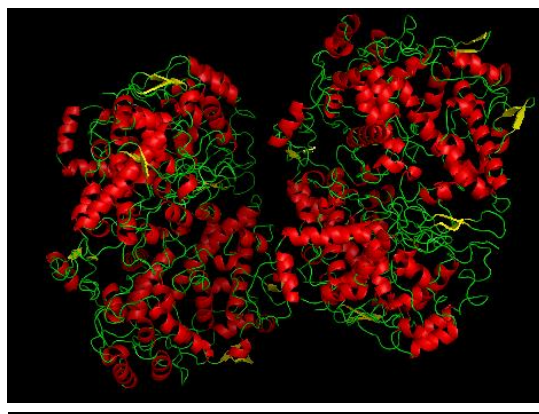


Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

Σχολή Χημικών Μηχανικών

Τομέας (I) Χημικών Επιστημών

Εργαστήριο Οργανικής Χημείας



# Μοριακή πρόσδεση ενώσεων με δράση στο ένζυμο της κυκλοοξυγονάσης-Σχεδιασμός και σύνθεση νέων αναστολέων του ενζύμου

---

Διπλωματική εργασία

Ρακοβίτης Νικόλαος

Επιβλέπουσα:

Δρ. Αναστασία Δέτση

Επίκουρος καθηγήτρια ΕΜΠ

Αθήνα 2015



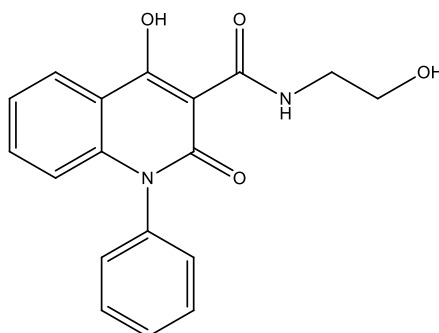
## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι αρχικά η μελέτη πρόσδεσης μιας 'βιβλιοθήκης' νέων οργανικών ενώσεων στο ένζυμο κυκλοοξυγονάση-2 και στην συνέχεια ο σχεδιασμός και η σύνθεση νέων μορίων με πιθανή ισχυρή ικανότητα αναστολής του ενζύμου.

Για τις *in silico* μελέτες πρόσδεσης, χρησιμοποιήθηκε η κρυσταλλική δομή της κυκλοοξυγονάσης-2 από τον οργανισμό *mus musculus* και εφόσον ήταν γνωστή η αλληλουχία της ανθρώπινης πρωτεΐνης, κατασκευάστηκε το ομόλογο μοντέλο της με την βοήθεια της γλώσσας προγραμματισμού *rython* και βρέθηκε ότι οι δυο δομές έχουν μεγάλη ομολογία καθώς και ομοιότητες στην διαμόρφωση στο ενεργό κέντρο και κατά συνέπεια την ίδια λειτουργικότητα.

Στην συνέχεια, έγινε επικύρωση της μεθόδου με υπολογισμούς Μοριακής Πρόσδεσης απλής και αυξημένης ακρίβειας και αφού επιβεβαιώθηκε ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί η συγκεκριμένη κρυσταλλική δομή, μελετήθηκαν 570 μόρια, ως προς την δυνατότητα πρόσδεσης τους στην κυκλοοξυγονάση-2 με την βοήθεια του λογισμικού *maestro* της Schrödinger. Προσδιορίστηκαν 50 μόρια τα οποία είναι πιθανοί παρεμποδιστές αναστολείς της δράσης του ενζύμου..

Την καλύτερη πρόσδεση από όλα τα μόρια παρουσίασε το καρβοξαμίδιο της N-φαινυλο-4-υδροξυ-2-κινολινόνης (Σχήμα 1), και για αυτό τον λόγο σχεδιάστηκαν μόρια, τα οποία είχαν μικρές διαφορές σε σχέση με το συγκεκριμένο μόριο για να μελετηθεί αν παρουσιάζουν μεγαλύτερη δυνατότητα πρόσδεσης. Σχεδιάστηκαν συνολικά 41 μόρια, στα οποία έγινε μελέτη πρόσδεσης απλής και σύνθετης ακρίβειας, ενώ επίσης πραγματοποιήθηκε μελέτη επαγόμενης προσαρμογής πρόσδεση. Το σύνολο σχεδόν των μορίων παρουσίαζε ικανοποιητική πρόσδεση στο ενεργό κέντρο της κυκλοοξυγονάσης-2, χωρίς όμως κάποιο να παρουσιάζει καλύτερη πρόσδεση από το αρχικό.



Σχήμα 1: Χημική δομή του καρβοξαμιδίου της N-φαινυλο-4-υδροξυ-2-κινολινόνης

Στη συνέχεια, έγινε προσπάθεια σύνθεσης των μορίων που παρουσίασαν την καλύτερη πρόσδεση, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της *in silico* μελέτης, στο

εργαστήριο Οργανικής Χημείας της σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ. Συνολικά συντέθηκαν 8 προϊόντα εκ των οποίων 3 είναι τελικά προϊόντα και ανήκουν στην κατηγορία των κινολινονών. Οι θεωρητικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν στο Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών.

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** Κυκλοοξυγονάση, Μελέτη πρόσδεσης, κινολινόνες, μοριακή μοντελοποίηση

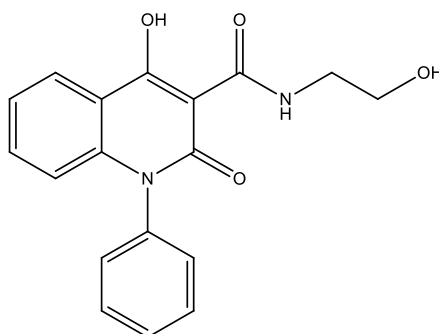
## ABSTRACT

The aim of this diploma thesis is to find new inhibitors of the enzyme cyclooxygenase-2 (COX-2) through studies of virtual screening using molecular binding programs (*in silico* docking) and to synthesize some of the compounds that present promising inhibitory activity.

Therefore, the crystal structure of cyclooxygenase-2 from *mus musculus* was used as well as the sequence of amino acids of human cyclooxygenase-2 and the crystallized structure of human cyclooxygenase-2 was created. The structure was created with the programming language python and it appeared that the crystal structure had the same similarity especially at the active site of the enzyme thus share the same functionality.

Afterwards, the validation of the method was performed with standard and extra precision calculations and it was confirmed that the crystallized structure can be used for docking studies. Therefore, 570 molecules were used for docking studies with the program maestro of Schrödinger. 50 of these molecules had satisfactory results and as a result they can be considered as potential COX-2 inhibitors.

The quinolinone analogue 4-hydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-2-oxo-1-phenyl-1,2-dihydroquinoline-3-carboxamide (Scheme 1) had the best docking score among all the studied molecules. As a result 41 new molecules, possessing structural modifications of the lead compound were designed in order to discover a molecule with better docking score. The computations were performed with standard and extra precision and the method of induced fit docking was also used. The results showed that the majority of the molecules can inhibit cyclooxygenase-2, but none of the molecules had better docking score. The molecules with the best docking scores were synthesized in order to be studied *in vitro* for their COX-2 inhibitory activity.



**Scheme 1:** Chemical structure of 4-hydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-2-oxo-1-phenyl-1,2-dihydroquinoline-3-carboxamide

**KEY WORDS:** Cyclooxygenase, Docking studies, Quinolinone, molecular modeling

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	ii
ABSTRACT.....	iv
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.....	vi
Κατάλογος σχημάτων .....	viii
Κατάλογος εικόνων.....	viii
Κατάλογος πινάκων .....	x
ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ .....	1
Αρτικολεξα .....	3
A. Θεωρητικό μέρος .....	4
A.1. Γενικά για την κυκλοοξυγονάση.....	4
A.1.1. Μεταβολικό μονοπάτι κυκλοοξυγονάσης.....	5
A.2. Επίδραση της κυκλοοξυγονάσης στον ανθρώπινο οργανισμό .....	7
A.2.1. Επίδραση στο γαστρεντερικό σύστημα .....	7
A.2.2. Επίδραση στον καρκίνο του παχέος εντέρου και άλλων μορφών καρκίνου .....	8
A.2.3. Η επίδραση της κυκλοοξυγονάσης στην φλεγμονή.....	9
A.2.4. Επίδραση της κυκλοοξυγονάσης σε άλλα μέρη του σώματος.....	9
A.3. Συμπεράσματα από την λειτουργία της κυκλοοξυγονάσης.....	10
A.4. Η αλληλουχία των αμινοξέων και το ενεργό κέντρο της κυκλοοξυγονάσης .....	11
A.5. Χαρακτηριστικοί δεσμοί που πρέπει να έχουν οι παρεμποδιστές με την COX-2.....	12
A.6. Μοριακή μοντελοποίηση .....	13
A.6.1. Ο ρόλος της τρισδιάστατης μορφής- Υπολογισμός της ενέργειας μίας τρισδιάστατης δομής.....	13
A.6.2. Ελαχιστοποίηση της ενέργειας και της δομής του μοριακού συστήματος .....	15
A.7. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού .....	16
A.8. Κινολινόνες.....	19
A.8.1. Φυσικές πηγές .....	20
A.9. Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (non-steroidal anti-inflammatory drugs) .....	21
B. Πειραματικό μέρος.....	24

B.1. Μοριακή μοντελοποίηση .....	24
B.1.1. Επιλογή της κατάλληλης πρωτεΐνης-Μοντελοποίηση ανθρώπινης πρωτεΐνης .....	24
B.1.2. Επικύρωση μεθόδου απλής ακρίβειας (SP) .....	27
B.1.3. Επικύρωση μεθόδου αυξημένης ακρίβειας XP.....	30
B.1.4. Μελέτη πρόσδεσης SP .....	32
B.1.5. Μελέτη πρόσδεσης XP.....	36
B.1.6. Σχολιασμός αποτελεσμάτων μοριακής μοντελοποίησης-Συμπεράσματα	42
B.1.7. Σχεδίαση μορίων-πιθανών αναστολέων της COX-2.....	43
B.1.8. Μελέτη πρόσδεσης νέων μορίων με την μέθοδο SP.....	49
B.1.9. Μελέτη πρόσδεσης νέων μορίων με την μέθοδο XP .....	54
B.1.10. Μελέτη πρόσδεσης νέων μορίων με την μέθοδο επαγόμενης προσαρμογής πρόσδεσης (Induced Fit Docking) .....	61
B.1.11. Σχολιασμός αποτελεσμάτων μοριακής μοντελοποίησης νέων μορίων-Συμπεράσματα .....	68
B.2. Σύνθεση των νέων μορίων .....	69
B.2.1. Όργανα και συσκευές.....	70
B.2.2. Σύνθεση του N-βενζυλο-ισατοϊκού ανιδρύτη (1) .....	70
B.2.3. Σύνθεση του 1-οκτυλ-ισατοϊκού ανυδρίτη (2).....	71
B.2.4. Σύνθεση της 1-βενζυλο-3-μεθοξυκαρβονυλο-4-υδροξυ-2-κινολινόνης (3) .....	72
B.2.4.1. Σύνθεση του εστέρα (3) με χρήση NaH ως βάσης.....	72
B.2.4.2. Σύνθεση του εστέρα (3) με χρήση tert-βουτοξειδίου του καλίου ως βάση .....	72
B.2.5 Σύνθεση της 3-μεθοξυκαρβονυλο-1-οκτυλ-4-υδροξυ-2-κινολινόνης (4)..	73
B.2.6. Σύνθεση της 3-μεθοξυκαρβονυλο-4-υδροξυ-2-κινολινόνης (5) [52] .....	73
B.2.7. Σύνθεση του N-υδροξυαιθυλο-1,2-διυδρο-4-υδροξυ-1-βενζυλο-2-οξο-3-κινολινονο-καρβοξαμιδίου (6).....	74
B.2.8. Σύνθεση του N-(1,3-διυδροξυπροπαν-2-υλο)-1,2-διυδρο-4-υδροξυ-1-βενζυλο-2-οξο-3-κινολινονο-καρβοξαμιδίου (7).....	75
B.2.9. Σύνθεση του N-(1,3-διυδροξυπροπαν-2υλ)-4-υδροξυ-2-οξο-1-φενυλ-1,2-διυδροκινολινόνη-3-καρβοξυλαμίδιο (8).....	75
B.2.10. Σχολιασμός αποτελεσμάτων Σύνθεσης-Συμπεράσματα .....	76
Γ. Συμπεράσματα-Προτάσεις για μελλοντική έρευνα .....	84
Δ. Βιβλιογραφία.....	85



<b>E. Παράρτημα</b> .....	89
E.1. Κώδικας για την δημιουργία της ομόλογης ανθρώπινης πρωτεΐνης .....	89
E.1.1. Επεξήγηση του κώδικα.....	89
E.2. Μόρια που χρησιμοποιήθηκαν στην μοριακή μοντελοποίηση .....	91
E.3. Αποτελέσματα πρόσδεσης των μορίων στο ενεργό κέντρο της κυκλοξυγονάσης απλής ακρίβειας.....	146
E.4. Αποτελέσματα πρόσδεσης των μορίων στο ενεργό κέντρο της κυκλοξυγενάσης αυξημένης ακρίβειας .....	149
E.5. Αποτελέσματα πρόσδεσης των μορίων που σχεδιάστηκαν στο ενεργό κέντρο της κυκλοξυγενάσης αυξημένης ακρίβειας.....	156
E.6. Φάσματα NMR.....	159

### **Κατάλογος σχημάτων**

Σχήμα 1: Χημική δομή του καρβοξυλαμίδιου της N-φαινυλο-4υδροξυ-2-κινολινόνης ii	
Σχήμα 2: Μεταβολικό μονοπάτι κυκλοξυγονάσης [1] .....	6
Σχήμα 3: Το ενεργό κέντρο των δύο ισομορφών της κυκλοξυγονάσης [1] .....	12
Σχήμα 4: Η γενική δομή της 4-υδρόκυ-2-κινολινόνης .....	19
Σχήμα 5: Κοινά μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα [1] .....	21
Σχήμα 6: COX-2 παρεμποδιστές [1].....	22
Σχήμα 7: Το μόριο AD 44.....	43
Σχήμα 8: Πορεία σύνθεσης νέων μορίων .....	69
Σχήμα 9: Παράδειγμα απεικόνισης TLC μη ολοκληρωμένης αντίδρασης.....	78
Σχήμα 10: Η χημική δομή της ένωσης (3).....	80
Σχήμα 11: Η χημική δομή της (6).....	82

### **Κατάλογος εικόνων**

Εικόνα 1: Διαφορές ανάμεσα στο mRNA που εκφράζεται για το COX-1, COX-3 και PCOX-1a [5] .....	4
Εικόνα 2: Σύγκριση του ενεργού κέντρου των δύο κρυσταλλικών δομών. Με πορτοκαλί χρώμα απεικονίζεται ο παρεμποδιστής, με γαλάζιο χρώμα η κρυσταλλική πρωτεΐνη από τον οργανισμό mus musculus και με κόκκινο χρώμα η ανθρώπινη κρυσταλλική δομή που κατασκευάστηκε .....	25
Εικόνα 3: Δεσμοί ανάμεσα στον παρεμποδιστή S-58 και τα αμινοξέα της πρωτεΐνης. Πάνω: κρυσταλλική δομή από τον οργανισμό mus musculus. Κάτω: Μοντέλο κρυσταλλικής δομής ανθρώπινης πρωτεΐνης.....	26
Εικόνα 4: Validation μεθόδου SP. Πάνω: υπέρθεση της πόζας του παρεμποδιστή στην αρχική πόζα. Κάτω: δεσμοί ανάμεσα στον παρεμποδιστή και την πρωτεΐνη .....	28
Εικόνα 5: Validation μεθόδου SP. Πάνω: υπέρθεση της πόζας του παρεμποδιστή στην αρχική πόζα. Κάτω: δεσμοί ανάμεσα στον παρεμποδιστή και την πρωτεΐνη .....	29

Εικόνα 6: Validation μεθόδου XR. Πάνω: υπέρθεση της πόζας του παρεμποδιστή στην αρχική πόζα. Κάτω: δεσμοί ανάμεσα στον παρεμποδιστή και την πρωτεΐνη.....	31
Εικόνα 7: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο AD 44 και τα αμινοξέα της COX-2.....	33
Εικόνα 8: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο AD 8 και τα αμινοξέα της COX-2.....	34
Εικόνα 9: Δεσμοί μορίων ανάμεσα στο μόριο TC 139 και τα αμινοξέα της COX-2..	35
Εικόνα 10: Δεσμοί μορίων ανάμεσα στο μόριο MK 110 και τα αμινοξέα της COX-2 .....	36
Εικόνα 11: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο AD 44 και τα αμινοξέα της COX-2.....	37
Εικόνα 12: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο TC 139 και τα αμινοξέα της COX-2.....	38
Εικόνα 13: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο MK 71 και τα αμινοξέα της COX-2 .....	39
Εικόνα 14: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο MK 47 και τα αμινοξέα της COX-2 .....	40
Εικόνα 15: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο MK 28 και τα αμινοξέα της COX-2 .....	41
Εικόνα 16: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο MK 68 και τα αμινοξέα της COX-2 .....	42
Εικόνα 17: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο N 8 και τα αμινοξέα της COX-2.....	50
Εικόνα 18: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο N 7 και τα αμινοξέα της COX-2.....	51
Εικόνα 19: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο N 11 και τα αμινοξέα της COX-2.....	52
Εικόνα 20: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο N 26 και τα αμινοξέα της COX-2.....	53
Εικόνα 21: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο N 22 και τα αμινοξέα της COX-2.....	54
Εικόνα 22: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο N 26 και τα αμινοξέα της COX-2.....	56
Εικόνα 23: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο N 10 και τα αμινοξέα της COX-2.....	57
Εικόνα 24: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο N 9 και τα αμινοξέα της COX-2.....	58
Εικόνα 25: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο N 40 και τα αμινοξέα της COX-2.....	59
Εικόνα 26: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο N 7 και τα αμινοξέα της COX-2.....	60
Εικόνα 27: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο N 8 και τα αμινοξέα της COX-2.....	61
Εικόνα 28: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο N 26 και τα αμινοξέα της COX-2.....	63
Εικόνα 29: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο N 40 και τα αμινοξέα της COX-2.....	64
Εικόνα 30: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο N 31 και τα αμινοξέα της COX-2.....	65
Εικόνα 31: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο N 29 και τα αμινοξέα της COX-2.....	66
Εικόνα 32: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο N 17 και τα αμινοξέα της COX-2.....	67
Εικόνα 33: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο N 9 και τα αμινοξέα της COX-2.....	68
Εικόνα 34: Πάνω: TLC πλάκα Κάτω: Χαρακτηριστικές παράδειγμα πλάκας.....	77
Εικόνα 35: Πλάκα TLC κάτω από πηγή υπερϊώδους ακτινοβολίας.....	78
Εικόνα 36: Χρωματισμένη πλάκα TLC .....	79
Εικόνα 37: Το φάσμα $^1\text{H}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) της ένωσης <b>(3)</b> .....	80
Εικόνα 38: Το φάσμα $^1\text{H}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) της ένωσης <b>(6)</b> .....	82
Εικόνα 39: Το φάσμα $^1\text{H}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) της ένωσης <b>(1)</b> .....	159
Εικόνα 40: Το φάσμα $^1\text{H}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) της ένωσης <b>(2)</b> .....	160
Εικόνα 41: Το φάσμα $^1\text{H}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) της ένωσης <b>(3)</b> .....	161
Εικόνα 42: Το φάσμα $^1\text{H}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) της ένωσης <b>(4)</b> .....	162
Εικόνα 43: Το φάσμα $^1\text{H}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) της ένωσης <b>(6)</b> .....	163

## **Κατάλογος πινάκων**

Πίνακας 1: Προϊόντα που εκφράζονται σε κάθε όργανο και οι λειτουργίες που επιτελούν [2] .....	10
Πίνακας 2: Περιεχόμενες κινονινολικές ενώσεις στα διάφορα είδη της οικογένειας των ρυτοειδών [43] .....	20
Πίνακας 3: Αποτελέσματα ομολογων μοντέλων ανθρώπινης COX-2 .....	24
Πίνακας 4: Αποτελέσματα πρόσδεσης εξακρίβωσης μεθόδου με την μέθοδο SP .....	30
Πίνακας 5: Νέα μόρια που σχεδιάστηκαν για μελέτη μοριακής μοντελοποίησης .....	44
Πίνακας 6: Αποτελέσματα πρόσδεσης νέων μορίων με την μέθοδο SP .....	49
Πίνακας 7: Αποτελέσματα πρόσδεσης με την μέθοδο XP .....	55
Πίνακας 8: Αποτελέσματα πρόσδεσης με την μέθοδο IFD .....	62
Πίνακας 9: Αποτελέσματα μελέτης πρόσδεσης με την μέθοδο SP .....	146
Πίνακας 10: Επεξήγηση των κωδικών του πίνακα αποτελεσμάτων .....	149
Πίνακας 11: Αποτελέσματα πρόσδεσης μορίων με την μέθοδο XP και δεσμοί που σχηματίζονται .....	150
Πίνακας 12: Αποτελέσματα πρόσδεσης μορίων με την μέθοδο XP και δεσμοί που σχηματίζονται (συνέχεια) .....	153
Πίνακας 13: Αποτελέσματα πρόσδεσης μορίων με την μέθοδο XP και δεσμοί που σχηματίζονται (συνέχεια) .....	154
Πίνακας 14: Αποτελέσματα πρόσδεσης νέων μορίων με την μέθοδο XP.....	156
Πίνακας 15: Αποτελέσματα πρόσδεσης νέων μορίων με την μέθοδο XP (συνέχεια) .....	158

## ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε σε δύο στάδια: στο πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκαν οι *in silico* μελέτες Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, υπό την επίβλεψη του Δρ. Ζουμπουλάκη Παναγιώτη, ερευνητή Γ', ενώ στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιήθηκε η σύνθεση των νέων μορίων στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας, της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη της Δρ. Δέτση Αναστασίας, Επίκουρης καθηγήτριας ΕΜΠ.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω την πολύτιμη βοήθεια που μου δόθηκε όποτε μου χρειάστηκε κατά την διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Δρ. Δέτση Αναστασία, Επίκουρη καθηγήτρια ΕΜΠ, η οποία μου εμπιστεύτηκε την συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, καθώς επίσης μου έδωσε την δυνατότητα να εργαστώ στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών και γνωρίσω την *in silico* πρόσδεση μορίων, ανοίγοντας μου περαιτέρω τους επιστημονικούς μου ορίζοντες. Θα ήθελα επίσης να την ευχαριστήσω για την δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω την εργασία μου στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος Χημικών μηχανικών ΕΜΠ.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον ερευνητή του ΕΙΕ Δρ. Ζουμπουλάκη Παναγιώτη, ο οποίος με καθοδήγησε σε ότι είχε σχέση με τις *in silico* μελέτες για μελέτη πρόσδεσης μορίων.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Ανδρομάχη Τζάνη, υποψήφια διδάκτορα στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας για την σημαντική βοήθεια που μου έδωσε όποτε είχα κάποιο πρόβλημα με τα πειράματα σύνθεσης και μου υπέδειξε τον τρόπο με τον οποίο θα έπρεπε να γράψω την διπλωματική μου εργασία.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω την Κρίτση Ευτυχία, υποψήφια διδάκτορα στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, η οποία με βοήθησε στην *in silico* μελέτη μοριακής πρόσδεσης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Ποταμίτη Κώστα, μεταδιδακτορικό ερευνητή του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών και την Ελένη Καβέτσου, υποψήφια διδάκτορα στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος Χημικών μηχανικών ΕΜΠ για την συμβολή τους κατά την διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Ματσούκα Μίνω, ο οποίος με βοήθησε στην δημιουργία του μοντέλου της ανθρώπινης πρωτεΐνης της κυκλοοξυγονάσης.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους με στήριξαν κατά την διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας, προκειμένου να καταφέρω να την

ολοκληρώσω και όσους με βοήθησαν προκειμένου να νιώσω άνετα στους χώρους όπου εργάστηκα για την συγκεκριμένη εργασία.

## ΑΡΤΙΚΟΛΕΞΑ

COX: Κυκλοοξυγονάση (cyclooxygenase)

NSAID: Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (non-steroidal anti-inflammatory drugs)

HIS: Ιστιδίνη (histidine)

ARG: Αργινίνη (arginine)

PG: Προσταγλαδίνη (prostaglandine)

TX: Θρομβοξάνη (thromboxane)

PES: Πολυδιάστατη επιφάνεια της δυναμικής ενέργειας (Potential Energy Surfaces)

NMR: Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (nuclear magnetic resonance spectrometry)

SP: απλή ακρίβεια (standard precision)

XP: αυξημένη ακρίβεια (extra precision)

IFD: Επαγόμενη προσαρμογή πρόσδεσης (induce fit docking)

DMF: Διμεθυλοφορμαμίδιο (dimethylformamide)

THF: Τετραυδροφουράνιο (Tetrahydrofuran)

t-BuOK: Τερτ-βουτοξείδιο του καλίου (potassium tert-butoxide)

DCC: Δικυκλοεξυλκαρβοδιιμίδιο (Dicyclohexylcarbodiimide)

DCM: Διχλωρομεθάνιο (Dichloromethane)

TLC: Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (thin layer chromatography)

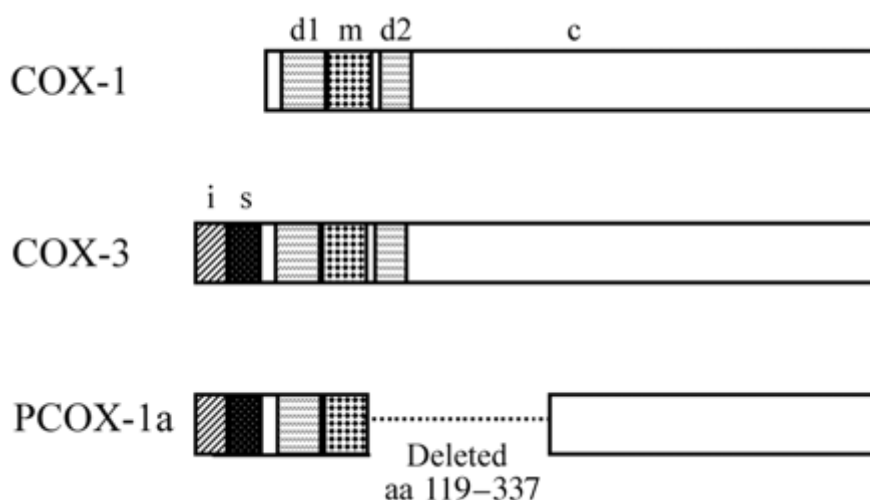
## A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### A.1. Γενικά για την κυκλοοξυγονάση

Η Κυκλοοξυγονάση (Cyclooxygenase ή COX), είναι ένα ένζυμο το οποίο παράγεται φυσιολογικά στον ανθρώπινο οργανισμό. Εμφανίζεται σε δύο ισομερή: την κυκλοοξυγονάση-1 (COX-1) και την κυκλοοξυγονάση-2 (COX-2). Τα δύο ισομερή έχουν την ίδια λειτουργία, καθώς παρουσιάζουν μικρές διαφορές στην δομή τους [1],[2]. Καταλύουν τις πρώτες αντιδράσεις του μεταβολικού μονοπατιού της κυκλοοξυγονάσης, μέσα από το οποίο παράγονται μία σειρά από προσταγλαδίνες και θρομβοξάνες [2].

Παρόλο που οι δύο μορφές της κυκλοοξυγονάσης είναι πολύ όμοιες μεταξύ τους, επιτελούν διαφορετικό σκοπό. Από τις μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, θεωρείται ότι η COX-1 εκφράζεται συνεχώς στα ανθρώπινα κύτταρα, ενώ η COX-2 είναι επαγόμενο ένζυμο [3]. Στις παρακάτω ενότητες θα παρουσιαστούν οι διαφορές που παρουσιάζουν οι δύο αυτές ισομορφές και θα εξηγηθεί γιατί είναι απαραίτητο να παρεμποδιστεί η λειτουργία της COX-2, χωρίς να παρεμποδιστεί η λειτουργία της COX-1.

Εκτός από τα δύο αυτά ισομερή, υπάρχουν και πρωτεΐνες-παραλλαγές της COX-1. Πρόκειται για τις πρωτεΐνες COX-3 και PCOX-1 (υπάρχουν 2 PCOX-1 με ονομασίες PCOX-1a και PCOX-1b). Οι πρωτεΐνες προέρχονται από το ίδιο γονίδιο από όπου προέρχεται και η COX-1, ωστόσο το ώριμο mRNA που μεταφράζεται στην κάθε πρωτεΐνη είναι διαφορετικό. Πιο συγκεκριμένα, το mRNA των πρωτεϊνών COX-3 και PCOX-1 περιέχει τμήματα τα οποία είναι ιντρόνια και αφαιρούνται κατά την διαδικασία ωρίμανσης του mRNA για την σύνθεση της COX-1 [4].



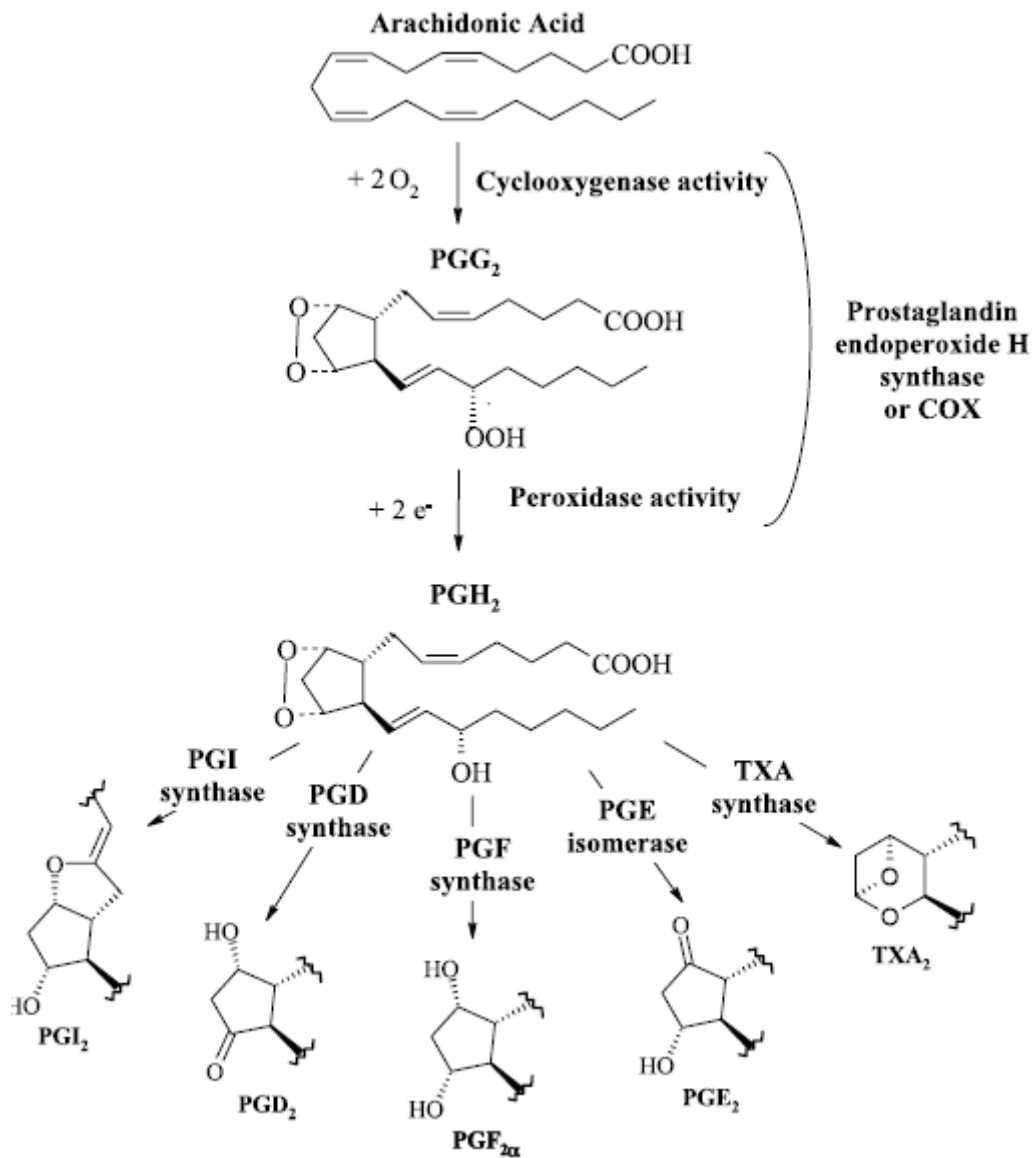
Εικόνα 1: Διαφορές ανάμεσα στο mRNA που εκφράζεται για το COX-1, COX-3 και PCOX-1a [5]

Η πρωτεΐνη COX-3, ανακαλύφθηκε όταν η χρήση ορισμένων φαρμάκων δεν μπορούσε να εξηγηθεί με την βιολογία της κυκλοοξυγονάσης που ήταν γνωστή έως εκείνη την εποχή. Πιο συγκεκριμένα η ακεταμινοφαίνη είχε αντιπυρετικές και αναλγητικές δράσεις, χωρίς να παρουσιάζει αντιφλεγμονώδη δραστηριότητα. Μάλιστα οι δράσεις αυτές της ακεταμινοφαίνης παρουσιάζονταν σε δόσεις όπου η παρεμπόδιση των δύο ισομερών της κυκλοοξυγονάσης ήταν αμελητέα. Ένα άλλο γεγονός που οδήγησε στην ανακάλυψη της πρωτεΐνης COX-3, ήταν το φαινόμενο που παρατηρήθηκε σε *in vivo* πειράματα που έγιναν για την μελέτη της δράσης μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων. Στα πειράματα αυτά παρατηρήθηκε ότι μετά από χρόνο 6 ωρών μετά από την μόλυνση και την είσοδο των φαρμάκων στα πειραματόζωα, παρατηρήθηκε ότι τα φάρμακα που δρούσαν αποκλειστικά ως COX-2 παρεμποδιστές δεν παρουσίαζαν καμία δράση ενώ τα υπόλοιπα που δρούσαν ως παρεμποδιστές και των δύο ισομορφών της κυκλοοξυγονάσης συνέχιζαν να παρουσιάζουν δράση. Έγινε η υπόθεση επομένως, ότι υπάρχει μία ακόμα μορφή της κυκλοοξυγονάσης η COX-3. Η μελέτη της πρωτεΐνης αυτής στην συνέχεια έδειξε ότι πρόκειται για μία παραλλαγή της COX-1 όπως προαναφέρθηκε [6].

