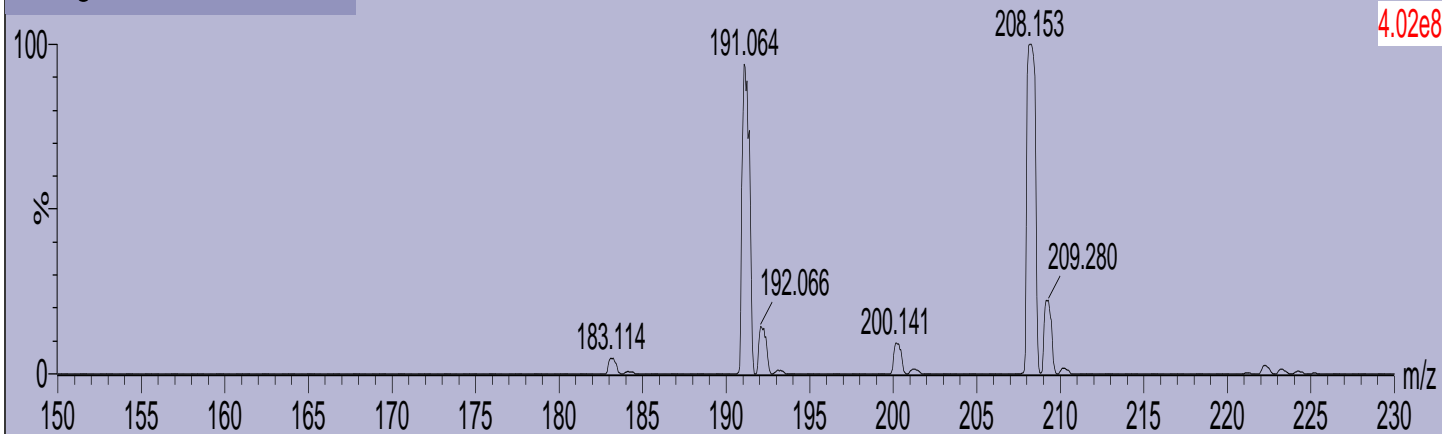
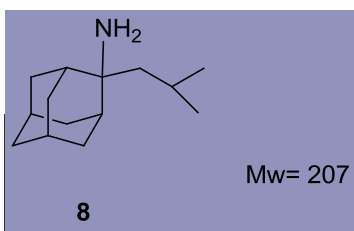
5

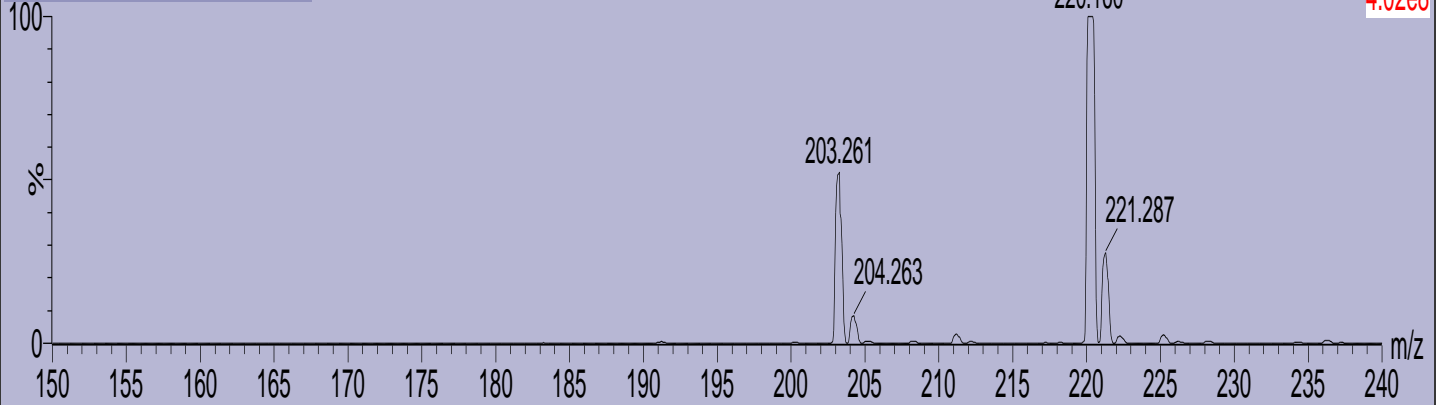
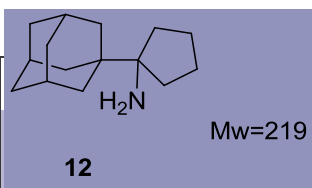
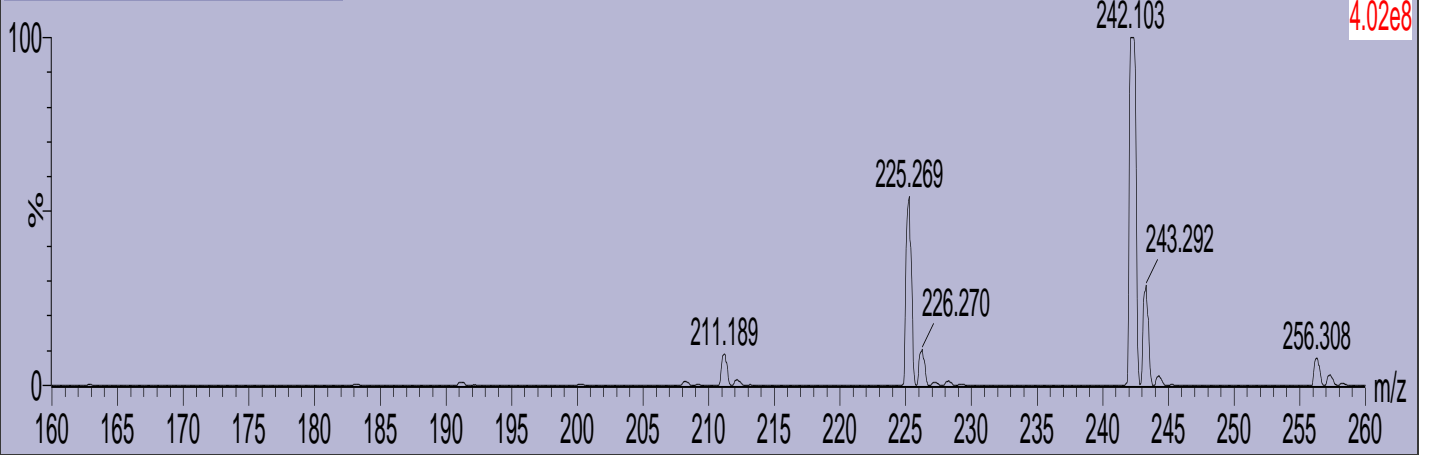
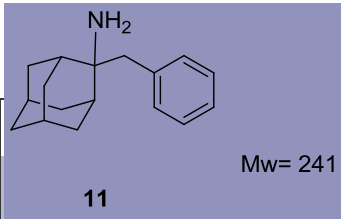


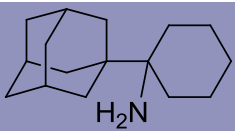
Mw= 207

7









H₂N

13

Mw=233

Scan ES+

1.58e8