#### *A.1.1. Μεταβολικό μονοπάτι κυκλοοξυγονάσης*

Η κυκλοοξυγονάση χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα το αραχιδονικό οξύ. Κατά το πρώτο στάδιο της αντίδρασης η κυκλοοξυγονάση οξειδώνει το αραχιδονικό οξύ σε προσταγλαδίνη (PG)  $G_2$  ( $PGG_2$ ), προσθέτοντας στην δομή της 2 μόρια οξυγόνου, ενώ ταυτόχρονα προκαλεί μία κυκλοποίηση καθώς ο άνθρακας 8 σχηματίζει έναν απλό δεσμό με τον άνθρακα 13. Στην συνέχεια, η COX μετατρέπει την  $PGG_2$  σε  $PGH_2$ . Η  $PGH_2$ , είναι μία πρόδρομη ένωση η οποία τροποποιείται από διάφορα ένζυμα παράγοντας μία σειρά από προσταγλαδίνες και θρομβοξάνες (TX):  $PGI_2$ ,  $PGD_2$ ,  $PGF_{2a}$ ,  $PGE_2$  και  $TXA_2$  [1],[7],[8] (Σχήμα 2)





Σχήμα 2: Μεταβολικό μονοπάτι κυκλοοξυγονάσης [1]

Τα ένζυμα που μετατρέπουν το PGH<sub>2</sub> στα αντίστοιχα προϊόντα δεν εκφράζονται με τον ίδιο τρόπο σε όλο το σώμα ενός ανθρώπινου οργανισμού. Επομένως σε διαφορετικά όργανα εμφανίζονται διαφορετικά προϊόντα σε διαφορετικές αναλογίες και διαδραματίζουν διαφορετικό ρόλο σε κάθε περίπτωση. Για παράδειγμα στο στομάχι παράγονται μόνο οι προσταγλαδίνες E<sub>2</sub> και I<sub>2</sub>, οι οποίες συμβάλουν στην προστασία του στομάχου. Έχει παρατηρηθεί ότι ανάλογα με το είδος των προϊόντων και την προέλευση τους οι προσταγλαδίνες και οι θρομβοξάνες μπορούν να συμβάλουν είτε σε θετικές είτε σε αρνητικές λειτουργίες στην υγεία του ανθρώπου [2].

## *A.2. Επίδραση της κυκλοοξυγονάσης στον ανθρώπινο οργανισμό*

### *A.2.1. Επίδραση στο γαστρεντερικό σύστημα*

Η δράση της κυκλοοξυγονάσης, φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στο γαστρεντερικό σύστημα. Πιο συγκεκριμένα, στο στομάχι ενός ανθρώπου βρίσκονται σε μεγάλο βαθμό οι PGE<sub>2</sub> και PGF<sub>2a</sub>, ενώ σε μικρότερες ποσότητες βρίσκονται τα PGD<sub>2</sub> και PGI<sub>2</sub> [9]. Από μελέτες που έχουν γίνει, στις οποίες χορηγούνταν οι προσταγλαδίνες που βρίσκονται στο στομάχι, φαίνεται ότι τα PGE<sub>2</sub> και PGI<sub>2</sub>, μειώνουν την έκκριση πεψίνης [10],[11], ενώ η PGE<sub>2</sub>, μειώνει επίσης την έκκριση διττανθρακικού από τα κύτταρα του γαστρεντερικού τοιχώματος [2]. Επομένως, οι προσταγλαδίνες μειώνουν την έκκριση των οξέων του στομάχου και διατηρούν την οξύτητα των στομαχικών υγρών σε επιθυμητά επίπεδα.

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι η χρήση των COX παρεμποδιστών θα δημιουργούσε πρόβλημα στο γαστρεντερικό σύστημα, όπως έλκος, γιατί θα μειώνονταν οι προσταγλαδίνες του στομάχου και κατά συνέπεια θα αυξάνονταν οι ενώσεις οι οποίες θα δημιουργούσαν γαστρεντερικό υγρό με χαμηλό pH. Πράγματι, η χρήση COX παρεμποδιστών σε πειραματόζωα, είχε σαν αποτέλεσμα την δημιουργία εκδορών και ελκών στο στομάχι και στο λεπτό έντερο των πειραματόζωων. Ωστόσο παρατηρήθηκε ότι παρόλο που τα επίπεδα των προσταγλαδινών μειώθηκαν, η έκκριση οξέων ήταν ίδια και στα πειραματόζωα που είχαν λάβει COX παρεμποδιστή, και σε αυτά που δεν είχαν λάβει [12]. Επομένως, η δράση της κυκλοοξυγονάσης είναι σημαντική στο γαστρεντερικό σύστημα και δεν είναι επιθυμητή η παρεμπόδιση του, χωρίς ωστόσο να είναι γνωστός ο μηχανισμός δράσης της κυκλοοξυγονάσης στο στομάχι [2].

Ένα άλλο σημαντικό γεγονός, είναι ότι οι προσταγλαδίνες που παράγονται σε ένα υγιές γαστρεντερικό σύστημα οφείλονται στην κυκλοοξυγονάση-1 [7]. Παραγωγή προσταγλαδινών από την COX-2 παρατηρούνται στο στομάχι μόνο σε περιπτώσεις μόλυνσης και φλεγμονής του στομάχου. Κατά συνέπεια η χρήση επιλεκτικών COX-2 παρεμποδιστών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αντιμετώπιση φλεγμονών σε οποιοδήποτε σημείο του σώματος ενός ανθρώπινου οργανισμού, χωρίς να επηρεαστεί η κανονική λειτουργία του στομάχου [2],[7],[8].

Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι η δράση της κυκλοοξυγονάσης επηρεάζει την κινητικότητα του γαστρεντερικού σωλήνα. Οι προσταγλαδίνες που υπάρχουν στο στομάχι, εκτός από την μείωση των οξέων και διατήρηση της ποιότητας του γαστρεντερικού σωλήνα, προκαλούν συστολές και διαστολές στον γαστρεντερικό σωλήνα, βοηθώντας κατά αυτόν τον τρόπο την πέψη. Πιο συγκεκριμένα η PGE<sub>2</sub> προκαλεί συστολή του διαμήκη μυ του γαστρεντερικού σωλήνα και χαλάρωση του κυκλικού μυ, ενώ η PGF<sub>2a</sub> προκαλεί συστολή και των μυών. Επομένως, με σύνθεση διαφορετικών ποσοτήτων των συγκεκριμένων προσταγλαδινών, πραγματοποιείται μία διαφορετική κίνηση του γαστρεντερικού σωλήνα. Ωστόσο δεν είναι γνωστό εάν η

δράση της COX-1 ή της COX-2, συμβάλει στην σύνθεση των προσταγλαδίνων που προκαλούν την κίνηση του γαστρεντερικού σωλήνα και θα πρέπει να μελετηθεί [13].

#### *A.2.2. Επίδραση στον καρκίνο του παχέος εντέρου και άλλων μορφών καρκίνου*

Ο ρόλος της κυκλοοξυγονάσης στον καρκίνο του παχέος εντέρου έχει μελετηθεί διεξοδικά και το σύνολο των μελετών έχουν δείξει ότι η COX-2 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο [3],[7],[14],[15].

Σε πρώτες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σχετικά με το ζήτημα αυτό ελέγχθηκαν οι ποσότητες των προσταγλαδίνων και των θρομβοξανών περιέχονταν στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου και τι σχέση έχουν οι ποσότητες αυτές σε σχέση με τα υγιή κύτταρα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η PGE<sub>2</sub> είναι διπλάσια σε ποσότητα στα καρκινικά κύτταρα από ότι στα φυσιολογικά, η PGI<sub>2</sub> ήταν υποτριπλάσια, ενώ και στα δύο είδη κυττάρων, περιέχονταν η ίδια ποσότητα από τα PGF<sub>2a</sub> και TXA<sub>2</sub> [16],[17],[18],[19]. Κατά συνέπεια η έκφραση των ενζύμων του μεταβολικού μονοπατιού της κυκλοοξυγονάσης είναι διαφορετική στα καρκινικά από ότι στα υγιή κύτταρα.

Περαιτέρω μελέτες, έδειξαν ότι η διαφορά αυτή στα προϊόντα οφείλεται στην αυξημένη έκφραση της κυκλοοξυγονάσης. Δείγματα από καρκινώματα του παχέος εντέρου λήφθηκαν και παρατηρήθηκε ότι ενώ η έκφραση της COX-1 ήταν ίδια σε σχέση με τα υγιή κύτταρα, η έκφραση της COX-2 ήταν αυξημένη κατά 2 έως 50 φορές σε σχέση με τα υγιή κύτταρα του ίδιου ασθενούς, ανάλογα με την περιοχή του καρκινώματος [20],[21]. Η μελέτη του καρκίνου του παχέος εντέρου πάνω σε πειραματόζωα επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα αυτά [22],[23],[24]. Επομένως, η COX-2 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον καρκίνο του παχέος εντέρου.

Η επιβεβαίωση του γεγονότος ότι η COX-2 επηρεάζει σημαντικά τον καρκίνο του παχέος εντέρου, οδήγησε τους ερευνητές στην μελέτη της συμπεριφοράς των καρκινωμάτων με μειωμένη έκφραση της COX-2. Στις μελέτες που ακολουθήσαν επιχειρήθηκε η μείωση της έκφρασης της COX-2, με παρεμπόδιση του ενζύμου με φάρμακο-παρεμποδιστή [25], και οι μελέτες αυτές πραγματοποιήθηκαν είτε *in vitro* με καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου [26],[27], είτε σε πειραματόζωα [28], είτε σε ασθενείς [29],[30],[31]. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η μείωση της έκφρασης της COX-2 είχε σαν αποτέλεσμα να μειωθεί η ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, ενώ στα πειραματόζωα τα καρκινώματα και οι πολύποδες μειώθηκαν σε σημαντικό βαθμό. Μάλιστα παρατηρήθηκε σε πληθυσμιακές μελέτες, ότι οι άνθρωποι που χρησιμοποιούσαν τακτικά μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα είχαν 40-50% μικρότερες πιθανότητες να εμφανίσουν καρκίνο του παχέος εντέρου [7],[26],[27],[28],[30].

Συμπερασματικά η COX-2 σχετίζεται άμεσα με τον καρκίνο του παχέος εντέρου, επομένως, είναι σημαντική η παρεμπόδιση της για μείωση του κινδύνου και για πιθανή αντιμετώπιση του καρκίνου του παχέος εντέρου.

#### *A.2.3. Η επίδραση της κυκλοοξυγονάσης στην φλεγμονή*

Η κυκλοοξυγονάση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και στις φλεγμονές. Πιο συγκεκριμένα οι προσταγλαδίνες και συγκεκριμένα η PGE<sub>2</sub> συμβάλει στην φλεγμονή καθώς είναι υπεύθυνη στην εκπομπή τριών σημάτων φλεγμονής: στο πρήξιμο, το κοκκίνισμα και τον πόνο.

Όταν πραγματοποιηθεί μία φλεγμονώδη προσβολή, παρατηρείται αύξηση της παραγωγής της PGE<sub>2</sub> η οποία οφείλεται στην αυξημένη λειτουργία της κυκλοοξυγονάσης. Χάρη στις αγγειοδιασταλτικές ιδιότητες που έχει η PGE<sub>2</sub>, τα αγγεία που βρίσκονται στην περιοχή της φλεγμονής διαστέλλονται, με αποτέλεσμα να διέρχεται από το σημείο αυτό μεγαλύτερη ποσότητα αίματος και κατά συνέπεια η περιοχή αυτή να γίνεται πιο ερυθρή (κοκκίνισμα). Επιπλέον, η PGE<sub>2</sub> μαζί με άλλους διαλυτούς παράγοντες, όπως οι κιτοκίνες, τα προϊόντα βακτηριδιακής φύσης, τα προϊόντα που προκύπτουν ύστερα από την αντίδραση μεταβολιτών με το οξυγόνο καθώς επίσης και τα ενδιάμεσα προϊόντα των λιπών αυξάνουν την διαπερατότητα των αγγείων με αποτέλεσμα το πλάσμα του αίματος να εξέρχεται από τα αγγεία και να προκαλείται πρήξιμο στο σημείο της φλεγμονής. Τέλος η PGE<sub>2</sub> είναι ένας ισχυρός διαβιβαστής η οποία συμβάλει στην εμφάνιση πυρετού.

Οι λειτουργίες αυτές της PGE<sub>2</sub> είναι επιθυμητές, ωστόσο υπάρχουν περιπτώσεις που η λειτουργίες της έχει δυσμενείς επιπτώσεις στον οργανισμό. Για παράδειγμα σε περιπτώσεις έντονων και χρόνιων πόνων καθώς επίσης σε περιπτώσεις αρθρικών φλεγμονών, δεν είναι επιθυμητή η λειτουργία της PGE<sub>2</sub>. Έχει παρατηρηθεί ότι στις περιπτώσεις αυτές η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων PGE<sub>2</sub> οφείλεται στην μεγάλη έκφραση της COX-2 που παρατηρείται στις περιοχές αυτές. Επομένως, η παρεμπόδιση της COX-2 μπορεί να βοηθήσει στην ανακούφιση των ατόμων που πάσχουν από οστεοαρθρίτιδα, ρευματοειδή αρθρίτιδα και από άλλες χρόνιες φλεγμονές [2],[7].

#### *A.2.4. Επίδραση της κυκλοοξυγονάσης σε άλλα μέρη του σώματος*

Η δράση της κυκλοοξυγονάσης έχει επίσης σημαντικές επιδράσεις και σε άλλα σημεία του σώματος του ανθρώπινου οργανισμού, καθώς παράγονται προσταγλαδίνες και θρομβοξάνες οι οποίες συμμετέχουν, άλλοτε σε σημαντικότερο βαθμό και άλλοτε σε λιγότερο σημαντικό βαθμό σε διάφορες λειτουργίες.

Στο καρδιαγγειακό σύστημα για παράδειγμα, η κυκλοοξυγονάση συμμετέχει στην συστολή και διαστολή των αγγείων όποτε αυτό είναι επιθυμητό. Ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν, συνθέτονται τα αντίστοιχα προϊόντα από την κυκλοοξυγονάση, προκειμένου να προκληθεί συστολή ή διαστολή των αγγείων [2].

Στην αναπαραγωγική λειτουργία, οι προσταγλαδίνες που παράγονται από την κυκλοοξυγονάση βοηθούν στην γονιμότητα, και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία του τοκετού. Πιο συγκεκριμένα, κατά την διάρκεια του τοκετού, έχει παρατηρηθεί σημαντική αύξηση των προσταγλαδίνων, οι οποίες βοηθούν στο να πραγματοποιηθεί κανονικά ο τοκετός [2].

Στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζονται συνοπτικά οι προσταγλαδίνες που παράγονται σε κάθε περίπτωση καθώς και η επίδραση τους:

**Πίνακας 1:** Προϊόντα που εκφράζονται σε κάθε όργανο και οι λειτουργίες που επιτελούν [2]

Tissue/Organ	Mediators	Effects
Female Reproductive Organs	PGE <sub>2</sub> , PGF <sub>2α</sub>	Uterine Contraction, Oxytocic Action
Male Reproductive Organs	PGE <sub>2</sub> , PGF <sub>2α</sub>	Fertility
Cardiovascular System	TXA <sub>2</sub> , PGI <sub>2</sub> TXA <sub>2</sub> PGE <sub>2</sub> , PGI <sub>2</sub> TXA <sub>2</sub> , PGF <sub>2α</sub> PGE <sub>2</sub> , PGI <sub>2</sub>	Thrombosis, Platelet Aggregation Vascular Permeability Arterial Vasodilation Venous vasoconstriction Patency of the Fetal Ductus Arteriosus
Respiratory System	PGE <sub>2</sub> PGF <sub>2α</sub> , TXA <sub>2</sub>	Bronchodilation Bronchoconstriction
Renal System	PGE <sub>2</sub> , PGI <sub>2</sub> PGE <sub>2</sub> , PGI <sub>2</sub> PGE <sub>2</sub>	Regulation Renal Blood Flow and Glomerular Filtration Rate Renin Release Inhibition Hydroosmotic Effect of ADH
Gastrointestinal System	PGE <sub>2</sub> , PGI <sub>2</sub>	Cytoprotection
Immune System	PGE <sub>2</sub> , PGI <sub>2</sub>	Inhibition T and B lymphocyte activation and proliferation
Central Nervous System	PGE <sub>2</sub> PGD <sub>2</sub> PGE <sub>2</sub> , PGI <sub>2</sub>	Fever Sleep Pain

### A.3. Συμπεράσματα από την λειτουργία της κυκλοοξυγονάσης

Όπως αναλύθηκε διεξοδικά παραπάνω, η κυκλοοξυγονάση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε όλα σχεδόν τα όργανα, ενός ανθρώπινου οργανισμού. Σε κάποιες περιπτώσεις είναι απαραίτητη η λειτουργία της για την σωστή λειτουργία του οργανισμού ενώ σε άλλες περιπτώσεις είναι μη επιθυμητή. Στην συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων οι μη επιθυμητές δράσεις της κυκλοοξυγονάσης

οφείλονται στην COX-2 ενώ οι επιθυμητές στην COX-1. Μάλιστα σε έναν υγιή άνθρωπο, η COX-2 δεν συντίθεται, σε αντίθεση με την COX-1 η οποία βρίσκεται σχεδόν σε όλους τους ιστούς ενός ανθρώπινου οργανισμού.

Επομένως, είναι απαραίτητη η παρεμπόδιση της COX-2, χωρίς όμως να παρεμποδίζεται η COX-1. Ένας επιλεκτικός παρεμποδιστής, θα είχε σαν αποτέλεσμα την παρεμπόδιση των αρνητικών επιπτώσεων που οφείλονται στην COX-2, χωρίς ωστόσο να επηρεάζεται η ομαλή λειτουργία του οργανισμού, που οφείλεται στην δράση της COX-1.

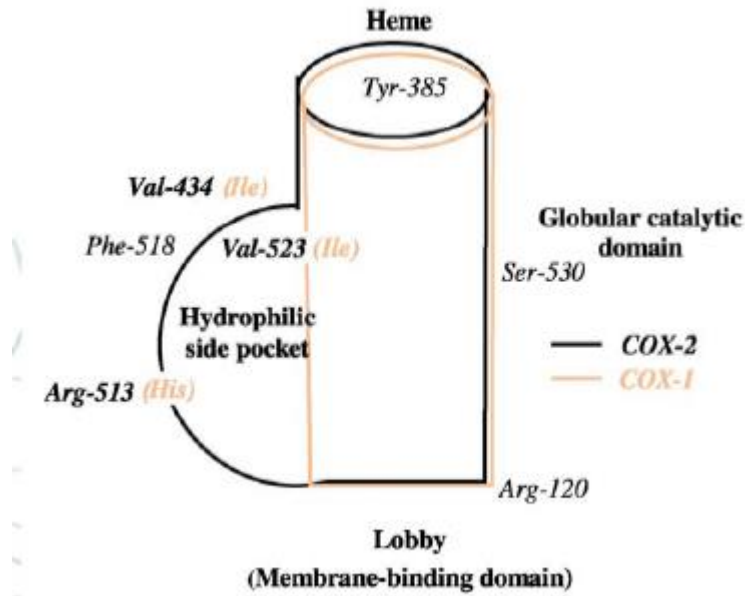
Προκειμένου όμως να συντεθούν φάρμακα τα οποία παρεμποδίζουν την δράση της COX-2, χωρίς να επηρεάζουν την COX-1, θα πρέπει να είναι γνωστές οι διαφορές που έχουν τα δύο αυτά ένζυμα. Γνωρίζοντας αυτές τις διαφορές, είναι δυνατόν να συντεθούν χημικά μόρια με τέτοια χαρακτηρισήκηκα, ώστε να προσδένονται ισχυρά στην COX-2 και πολύ λίγο ή καθόλου στην COX-1.

#### *A.4. Η αλληλουχία των αμινοξέων και το ενεργό κέντρο της κυκλοοξυγονάσης*

Η αλληλουχία των αμινοξέων ανάμεσα στην COX-1 και την COX-2 είναι ίδια κατά περίπου 60-65% [1],[2]. Οι δύο μορφές, οι οποίες απομονώθηκαν από ενήλικο θηλαστικό, αποτελούνται από 576 και 587 αμινοξέα αντίστοιχα [1]. Υπάρχουν διάφορες αλλαγές στο εσωτερικό της αλυσίδας των δύο ισομορφών, όμως η κυριότερη διαφορά εντοπίζεται στην αρχή και στο τέλος των δύο πεπτιδικών αλυσίδων. Η COX-1 έχει στο αμινικό της άκρο 17 αμινοξέα τα οποία δεν εντοπίζονται στην COX-2, ενώ στην COX-2 υπάρχουν 18 αμινοξέα τα οποία δεν βρίσκονται στην πεπτιδική αλυσίδα της COX-1 [2].

Παρά τις αρκετές διαφορές που παρουσιάζουν στην αλληλουχία των αμινοξέων τους, οι δύο ισομορφές έχουν ενεργό κέντρο που διαφέρει σε μικρό βαθμό. Πιο συγκεκριμένα, τα αμινοξέα που διαφέρουν ανάμεσα στο ενεργό κέντρο της COX-1 και COX-2 βρίσκονται στις θέσεις 513 και 523. Στην θέση 513 η COX-1 περιέχει μία ισολευκίνη, ενώ η COX-2 περιέχει μία βαλίνη, και στην θέση 523 η COX-1 περιέχει μία ιστιδίνη ενώ η COX-2 περιέχει μία αργινίνη. Το διαφορετικό αμινοξύ στην θέση 523, έχει σαν αποτέλεσμα, την αύξηση του ενεργού κέντρου της COX-2 κατά 20% (Σχήμα 3) σε σχέση με την COX-1, ενώ η αργινίνη 513 που περιέχει η δεύτερη ισομορφή μπορεί να αλληλεπιδράσει με πολικά τμήματα μορίων [1].

Επιπλέον, μία ακόμα αλλαγή, η οποία δεν περιέχεται στο ενεργό κέντρο της κυκλοοξυγονάσης, οδηγεί σε μεγαλύτερο ενεργό κέντρο για την COX-2. Πιο συγκεκριμένα η αντικατάσταση της ισολευκίνης στην θέση 434 στην COX-1 με βαλίνη στην COX-2, έχει σαν αποτέλεσμα να αλλάξει την γειτονική διάταξη των αμινοξέων, κάτι που οδηγεί σε αύξηση του ενεργού κέντρου της κυκλοοξυγονάσης [1].



Σχήμα 3: Το ενεργό κέντρο των δύο ισομορφών της κυκλοοξυγονάσης [1]

#### A.5. Χαρακτηριστικοί δεσμοί που πρέπει να έχουν οι παρεμποδιστές με την COX-2

Με βάση τις αλλαγές που παρουσιάζουν οι δύο πρωτεΐνες, προκύπτει ότι το ενεργό κέντρο της COX-2 έχει μεγαλύτερο ενεργό κέντρο σε σχέση με την COX-1, καθώς διαθέτει μία υδροφιλική πλευρική ‘τσέπη’, που δεν υπάρχει στην COX-1. Η ‘τσέπη’ αυτή σχηματίζεται από τα εξής αμινοξέα: από την αργινίνη της θέσης 513, από την βαλίνη της θέσης 523, την ιστιδίνη της θέσης 90 και την φαινοαλανίνη της θέσης 528. Επομένως, ένας παρεμποδιστής για να έχει πιθανότητες να είναι παρεμποδιστής μόνο για την COX-2, θα πρέπει είτε να είναι ογκώδης, σε τέτοιο βαθμό ώστε να μπορεί να εισέλθει στο ενεργό κέντρο της COX-2 χωρίς να μπορεί να εισέλθει στο ενεργό κέντρο της COX-1, είτε να παρουσιάζει ισχυρούς δεσμούς στην υδροφιλική ‘τσέπη’ [1].

Μελέτες που έχουν γίνει (*in silico* και *in vitro*) έχουν δείξει ότι μόρια τα οποία σχηματίζουν δεσμούς με την ιστιδίνη της θέσης 90, είτε με την αργινίνη της θέσης 513 είναι πιθανοί παρεμποδιστές. Μάλιστα η αργινίνη της θέσης 513 είναι ένα αμινοξύ κλειδί, καθώς το αμινοξύ αυτό διαφέρει στην COX-1 όπως προαναφέρθηκε και ο σχηματισμός δεσμού υδρογόνου στο αμινοξύ αυτό με το μόριο σταθεροποιεί την πρόσδεση του μορίου [32-37]

## A.6. Μοριακή μοντελοποίηση

Μοριακή μοντελοποίηση, ονομάζεται η *in silico* μελέτη της τρισδιάστατης μορφής ενός μορίου και περιλαμβάνει τη μελέτη πρόσδεσής του με έναν πρωτεϊνικό στόχο. Ο στόχος αυτός μπορεί να είναι ένα ένζυμο ή ένας υποδοχέας. Στην φαρμακευτική χημεία, η μοριακή μοντελοποίηση χρησιμοποιείται, προκειμένου να αναζητηθούν μόρια τα οποία προσδέονται ισχυρά σε ένα ένζυμο ή υποδοχέα με ευεργετικές επιπτώσεις στον ανθρώπινο οργανισμό [38].

Ο συνδυασμός της φαρμακευτικής χημείας με την μοριακή μοντελοποίηση είναι σημαντικός προκειμένου να εξοικονομηθεί χρόνος και οικονομικοί πόροι. Αρχικά, στην αναζήτηση ενός φαρμακευτικού μορίου-παρεμποδιστή, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η μοριακή μοντελοποίηση. Κατά αυτόν τον τρόπο θα μελετηθούν μία σειρά από μόρια και θα ελεγχθεί εάν είναι υποσχόμενα για να παρεμποδίσουν το ένζυμο στόχο. Η διαδικασία αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί σε πολύ μικρό χρόνο και χωρίς να καταναλωθούν πόροι από την χρήση αντιδραστηρίων για την σύνθεση ενός μορίου το οποίο μπορεί ακόμη και να μην είναι ικανό να παρεμποδίσει το ένζυμο στόχο. Με την μοριακή μοντελοποίηση επομένως, θα γίνει *in silico* μελέτη για το ποια μόρια μπορούν να προσδεθούν ισχυρά με το ένζυμο και κατά συνέπεια έχουν μεγάλες πιθανότητες να παρεμποδίσουν το συγκεκριμένο ένζυμο.

Αφού ολοκληρωθεί η *in silico* μελέτη, ξεκινά η σύνθεση των υποσχόμενων μορίων με βάση τους κανόνες της φαρμακευτικής χημείας. Ο χρόνος και το κόστος έχουν μειωθεί σημαντικά, καθώς μόνο μερικά μόρια από το σύνολο των μορίων που μελετήθηκαν θα συντεθούν. Τα μόρια που συντίθενται μελετώνται για το αν έχουν την δυνατότητα να παρεμποδίσουν το ένζυμο-στόχο. Εάν η παρεμπόδιση είναι εφικτή, η διαδικασία προχωρά στα επόμενα στάδια, προκειμένου να ελεγχθεί εάν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φάρμακο [38], [39].

### A.6.1. Ο ρόλος της τρισδιάστατης μορφής- Υπολογισμός της ενέργειας μίας τρισδιάστατης δομής

Η τρισδιάστατη δομή ενός μορίου παίζει σημαντικό ρόλο στις βιολογικές και φυσικοχημικές ιδιότητες των μορίων. Η διάταξη που παίρνουν τα μόρια στον χώρο, πρέπει να είναι τέτοια ώστε να ταιριάζει με την αντίστοιχη δομή του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης, προκειμένου να εισέλθει σε αυτό και το σύστημα να έχει την χαμηλότερη δυνατή ενέργεια, έχοντας όσον το δυνατόν περισσότερες αλληλεπιδράσεις. Θα πρέπει δηλαδή το μόριο και ο υποδοχέας να έχουν γεωμετρική και χημική συμπληρωματικότητα.

Στην μοριακή μοντελοποίηση επομένως, είναι σημαντικό εκτός από την διδιάστατη απεικόνιση του μορίου να είναι γνωστή ποια είναι η διαμόρφωση του



μορίου. Η διάταξη των ατόμων του μοριακού συστήματος στον χώρο μπορεί να βρεθεί υπολογίζοντας την δυναμική ενέργεια που θα έχει το μοριακό σύστημα. Ο υπολογισμός αυτός μπορεί να γίνει από τα λογισμικά μοριακής μοντελοποίησης, ωστόσο απαιτούν υπολογιστικό χρόνο. Η ενέργεια ενός μοριακού συστήματος μπορεί να υπολογιστεί με την βοήθεια δύο μεθοδολογιών: της κβαντικής μηχανικής και της μοριακής μηχανικής.

Σύμφωνα με την κβαντική μηχανική όλα τα ηλεκτρόνια των ατόμων του μοριακού συστήματος περιγράφονται αναλυτικά κατά τους υπολογισμούς της ενέργειας. Η περιγραφή των ηλεκτρονίων του συστήματος, μπορεί να υπολογίσει διάφορες ιδιότητες που έχουν σχέση με την κατανομή των ηλεκτρονίων, απαιτούν όμως αρκετό υπολογιστικό χρόνο και δεν προτιμώνται, κυρίως όταν απαιτείται ο υπολογισμός της ενέργειας ενός πολύπλοκου μοριακού συστήματος. Οι υπολογισμοί της κβαντικής μηχανικής χωρίζονται σε δύο υποκατηγορίες: στους εξ υπαρχής και στους ημιεμπειρικούς

Σύμφωνα με τους εξ υπαρχής υπολογισμούς, επιχειρείται να επιλυθεί η εξίσωση Schrodinger χωρίς να πραγματοποιηθεί καμία απλοποίηση. Κατά συνέπεια οι υπολογισμοί αυτοί είναι αρκετά δαπανηροί, καθώς απαιτούν τεράστιο υπολογιστικό χρόνο. Οι ημιεμπειρικοί υπολογισμοί αντίθετα, επιλύουν την εξίσωση Schrodinger με κάποιες απλοποιήσεις, ενώ επίσης χρησιμοποιούν ορισμένα πειραματικά δεδομένα. Επομένως, απαιτούν μικρό υπολογιστικό χρόνο, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις δίνουν καλύτερα αποτελέσματα από τους εξ υπαρχής υπολογισμούς, λόγω του γεγονότος ότι περιέχονται πειραματικά δεδομένα. Επομένως, ανάλογα με το μοριακό σύστημα του οποίου είναι επιθυμητό να υπολογιστεί η ενέργεια, και τα πειραματικά δεδομένα που είναι διαθέσιμα, επιλέγεται η κατάλληλη μέθοδος υπολογισμού

Η μοριακή μηχανική χρησιμοποιεί για τους υπολογισμούς της ενέργειας μία σημαντική παραδοχή. Την προσέγγιση Bohr-Oppenheimer. Σύμφωνα με την προσέγγιση αυτή, οι μάζες των πυρήνων είναι πολύ μεγαλύτερες από τις μάζες των ηλεκτρονίων και κατά συνέπεια όταν ένας πυρήνας μετακινείται στον χώρο τα ηλεκτρόνια προσαρμόζονται σε αμελητέο χρόνο στην νέα τους θέση. Επομένως, κατά τους υπολογισμούς σύμφωνα με την μοριακή μηχανική, αγνοούνται οι κινήσεις των ηλεκτρονίων και καταλήγει σε αποτελέσματα τα οποία είναι συναρτήσεων των θέσεων των πυρήνων των ατόμων.

Προκειμένου να γίνουν οι υπολογισμοί σύμφωνα με την μοριακή μηχανική, θα πρέπει να είναι γνωστές οι γενικές αρχές πάνω στην οποία βασίζεται. Σύμφωνα λοιπόν με την μοριακή μηχανική, τα ηλεκτρόνια και οι πυρήνες των σωματιδίων θεωρούνται ενιαία σωματίδια-σφαίρες, πάνω στις οποίες ασκούνται δυνάμεις από άλλα σωματίδια-σφαίρες. Επιπλέον, οι δεσμοί που σχηματίζονται ανάμεσα στα άτομα του μοριακού συστήματος συμπεριφέρονται σαν ελατήρια τα οποία υπακούουν στον νόμο του Hooke. Τέλος, η ενέργεια υπολογίζεται από την συνάρτηση των θέσεων των ατόμων στον χώρο, ενώ η αλληλεπίδραση μεταξύ των σωματιδίων-σφαιρών περιγράφεται από τους νόμους της κλασικής μηχανικής

Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με βάση την μοριακή μηχανική είναι παρόμοια με εκείνα της κβαντικής μηχανικής και απαιτούν πολύ μικρότερο υπολογιστικό χρόνο καθώς οι υπολογισμοί είναι πολύ πιο απλοί. Επομένως, επιλέγεται κυρίως αυτή η μέθοδος υπολογισμού της ενέργειας των μοριακών συστημάτων, ιδιαίτερα όταν το μοριακό σύστημα είναι μεγάλο και πολύπλοκο. Το μόνο μειονέκτημα σε σχέση με τους υπολογισμούς της κβαντικής μηχανικής είναι ότι δεν μπορεί να προβλέψει τις ιδιότητες οι οποίες σχετίζονται με το ηλεκτρονιακό νέφος του μοριακού συστήματος. Όταν απαιτούνται αυτές οι ιδιότητες, τότε είναι αναπόφευκτο να γίνουν οι υπολογισμοί με βάση την κβαντική μηχανική [39].

#### *A.6.2. Ελαχιστοποίηση της ενέργειας και της δομής του μοριακού συστήματος*

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η ενέργεια ενός μοριακού συστήματος εξαρτάται από την διάταξη που έχουν τα άτομα του συστήματος στον χώρο. Επομένως, σε ένα σύστημα  $N$  ατόμων, η ενέργεια του συστήματος είναι μία συνάρτηση  $3N$  καρτεσιανών συντεταγμένων (ή  $3N-6$  εσωτερικές συντεταγμένες) τα οποία σχηματίζουν την πολυδιάστατη επιφάνεια της δυναμικής ενέργειας (PES-Potential Energy Surfaces).

Η απεικόνιση της επιφάνειας της δυναμικής ενέργειας είναι αδύνατη, λόγω των πολλών μεταβλητών από την οποία εξαρτάται η δυναμική ενέργεια. Υπάρχουν ελάχιστες περιπτώσεις που μπορεί να απεικονιστεί η επιφάνεια αυτή. Παράδειγμα αποτελεί το μοριακό σύστημα δύο ατόμων αργού, όπου η δυναμική ενέργεια εξαρτάται μόνο από την απόσταση των δύο ατόμων.

Το γεγονός ότι η επιφάνεια αυτή δεν μπορεί να απεικονιστεί, δεν σημαίνει ότι διαφέρει από τις περιπτώσεις όπου μία επιφάνεια εξαρτάται από δύο ή τρεις μεταβλητές: η πολυδιάστατη αυτή επιφάνεια θα παρουσιάζει περιοχές όπου η ενέργεια θα είναι τοπικά μικρότερη (τοπικά ελάχιστα), ενώ επίσης θα υπάρχει κάποιο σημείο, όπου η ενέργεια θα είναι η μικρότερη από οποιοδήποτε άλλο σημείο (ολικό ελάχιστο). Θα πρέπει επομένως να προσδιοριστεί ποια είναι τα τοπικά αυτά ελάχιστα και σε ποια διάταξη των ατόμων αντιστοιχούν.

Το συγκεκριμένο πρόβλημα είναι γνωστό ήδη στα μαθηματικά. Μία συνάρτηση παρουσιάζει σε ένα σημείο τοπικό ή ολικό ελάχιστο, εάν η πρώτη παράγωγος της συνάρτησης στο σημείο αυτό ισούται με μηδέν ενώ η δεύτερη παράγωγος στο ίδιο σημείο είναι θετική. Επομένως, για να ελαχιστοποιηθεί η ενέργεια ενός μοριακού συστήματος μπορούν να χρησιμοποιηθεί το παραπάνω γεγονός. Δηλαδή γνωρίζοντας την συνάρτηση της δυναμικής ενέργειας του συστήματος, μπορεί να υπολογιστεί η πρώτη και η δεύτερη παράγωγος, προκειμένου να ληφθούν πληροφορίες για το σχήμα της επιφάνειας. Οι αλγόριθμοι που χρησιμοποιούνται για την εύρεση την πιο σταθερής διαμόρφωσης χρησιμοποιούν τα δεδομένα αυτά που λαμβάνονται για την συνάρτηση και τις παραγώγους της προκειμένου να βρουν κάποιο τοπικό ελάχιστο.

Πιο συγκεκριμένα ένας αλγόριθμος λαμβάνει μία αρχική κατάσταση του μοριακού συστήματος (που δίνεται από τον χρήστη). Στην συνέχεια ο αλγόριθμος, τροποποιεί τις συνθήκες αυτές, αλλάζοντας κάποιο ή κάποια από τα άτομα του μοριακού συστήματος και μελετάει την μεταβολή της ενέργειας που παρατηρείται καθώς επίσης και την μεταβολή της παραγώγου ή των παραγώγων. Όταν καταλήξει σε μία ικανοποιητική τιμή, τότε ο αλγόριθμος σταματάει και δίνει μία διάταξη η οποία είναι σχετικά σταθερή. Ένας αλγόριθμος επομένως εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από την αρχική τιμή που θα δοθεί από τον χρήστη, καθώς με διαφορετικές αρχικές τιμές, ένας αλγόριθμος μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικές τελικές τιμές. Επομένως, προκειμένου να βρεθούν όσο το δυνατόν παραπάνω τοπικά ελάχιστα, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν όσο το δυνατόν περισσότερα σημεία έναρξης.

Ανάλογα με το είδος των πληροφοριών που χρησιμοποιεί ένας αλγόριθμος, κατατάσσεται και σε διαφορετική κατηγορία. Αν ο αλγόριθμος χρησιμοποιεί την πρώτη παράγωγο για την εύρεση τοπικών ελαχίστων, τότε κατατάσσεται στην κατηγορία των αλγορίθμων πρώτης τάξης. Εάν χρησιμοποιεί και την δεύτερη παράγωγο, κατατάσσεται στην κατηγορία των αλγορίθμων δεύτερης τάξης, ενώ αν δεν χρησιμοποιεί πληροφορίες από την παράγωγο τότε κατατάσσεται στην κατηγορία αλγορίθμων μηδενικής τάξης.

Στην μοριακή μοντελοποίηση και συγκεκριμένα στην μελέτη πρόσδεσης είναι σημαντικό εκτός από την ποια είναι η πιο σταθερή διάταξη ενός μορίου, να βρεθεί και ποια είναι η πιο σταθερή διάταξη του συστήματος προσδέτης-υποδοχέας. Επομένως, εκτός από τον υπολογισμό της πιο σταθερής δομής του μοριακού συστήματος θα πρέπει να προσδιοριστεί και η πιο σταθερή δομή του συνολικού συστήματος. Επομένως κατά την διάρκεια μίας μελέτης πρόσδεσης υπολογίζεται αρχικά ποια είναι η πιο σταθερή δομή του μοριακού συστήματος και στην συνέχεια, η δομή αυτή τοποθετείται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, όπου επίσης πραγματοποιούνται μεταβολές στα άτομα του μορίου, προκειμένου να βρεθεί ποια είναι η διάταξη εκείνη του μορίου ώστε το συνολικό σύστημα να παρουσιάζει την ελάχιστη δυνατή ενέργεια, δηλαδή η πρόσδεση να είναι ισχυρή. Αυτό σημαίνει ότι ένα μόριο μπορεί να έχει τέτοια διάταξη στο εσωτερικό του ενζύμου, όπου να μην αντιστοιχεί στο ολικό ελάχιστο ή κάποιο τοπικό ελάχιστο, αλλά το συνολικό σύστημα να παρουσιάζει την ελάχιστη δυνατή ενέργεια [39].

#### *A.7. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού*

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (nuclear magnetic resonance spectrometry, NMR) είναι μία από τις σημαντικότερες μεθόδους προσδιορισμού μίας οργανικής ένωσης. Με την βοήθεια του NMR μπορεί να προσδιοριστούν οι οργανικές ενώσεις που έχουν συντεθεί στο εργαστήριο [40],[41].

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι οι πυρήνες παρουσιάζουν ορισμένες μηχανικές και μαγνητικές ιδιότητες. Πιο συγκεκριμένα, όλα τα σωματίδια ενός μορίου (πρωτόνια, νετρόνια, ηλεκτρόνια) έχουν spin. Το σημαντικότερο ωστόσο στην μέθοδο NMR είναι το πυρηνικό spin.

Σύμφωνα με την κβαντική θεωρία, το είδος της περιστροφής ενός σωματιδίου χαρακτηρίζεται από τιμές spin οι οποίες μπορεί να είναι είτε ακέραιες τιμές, είτε περιττά πολλαπλάσια του  $\frac{1}{2}$ :

$$I = 0, \frac{1}{2}, 1, \frac{3}{2}, \dots$$

Άτομα που έχουν στον πυρήνα τους ζυγό αριθμό σωματιδίων (συζευγμένα), έχουν πυρηνικό spin 0, ενώ άτομα που έχουν περιττό αριθμό σωματιδίων (μη συζευγμένα) έχουν πυρηνικό spin  $\frac{1}{2}$ . Με το NMR, μπορούν να προσδιοριστούν μόνο πυρήνες, οι οποίοι διαθέτουν πυρηνικό spin. Επομένως, μπορούν να προσδιοριστούν οι πυρήνες των ατόμων  $^1_1H$  και  $^{13}_6C$ , καθώς είναι ασύζευκτοι πυρήνες, ενώ οι πυρήνες των  $^{12}_6C$  και  $^{16}_8O$  δεν μπορούν να προσδιοριστούν καθώς είναι συζευγμένοι πυρήνες [41].

Η περιστροφή ενός πυρήνα έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία μαγνητικής ροπής η οποία δίνονται από την σχέση:

$$\mu = \gamma \sqrt{I(I + 1)} \hbar \quad (1)$$

Ο συντελεστής αναλογίας  $\gamma$ , ονομάζεται γυρομαγνητικός λόγος και από αυτόν τον λόγο εξαρτάται η αντίχρεση του πυρήνα. Οι πυρήνες που έχουν μεγάλο γυρομαγνητικό λόγο μπορούν πιο εύκολα να προσδιοριστούν από ότι οι πυρήνες που έχουν μικρό γυρομαγνητικό λόγο.

Ο προσανατολισμός της πυρηνικής μαγνητικής ροπής των πυρήνων σε ένα δείγμα είναι τυχαίος: ο κάθε πυρήνας έχει τυχαίο προσανατολισμό στον χώρο καθώς δεν υπάρχει κάποιος παράγοντας που να προσανατολίζει τα άτομα κατά κάποιο τρόπο και κατά συνέπεια δεν υπάρχει προσανατολισμός και στην μαγνητική ροπή των πυρήνων του δείγματος. Εάν όμως εφαρμοστεί ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο στο σύστημα,  $B_0$  τότε οι πυρήνες των ατόμων προσανατολίζονται κατά τέτοιο τρόπο, ώστε η πυρηνική μαγνητική ροπή να προσανατολίζεται είτε παράλληλα είτε αντιπαράλληλα στο εξωτερικό μαγνητικό πεδίο. Ο παράλληλος προσανατολισμός έχει χαμηλότερη ενέργεια σε σχέση με τον αντιπαράλληλο προσανατολισμό και κατά συνέπεια μεγαλύτερο ποσοστό πυρήνων προσανατολίζονται παράλληλα [40].

Εάν στο παραπάνω σύστημα, ακτινοβοληθεί με κατάλληλη ακτινοβολία χαμηλής συχνότητας (ραδιοκύματα), τότε οι ήδη προσανατολισμένοι πυρήνες απορροφούν την ενέργεια και μεταβαίνουν στην κατάσταση αντιπαράλληλου spin. Η μεταβολή αυτή δημιουργεί ένα σήμα το οποίο λαμβάνεται και ενισχύεται. Η συχνότητα της

ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που προκαλεί αυτή την αναστροφή spin ονομάζεται φαινόμενο συντονισμού και δίνεται από την σχέση:

$$\nu = \left| \frac{\gamma}{2\pi} \right| B_0 \quad (2)$$

Όπως φαίνεται και από την παραπάνω σχέση οι πυρήνες που έχουν μεγάλη τιμή γυρομαγνητικού λόγου, η συχνότητα συντονισμού είναι μεγαλύτερη και κατά συνέπεια μπορεί πιο εύκολα να ανιχνευτεί ο συγκεκριμένος πυρήνας.

Το φαινόμενο αυτό από μόνο του δεν είναι ικανό να δώσει πληροφορίες για το είδος της δομής μίας χημικής ένωσης καθώς οι ίδιοι πυρήνες (π.χ.  $^1H$ ) θα παρουσίαζαν την ίδια συχνότητα συντονισμού. Κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει όμως, καθώς οι ίδιοι πυρήνες δεν παρουσιάζουν την ίδια συχνότητα συντονισμού. Αυτό οφείλεται στο φαινόμενο της χημικής μετατόπισης.

Όλοι οι πυρήνες σε ένα μόριο περιβάλλονται από ηλεκτρόνια ενώ τα άτομα των μορίων σχηματίζουν έναν ή παραπάνω δεσμούς με γειτονικά άτομα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα οι πυρήνες του μορίου να μην αντιλαμβάνονται το ίδιο μαγνητικό πεδίο με αυτό που εφαρμόζεται, καθώς τα ηλεκτρόνια διαθέτουν επίσης spin, επομένως δημιουργούν έναν δικό τους μαγνητικό πεδίο. Έτσι το μαγνητικό πεδίο που αντιλαμβάνεται ο κάθε πυρήνας είναι διαφορετικός και μάλιστα μικρότερος από τον πραγματικό:

$$B = B_0 - B_e = B_0 - \sigma B_0 = B_0(1 - \sigma) \quad (3)$$

Όπου  $\sigma$ , η σταθερά προάσπισης, η οποία εξαρτάται από ηλεκτρονιακό νέφος. Όσο πιο πυκνό είναι το ηλεκτρονιακό νέφος γύρο από έναν πυρήνα τόσο μεγαλύτερη είναι η σταθερά προάσπισης. Οι πυρήνες μίας ένωσης, ανάλογα με τους δεσμούς που έχει κάνει, έχει διαφορετική πυκνότητα ηλεκτρονιακού νέφους και αντιλαμβάνεται διαφορετικό πεδίο. Επομένως η συχνότητα συντονισμού που αντιλαμβάνεται ο κάθε πυρήνας είναι διαφορετικός:

$$\nu = \left| \frac{\gamma}{2\pi} \right| (1 - \sigma) B_0 \quad (4)$$

Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται χημική μετατόπιση. Η χημική μετατόπιση δεν έχει κάποια απόλυτη κλίμακα. Μετράται με βάση μία σχετική κλίμακα  $\delta$  η οποία αυξάνεται από τα δεξιά προς τα αριστερά και ορίζεται ως εξής:

$$\delta = \frac{\Delta\nu}{\text{συχνότητα λειτουργίας οργάνου}} \quad (5)$$

Ως συχνότητα αναφοράς χρησιμοποιείται η συχνότητα μίας ένωσης αναφοράς, όπως για παράδειγμα το τετραμέθυλοσιλάνιο [40],[41].

Ένα άλλο φαινόμενο που επίσης παρατηρείται είναι το φαινόμενο σχάσης spin-spin. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η πυρηνική μαγνητική ροπή ενός πυρήνα, επηρεάζει τους πυρήνες των υπόλοιπων ατόμων του πυρήνα. Σε ένα φάσμα NMR το φαινόμενο αυτό παρουσιάζεται ως 'σπάσιμο' της κορυφής σε περισσότερα τμήματα. Ο αριθμός των κορυφών που δημιουργούνται εξαρτάται από τους γειτονικούς πυρήνες.

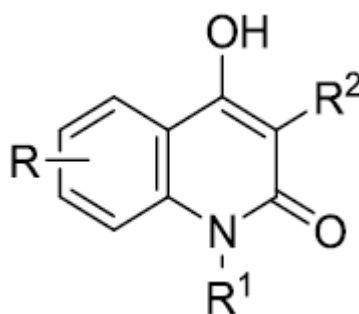
Η εξήγηση του φαινομένου αυτού είναι η εξής: η μαγνητική ροπή ενός πυρήνα, μπορεί να είναι παράλληλη ή αντιπαράλληλη με την αντίστοιχη μαγνητική ροπή ενός γειτονικού πυρήνα. Ανάλογα με τον προσανατολισμό, ο πυρήνας θα αντιλαμβάνεται διαφορετικό πεδίο και κατά συνέπεια η κάθε περίπτωση θα έχει διαφορετική μετατόπιση. Επομένως στην περίπτωση όπου ένας πυρήνας έχει ένα μόνο γειτονικό πυρήνα, θα εμφανιστούν 2 κορυφές (αρκετά κοντά η μία στην άλλη) για τον συγκεκριμένο πυρήνα, δηλαδή η κορυφή θα έχει διπλή πολλαπλότητα. Στην γενική περίπτωση ο αριθμός των κορυφών του κάθε πυρήνα δίνεται από την σχέση:

$$\text{Πολλαπλότητα} = 2nI + 1 \quad (6)$$

Όπου n, ο αριθμός των γειτονικών πυρήνων [40].

#### A.8. Κινολινόνες

Οι κινολινόνες είναι χημικές ενώσεις οι οποίες αποτελούνται από έναν αρωματικό δακτύλιο ο οποίος είναι ενωμένος με έναν επίσης αρωματικό ετελοκυκλικό δακτύλιο, ενώ οι δακτύλιοι αυτοί μπορούν να περιέχουν διάφορους υποκαταστάτες, ανάλογα την πηγή από την οποία προέρχονται.



Σχήμα 4: Η γενική δομή της 4-υδροxy-2-κινολινόνης

### A.8.1. Φυσικές πηγές

Οι κινολινόνες εμφανίζονται σε διάφορα φυτά, κυρίως ως ενδιάμεσα προϊόντα του μεταβολικού τους μονοπατιού. Για παράδειγμα η οικογένεια των ρυτοειδών (εσπεριδοειδή), περιέχουν μεγάλο αριθμό κινολινικών ενώσεων. Αποτελούν επομένως μία σημαντική φυσική πηγή κινολινικών ενώσεων [42]. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι διάφορες κινολινικές ενώσεις που βρίσκονται στην οικογένεια των ρυτοειδών:

**Πίνακας 2:** Περιεχόμενες κινολινικές ενώσεις στα διάφορα είδη της οικογένειας των ρυτοειδών [43]

Species <sup>a</sup>	Alkaloid <sup>b</sup>
<i>Almeidea rubra</i>	<i>rel</i> -(7 <i>R</i> ,8 <i>R</i> )-7-Acetoxy-8-[( <i>E</i> )-3-hydroxy-3-methylbut-1-enyl]-4,8-dimethoxy-5,6,7,8-tetrahydrofuro[2,3- <i>b</i> ]quinoline <sup>c</sup> <b>14</b> Isodutadrupine Isokokusagine <sup>c</sup> <b>17</b> Isokimmianine <sup>c</sup> <b>18</b> Kokusagine <b>8</b>
<i>Casimiroa pubescens</i>	Casimiroine
<i>Dictamnus albus</i>	Haplopine Robustine
<i>Esenbeckia almawillia</i>	<i>N</i> -Methyl-3,3-diprenylquinoline-2,4-dione <b>1</b>
<i>Evodia leptota</i>	Dictamnine <b>74</b> Evolitrine <b>22</b>
<i>Glycosmis arborea</i>	Acutifolin Glycocitlone C Isodictamnine <b>19</b> Iso- $\gamma$ -fagarine <b>20</b>
<i>Haplophyllum foliosum</i> and <i>H. pedicellatum</i>	(-)-Folipidine <sup>c</sup> <b>29</b>
<i>Orixa japonica</i>	Eduinine $\gamma$ -Fagarine <b>21</b> Isoplatydesmine Lunidonine Orixalone A <sup>c</sup> <b>4</b> Orixalone B <sup>c</sup> <b>5</b> Orixalone C <sup>c</sup> <b>6</b> (+)-Orixalone D <sup>c</sup> <b>7</b> Preskimmianine
<i>Sarcomelicope follicularis</i>	(-)-Sarcodifurine A <sup>c</sup> <b>23</b> (+)-Sarcodifurine B <sup>c</sup> <b>24</b>
<i>Skimmia laureola</i>	(-)-Acetylribalinine <sup>c</sup> <b>2</b> (+)-Ribaliprenylene <sup>c</sup> <b>3</b>
<i>Teclea natalensis</i>	Dictamnine 4,7-Dimethoxy-8-prenyloxyfuro[2,3- <i>b</i> ]quinoline <b>13</b> Flindersiamine (+)-Tecleanatalensine A (= tecleoxine) <b>12</b> Tecleanatalensine B <sup>c</sup> <b>11</b>
<i>Zanthoxylum beecheyanum</i> (= <i>Z. arnottianum</i> )	Flindersine <b>63</b> <i>N</i> -Methylatanine <i>N</i> -Methylflindersine <b>62</b> Toddaquinoline Zanthobunganine Zanthodioline
<i>Zanthoxylum budrunga</i> (= <i>Z. rhetsa</i> )	$\gamma$ -Fagarine <i>N</i> -Methylflindersine
<i>Zanthoxylum ekmanii</i>	Dictamnine Skimmianine <b>16</b>
<i>Zanthoxylum integrifolium</i>	$\gamma$ -Fagarine
<i>Zanthoxylum nitidum</i>	Haplopine

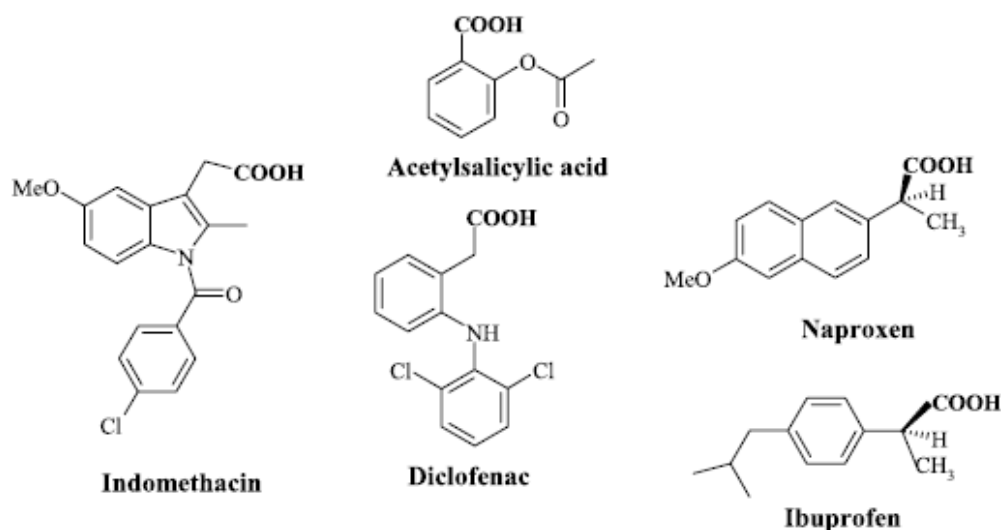
Οι κινολινόνες απαντώνται επίσης και σε διάφορους μικροοργανισμούς και ζώα. Πιο συγκεκριμένα στους μικροοργανισμούς *Pseudomonas aeruginosa* και

*Burkholderia thailandensis* έχει παρατηρηθεί ότι η 2,4-διυδροξυκινολινόνη αποτελεί συστατικό του μεταβολικού τους μονοπατιού [44],[45]. Επιπλέον το κινολινικό οξύ (Quinolinic acid) είναι ένα ενδογενές μεταβολικό συστατικό του καταβολισμού ορισμένων θηλαστικών [46].

#### A.9. Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (*non-steroidal anti-inflammatory drugs*)

Τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (*non-steroidal anti-inflammatory drugs* or NSAIDs), είναι ενώσεις οι οποίες έχουν ως στόχο να παρεμποδίσουν το ένζυμο της κυκλοοξυγονάσης [1]. Τα NSAIDs, δρουν ανταγωνίστηκα με το αραχιδονικό οξύ ως προς την πρόσδεση τους στην κυκλοοξυγονάση [47].

Το πρώτο NSAID που δημιουργήθηκε ήταν το μόριο του ακετυλοσαλικυλικού οξέος (ασπιρίνη). Η ασπιρίνη συντέθηκε για πρώτη φορά το 1899 προκειμένου να αντιμετωπίσει ασθένειες ρευματοπάθειας [1]. Η μεγάλη επιτυχία που είχε η ασπιρίνη, καθώς χρησιμοποιούνταν για την αντιμετώπιση πονοκεφάλου, διάφορων ειδών πόνου και φλεγμονών, είχε σαν αποτέλεσμα την σύνθεση μιας πληθώρας τέτοιων φαρμάκων με ευρεία κατανάλωση (Σχήμα 5). Μάλιστα το έτος 1998, μόνο στις Ηνωμένες πολιτείες της Αμερικής, 50 εκατομμύρια άνθρωποι αγόρασαν φάρμακα τέτοιου είδους ξοδεύοντας περίπου 5-10 δισεκατομμύρια δολάρια [7].



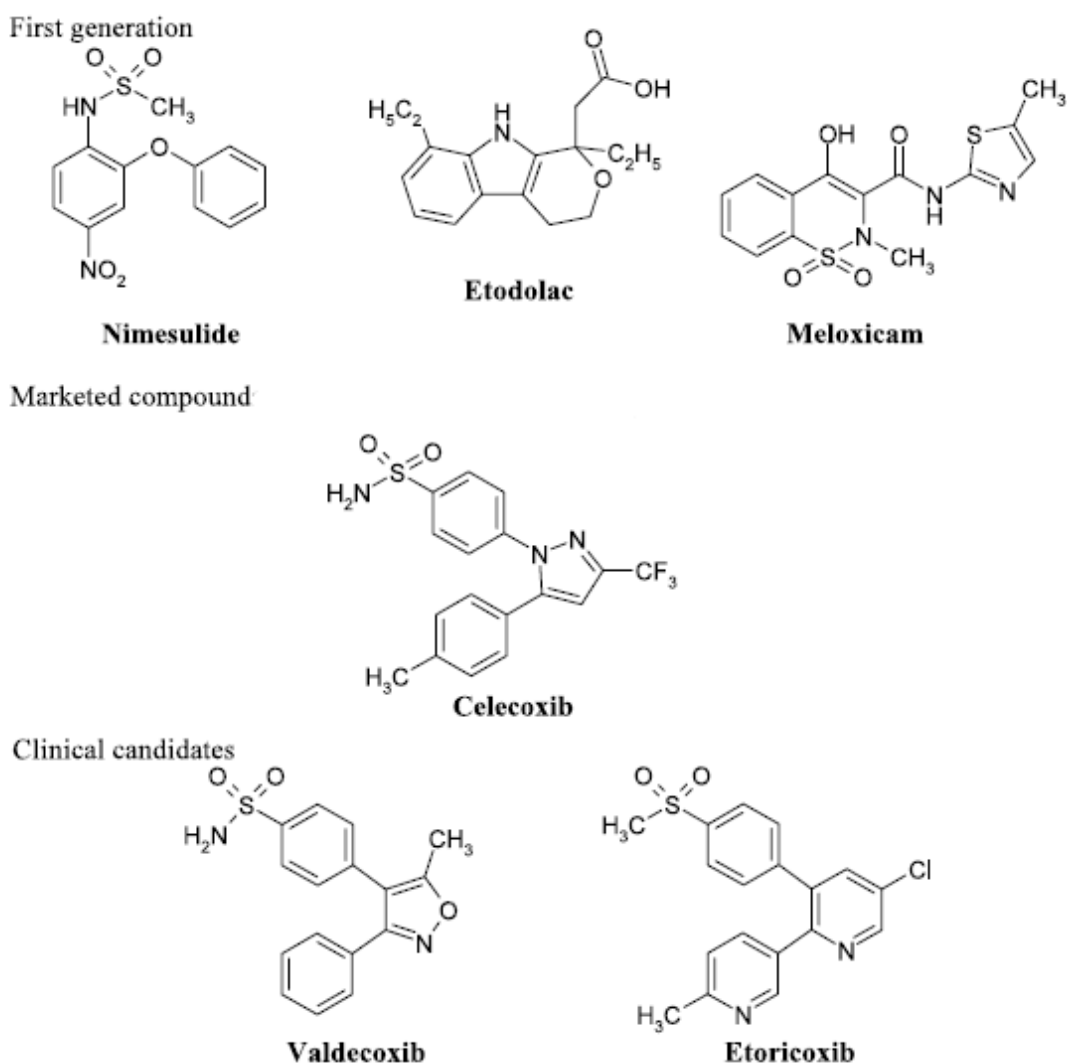
Σχήμα 5: Κοινά μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα [1]

Παρά την εκτεταμένη χρήση των NSAIDs, μέχρι το 1971 δεν ήταν γνωστός ο μηχανισμός δράσης τους. Τότε ανακαλύφθηκε ότι τα φάρμακα αυτά δρουν



παρεμποδίζοντας το ένζυμο της κυκλοοξυγονάσης [48]. Μάλιστα βρέθηκε ότι το σύνολο σχεδόν των NSAIDs σχηματίζουν έναν ιοντικό δεσμό με το αμινοξύ αργινίνη της θέσης 120 του ενζύμου της κυκλοοξυγονάσης [49].

Εκτός από τις ευεργετικές ιδιότητες που έχουν τα NSAIDs, παρουσιάζουν και ορισμένες παρενέργειες, όπως γαστρεντερικές διαταραχές, νεφρική τοξικότητα, ενώ η κατανάλωση μεγάλων δόσεων, έχουν σαν αποτέλεσμα την δημιουργία έλκους, αιμορραγίας ή ακόμη και θάνατο [50]. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα κλασσικά NSAIDs που συντέθηκαν παρεμπόδιζαν και τις δύο ισομορφές της κυκλοοξυγονάσης, καθώς όπως προαναφέρθηκε σχηματίζουν δεσμό με την αργινίνη της θέσης 120 η οποία βρίσκεται και στις δύο ισομορφές. Για τον λόγο αυτό, ξεκίνησε η δημιουργία μίας νέας γενιάς φαρμάκων, τα οποία θα παρεμπόδισαν την COX-2 χωρίς να παρεμποδίζουν την COX-1 ή να την παρεμποδίζουν σε πολύ μικρό βαθμό (Σχήμα 6). Δύο μόλις φάρμακα που είναι COX-2 παρεμποδιστές κυκλοφορούν στην αγορά (Celecoxib και Rofecoxib), πραγματοποιούνται όμως και κλινικές μελέτες προκειμένου να κυκλοφορήσουν νέα φάρμακα στην αγορά [1].



Σχήμα 6: COX-2 παρεμποδιστές [1]

Τελευταίες μελέτες έχουν δείξει ότι η χρήση COX-2 παρεμποδιστών, έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία ορισμένων προβλημάτων, κυρίως λόγω του ότι η κυκλοξυγονάση-2 λειτουργεί ως διασταλτικός παράγοντας. Επομένως, η παρεμπόδιση μόνο της COX-2 μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα σε ασθενείς, ιδιαίτερα καρδιοπαθείς [51]. Για τον λόγο αυτό εξετάζεται η δημιουργία φαρμάκων τα οποία είναι ταυτόχρονα παρεμποδιστές της COX-2 και της λιποξυγενάσης-5 (5-LOX), η οποία συνθέτει ενώσεις οι οποίες προκαλούν συστολή.

## B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### B.1. Μοριακή μοντελοποίηση

#### B.1.1. Επιλογή της κατάλληλης πρωτεΐνης-Μοντελοποίηση ανθρώπινης πρωτεΐνης

Προκειμένου να μελετηθεί η πρόσδεση των μορίων θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί μία ήδη υπάρχουσα κρυσταλλική μορφή της κυκλοοξυγονάσης-2. Στην βιβλιογραφία (pdb.org) ωστόσο δεν υπάρχει ανθρώπινη COX-2 σε κρυσταλλική μορφή, αλλά μόνο η αλληλουχία των αμινοξέων της. Επομένως θα πρέπει να μελετηθεί εάν η ανθρώπινη πρωτεΐνη είναι όμοια με τις πρωτεΐνες ζωικής προέλευσης. Η μελέτη αυτή μπορεί να γίνει με την βοήθεια της μοντελοποίησης.

Ως ζωική πρωτεΐνη που χρησιμοποιήθηκε προήλθε από τον οργανισμό *mus musculus* (pdb entry 1cx2). Η αλληλουχία της ανθρώπινης χρησιμοποιήθηκε επίσης από την ίδια πηγή (pdb entry 1n0x). Παρατηρώντας τις ακολουθίες των δυο αυτών πρωτεϊνών βρέθηκε ότι διαφέρουν κατά 90% περίπου, ενώ το ενεργό τους κέντρο έχει τα ίδια ακριβώς αμινοξέα. Εφόσον η διαφορά ήταν μικρή επιλέχθηκε με την βοήθεια της μοντελοποίησης να αλλαχθούν τα αμινοξέα που ήταν διαφορετικά στην ζωική πρωτεΐνη με τα αμινοξέα που περιέχονταν στην ανθρώπινη. Αυτό πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια κώδικα γλώσσας *python* (Παράρτημα E.1.). Σύμφωνα με τον κώδικα αυτό τα αμινοξέα στην κρυσταλλική δομή της ζωικής πρωτεΐνης αντικαταστάθηκαν με αυτά της ζωική και πραγματοποιήθηκε μια πρώτη ελαχιστοποίηση. Η διαδικασία στην συνέχεια πραγματοποιούσε μια ενεργειακή ελαχιστοποίηση προκειμένου να υπολογίσει ποια είναι η πιθανή θέση των νέων αμινοξέων στην κρυσταλλική δομή.

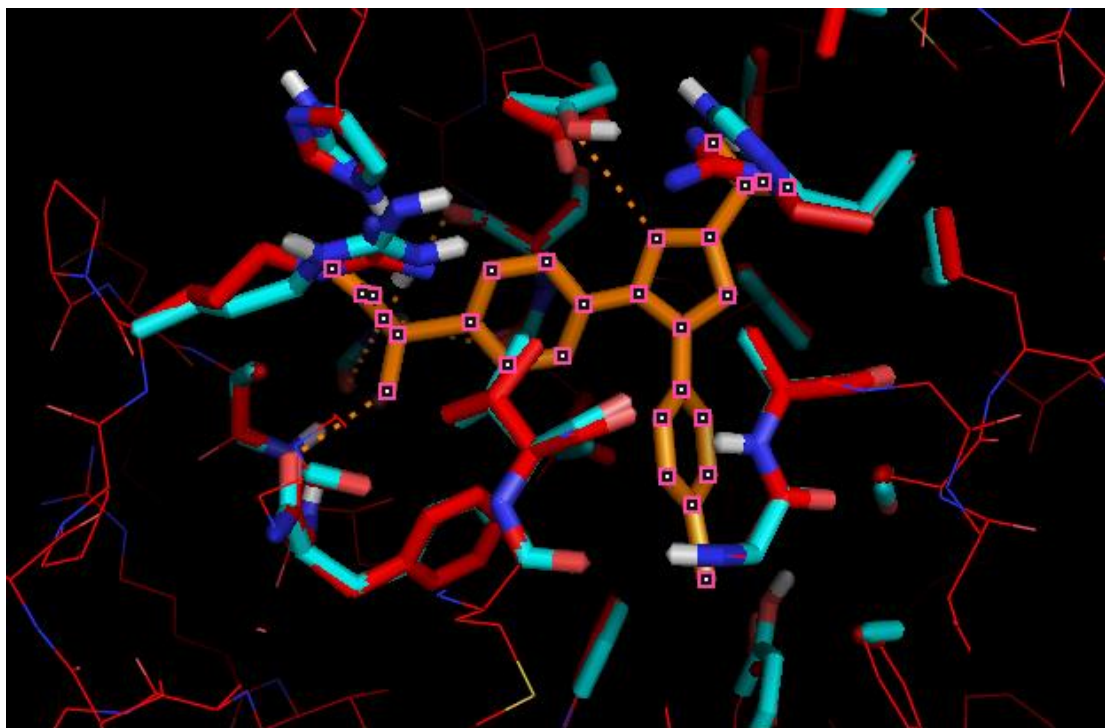
Μετά το τέλος της διαδικασίας δέκα ομόλογα μοντέλα είχαν σχεδιαστεί, τα οποία είχαν διαφορετική ενέργεια (Πίνακας 3). Από τις δομές που δημιουργήθηκαν επιλέχθηκε αυτή που είχε την χαμηλότερη τιμή ενέργειας (χαμηλότερο DOPE score), προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για την μοριακή πρόσδεση.

Πίνακας 3: Αποτελέσματα ομόλογων μοντέλων ανθρώπινης COX-2

```
>> Summary of successfully produced models:
```

Filename	molpdf	DOPE score	GA341 score
cox2human.B99990001.pdb	3996.90552	-67114.86719	1.00000
cox2human.B99990002.pdb	3874.61987	-67063.16406	1.00000
cox2human.B99990003.pdb	4232.56689	-66063.62500	1.00000
cox2human.B99990004.pdb	3965.27148	-66976.22656	1.00000
cox2human.B99990005.pdb	3619.73438	-67297.90625	1.00000
cox2human.B99990006.pdb	3826.43848	-66737.71094	1.00000
cox2human.B99990007.pdb	3950.38013	-66892.46875	1.00000
cox2human.B99990008.pdb	4133.55225	-67388.85938	1.00000
cox2human.B99990009.pdb	3839.50806	-66880.12500	1.00000
cox2human.B99990010.pdb	3867.86060	-67288.93750	1.00000

Με βάση τα αποτελέσματα, χαμηλότερη τιμή ενέργειας παρουσίαζε η δομή cox2human.B99990005.pdb. Ελέγχοντας τις δύο δομές, παρατηρήθηκε ότι τα δύο μόρια μεταξύ τους είχαν το ίδιο ακριβώς ενεργό κέντρο και τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου είχαν σε πολύ μεγάλο βαθμό την ίδια θέση.

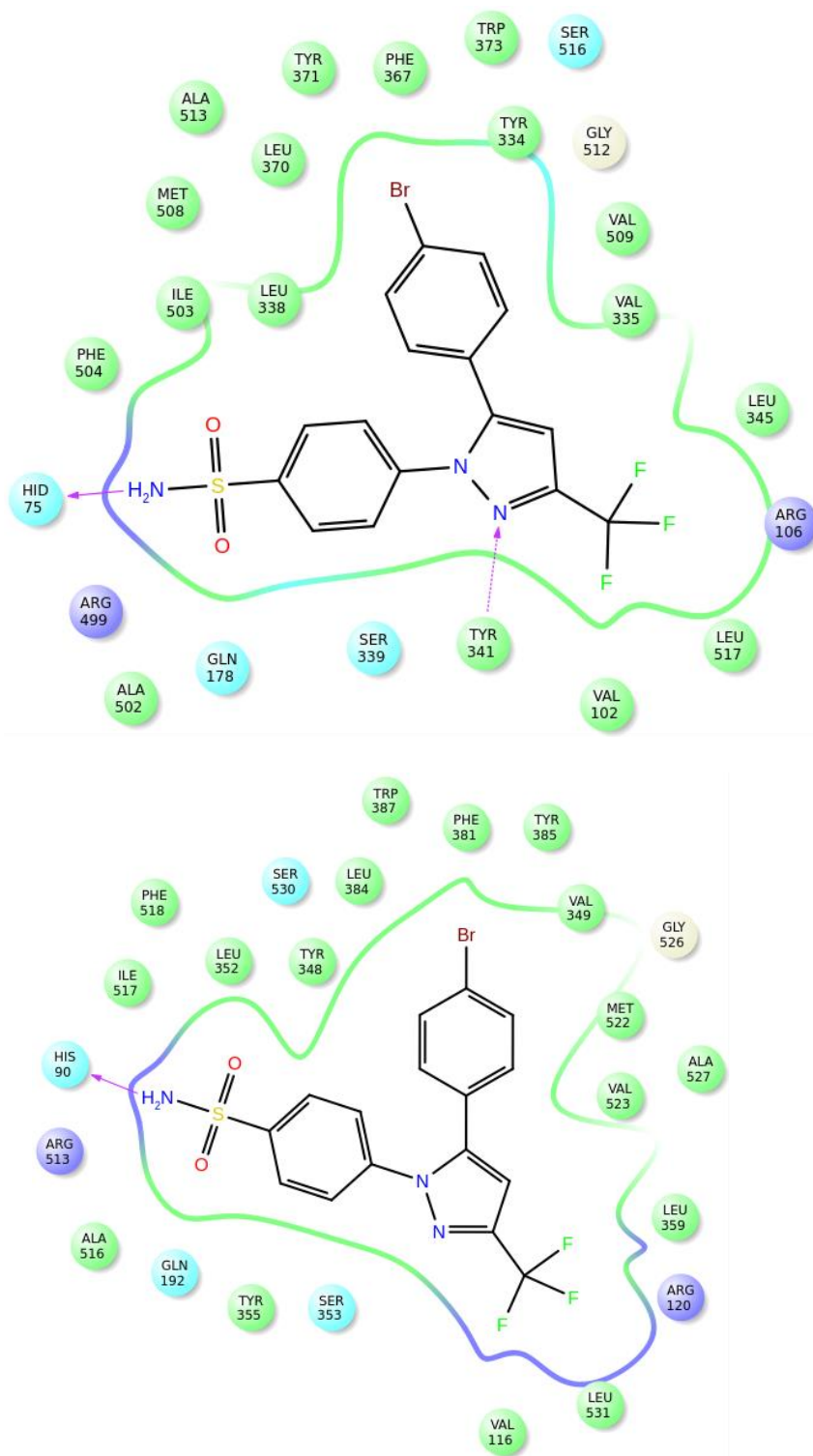


**Εικόνα 2:** Σύγκριση του ενεργού κέντρου των δύο κρυσταλλικών δομών. Με πορτοκαλί χρώμα απεικονίζεται ο παρεμποδιστής, με γαλάζιο χρώμα η κρυσταλλική πρωτεΐνη από τον οργανισμό *mus musculus* και με κόκκινο χρώμα η ανθρώπινη κρυσταλλική δομή που κατασκευάστηκε

Όπως φαίνεται και από την παραπάνω εικόνα τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου είναι τα ίδια ενώ βρίσκονται σε πολύ κοντινές θέσεις. Κατά συνέπεια, η λειτουργικότητα των δύο πρωτεϊνών πιθανόν να είναι όμοια.

Για να εξακριβωθεί ακόμα παραπάνω ότι οι δυο πρωτεΐνες είναι όμοιες ως προς την λειτουργικότητά τους, προστέθηκε στο ομόλογο μοντέλο που σχεδιάστηκε ο παρεμποδιστής που ήταν συγκρυσταλλωμένος στην ζωική πρωτεΐνη, καθώς επίσης και το μόριο της αίμης. Αφού πραγματοποιήθηκε η συγκεκριμένη διαδικασία, έγιναν διαδοχικές ελαχιστοποιήσεις έως ότου να μην παρατηρείται καμία αλλαγή και ελέγχθηκαν οι δεσμοί που σχηματίζονται ανάμεσα στον παρεμποδιστή και την πρωτεΐνη. Παρατηρήθηκε ότι και στις δύο δομές υπήρχε ο δεσμός ανάμεσα στο μόριο του παρεμποδιστή και στον κορμό του αμινοξέος ιστιδίνη 90 (η αρίθμηση στην περίπτωση του ομόλογου μοντέλου της ανθρώπινης πρωτεΐνης είναι διαφορετική από αυτή του κρυστάλλου) και μάλιστα η απόσταση του δεσμού είναι και στις δύο περιπτώσεις ίδιας περίπου απόστασης (2.11 Å στην ανθρώπινη πρωτεΐνη και 1.94 Å στην ζωική πρωτεΐνη). Επομένως η λειτουργία και των δυο πρωτεϊνών είναι ίδια και

μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε από τις δύο πρωτεΐνες για να μελετηθεί η πρόσδεση των μορίων.



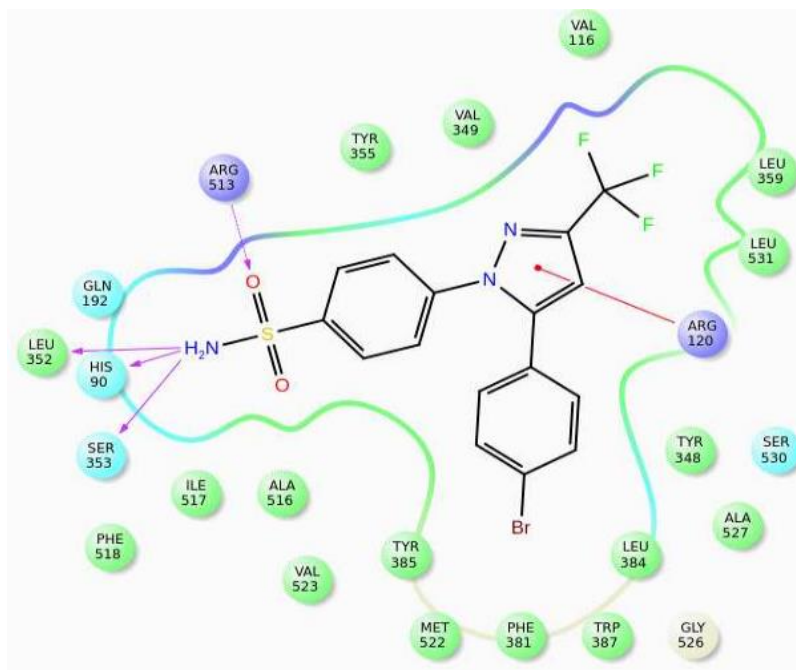
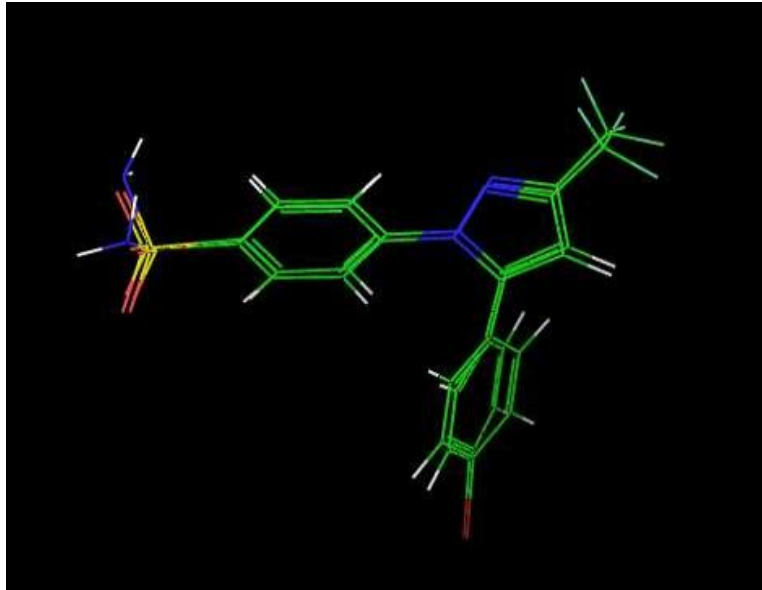
**Εικόνα 3:** Δεσμοί ανάμεσα στον παρεμποδιστή S-58 και τα αμινοξέα της πρωτεΐνης. Πάνω: κρυσταλλική δομή από τον οργανισμό *mus musculus*. Κάτω: Μοντέλο κρυσταλλικής δομής ανθρώπινης πρωτεΐνης

Για το υπόλοιπο της εργασίας επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί η κρυσταλλική δομή της πρωτεΐνης που βρέθηκε βιβλιογραφικά, εφόσον πρόκειται για πειραματικά αποτελέσματα τα οποία έχουν μεγαλύτερη αξιοπιστία.

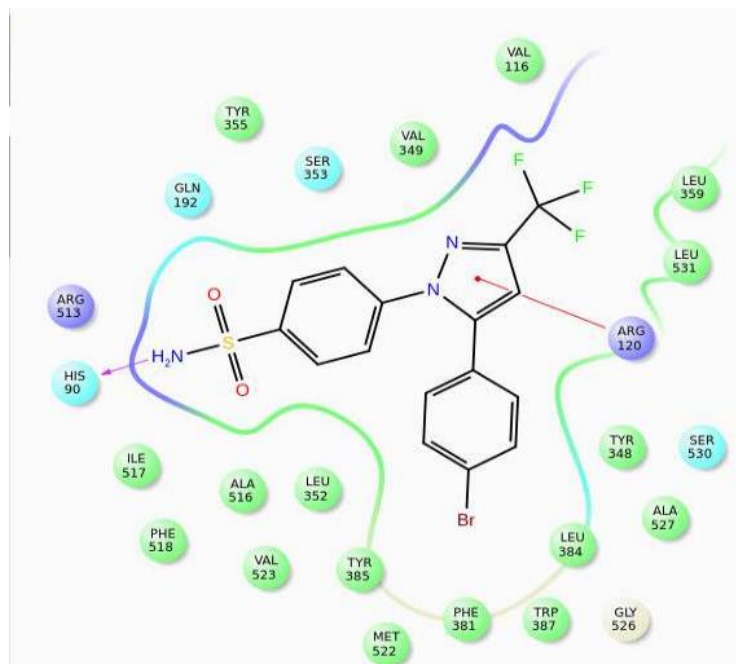
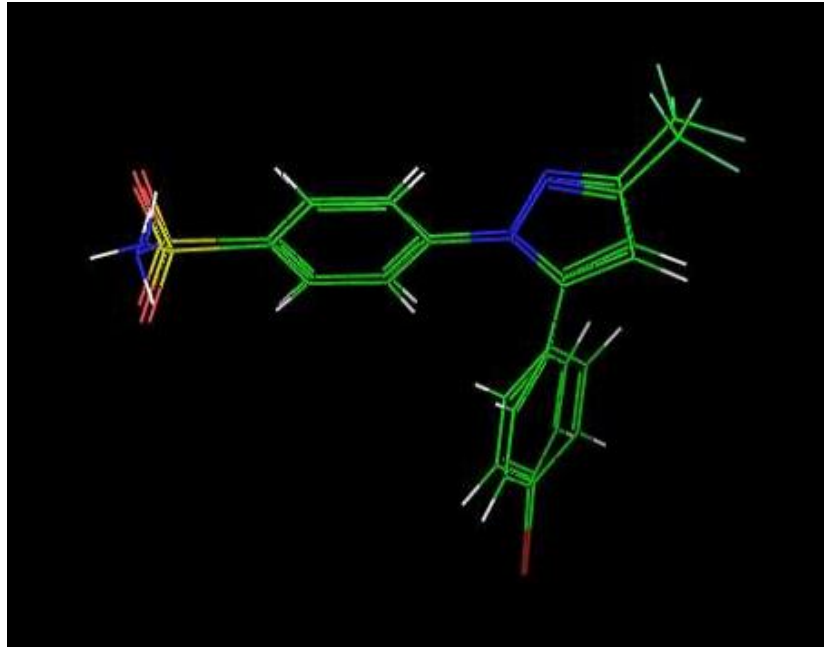
### *B.1.2. Επικύρωση μεθόδου απλής ακρίβειας (SP)*

Προκειμένου να ελεγχθεί εάν μπορεί να πραγματοποιηθεί η μοριακή πρόσδεση με ακρίβεια και η μέθοδος να έχει αξιόπιστα, θα πρέπει να πραγματοποιηθεί επικύρωση (validation) της μεθόδου. Πιο συγκεκριμένα, ο παρεμποδιστής που περιέχει την κρυσταλλική δομή της πρωτεΐνης θα πρέπει να απομονωθεί και να πραγματοποιηθεί η μελέτη πρόσδεσης του μορίου στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης. Εάν οι νέες πόζες του παρεμποδιστή έχουν την ίδια διάταξη στον χώρο με τον παρεμποδιστή πριν πραγματοποιηθεί καμία επεξεργασία, παρουσιάζουν τους ίδιους δεσμούς και έχουν μικρές τιμές Docking score (υψηλή συγγένεια πρόσδεσης) τότε η συγκεκριμένη μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μελέτη πρόσδεσης άλλων παρεμποδιστών με μεγάλη ακρίβεια και αξιοπιστία.

Στην περίπτωση της COX-2, από την κρυσταλλική δομή της πρωτεΐνης απομονώθηκε ο παρεμποδιστής. Το μόριο του παρεμποδιστή προετοιμάστηκε με την βοήθεια της εφαρμογής ligprep σε pH όπου η πρωτεΐνη παρουσιάζει μέγιστη λειτουργικότητα, όπου για την περίπτωση της COX-2 είναι η τιμή 8 και στην συνέχεια μελετήθηκε η δυνατότητα πρόσδεσης του μορίου στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης. Πραγματοποιήθηκε υπολογισμός απλής ακρίβειας (Standard Precision SP). Επιλέχθηκε να δοθούν 20 διαφορετικές πόζες πρόσδεσης στην πρωτεΐνη. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν μελετήθηκαν ως προς την αρχική διάταξη που είχε ο παρεμποδιστής. Παρακάτω παρουσιάζονται δύο από τις καλύτερες πόζες που προέκυψαν από την μελέτη πρόσδεσης απλής:



**Εικόνα 4:** Validation μεθόδου SP. Πάνω: υπέρθεση της πόζας του παρεμποδιστή στην αρχική πόζα. Κάτω: δεσμοί ανάμεσα στον παρεμποδιστή και την πρωτεΐνη



**Εικόνα 5:** Validation μεθόδου SP. Πάνω: υπέρθεση της πόζας του παρεμποδιστή στην αρχική πόζα. Κάτω: δεσμοί ανάμεσα στον παρεμποδιστή και την πρωτεΐνη

Παρατηρώντας, τις παραπάνω εικόνες, καθώς επίσης και τα αποτελέσματα πρόσδεσης, συμπεραίνεται ότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί με αξιοπιστία για την μελέτη πρόσδεσης μορίων.



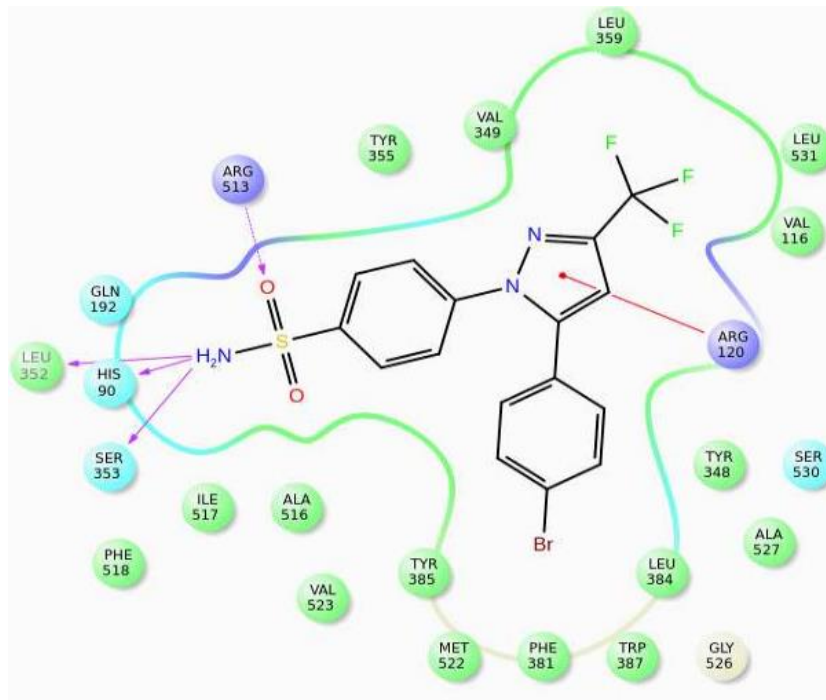
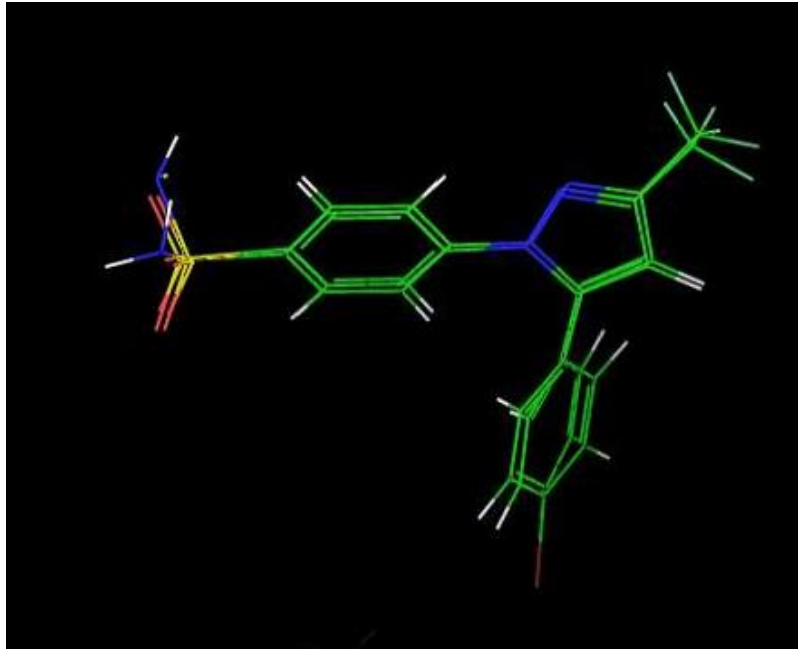
**Πίνακας 4:** Αποτελέσματα πρόσδεσης εξακρίβωσης μεθόδου με την μέθοδο SP

α/α πόζας	Docking score	Glide emodel
1	-10.534	-99.361
2	-8.940	-84.447

### *B.1.3. Επικύρωση μεθόδου αυξημένης ακρίβειας XP*

Οι πόζες όπου παρουσίαζαν τα καλύτερα αποτελέσματα στην μελέτη απλής ακρίβειας χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να πραγματοποιηθούν υπολογισμοί αυξημένης ακρίβειας (extra precision XP). Οι υπολογισμοί αυτοί παρουσιάζουν μεγαλύτερη ακρίβεια στον υπολογισμό τους, ωστόσο απαιτούν αρκετά μεγαλύτερη υπολογιστική ισχύ, οπότε και πραγματοποιούνται μόνο για τα καλύτερα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν στην SP μέθοδο.

Η XP μέθοδος έδειξε ότι η πρωτεΐνη που επιλέχτηκε μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μελέτη πρόσδεσης με ακόμα πιο αξιόπιστα αποτελέσματα. Παρακάτω παρουσιάζεται η καλύτερη πόζα που εμφανίστηκε κατά την μέθοδο αυτή με Docking score=-10.150 και Glide emodel=-101.058:



**Εικόνα 6:** Validation μεθόδου XP. Πάνω: υπέρθεση της πόζας του παρεμποδιστή στην αρχική πόζα. Κάτω: δεσμοί ανάμεσα στον παρεμποδιστή και την πρωτεΐνη

Επιπλέον, παρατηρείται ότι το μόριο το οποίο περιέχονταν στην COX-2 ως παρεμποδιστής, σχηματίζει δεσμούς με τα αμινοξέα ιστιδίνη 90 και αργινίνη 513, τα οποία είναι οι σημαντικότεροι δεσμοί προκειμένου ένα μόριο να έχει μεγάλες πιθανότητες να είναι COX-2 παρεμποδιστής. Επομένως, στην συνέχεια της εργασίας τα μόρια με υψηλό σκορ πρόσδεσης (αρνητική τιμή) που θα σχηματίζουν δεσμούς με τα συγκεκριμένα αμινοξέα θα θεωρούνται πιθανοί COX-2 παρεμποδιστές.

#### B.1.4. Μελέτη πρόσδεσης SP

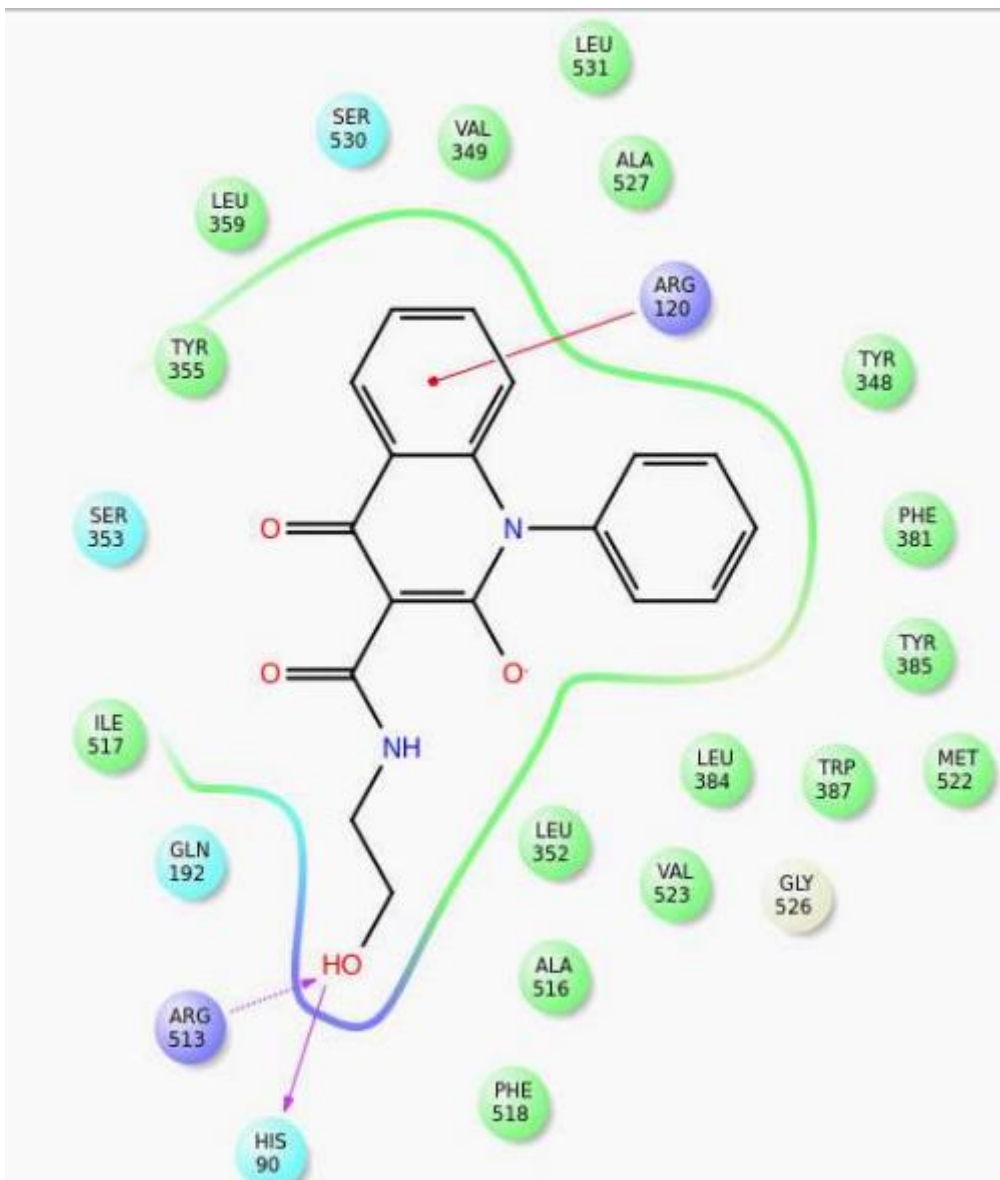
Αφού πραγματοποιήθηκαν όλοι οι παραπάνω έλεγχοι, μελετήθηκε η πρόσδεση διάφορων μορίων στο ένζυμο με την μέθοδο SP. Επιλέχθηκαν αρχικά να μελετηθούν μόρια τα οποία έχουν ήδη συντεθεί στο εργαστήριο. Έτσι εάν κάποιο μόριο παρουσίαζε καλή παρεμπόδιση θα μπορούσε άμεσα να χρησιμοποιηθεί για να ελεγχθεί *in vitro* για το ποια είναι η πειραματική παρεμπόδιση του ενζύμου και στην συνέχεια *in vivo*, για να ελεγχθεί εάν το μόριο έχει τις απαραίτητες ιδιότητες πάνω σε πειραματόζωα.

Τα μόρια σχεδιάστηκαν με την βοήθεια του λογισμικού maestro της Schrödinger και είναι συνθετικά οργανικά μόρια που προέρχονται από την ερευνητική δραστηριότητα του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου (κωδικοί μορίων AD, ADMK, ADAT, ADDP, ADGAN, ADOX, ADTA, MR) και του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (κωδικοί μορίων MK, TC, TCVR) Συνολικά μελετήθηκαν 570 μόρια για την δυνατότητα πρόσδεσής τους (Παράρτημα Ε.2.).

Τα αποτελέσματα έδειξαν πως 138 από τα συνολικά 570 μόρια, εμφανίζονται ως υποσχόμενοι COX-2 παρεμποδιστές (Παράρτημα Ε.3.), καθώς παρουσίαζαν δεσμούς είτε με την Ιστιδίνη της θέσης 90, είτε με την αργινίνη της θέσης 513, ενώ παρουσίαζαν καλά αποτελέσματα πρόσδεσης. Τα μόρια αυτά θα μελετηθούν περαιτέρω, με την μέθοδο XP, για να επιβεβαιωθεί σε μεγαλύτερο βαθμό εάν τα μόρια μπορούν να λειτουργήσουν ως COX-2 παρεμποδιστές.

Παρακάτω παρουσιάζονται οι δεσμοί των μορίων που παρουσίασαν την καλύτερη πρόσδεση με την SP μέθοδο:

- Πρόσδεση του μορίου **AD 44**

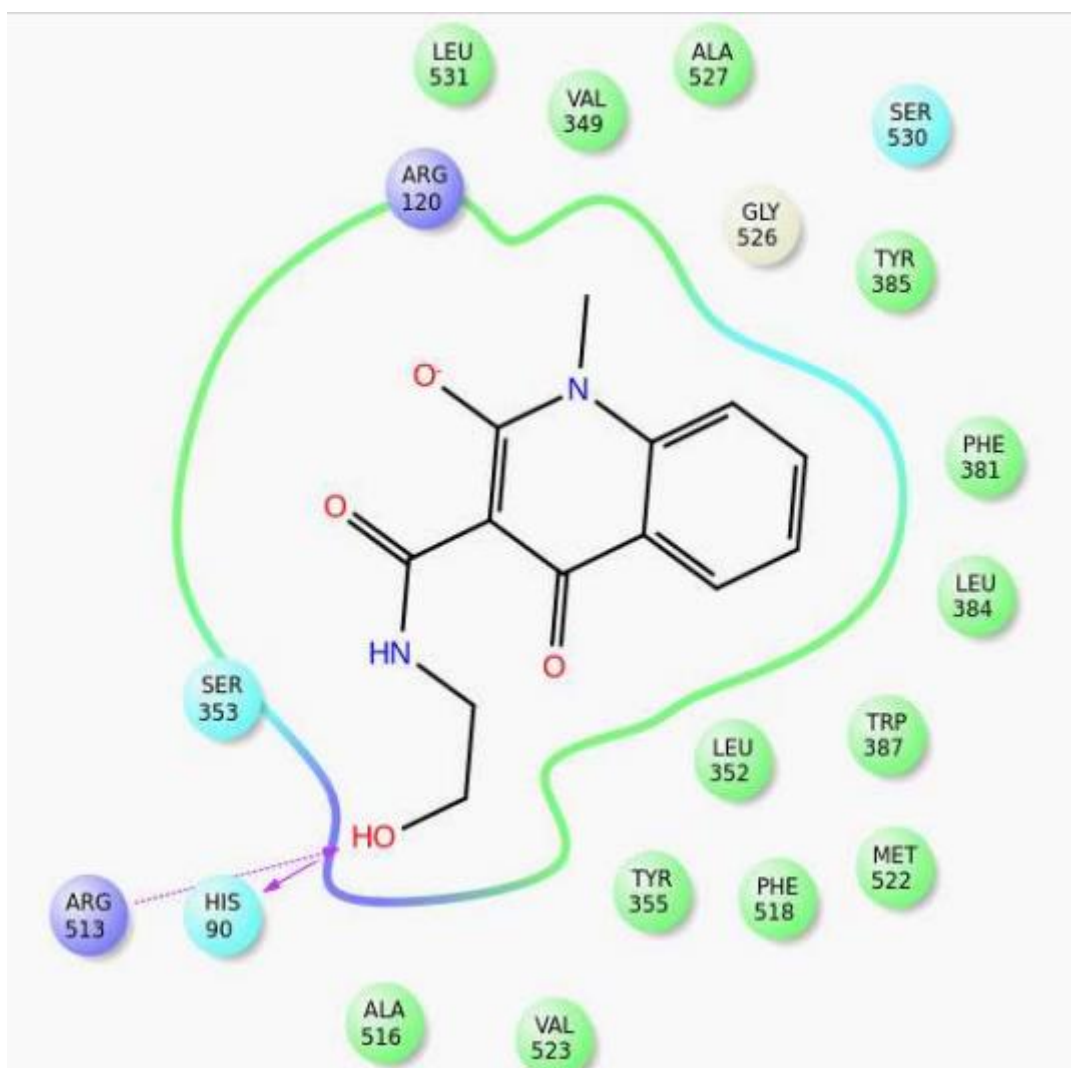


Εικόνα 7: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο **AD 44** και τα αμινοξέα της COX-2

Όπως φαίνεται από την παραπάνω απεικόνιση το μόριο **AD 44** κάνει δεσμούς υδρογόνου και με τα δύο κρίσιμα αμινοξέα (**HIS 90** και **ARG 513**) και μάλιστα αρκετά ισχυρούς, καθώς το υδροξύλιο του μορίου βρίσκεται σε πολύ κοντινή απόσταση από τα δύο αμινοξέα (1.82 και 2.02Å αντίστοιχα) ενώ επίσης η γωνία των δεσμών είναι κοντά στις 180° για την **HIS 90** (153°), ενώ η γωνία του δεσμού ανάμεσα στην υδροξυλομάδα του **AD 44** και την **ARG 513** είναι 110°. Η πρόσδεση του μορίου γίνεται ακόμα ισχυρότερη, καθώς παρουσιάζεται μία υδρόφοβη αλληλεπίδραση με την αργινίνη της θέσης 120 (**ARG 120**). Η αλληλεπίδραση αυτή παρουσιάζεται ανάμεσα στα πη ηλεκτρόνια του αρωματικού δακτυλίου και του

φορτισμένου αμινοξέος (ri-cation). Το μήκος του δεσμού είναι 5.98 Å, ενώ η γωνία του δεσμού είναι 29°.

Εκτός όμως από τους δεσμούς φαίνεται ότι η δομή του μορίου παίζει σημαντικό ρόλο στην ισχυροποίηση του δεσμού. Ο φαινυλο-υποκαταστάτης στο ετεροκυκλικό άζωτο του μορίου φαίνεται να σταθεροποιεί τον δεσμό, καθώς ο δακτύλιος αυτός φαίνεται να προσανατολίζεται στο τέλος του κυλίνδρου του ενεργού κέντρου, προσανατολίζοντας κατάλληλα το μόριο, χωρίς ωστόσο να παρατηρείται κάποια υδρόφοβη αλληλεπίδραση. Το γεγονός αυτό μπορεί να επαληθευτεί και με το ανάλογο μόριο **AD 8**, το οποίο διαφέρει από το **AD 44** στο ότι έχει υποκαταστάτη μεθύλια αντί για φαινύλιο στο ετεροκυκλικό άζωτο. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 8 το μόριο **AD 8** παρουσιάζει τις σημαντικές αλληλεπιδράσεις, ωστόσο ο προσανατολισμός του είναι τελείως διαφορετικός και δεν φαίνεται να προσεγγίζει ικανοποιητικά το ενεργό κέντρο. Αυτό μπορεί να φανεί και από τα αποτελέσματα της πρόσδεσης, καθώς το μόριο **AD 44** παρουσιάζει docking score -9.767, ενώ το **AD 8** -9.083.

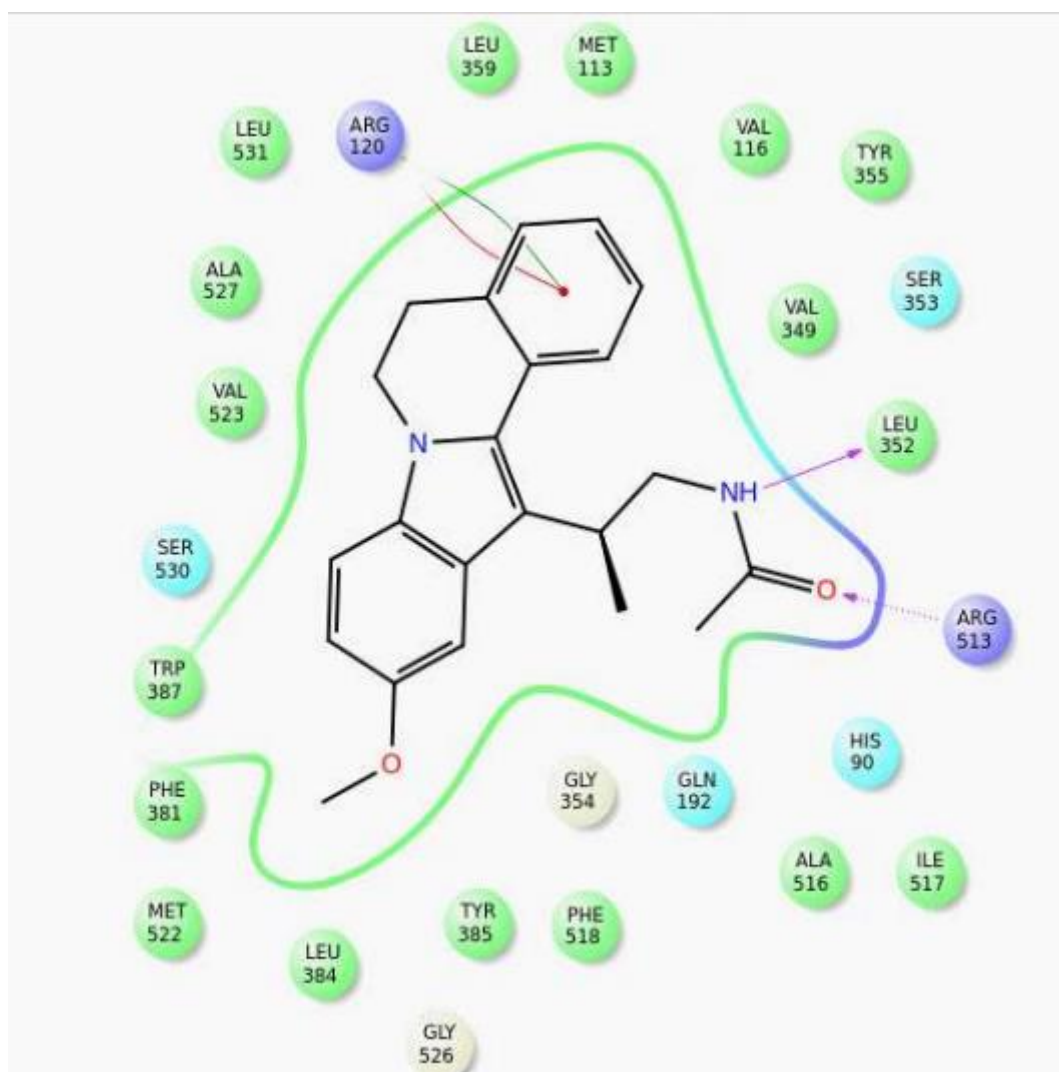


Εικόνα 8: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο **AD 8** και τα αμινοξέα της COX-2

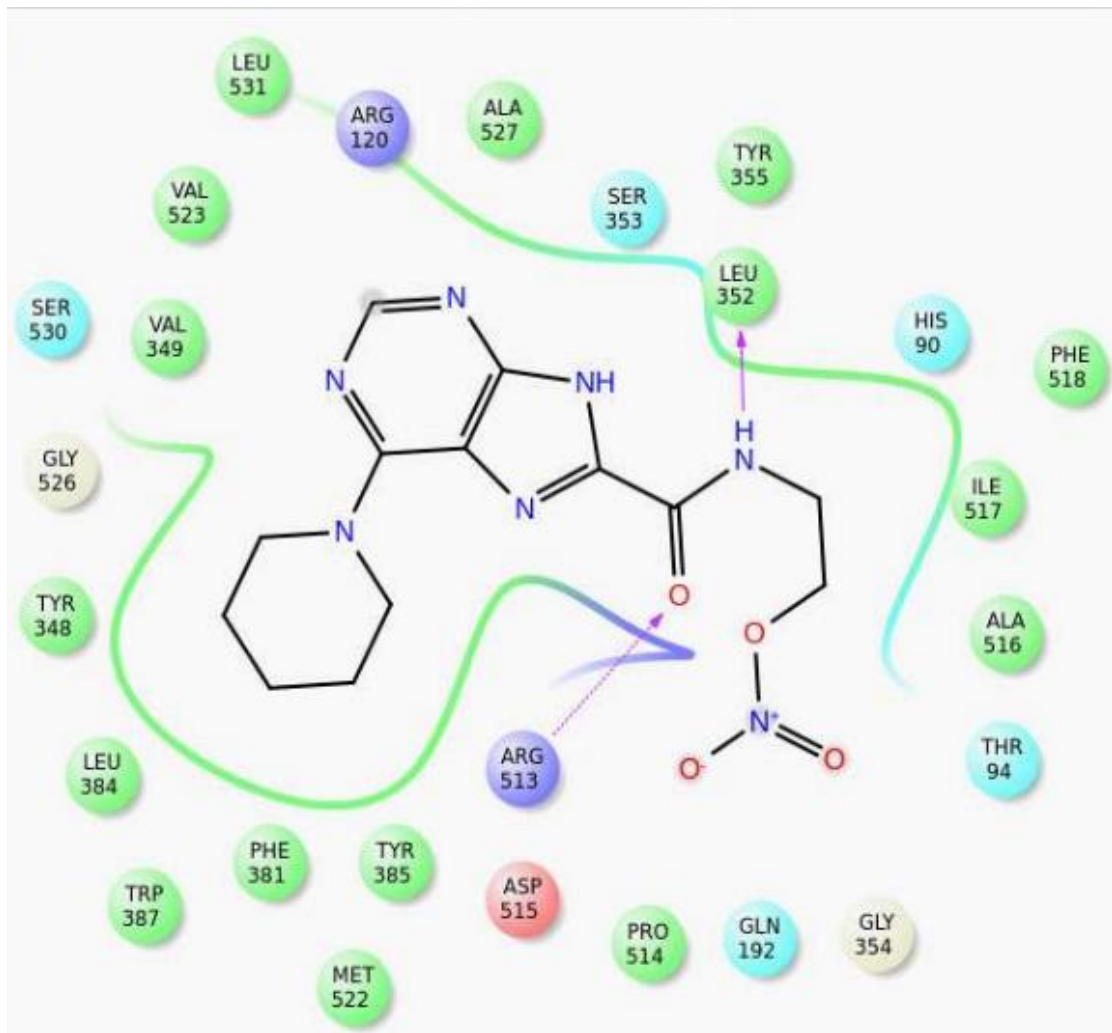
Επομένως, συμπεραίνουμε πως ο αρωματικός δακτύλιος που περιέχει το μόριο στο ετεροκυκλικό άζωτο είναι σημαντικός, προκειμένου να προσδεθεί ισχυρά το μόριο στο ενεργό κέντρο.

- Πρόσδεση των μορίων **TC 139** και **MK 110**

Όπως γίνεται εμφανές και από τις απεικονίσεις τα μόρια αυτά παρουσιάζουν μία σημαντική αλληλεπίδραση με την **ARG 513**, ενώ επίσης παρουσιάζουν καλά αποτελέσματα πρόσδεσης (-10.509 και -9.024 αντίστοιχα). Ωστόσο δεν παρουσιάζουν αλληλεπίδραση με την **HIS 90**. Για αυτό τον λόγο θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω εάν τα μόρια αυτά παρεμποδίζουν ικανοποιητικά την COX-2, με την μελέτη πρόσδεσης XP.



Εικόνα 9: Δεσμοί μορίων ανάμεσα στο μόριο **TC 139** και τα αμινοξέα της COX-2



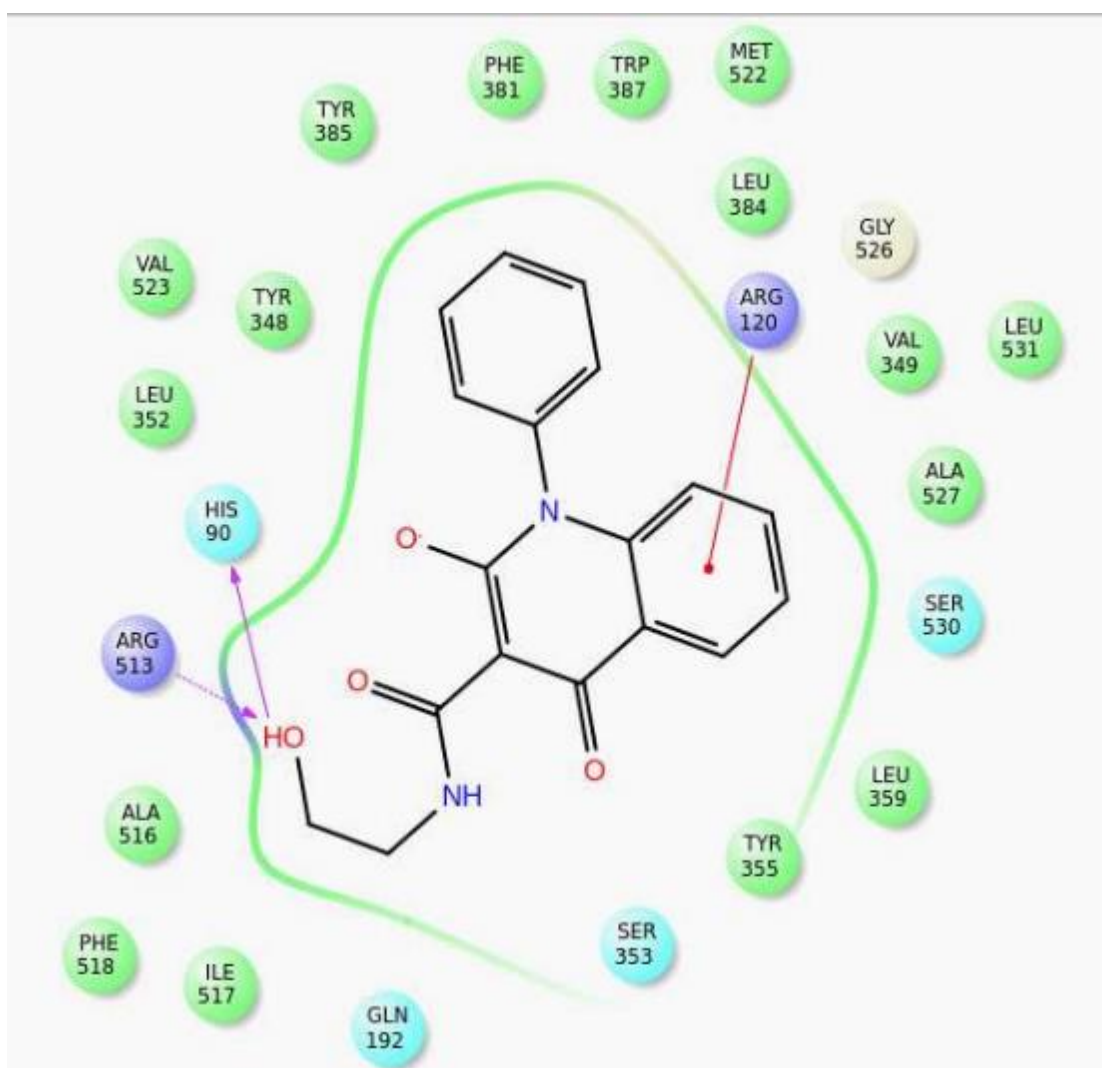
Εικόνα 10: Δεσμοί μορίων ανάμεσα στο μόριο MK 110 και τα αμινοξέα της COX-2

### B.1.5. Μελέτη πρόσδεσης XP

Η μελέτη πρόσδεσης XP των μορίων έδειξε ότι συνολικά 50 από τα συνολικά 570 μόρια της βιβλιοθήκης παρουσιάζουν επιθυμητά αποτελέσματα (Παράρτημα Ε.4.). Επομένως, τα μόρια αυτά έχουν μεγάλη πιθανότητα να είναι παρεμποδιστές της κυκλοοξυγονάσης-2 χωρίς να παρεμποδίζουν την κυκλοοξυγονάση-1.

Παρακάτω παρουσιάζονται η 2-d απεικόνιση ορισμένων μορίων, στα οποία παρατηρήθηκε ισχυρή πρόσδεση:

- Πρόσδεση του μορίου **AD 44**

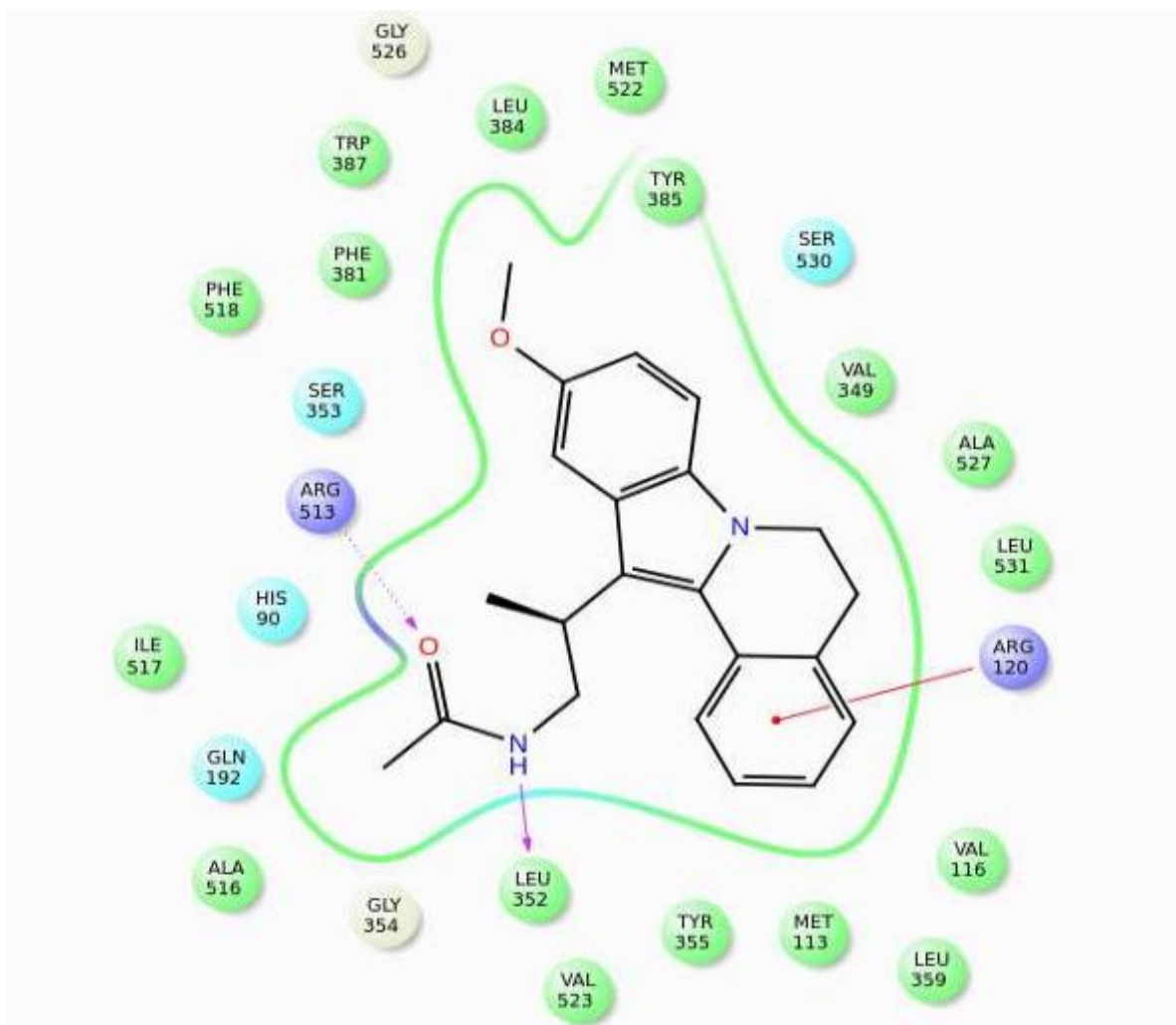


Εικόνα 11: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο **AD 44** και τα αμινοξέα της COX-2

Όπως αναφέρθηκε και στα αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης με την μέθοδο SP, η δομή του μορίου **AD 44** είναι τέτοια ώστε να σταθεροποιεί τους δεσμούς που σχηματίζονται ανάμεσα στο μόριο και το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Μάλιστα τα πολύ καλά αποτελέσματα του μορίου (-11.195) και με την μέθοδο XP, δείχνουν ότι το συγκεκριμένο μόριο έχει μεγάλες πιθανότητες να είναι παρεμποδιστής της COX-2. Το σημαντικότερο γεγονός ωστόσο είναι ότι το συγκεκριμένο μόριο σχηματίζει ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου και με τα δύο σημαντικά αμινοξέα (ιστιδίνη 90 και αργινίνη 513 με απόσταση δεσμού 1.85 Å και 2.05 Å αντίστοιχα) κάτι που το καθιστά ένα από τα πιο υποσχόμενα μόρια της βιβλιοθήκης.



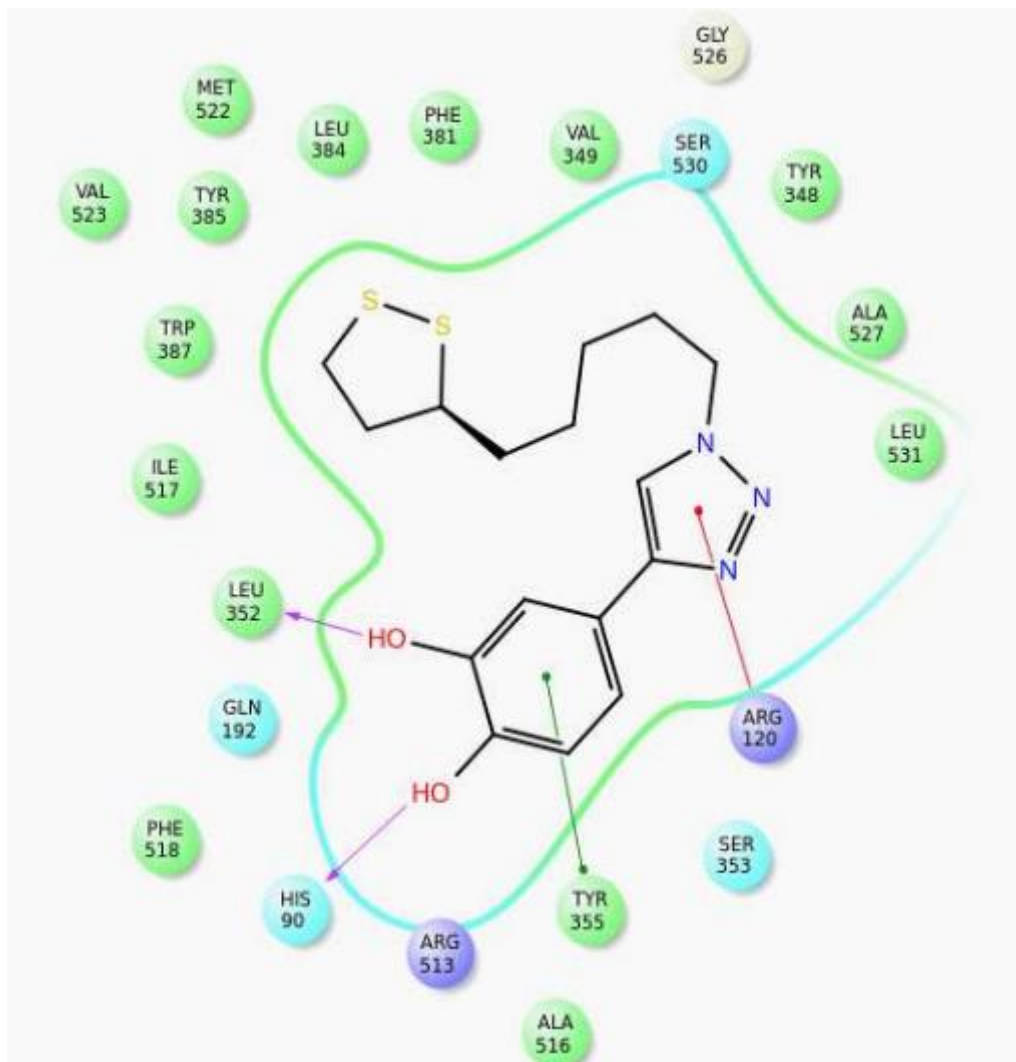
- Πρόσδεση του μορίου **TC 139**



Εικόνα 12: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο **TC 139** και τα αμινοξέα της COX-2

Όπως φαίνεται και με τη μελέτη αυξημένης ακρίβειας, το μόριο **TC 139** παρουσιάζει μία ισχυρή πρόσδεση με το ενεργό κέντρο της COX-2. Ένας ισχυρός δεσμός υδρογόνου με την πλευρική αλυσίδα του αμινοξέος αργινίνη 513 (απόσταση δεσμού 2.09 Å γωνία δεσμού 165.18) κάνει το μόριο ένα από τους πιθανούς παρεμποδιστές. Οι δεσμοί που σχηματίζει το μόριο με τα αμινοξέα του κυλίνδρου του ενεργού κέντρου της COX-2 ενισχύουν την πρόσδεση. Είναι λογικό επομένως να παρουσιάζει ένα καλό docking score (-10.630).

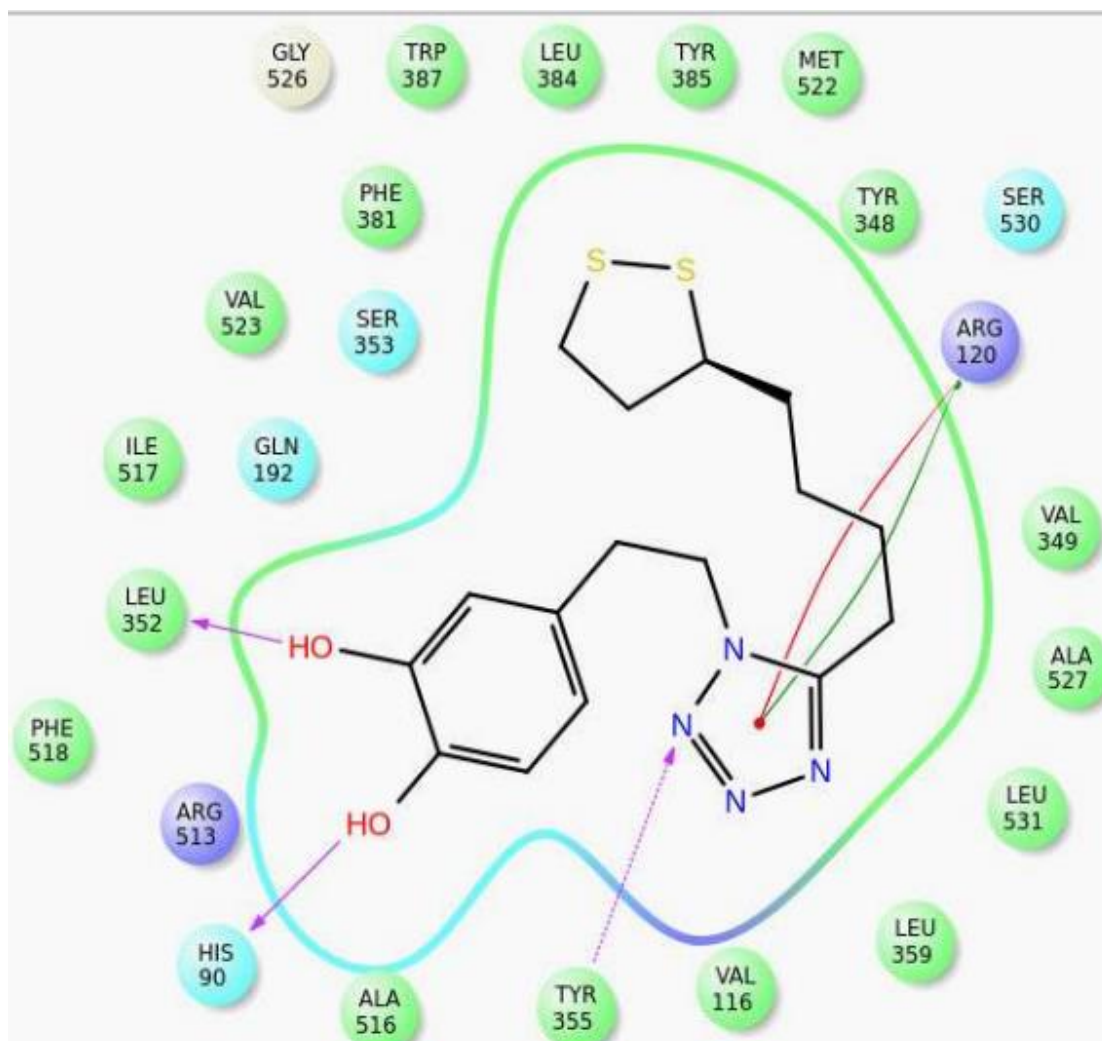
- Πρόσδεση του μορίου (MK 71)



Εικόνα 13: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο MK 71 και τα αμινοξέα της COX-2

Το μόριο **MK 71** σχηματίζει αρκετούς δεσμούς με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου, κάτι το οποίο είναι σημαντικό καθώς όσο πιο πολλοί δεσμοί σχηματίζονται, τόσο πιο ισχυρή είναι η πρόσδεση του μορίου. Μάλιστα το μόριο σχηματίζει ισχυρό δεσμό υδρογόνου με τον κύριο κορμό του αμινοξέος ιστιδίνη 90 (απόσταση δεσμού 2.08 Å), κάτι που το καθιστά ένα από τα υποσχόμενα μόρια για COX-2 παρεμποδιστή. Οι δεσμοί υδρογόνου και οι υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις που παρουσιάζονται ανάμεσα στο μόριο και τα αμινοξέα λευκίνη 352, αργινίνη 120 και τυροσίνη 355, σταθεροποιεί τον δεσμό κάτι το οποίο φαίνεται και από το καλό αποτέλεσμα πρόσδεσης που παρουσιάζει (-10.663)

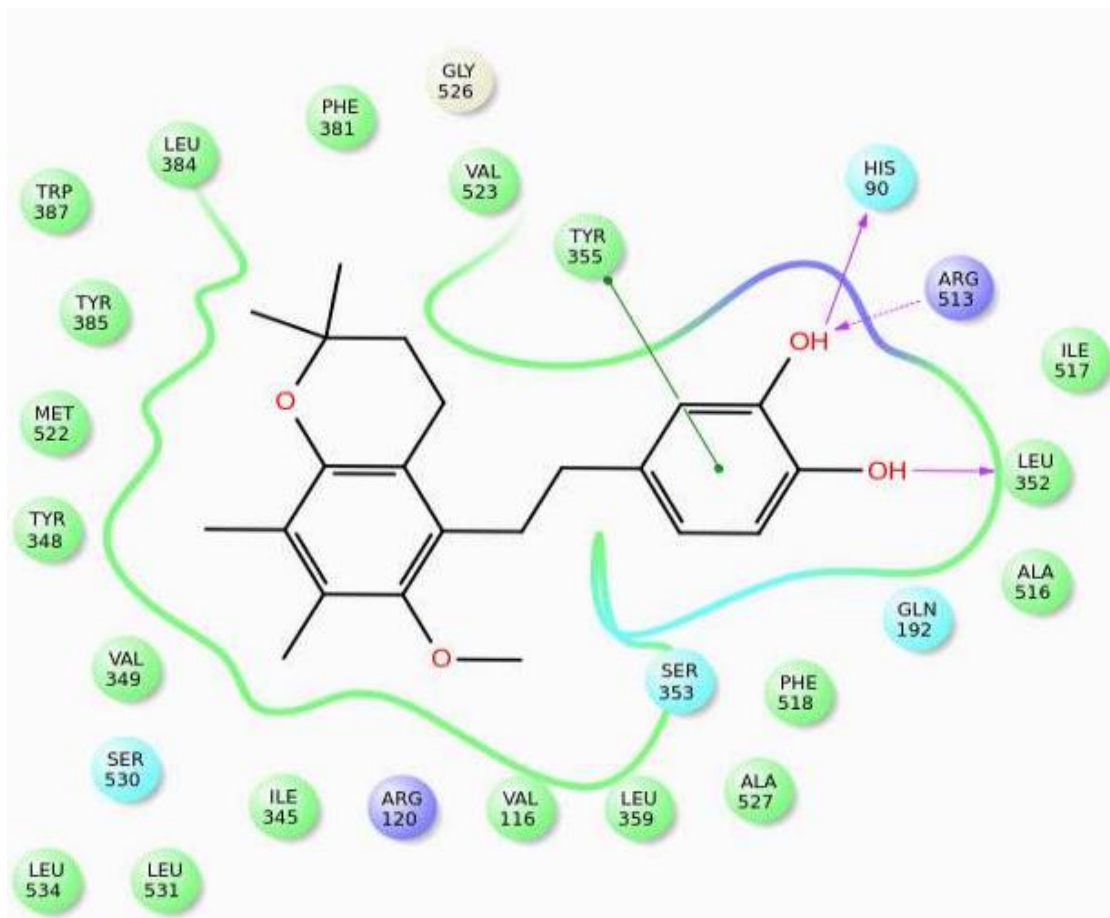
- Πρόσδεση του μορίου (MK 47)



Εικόνα 14: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο MK 47 και τα αμινοξέα της COX-2

Παρόμοια με τις παραπάνω περιπτώσεις το μόριο **MK 47**, εμφανίζει να έχει ισχυρή πρόσδεση με το ενεργό κέντρο της COX-2, καθώς σχηματίζει πολλούς δεσμούς με το ενεργό κέντρο, ενώ επίσης σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την ιστονίνη 90 (απόσταση δεσμού 1.96 Å). Επομένως έχει μεγάλες πιθανότητες το συγκεκριμένο μόριο να είναι παρεμποδιστής κάτι το οποίο φαίνεται και από το καλό αποτέλεσμα πρόσδεσης που παρουσιάζει (-10.140).

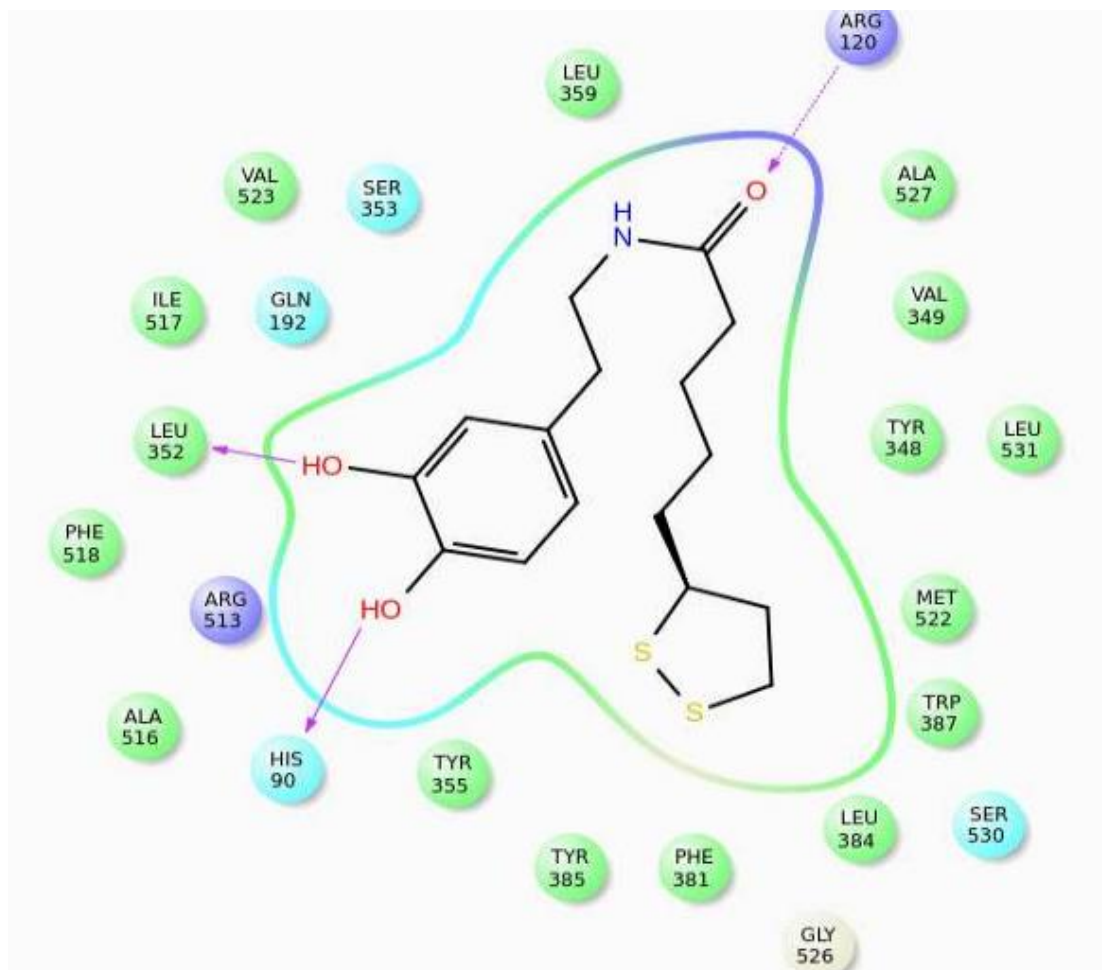
- Πρόσδεση του μορίου **MK 28**



Εικόνα 15: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο **MK 28** και τα αμινοξέα της COX-2

Το μόριο **MK 28** παρουσιάζει και τους δύο σημαντικούς δεσμούς με την ιστιδίνη 90 και την αργινίνη 513. Πιο συγκεκριμένα το μόριο σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με τα δύο αυτά αμινοξέα με απόσταση δεσμού 1.82 Å και 2.26 Å αντίστοιχα. Ωστόσο όπως φαίνεται από την παραπάνω εικόνα οι δεσμοί που σχηματίζονται με το ενεργό κέντρο εντοπίζονται κυρίως στην υδροφιλική ‘τσέπη’ του COX-2 και μόνο από ένα μικρό τμήμα του μορίου, ενώ το υπόλοιπο μόριο δεν σχηματίζει δεσμούς με το ενεργό κέντρο της κυκλοοξυγονάσης. Επομένως, μπορεί να παρουσιάζει ένα καλό αποτέλεσμα πρόσδεσης (-10.107), ωστόσο υπάρχει πιθανότητα να μην έχει καλά αποτελέσματα πρόσδεσης, κυρίως με την πάροδο του χρόνου.

- Πρόσδεση του μορίου **MK 68**



Εικόνα 16: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο **MK 68** και τα αμινοξέα της COX-2

Παρόμοια με τα παραπάνω μόρια, το μόριο **MK 68** παρουσιάζει έναν δεσμό υδρογόνου με την ιστιδίνη 90 κάτι που το καθιστά έναν πιθανό COX-2 παρεμποδιστή. Το μόριο παρουσιάζει άλλους δύο δεσμούς υδρογόνου στο υπόλοιπο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης και ισχυροποιείται η πρόσδεση του μορίου στο ενεργό κέντρο (docking score -10.853).

#### *B.1.6. Σχολιασμός αποτελεσμάτων μοριακής μοντελοποίησης-Συμπεράσματα*

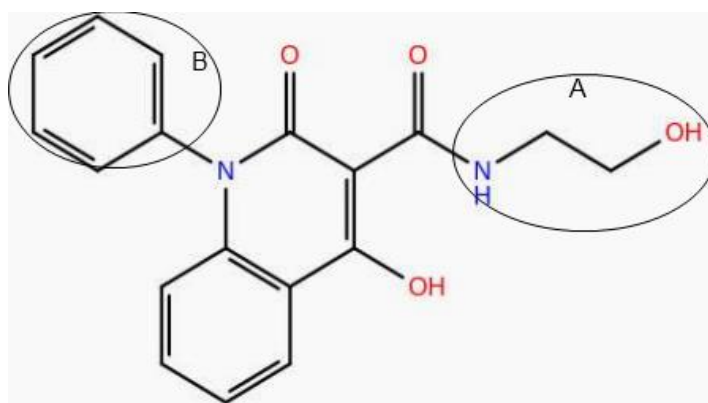
Από τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από την πρόσδεση των μορίων της βιβλιοθήκης, παρατηρείται ότι υπάρχουν μόρια τα οποία παρουσιάζουν πολύ καλή μοριακή πρόσδεση. Ιδιαίτερα τα μόρια που παρουσιάζουν docking score μεγαλύτερα από το μόριο που περιείχε ήδη η κρυσταλλική δομή της πρωτεΐνης, πιθανόν να είναι

ισχυροί παρεμποδιστές της COX-2. Ο βαθμός της παρεμπόδισης ωστόσο δεν μπορεί να προβλεφτεί. Για να συμβεί κάτι τέτοιο θα πρέπει να μελετηθούν *in vitro* οι συγκεκριμένες ενώσεις και η δυνατότητα πρόσδεσης του στην COX-2.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε ένα συγκεκριμένο μόριο, το καρβοξαμίδιο της N-φαινυλο-4-υδροξυ-2-κινολινόνης **AD 44**. Το **AD 44** με βάση τα αποτελέσματα που λήφθηκαν παρουσίασε ισχυρή πρόσδεση με το ένζυμο, ενώ η διαμόρφωση του, ένα μεγάλο υδρόφοβο τμήμα που στην συγκεκριμένη περίπτωση είναι ένας αρωματικός δακτύλιος και μία υδρόφιλη αλυσίδα, είναι τέτοια που καλύπτει το σύνολο σχεδόν του ενεργού κέντρου της κυκλοοξυγονάσης-2. Μάλιστα η δομή του είναι τέτοια ώστε η πρόσδεση του να είναι ισχυρή με την COX-2, αλλά η πρόσδεση του με την COX-1 να μην είναι δυνατή. Ωστόσο παρατηρείται ότι ενώ η διάταξη του μορίου στο χώρο είναι η ιδανική, το υδρόφοβο τμήμα του μορίου δεν παρουσιάζει καμία αλληλεπίδραση με το ένζυμο. Για τον λόγο αυτό θα μελετηθεί παρακάτω η επίδραση της δυνατότητας πρόσδεσης μορίων τα οποία έχουν μικρές δομικές διαφορές από το **AD 44**, προκειμένου να ελεγχθεί αν υπάρχει κάποιο μόριο το οποίο προσδένεται ακόμα πιο ισχυρά.

#### B.1.7. Σχεδίαση μορίων-πιθανών αναστολέων της COX-2

Σκοπός της μελέτης αυτής, είναι να σχεδιαστούν μόρια, με βάση τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από την μοριακή πρόσδεση, τα οποία θα παρουσιάζουν καλύτερη πρόσδεση από τα μόρια που μελετήθηκαν και έχουν ήδη συντεθεί. Για αυτό τον λόγο χρησιμοποιείται το **AD 44** ως μόριο οδηγός, πάνω στο οποίο πραγματοποιούνται μεταβολές προκειμένου να δημιουργηθεί ένα μόριο με ισχυρότερη πρόσδεση από ότι το αρχικό.



Σχήμα 7: Το μόριο AD 44

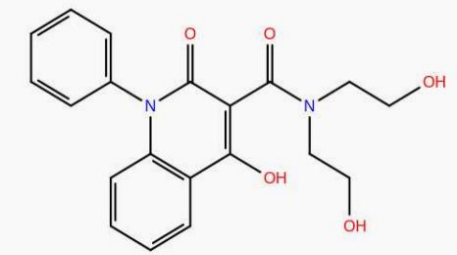
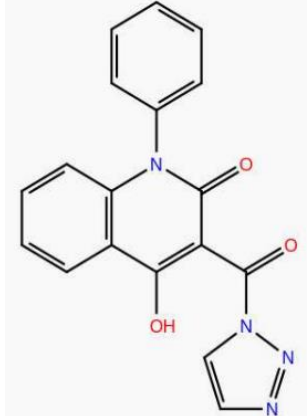
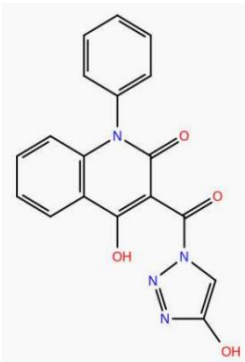
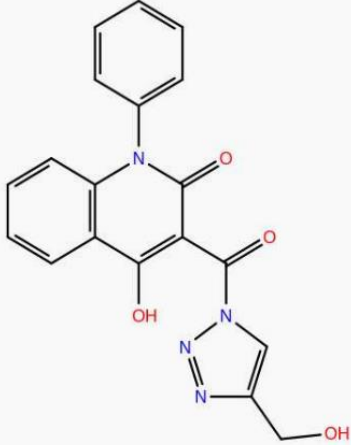
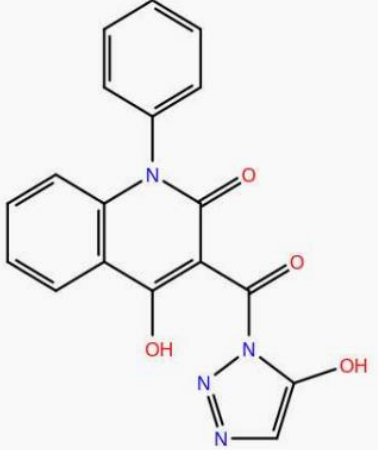
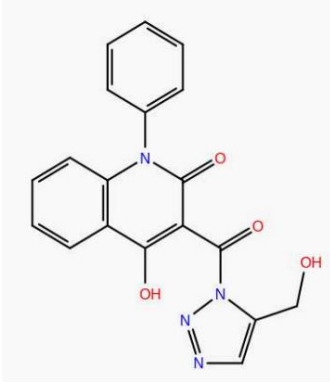
Τα μόρια που σχεδιάστηκαν διέφεραν από το αρχικό μόριο σε δύο σημεία (περιοχές A και B). Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση της αύξησης της αλειφατικής

αλυσίδας στην περιοχή A, η απομάκρυνση του αρωματικού δακτυλίου από το άζωτο στην περιοχή B με προσθήκη ατόμων άνθρακα και η αντικατάσταση του αρωματικού δακτυλίου με αλειφατική αλυσίδα. Στην συνέχεια μελετήθηκε η αντικατάσταση της αλυσίδας της περιοχής A με προσθήκη ετεροκυκλικών συνδετών όπως οξοδιαζόλια και τριαζόλια. Τέλος μελετήθηκε η επίδραση της κορεστότητας της αλυσίδας της περιοχής A.

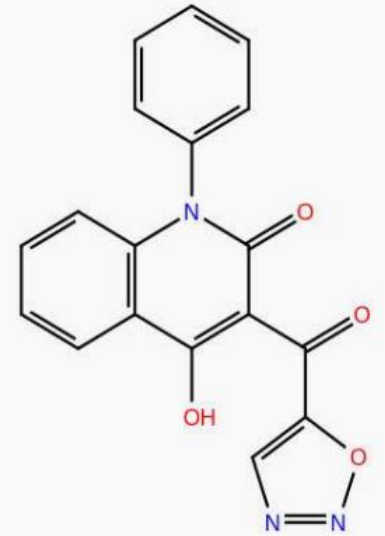
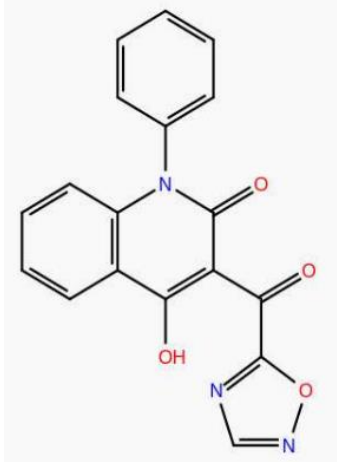
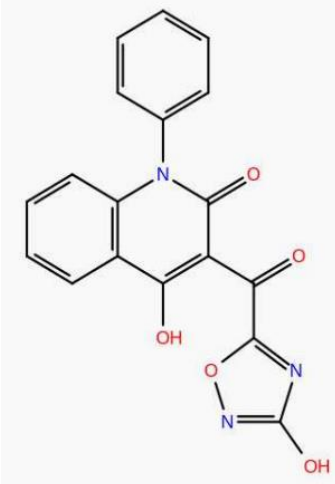
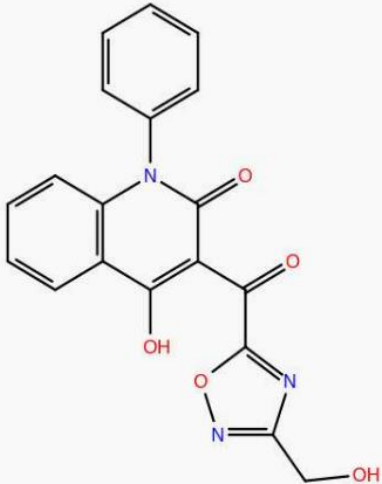
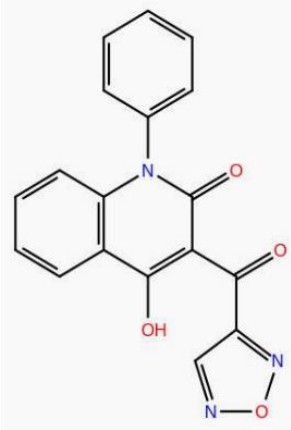
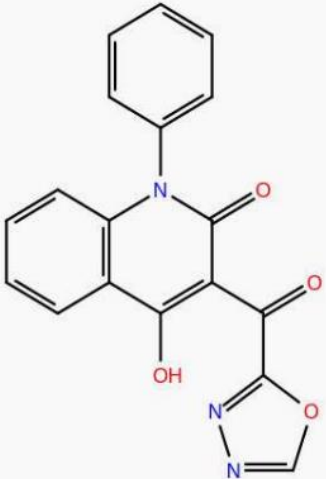
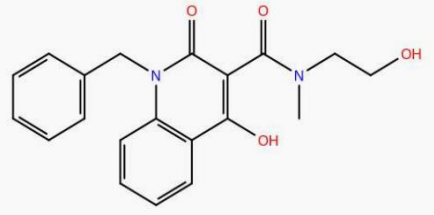
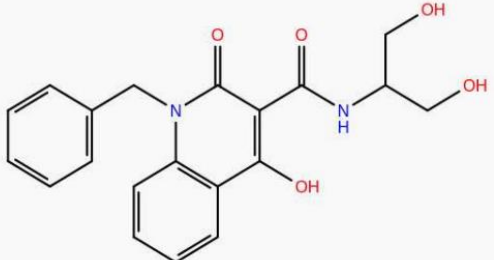
Συνοψίζοντας, τα μόρια που μελετήθηκαν ως προς την πρόσδεση τους παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

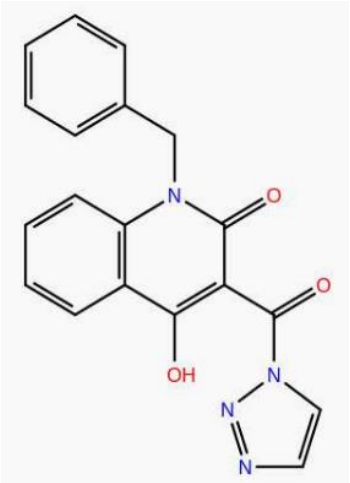
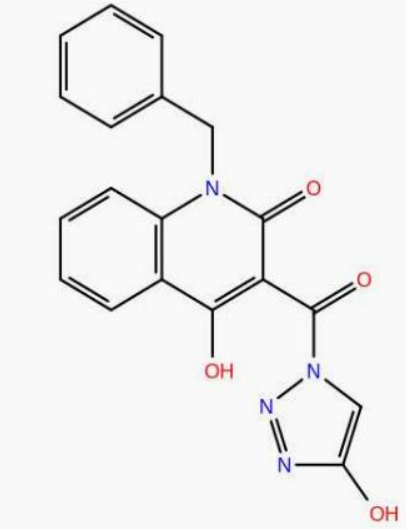
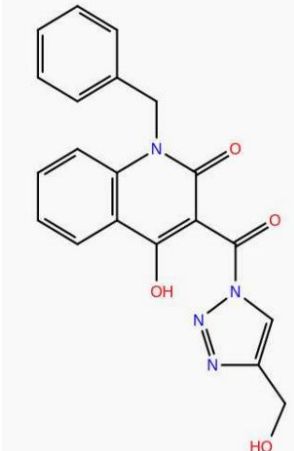
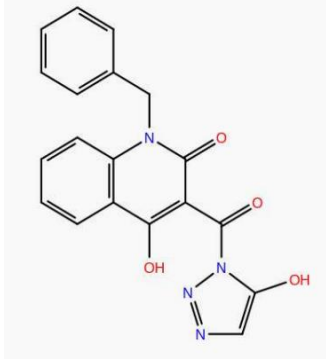
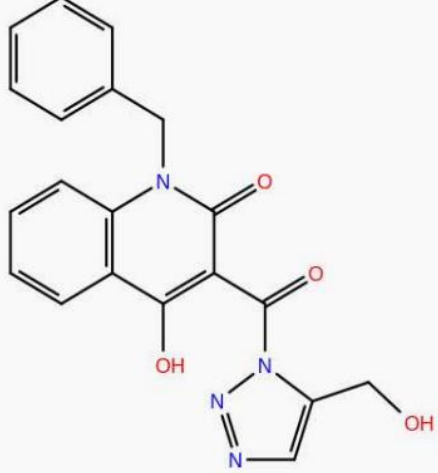
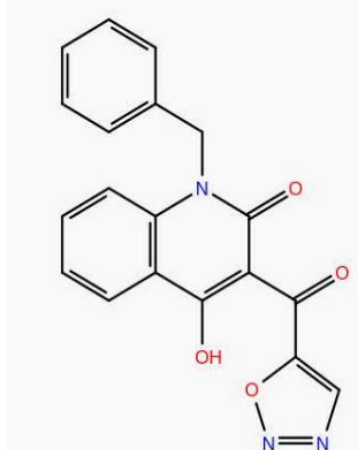
Πίνακας 5: Νέα μόρια που σχεδιάστηκαν για μελέτη μοριακής μοντελοποίησης

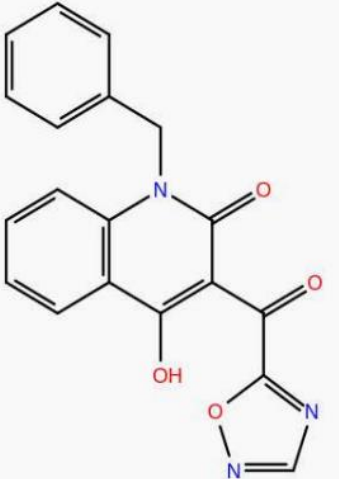
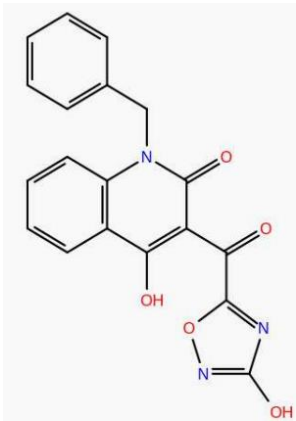
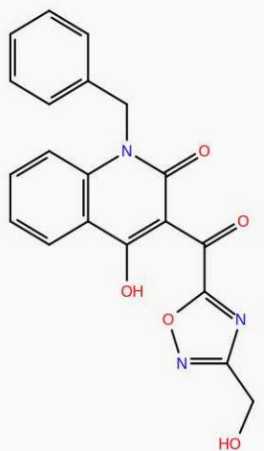
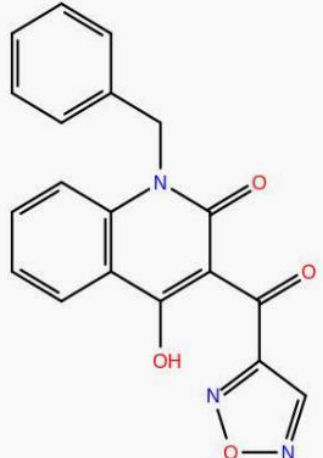
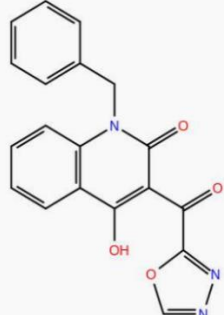
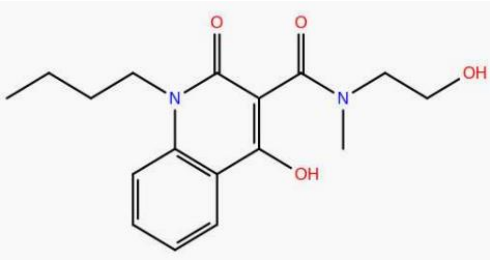
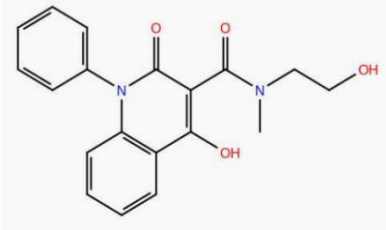
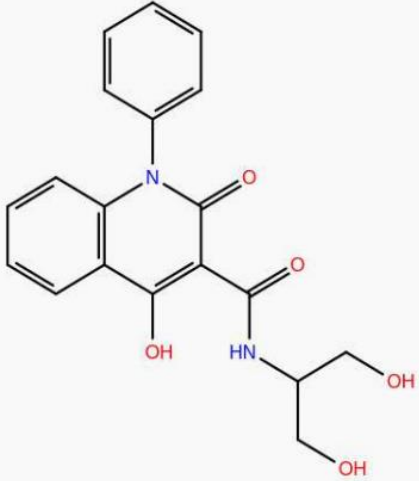
N 1		N 2	
N 3		N 4	
N 5		N 6	
N 7		N 8	
N 9		N 10	
N 11		N 12	

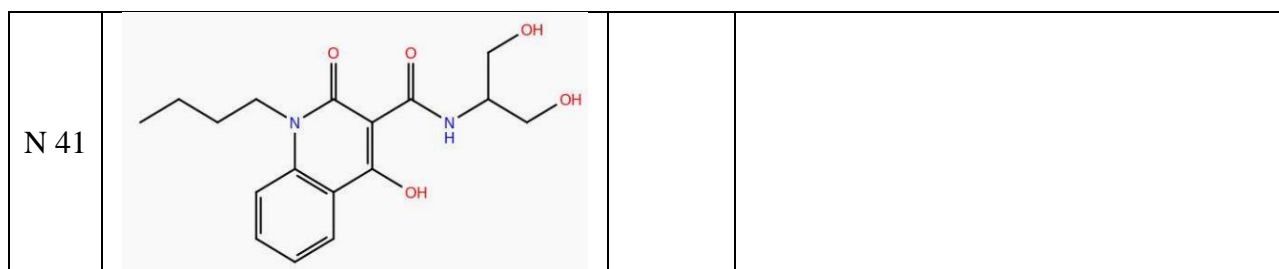
N 13		N 14	
N 15		N 16	
N 17		N 18	



N 19		N 20	
N 21		N 22	
N 23		N 24	
N 25		N 26	

N 27		N 28	
N 29		N 30	
N 31		N 32	

N 33		N 34	
N 35		N 36	
N 37		N 38	
N 39		N 40	



Αφού πρώτα τα μόρια προετοιμάστηκαν, σε συνθήκες βέλτιστης λειτουργίας του ενζύμου (pH 8), μελετήθηκε η δυνατότητα πρόσδεσης των παραπάνω μορίων με τρεις μεθόδους: με την μέθοδο απλής ακρίβειας SP, με την μέθοδο αυξημένης ακρίβειας XP και με την μέθοδο επαγόμενης προσαρμογής πρόσδεσης (induce fit docking ή IFD).

#### *B.1.8. Μελέτη πρόσδεσης νέων μορίων με την μέθοδο SP*

Η μελέτη πρόσδεσης, πραγματοποιήθηκε προκειμένου να ελεγχθεί η δυνατότητα πρόσδεσης των νέων μορίων που σχεδιάστηκαν. Το κριτήριο ελέγχου όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις είναι το ίδιο, Δηλαδή ένα μόριο το οποίο σχηματίζει δεσμό με την **HIS 90** ή την **ARG 513**, είναι ένας πιθανός παρεμποδιστής. Τα αποτελέσματα της μελέτης πρόσδεσης SP για τα νέα μόρια παρουσιάζονται παρακάτω:

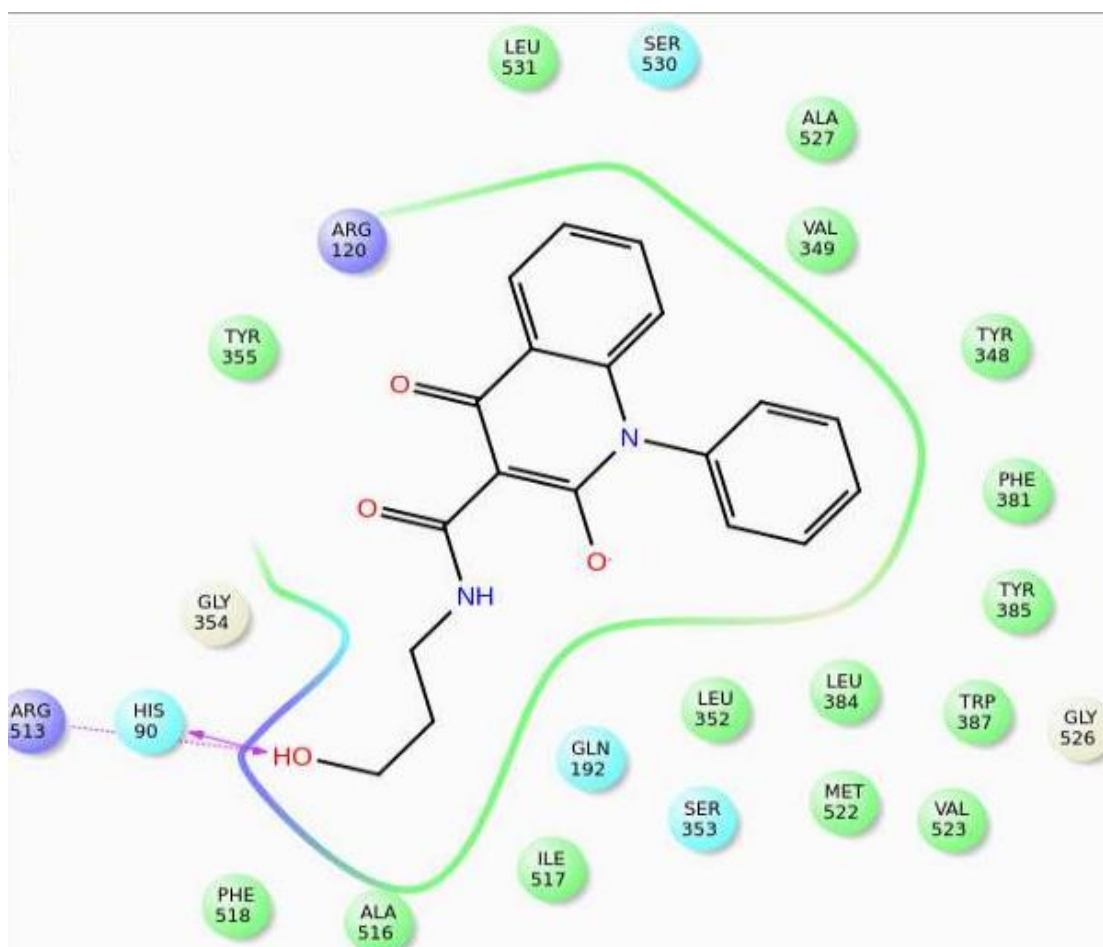
**Πίνακας 6:** Αποτελέσματα πρόσδεσης νέων μορίων με την μέθοδο SP

Κωδικός μορίου	Docking score	Glide emodel
N 8	-10.294	-65.553
N 7	-9.794	-38.211
N 11	-9.694	-70.200
N 26	-9.673	-29.698
N 22	-9.631	-54.332
N 3	-9.353	-64.012
N 21	-9.225	-57.526
N 40	-9.153	-67.771
N 2	-9.082	-66.216
N 17	-8.964	-41.822
N 20	-8.879	-29.274
N 39	-8.863	-26.989
N 33	-8.843	-28.711
N 16	-8.830	-52.265
N 19	-8.762	-57.770
N 4	-8.584	-48.199
N 6	-8.474	-51.103
N 5	-8.474	-54.259
N 12	-8.451	-58.226

N 32	-8.283	-32.471
N 1	-8.263	-60.834
N 18	-8.262	-26.883
N 41	-8.082	-55.596
N 30	-7.984	-26.425
N 35	-7.958	-55.831
N 36	-7.739	-21.949
N 31	-7.738	-38.963
N 15	-7.562	-12.860
N 34	-7.525	-50.659
N 25	-6.782	-16.470
N 37	-6.659	-3.623
N 24	-6.154	-30.509
N 17	-6.117	-17.127

Παρακάτω παρουσιάζονται ορισμένες εικόνες από τα μόρια με τα καλύτερα αποτελέσματα πρόσδεσης:

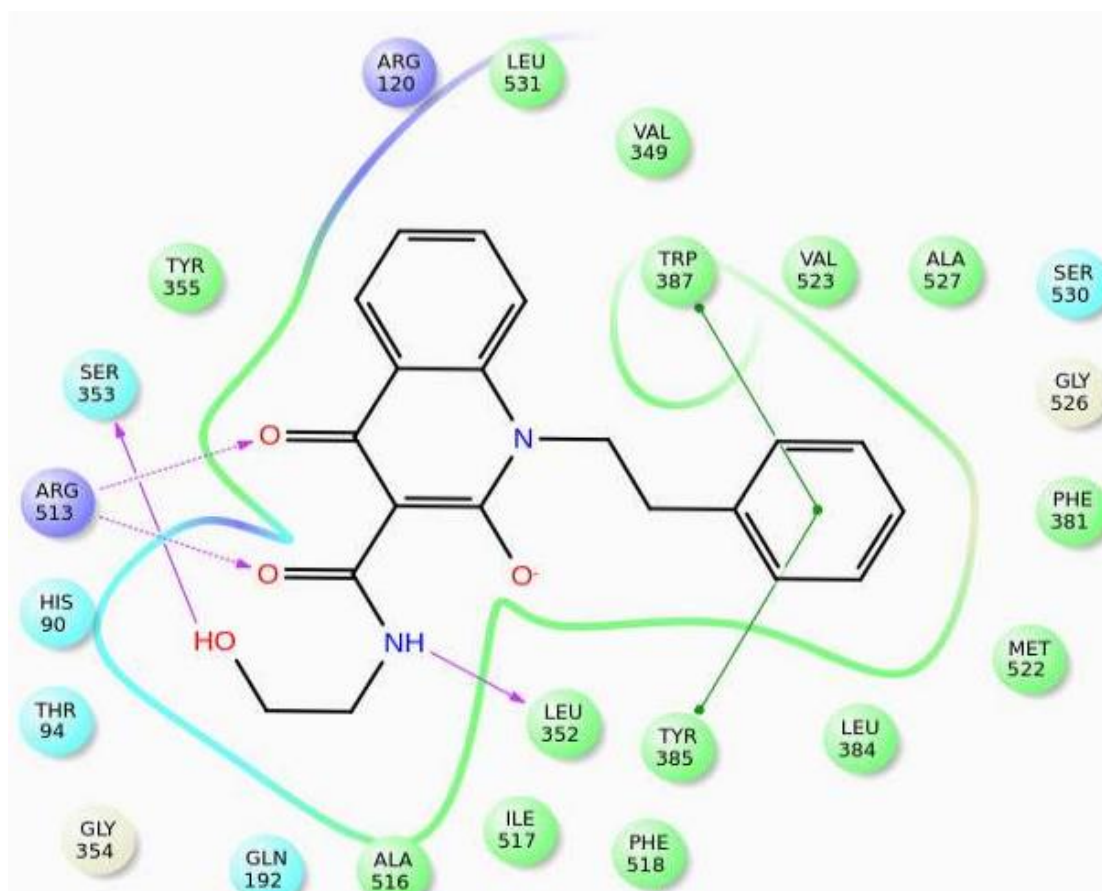
- Πρόσδεση του μορίου N 8



Εικόνα 17: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο N 8 και τα αμινοξέα της COX-2

Όπως φαίνεται από την παραπάνω απεικόνιση το συγκεκριμένο μόριο παρουσιάζει δεσμούς και με τα δύο σημαντικά αμινοξέα ιστιδίνη 90 και αργινίνη 513. Πιο συγκεκριμένα το μόριο σχηματίζει ένα δεσμό υδρογόνου με τον κύριο κορμό της ιστιδίνης 90 με απόσταση δεσμού 1.77 Å και με την πλευρική αλυσίδα της αργινίνης 513 με απόσταση δεσμού 1.96 Å. Το μικρό μήκος δεσμού υδρογόνου που παρουσιάζει η πρόσδεση έχει σαν αποτέλεσμα να παρουσιάζεται καλό αποτέλεσμα πρόσδεσης (-10.294). Επομένως, φαίνεται να έχει αρκετές πιθανότητες το μόριο N 8 να είναι πιθανός COX-2 παρεμποδιστής.

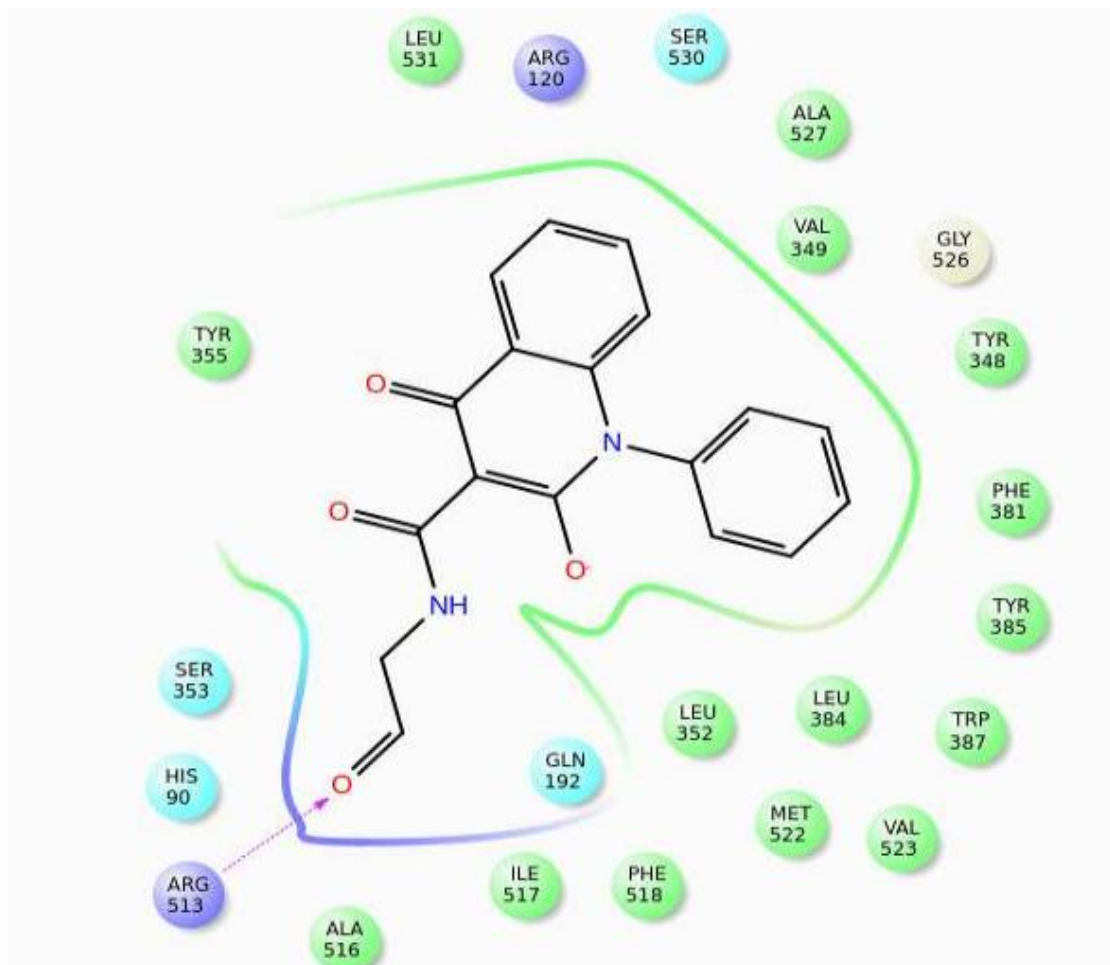
- Πρόσδεση του μορίου N 7



Εικόνα 18: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο N 7 και τα αμινοξέα της COX-2

Το μόριο N 7 παρουσιάζει καλά αποτελέσματα πρόσδεσης (-9.794) καθώς σχηματίζονται πολλοί δεσμοί (κατά κύριο λόγο δεσμοί υδρογόνου) ανάμεσα στο μόριο και το ενεργό κέντρο της COX-2. Μάλιστα το συγκεκριμένο μόριο σχηματίζει 2 δεσμούς υδρογόνου με την αργινίνη 513 (απόσταση δεσμών 1.96 Å και 2.74 Å αντίστοιχα) κάτι το οποίο το καθιστά ένα από τα πιθανά μόρια παρεμποδιστές.

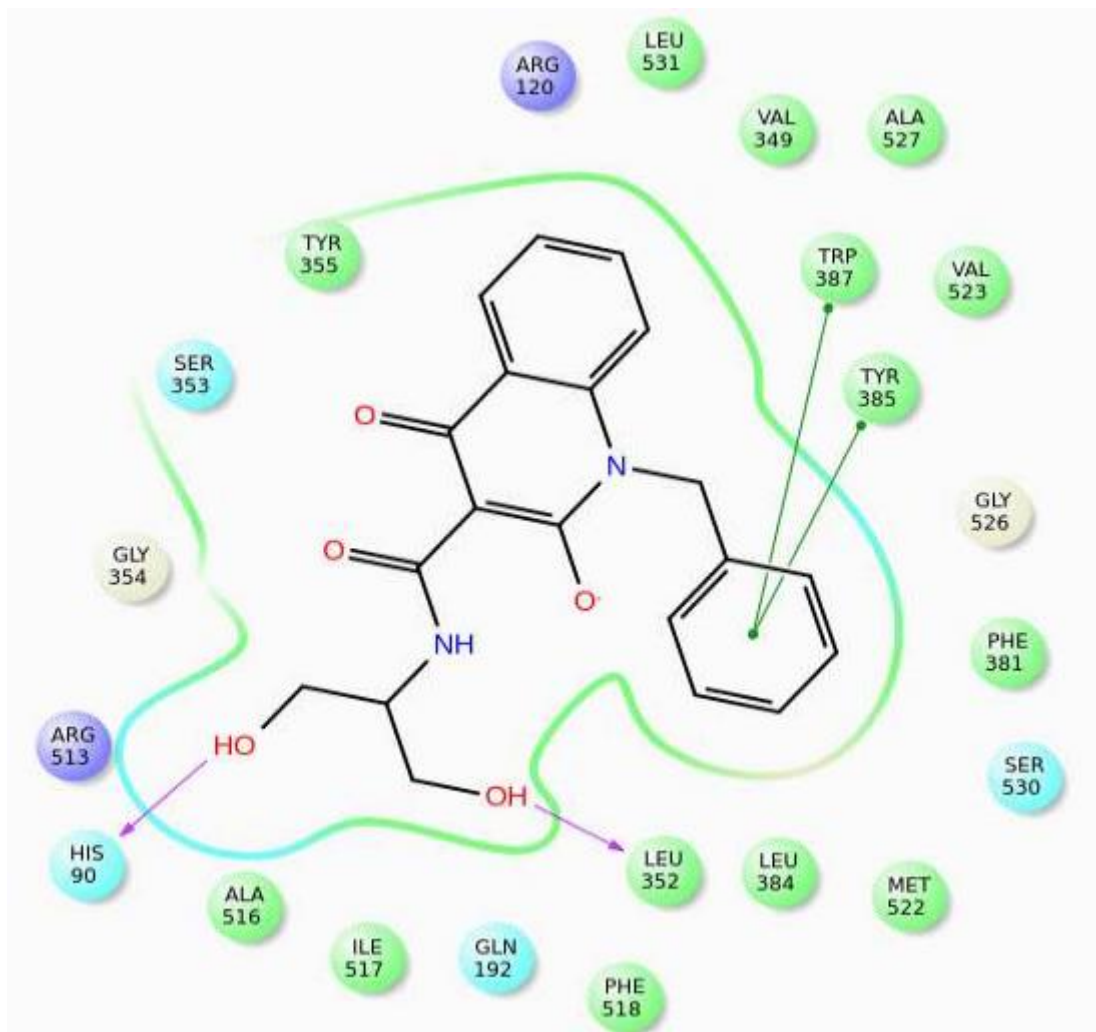
- Πρόσδεση του μορίου **N 11**



Εικόνα 19: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο **N 11** και τα αμινοξέα της COX-2

Το μόριο **N 11** παρουσιάζει έναν μόνο δεσμό, ο οποίος ωστόσο σχηματίζεται με την αργινίνη 513. Επομένως, θα πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω με την μελέτη πρόσδεσης ΧΡ προκειμένου να μπορεί να θεωρηθεί με μεγαλύτερη σιγουριά COX-2 παρεμποδιστής.

- Πρόσδεση του μορίου N 26

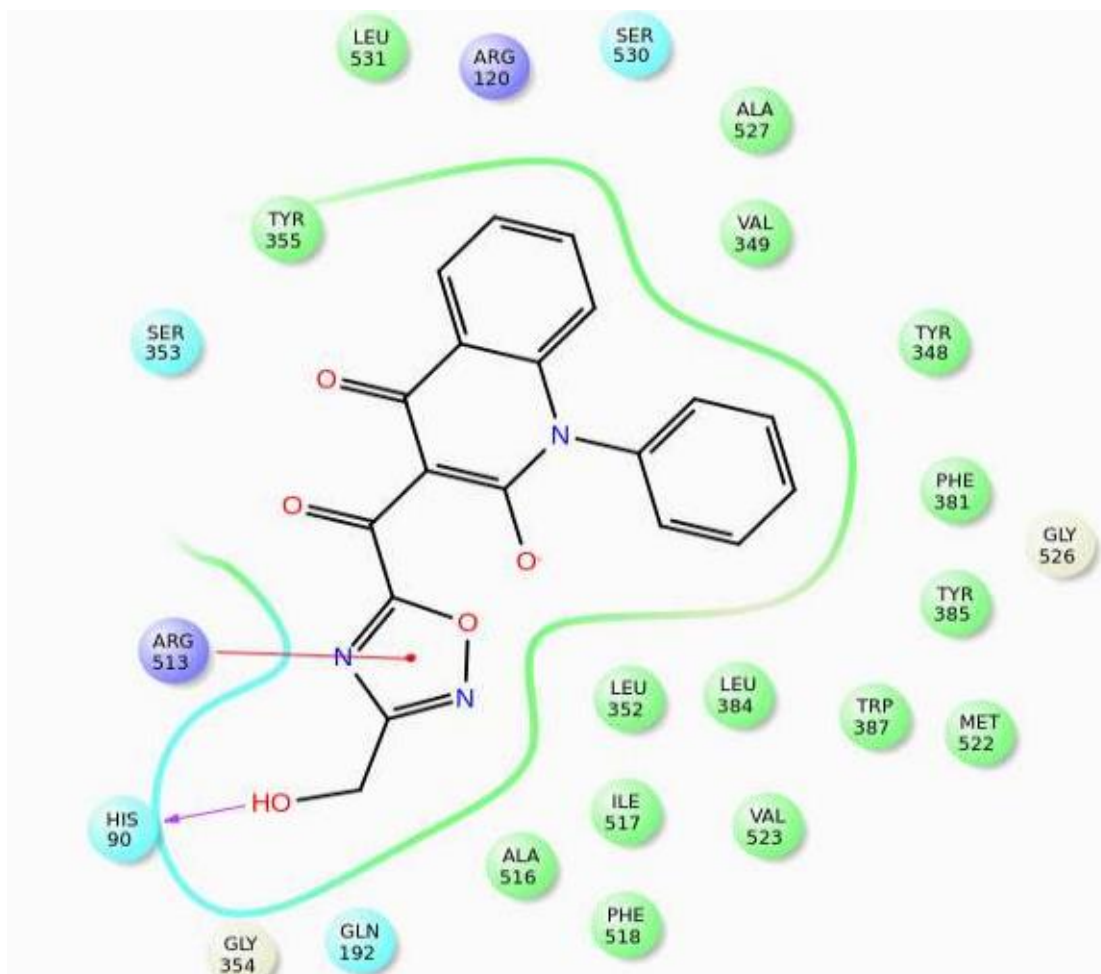


Εικόνα 20: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο N 26 και τα αμινοξέα της COX-2

Το συγκεκριμένο μόριο σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με τον κύριο κορμό της ιστοιδίνης 90 (απόσταση δεσμού 1.97 Å), ενώ σχηματίζεται ένας δεσμός υδρογόνου με την λευκίνη 352 και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με την τυροσίνη 385 και την τριπτοφάνη 387, κάτι το οποίο σταθεροποιεί την πρόσδεση του συγκεκριμένου μορίου (docking score -9.673).



- Πρόσδεση του μορίου N 22



Εικόνα 21: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο N 22 και τα αμινοξέα της COX-2

Το μόριο N 22 παρουσιάζει και τις δύο σημαντικές αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της COX-2 και επομένως θα πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω με την μελέτη πρόσδεσης XP για να επιβεβαιωθεί σε μεγαλύτερο βαθμό εάν το συγκεκριμένο μόριο είναι πιθανός COX-2 παρεμποδιστής.

#### *B.1.9. Μελέτη πρόσδεσης νέων μορίων με την μέθοδο XP*

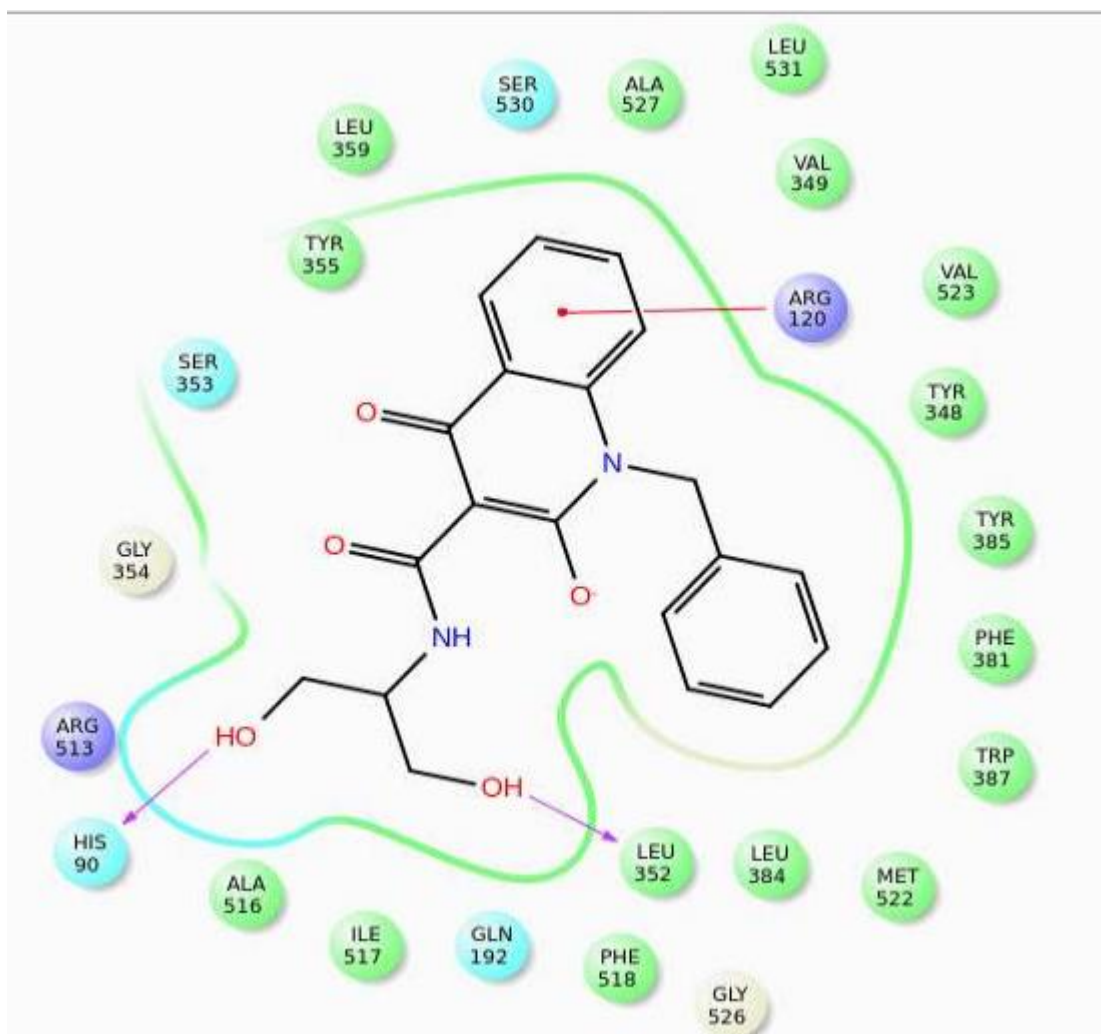
Οι καλύτερες πόζες που λήφθηκαν από την μέθοδο SP, χρησιμοποιήθηκαν και πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί αυξημένης ακρίβειας. Από τα αποτελέσματα που λήφθηκαν (Πίνακας 6, Παράρτημα Ε.5.) τα μόρια πιθανόν να έχουν ικανοποιητική πρόσδεση με την COX-2 είναι:

Πίνακας 7: Αποτελέσματα πρόσδεσης με την μέθοδο XP

Κωδικός μορίου	Docking score	Glide emodel
N 26	-11.136	-60.858
N 10	-10.851	-62.993
N 9	-10.811	-55.812
N 40	-10.806	-68.380
N 7	-10.244	-45.743
N 8	-10.200	-64.230
N 39	-10.092	-51.171
N 11	-9.824	-65.539
N 22	-9.634	-60.221
N 32	-9.404	-46.237
N 38	-9.306	-33.867
N 37	-9.221	-24.371
N 33	-9.212	-48.274
N 5	-9.133	-55.353
N 21	-9.114	-65.696
N 15	-9.018	-45.499
N 41	-8.956	-57.716
N 19	-8.702	-67.828
N 20	-8.675	-60.410
N 25	-8.391	-33.807
N 4	-8.301	-56.645
N 12	-8.161	-65.760
N 1	-7.960	-57.059
N 3	-7.939	-55.338
N 34	-7.747	-50.278
N 6	-7.668	-65.114
N 2	-7.210	-58.107
N 35	-6.439	-55.774
N 36	-4.423	-8.309
N 18	-2.646	-36.916
N 31	-2.538	-17.364
N 30	-2.391	-32.014

Παρακάτω θα παρουσιαστούν ορισμένα μόρια που παρουσίασαν καλά αποτελέσματα πρόσδεσης καθώς επίσης και οι αλληλεπιδράσεις που παρουσιάζονται με το ενεργό κέντρο:

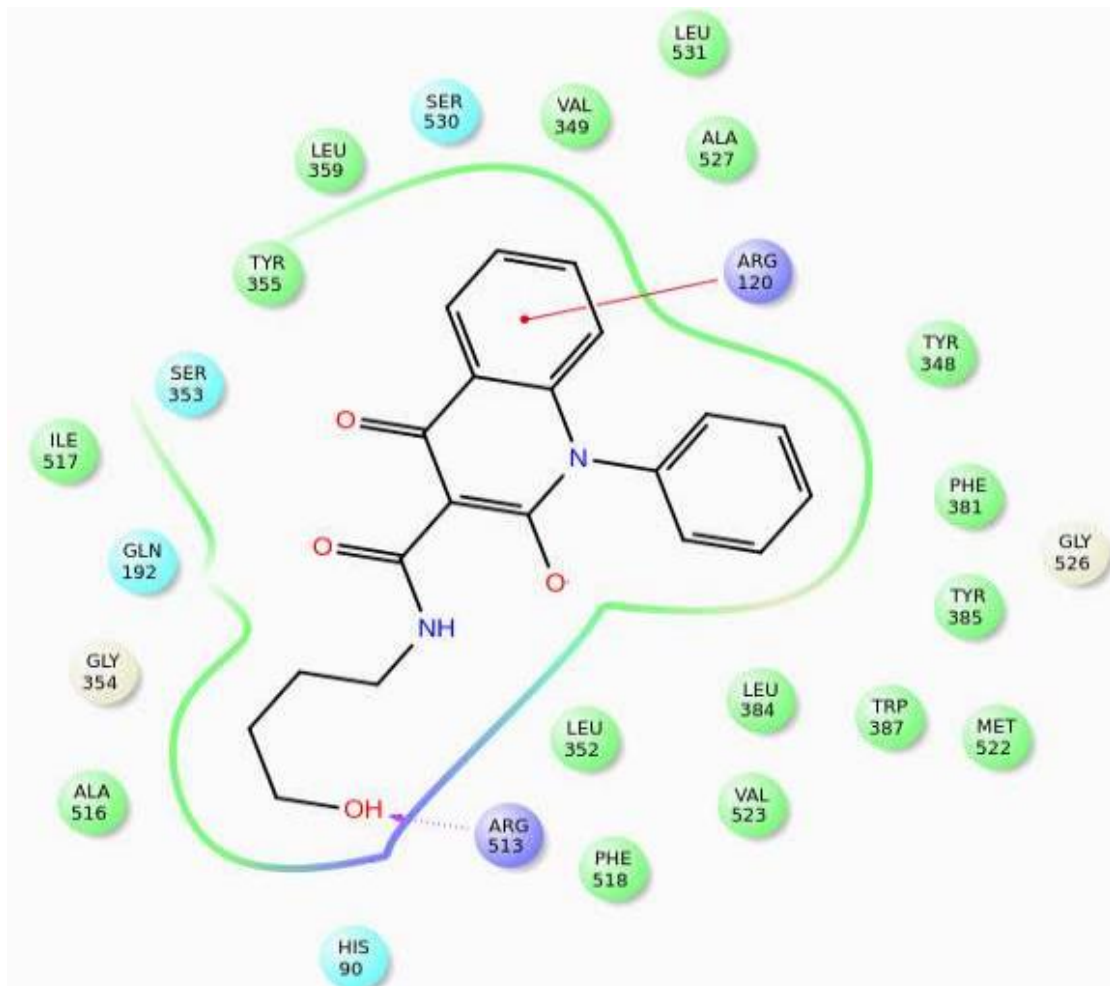
- Πρόσδεση του μορίου N 26



Εικόνα 22: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο N 26 και τα αμινοξέα της COX-2

Όπως φαίνεται από την παραπάνω απεικόνιση, το μόριο σχηματίζει ένα δεσμό υδρογόνου με τον κύριο κορμό του αμινοξέος ιστιδίνη 90 και κατά συνέπεια είναι ένα από τα πιθανά μόρια παρεμποδιστές της COX-2. Μάλιστα το μήκος του δεσμού είναι αρκετά μικρό (2 Å) και ο δεσμός υδρογόνου με την λευκίνη 352 και την υδρόφοβη αλληλεπίδραση με την αργινίνη 120, συμβάλουν στην σταθεροποίηση της πρόσδεσης, όπως φαίνεται επίσης και από τα αποτελέσματα πρόσδεσης (docking score -11.136). Μάλιστα τα αποτελέσματα της πρόσδεσης είναι αρκετά καλά και πλησιάζουν στα αποτελέσματα του αρχικού μορίου της βιβλιοθήκης που τροποποιήθηκε.

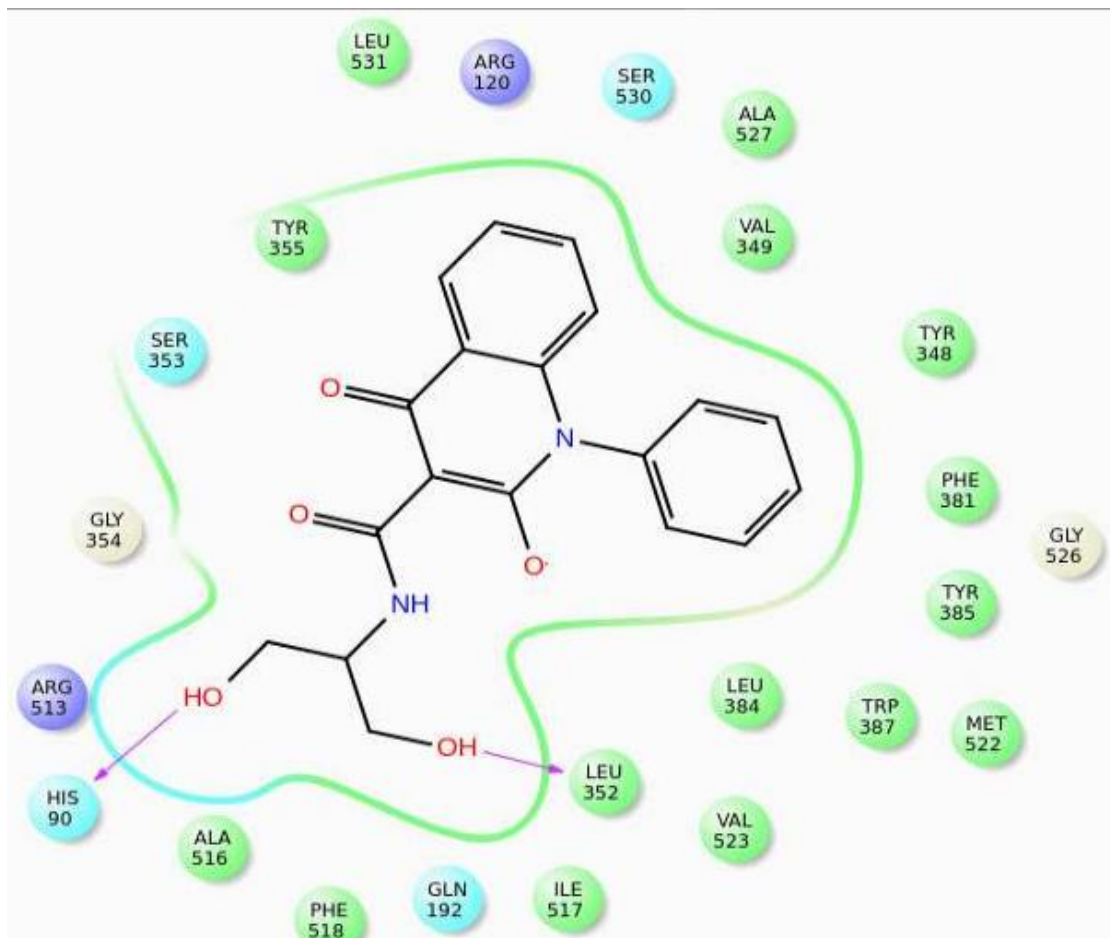




Εικόνα 24: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο N 9 και τα αμινοξέα της COX-2

Και τα δύο μόρια σχηματίζουν δεσμό υδρογόνου με την αργινίνη 513, και η πρόσδεση στο ενεργό κέντρο της COX-2 σταθεροποιείται με την βοήθεια της υδρόφοβης αλληλεπίδρασης της αργινίνης 120. Επομένως και τα δύο μόρια έχουν καλές πιθανότητες να είναι COX-2 παρεμποδιστές (docking score -10.851 και -10.811 αντίστοιχα)

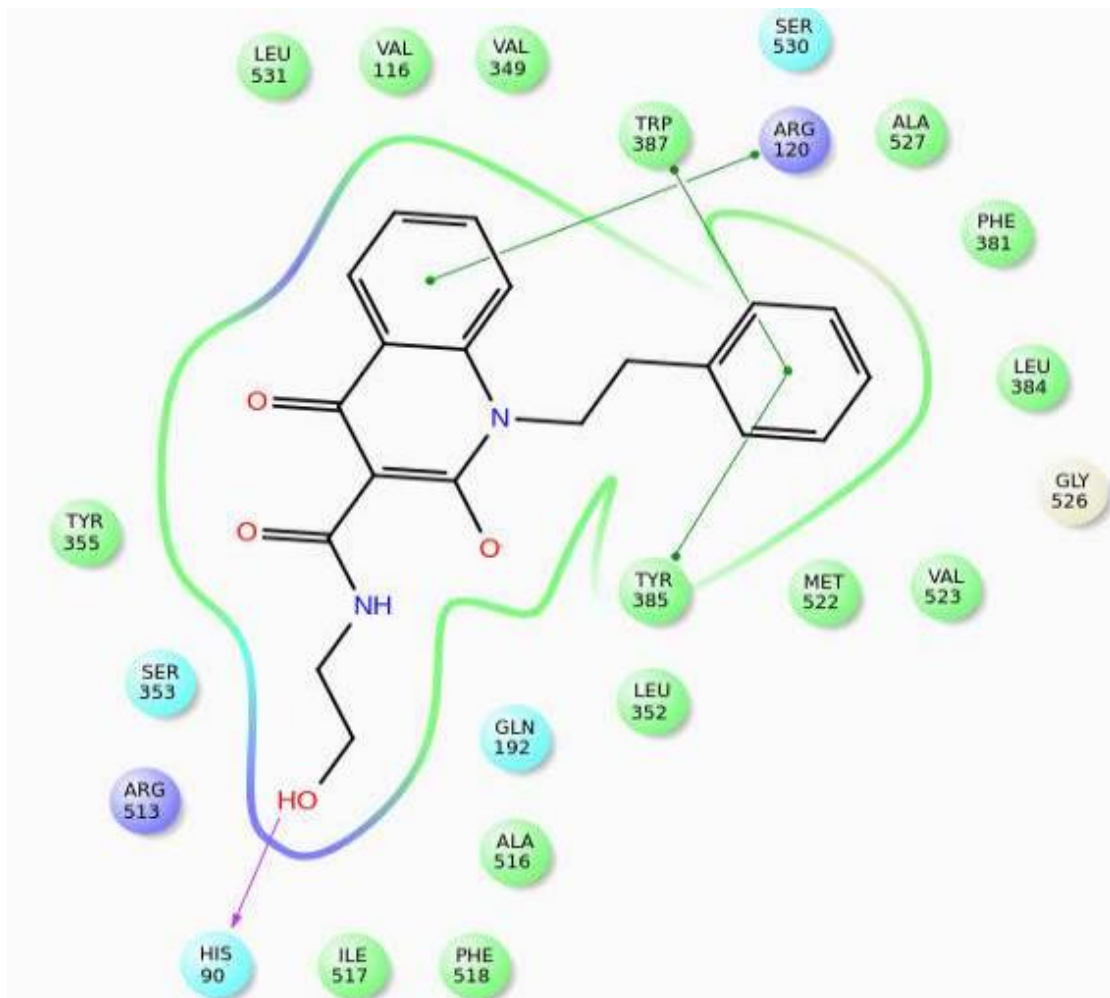
- Πρόσδεση του μορίου N 40



Εικόνα 25: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο N 40 και τα αμινοξέα της COX-2

Όπως φαίνεται παραπάνω ο συγκεκριμένο μόριο σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με την ιστοιδίνη 90 και την λευκίνη 352 (μήκος δεσμού 1.97 Å και 2.04 Å αντίστοιχα). Ωστόσο φαίνεται ότι το κύριο μέρος του μορίου δεν σχηματίζει κάποια αλληλεπίδραση με το ενεργό κέντρο της COX-2. Επομένως ακόμα και αν είναι παρεμποδιστής της COX-2 πιθανόν να αποδεσμεύεται εύκολα από το ενεργό της κέντρο.

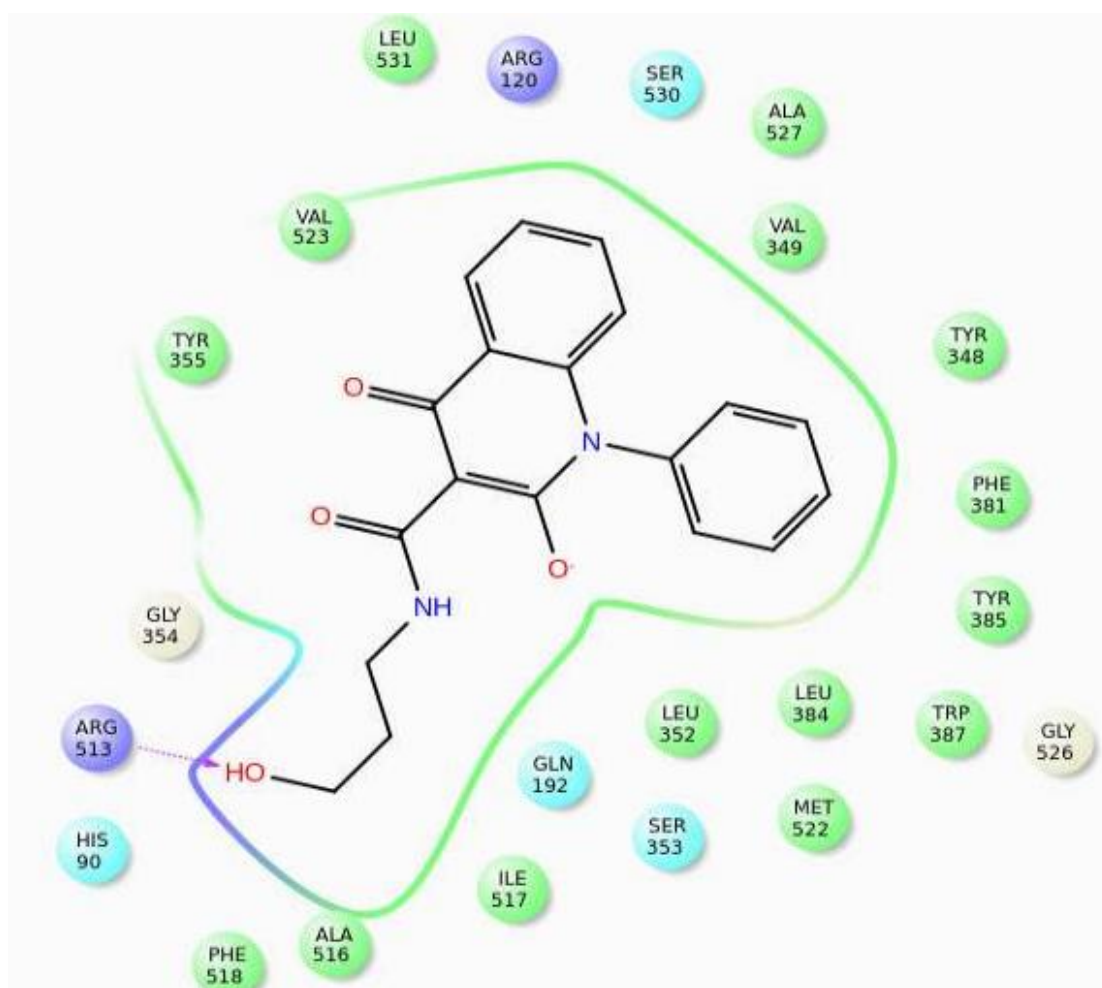
- Πρόσδεση του μορίου N 7



Εικόνα 26: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο N 7 και τα αμινοξέα της COX-2

Στο συγκεκριμένο μόριο παρατηρείται ότι υπάρχει η απαραίτητη αλληλεπίδραση με την ιστονίνη 90 ενώ επίσης υπάρχουν αρκετές υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις ώστε να σταθεροποιηθεί η πρόσδεση του μορίου.

- Πρόσδεση του μορίου N 8



Εικόνα 27: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο N 8 και τα αμινοξέα της COX-2

#### *B.1.10. Μελέτη πρόσδεσης νέων μορίων με την μέθοδο επαγόμενης προσαρμογής πρόσδεσης (Induced Fit Docking)*

Τα νέα μόρια που σχεδιάστηκαν, μελετήθηκαν και με την μέθοδο επαγόμενης προσαρμογής πρόσδεσης. Η διαφορά της συγκεκριμένης μεθόδου από τις άλλες δύο, είναι ότι κατά τους υπολογισμούς των δεσμών πρόσδεσης του παρεμποδιστή με την πρωτεΐνη, πραγματοποιούνται μικρές μεταβολές στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης και μελετάται ποια είναι η διάταξη με την χαμηλότερη ενέργεια. Οι μέθοδοι SP και XP, βασίζονταν μόνο στην του μορίου για την εύρεση της διάταξης με την χαμηλότερη ενέργεια. Έτσι η μέθοδος IFD, δίνει ποιο αξιόπιστα αποτελέσματα, ωστόσο ο υπολογιστικός χρόνος που απαιτείται αυξάνεται σημαντικά.

Τα αποτελέσματα της μελέτης πρόσδεσης των μορίων στην COX-2 παρουσιάζονται στο παρακάτω πίνακα:

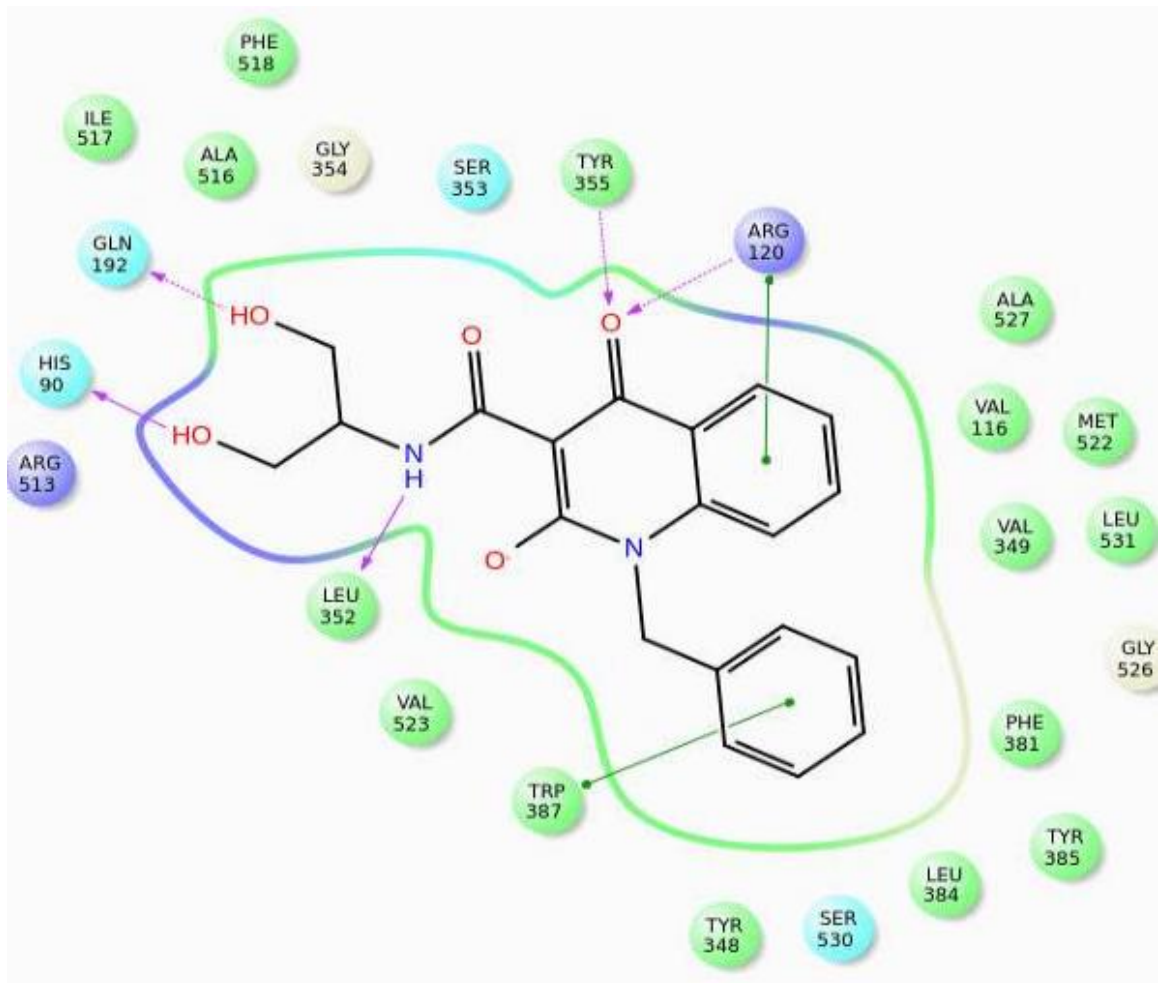


Πίνακας 8: Αποτελέσματα πρόσδεσης με την μέθοδο IFD

Κωδικός μορίου	Docking score	Glide emodel
N 26	-12.385	-104.134
N 40	-12.067	-108.095
N 31	-11.601	-96.955
N 29	-11.317	-99.272
N 17	-11.219	-98.231
N 9	-11.208	-98.536
N 35	-11.102	-100.105
N 23	-10.731	-92.431
N 6	-10.606	-89.161
N 22	-10.609	-102.421
N 13	-10.553	-84.304
N 38	-10.502	-88.256
N 8	-10.455	-97.066
N 16	-10.421	-84.256
N 18	-10.419	-93.079
N 7	-10.288	-91.257
N 11	-10.218	-85.929
N 39	-10.180	-84.171
N 24	-10.155	-90.910
N 28	-10.146	-92.895
N 37	-10.139	-84.618
N 33	-10.044	-86.223
N 10	-10.023	-99.567
N 20	-10.010	-75.811
N 14	-9.782	-84.493
N 12	-9.499	-81.198
N 5	-9.264	-80.773
N 3	-9.236	-78.983
N 32	-9.214	-77.904
N 4	-9.179	-66.308
N 2	-8.725	-73.482
N 41	-8.652	-90.991
N 1	-8.291	-67.898

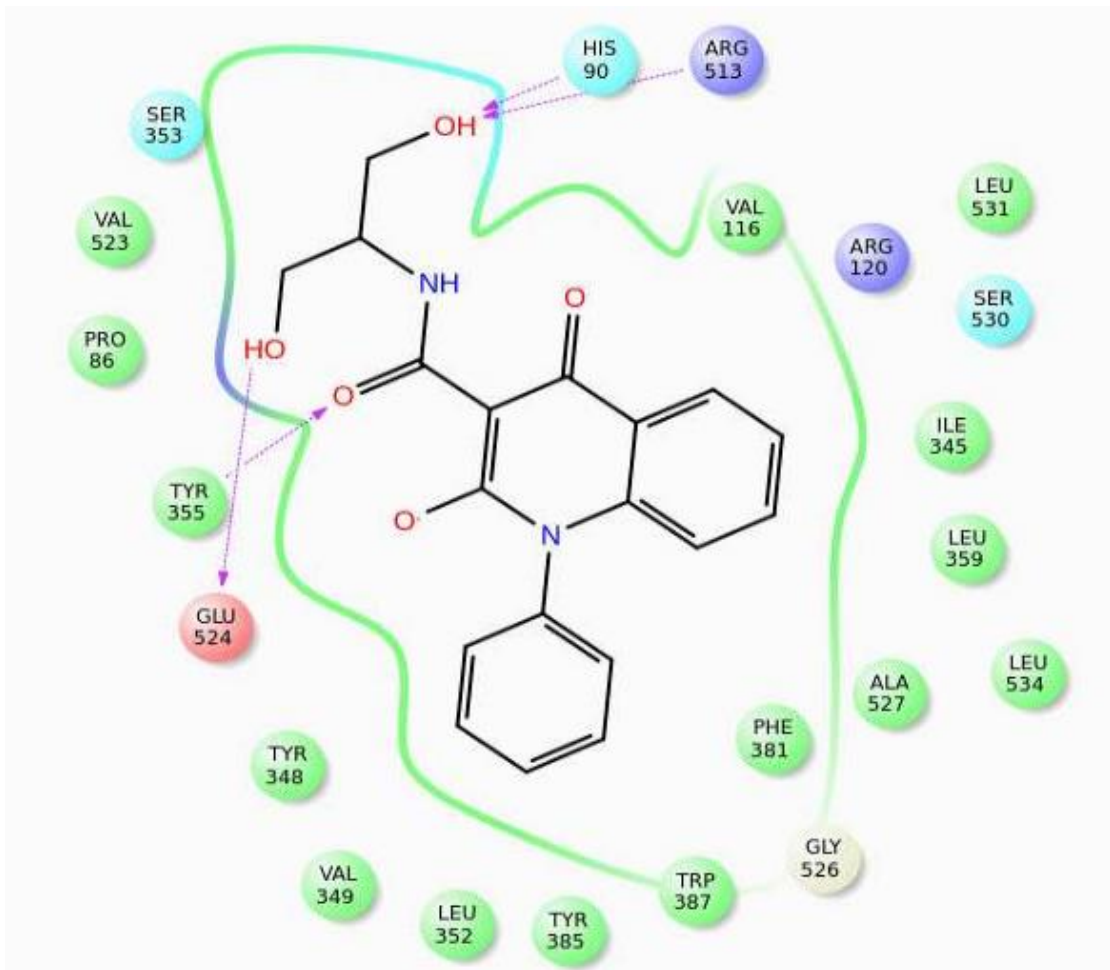
Όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα της μελέτης IFD, τα μόρια που παρουσίαζαν τις απαραίτητες αλληλεπιδράσεις και είχαν καλά αποτελέσματα πρόσδεσης, παρουσιάζουν καλά αποτελέσματα πρόσδεσης και στην συγκεκριμένη μελέτη. Ωστόσο στην περίπτωση αυτή, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα με μεγαλύτερη ακρίβεια. Οι πόζες των μορίων στις οποίες παρουσιάζονται οι αλληλεπιδράσεις με το ενεργό κέντρο, παρουσιάζονται συνοπτικά παρακάτω:

- Πρόσδεση του μορίου N 26



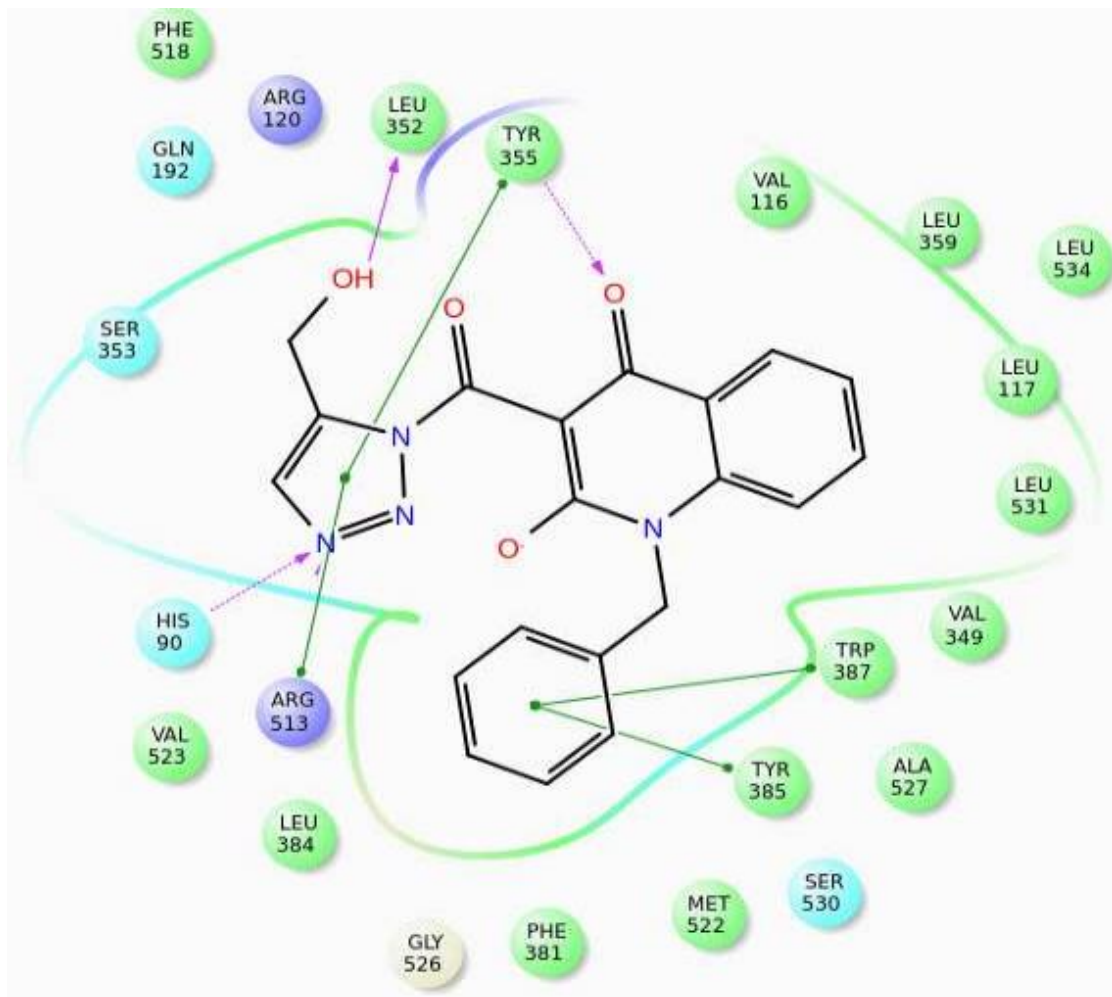
Εικόνα 28: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο N 26 και τα αμινοξέα της COX-2

- Πρόσδεση του μορίου N 40



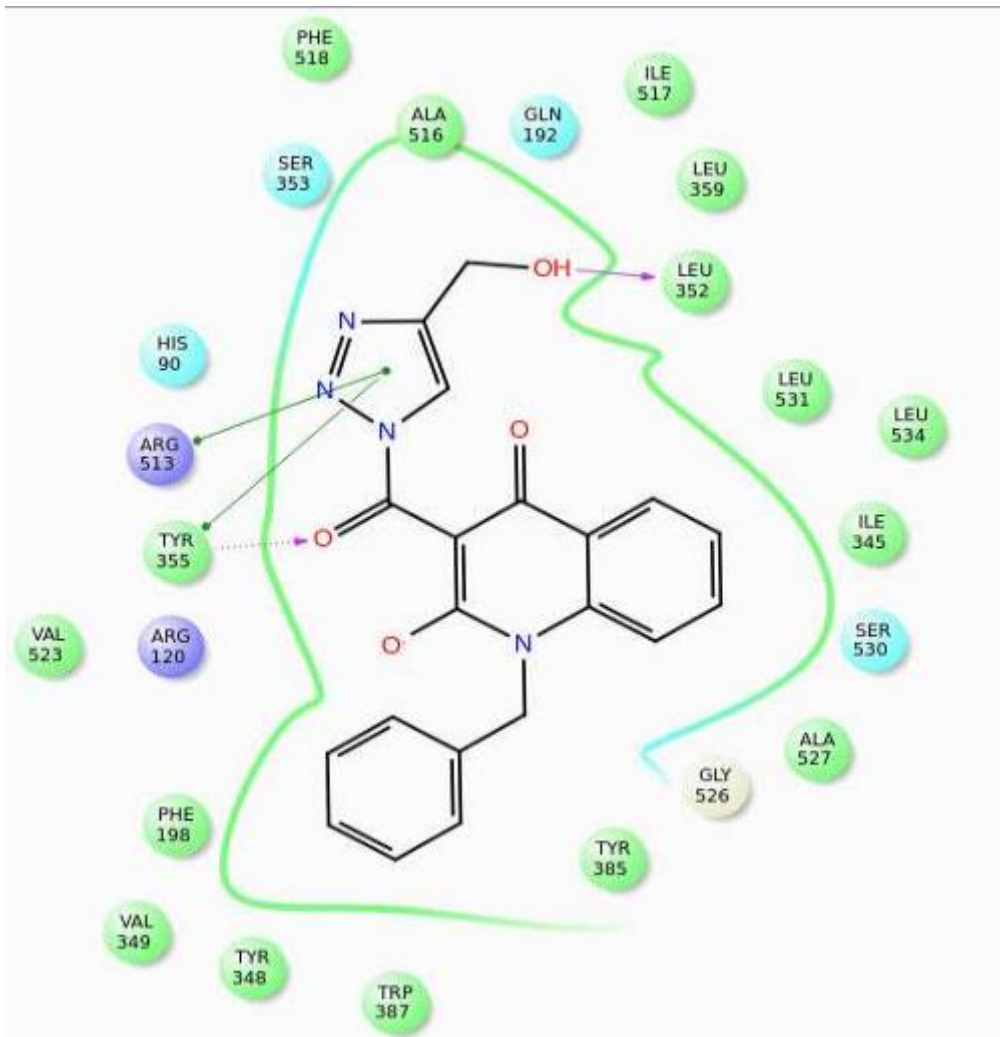
Εικόνα 29: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο N 40 και τα αμινοξέα της COX-2

- Πρόσδεση του μορίου N 31



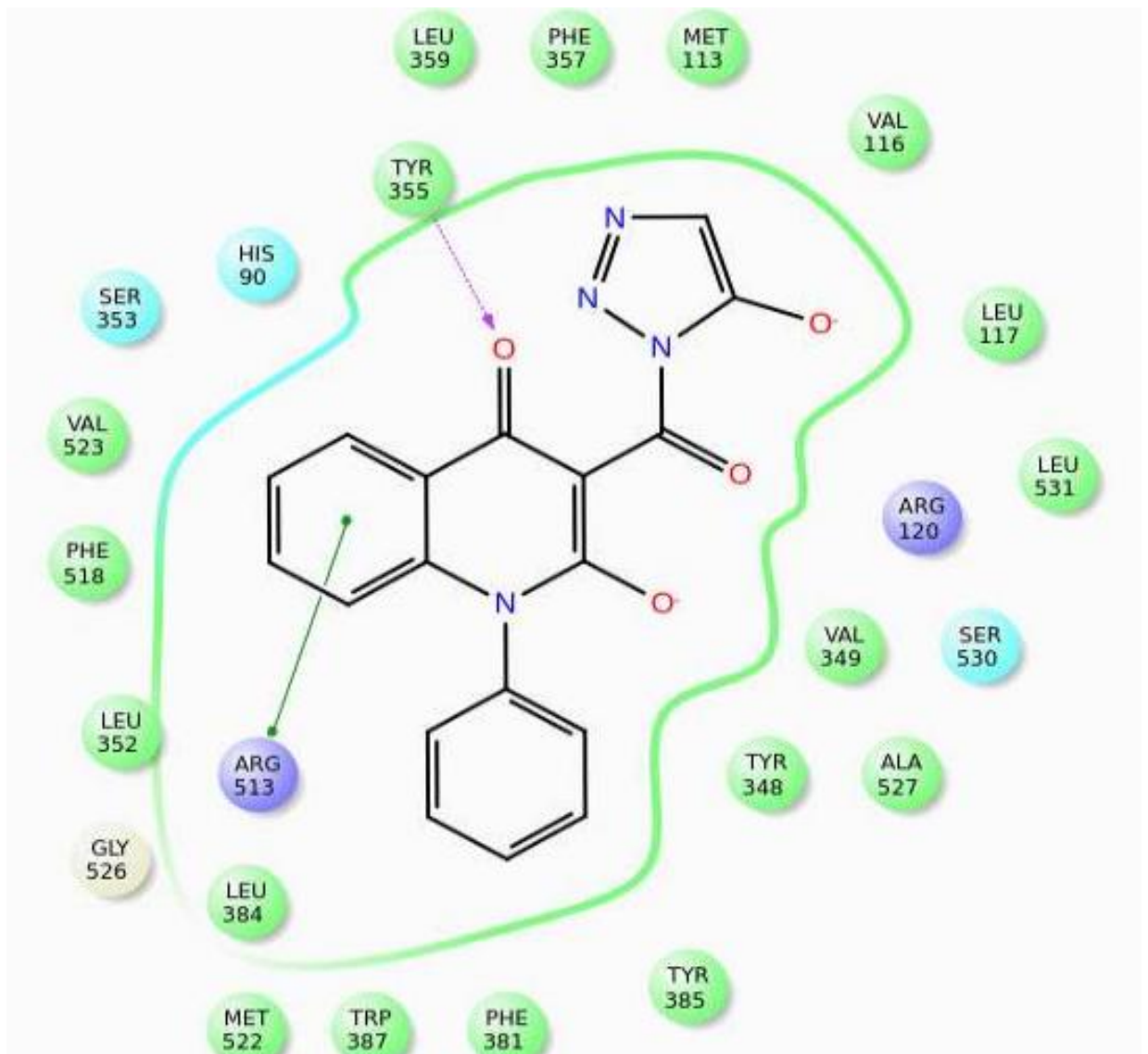
Εικόνα 30: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο N 31 και τα αμινοξέα της COX-2

- Πρόσδεση του μορίου N 29



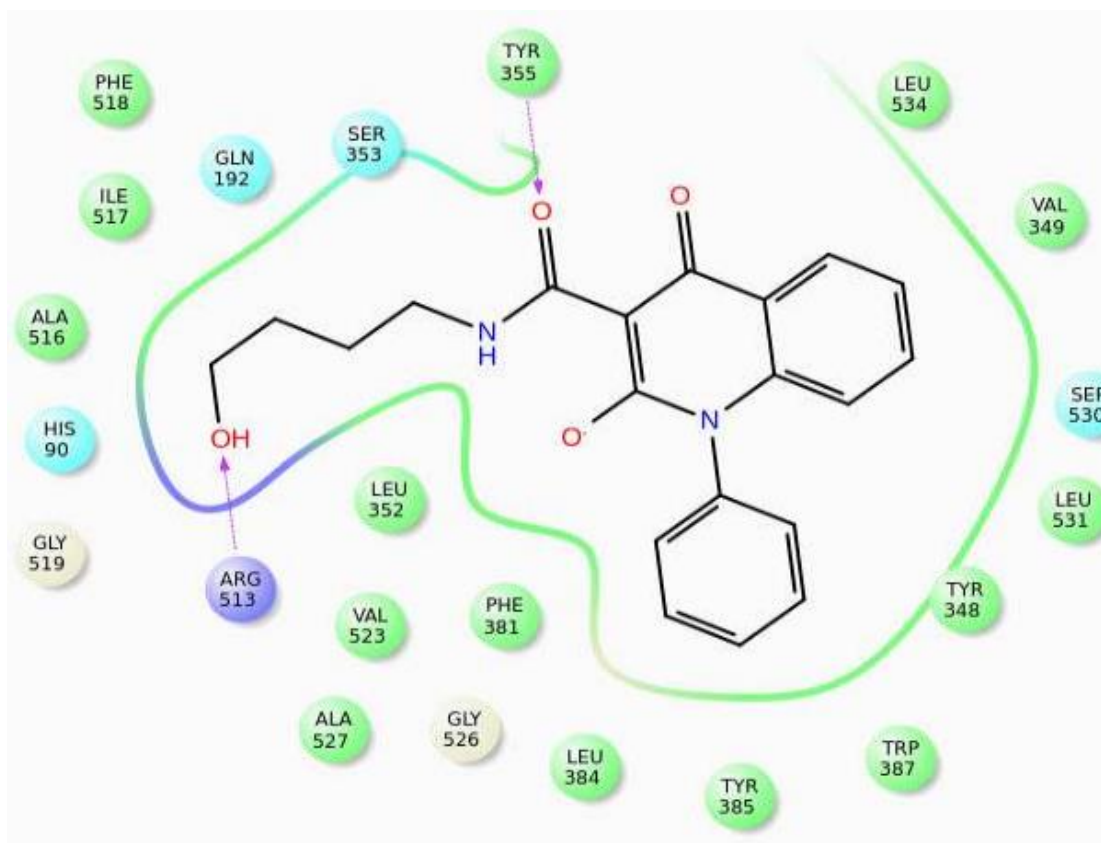
Εικόνα 31: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο N 29 και τα αμινοξέα της COX-2

- Πρόσδεση του μορίου N 17



Εικόνα 32: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο N 17 και τα αμινοξέα της COX-2

- Πρόσδεση του μορίου N 9



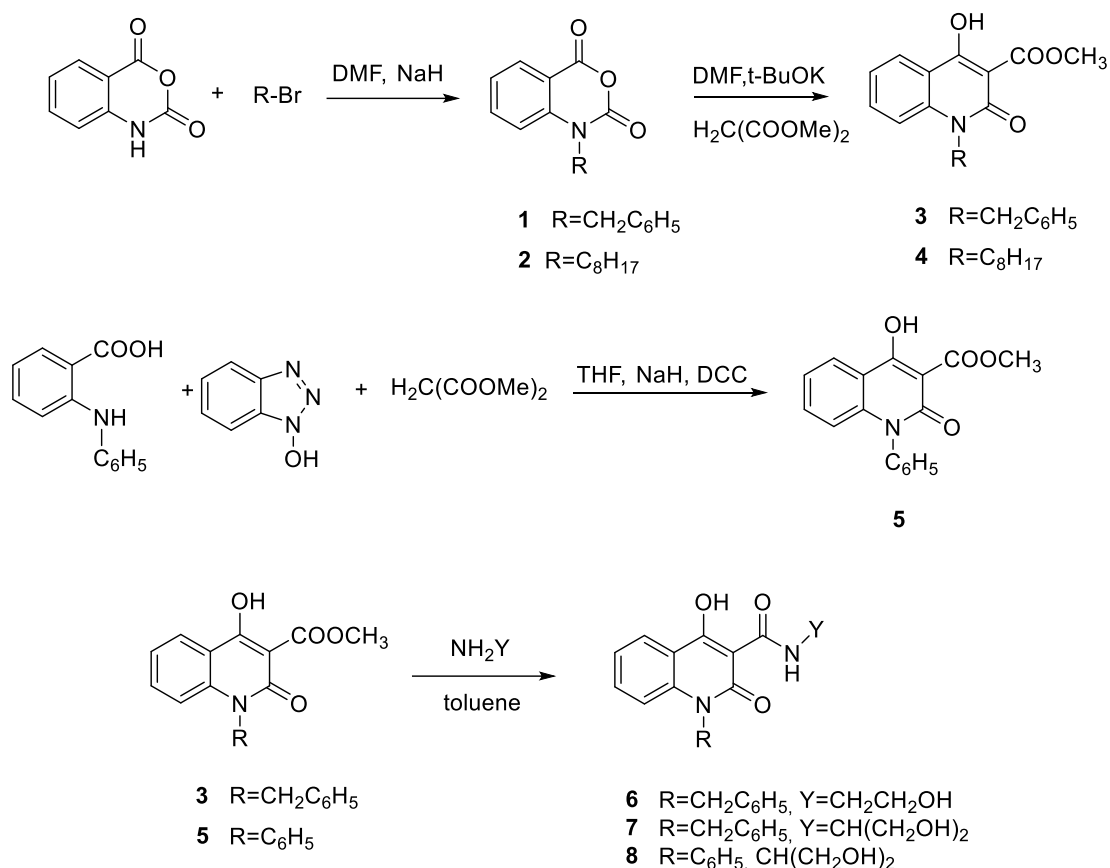
Εικόνα 33: Δεσμοί ανάμεσα στο μόριο N 9 και τα αμινοξέα της COX-2

#### B.1.11. Σχολιασμός αποτελεσμάτων μοριακής μοντελοποίησης νέων μορίων-Συμπεράσματα

Με βάση τα αποτελέσματα που λήφθηκαν, παρατηρείται ότι ορισμένα από τα νέα μόρια που σχεδιάστηκαν, παρουσίαζαν επίσης ισχυρή πρόσδεση με την COX-2, χωρίς ωστόσο να υπάρχει κάποιο μόριο το οποίο να παρουσιάζει καλύτερη πρόσδεση σε σχέση με το αρχικό. Ένα γενικό συμπέρασμα που μπορεί να εξαχθεί από τα αποτελέσματα αυτά είναι ότι η αύξηση της αλυσίδας ανάμεσα στο άτομο του αζώτου και του αρωματικού δακτυλίου στο υδρόφοβο τμήμα του μορίου, καθώς επίσης και η ύπαρξη παραπάνω από μίας αλυσίδας συνδεδεμένα με υδροξύλια στο υδρόφιλο τμήμα του μορίου, δίνει μία μεγαλύτερη ελευθερία στην κίνηση των επιμέρους τμημάτων, με αποτέλεσμα να παρατηρείται πρόσδεση και στο υδρόφιλο και στο υδρόφοβο τμήμα του ενζύμου. Έτσι τα συγκεκριμένα μόρια θα πρέπει να μελετηθούν επίσης με *in vitro* πειράματα. Για τον λόγο αυτό, στην συνέχεια της διπλωματικής εργασίας θα συντεθούν ορισμένα από τα μόρια που σχεδιάστηκαν και μελετήθηκαν με την βοήθεια της μοριακής μοντελοποίησης.

## B.2. Σύνθεση των νέων μορίων

Η συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε για την σύνθεση των νέων μορίων παρουσιάζεται στο Σχήμα 8:



Σχήμα 8: Πορεία σύνθεσης νέων μορίων

Κατά την πρώτη αντίδραση της συνθετικής πορείας, πραγματοποιείται μία πυρηνόφιλη υποκατάσταση ανάμεσα σε ένα αλκυλαλογονίδιο και τον ισατοϊκό ανυδρίτη. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται το βενζυλοβρωμίδιο και το 1-βρωμοοκτάνιο και παράγεται ο N-βενζυλο-ανυδρίτης (**1**) και ο N-οκτυλο-ισατοϊκός ανυδρίτης (**2**) αντίστοιχα. Η αντίδραση των N-αλκυλο-ισατοϊκών ανυδριτών **1** και **2** με μεθονικό διμεθυλεστέρα σε διαλύτη DMF παρουσία t-BuOK ως βάση οδηγεί στις αντίστοιχες N-υποκατεστημένες-3-μεθοξυκαρβονυλο-4-υδροξυ-2-κινολινόνες **3** και **4**.

Η σύνθεση της N-φαινυλο-3-μεθοξυκαρβονυλο-4-υδροξυ-2-κινολινόνης (**5**) πραγματοποιείται μέσω αντίδρασης C-ακυλίωσης του μεθονικού διμεθυλεστέρα από το ενεργοποιημένο N-φαινυλο-ανθρανικό οξύ και αυθόρμητη κυκλοποίηση του προϊόντος C-ακυλίωσης προς το επιθυμητό προϊόν **5**.



Τέλος, μέσω αμινόλυσης οι εστέρες (**2**) και (**8**), μετατρέπονται στα αμίδια 6, 7 και 8. Η αντίδραση πραγματοποιείται με θέρμανση των εστέρων με την κατάλληλη αμίνη (αιθανολαμίνη ή σερινόλη) σε διαλύτη τολουόλιο.

### B.2.1. Όργανα και συσκευές

Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ( $^1\text{H}$ ) των ενώσεων που συντέθηκαν έχουν καταγραφεί με τα εξής όργανα:

- Varian Gemini 300MHz

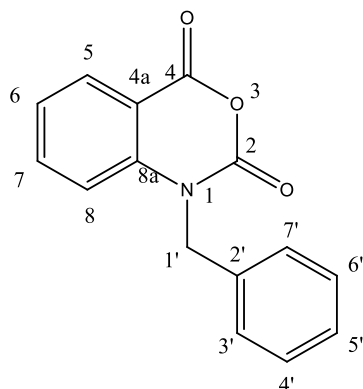
Οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων, δίνονται σε ppm. Η πολλαπλότητα των σημάτων στα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR αναφέρονται ως:

- s (singlet, απλό)
- d (doublet, διπλό)
- t (triplet, τριπλό)
- q (quartet, τετραπλό)
- m (multiplet, πολλαπλό)
- br (broad, ευρύ).

Οι σταθερές συζεύξεως J δίνονται σε Hz.

Για την ξήρανση των παραγόμενων ενώσεων χρησιμοποιήθηκε αντλία υψηλού κενού Edwards

### B.2.2. Σύνθεση του N-βενζυλο-ισατοϊκού ανιδρύτη (**1**)



Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 50 mL DMF. Στην συνέχεια, προστίθενται 15 mmol (0.36 g) υδρίδιο του νατρίου (NaH) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και υπό συνεχή ανάδευση και 10 mmol (2 g) ισατοϊκού ανιδρύτη στο διάλυμά. Το αιώρημα που δημιουργείται, ψύχεται με την βοήθεια παγόλουτρου στους 0°C και πραγματοποιείται στάγδην προσθήκη 12 mmol (1.44 mL) βενζυλοβρωμιδίου (εντόνως εξώθερμη αντίδραση). Το μίγμα αναδεύεται για 24 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

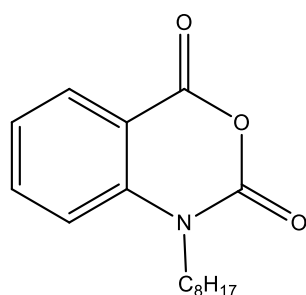
Μετά από την πάροδο 24 h, το διάλυμα μεταφέρεται σε ένα ποτήρι ζέσεως, στο οποίο περιέχεται πάγος. Παρατηρείται καταβύθιση στερεού γκριζού χρώματος. Το στερεό λαμβάνεται με διήθηση υπό κενό και έκπλυση με διαιθυλαιθέρα. Η ποσότητα του στερεού που λήφθηκε ήταν 1.49 g.

Απόδοση: 41.1%

Σημείο τήξης: 135-136°C (βιβλιογραφική τιμή 137-140°C [53])

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.16 (1H, d, J=9.3 Hz, H-5), 8.06 (1H, d, J=10.8 Hz, H-8), 7.63 (1H, t, J=8 Hz, H-7), 7.34 (5H, m, J=7.1 Hz, H-3', H-4', H-5', H-6' & H-7') 7.14 (1H, t, J=10.5 Hz, H-6) 5.32 (2H, s, H-1')

### B.2.3. Σύνθεση του 1-οκτυλ-ισατοϊκού ανυδρίτη (2)



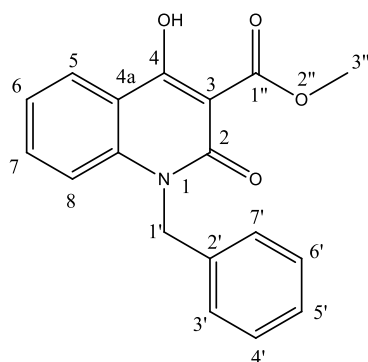
Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 50 mL DMF, 15 mmol (0.36 g) υδρίδιο του νατρίου (NaH) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και υπό συνεχή ανάμειξη. Έπειτα προστίθενται 10 mmol (2 g) ισατοϊκού ανυδρίτη στο διάλυμά. Το αιώρημα που δημιουργείται ψύχεται με την βοήθεια πάγου στους 0°C και προστίθεται σταγόδην 12 mmol (2.09 mL) βρωμοοκτανίου (εντόνως εξώθερμη αντίδραση). Το μίγμα αναδεύεται για 24 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Μετά από την πάροδο 24 h το διάλυμά μεταφέρεται σε ένα ποτήρι ζέσεως, στο οποίο περιέχεται πάγος. Στην συνέχεια το διάλυμα εκχυλίζεται με διεθυλεθέρα και η οργανική φάση εξατμίζεται ως ότου να ληφθεί υγρό λευκού χρώματος, το οποίο στερεοποιούνταν σε θερμοκρασία 3-5°C. Το προϊόν χρησιμοποιήθηκε στο επόμενο στάδιο σύνθεσης χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

#### B.2.4. Σύνθεση της 1-βενζυλο-3-μεθοξυκαρβονυλο-4-υδροξυ-2-κινολινόνης (3)

Η ένωση (3) συντέθηκε με δύο διαφορετικές μεθόδους:

##### B.2.4.1. Σύνθεση του εστέρα (3) με χρήση NaH ως βάσης



Σε σφαιρική φιάλη τοποθετούνται 15 mL DMF, και στην συνέχεια προστίθενται 4 mmol (0.46 mL) μηλονικού διμεθυλεστέρα. Το σύστημα ψύχεται στους 0°C, με την βοήθεια πάγου και προστίθενται 4 mmol (0.096 g) το NaH. Στην συνέχεια προστέθηκαν 2 mmol (0.5 g) της ένωση **1** και το όλο σύστημα τοποθετήθηκε σε λουτρό θερμοκρασίας 80°C.

Μετά από χρονικό διάστημα 1.5 ώρας, προστέθηκε στο διάλυμα μικρή ποσότητα HCl 10%, και το διάλυμα τοποθετήθηκε σε ποτήρι ζέσεως, στο οποίο περιείχε πάγο. Σχηματίστηκε στερεό κολλώδους μορφής, το οποίο διαλύθηκε σε οξικό αιθυλεστέρα και πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με χρήση οξικού αιθυλεστέρα ως οργανικής φάσης. Από την εκχύλιση λήφθηκε η οργανική φάση από την οποία απομακρύνθηκαν τα ίχνη νερού με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Το διάλυμά εξατμίστηκε με την βοήθεια συσκευής εξάτμισης υπό κενό, και λήφθηκε μικρή ποσότητα υγρού διαλύματος.

Η απόδοση της αντίδρασης που προέκυψε από τη συγκεκριμένη μέθοδο, ήταν πολύ μικρή με αποτέλεσμα να χρησιμοποιηθεί μία δεύτερη μεθοδολογία για την σύνθεση του επιθυμητού προϊόντος.

##### B.2.4.2. Σύνθεση του εστέρα (3) με χρήση tert-βουτοξειδίου του καλίου ως βάση

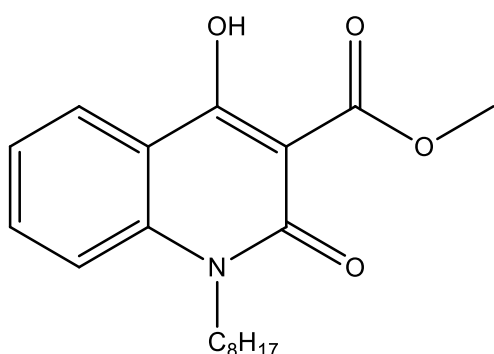
Σε σφαιρική φιάλη, προστίθενται 5.5 mL DMF και στην συνέχεια 11.06 mmol (1.46 g) μηλονικού διμεθυλεστέρα και 5.53 mmol (1.40 g) της ένωσης (**1**) (σφαιρική φιάλη 1). Σε άλλη σφαιρική φιάλη, προστίθενται 5.5 mL DMF και έπειτα προστίθενται 11.06 mmol (1.24 g) tert-βουτοξείδιο του καλίου (potassium tert-butoxide) (σφαιρική φιάλη 2). Αφού διαλυθεί το μεγαλύτερο μέρος της βάσης, το περιεχόμενο της σφαιρικής φιάλης 2 τοποθετείται στην σφαιρική φιάλη 1. Η έκπλυση της σφαιρικής φιάλης 2 γίνεται με μικρή ποσότητα DMF. Μετά από 1.5 ώρα προστίθεται στο διάλυμά HCl 10% (11 mL), όπου παρατηρείται καταβύθιση λευκού στερεού, και το όλο σύστημα αναδεύεται έντονα για 30 περίπου λεπτά. Το στερεό διηθείται υπό κενό και εκπλένεται με κρύο νερό και διαιθυλεθέρα. Η ποσότητα που λήφθηκε ήταν 0.66 g

Απόδοση: 61.4%

Σημείο τήξης: 147-149°C (βιβλιογραφική τιμή 149-152°C [53])

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz CDCl<sub>3</sub>): δ 14.13 (1H, s, H-4) 8.14 (1H, d, J=8.3 Hz, H-5), 7.37 (1H, t, J=7.8 Hz, H-6) 7.18 (7H, br, H-3', H-4', H-5', H-6', H-7', H-7 & H-8) 5.46 (2H, s, H-1') 4.02 (3H, s, H-3'')

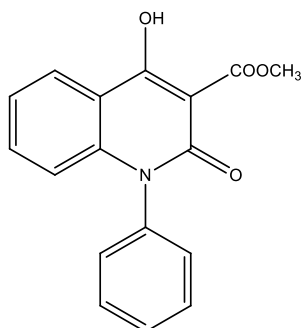
#### B.2.5 Σύνθεση της 3-μεθοξυκαρβονυλο-1-οκτυλ-4-υδροξυ-2-κινολινόνης (4)



Σε σφαιρική φιάλη, προστίθενται 4.5 mL DMF και στην συνέχεια 8.20 mmol (0.94 mL) μεθονικού διμεθυλεστέρα και 4.10 mmol (1.13 g) της ένωσης (1) (σφαιρική φιάλη 1). Σε άλλη σφαιρική φιάλη, προστίθενται 4.5 mL DMF και έπειτα προστίθενται 8.20 mmol (0.92 g) τερτ-βουτοξείδιο του καλίου (potassium tert-butoxide) (σφαιρική φιάλη 2). Αφού διαλυθεί

το μεγαλύτερο μέρος του τερτ-βουτοξείδιο του καλίου, το περιεχόμενο της σφαιρική φιάλης 2 τοποθετείται στην σφαιρική φιάλη 1. Η έκπλυση της σφαιρικής φιάλης 2 γίνεται με μικρή ποσότητα DMF. Μετά από 1.5 ώρα προστίθεται στο διάλυμά HCl 10% (11 mL), και το όλο σύστημα αναδεύεται έντονα για 30 περίπου λεπτά. Ακολουθεί εξάτμιση του διαλύματος και λαμβάνεται άχρωμο υγρό. Το φάσμα <sup>1</sup>H NMR έδειξε ότι η επιθυμητή ένωση έχει σχηματιστεί αλλά απαιτεί περαιτέρω καθαρισμό.

#### B.2.6. Σύνθεση της 3-μεθοξυκαρβονυλο-4-υδροξυ-2-κινολινόνης (5) [52]

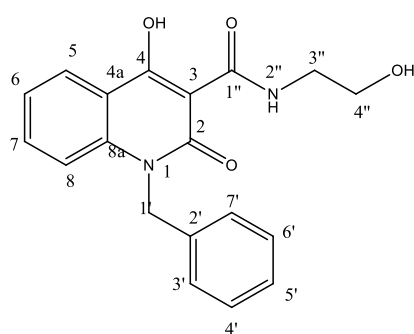


Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 20 mL άνυδρου THF και στην συνέχεια 4.69 mmol (1 g) N-φαινυλανθρανιλικού οξέος και 4.69 mmol (0.63 g) 1-υδροξυβενζοτριάζολιο. Το σύστημα ψύχεται σε θερμοκρασία 0°C και ακολουθεί στάγδην προσθήκη 3 mL διαλύματος THF στο οποίο έχουν διαλυθεί 4.69 mmol (0.97 g) DCC.

Το μίγμα αναδεύεται για 1 ώρα και αφήνεται να ηρεμήσει για 24 ώρες σε θερμοκρασία 3-5°C. Έπειτα το διάλυμα διηθείται, προκειμένου να απομακρυνθεί το ανεπιθύμητο παραπροϊόν (DCU). Το φιλτραρισμένο διάλυμα τοποθετείται σε μία σφαιρική φιάλη στην οποία περιέχονταν 30 mL THF και 4.69 mmol μεθονικού διμεθυλεστέρα και 9.38 mmol (0.23 g) NaH

και αναδεύεται για 2.5 ώρες. Μετά το πέρας του διαστήματος των 2,5 ωρών, ακολουθεί εξάτμιση και παραλαμβάνεται κίτρινο τσιγλώδες στερεό. Το στερεό αυτό διαλύεται σε νερό και το διάλυμα οξινίζεται με διάλυμα υδροχλωρικού οξέος 10%. Παρατηρείται καταβύθιση λευκού στερεού το οποίο πρόκειται για την 1-υδροξυβενζοτριάζολη που δεν αντέδρασε. Το λευκό στερεό απομακρύνεται με διήθηση υπό κενό και το διάλυμά εκχλιίζεται με DCM. Η οργανική φάση εξατμίζεται και το ελαιώδες προϊόν που προκύπτει ψύχεται σε θερμοκρασία 3-5°C, για 24 ώρες, όπου και σχηματίζεται στερεό κίτρινου χρώματος. Το στερεό εκπλένεται με πετρελαϊκό αιθέρα για απομάκρυνση των μη επιθυμητών ουσιών. Το προϊόν που παράχθηκε δεν καθαρίστηκε αλλά χρησιμοποιήθηκε ως είχε για την σύνθεση του επόμενου προϊόντος.

#### B.2.7. Σύνθεση του *N*-υδροξυαιθυλο-1,2-διυδρο-4-υδροξυ-1-βενζυλο-2-οξο-3-κινολινο-καρβοξαμίδιου (**6**)



Σε σφαιρική φιάλη προστίθεται τολουόλιο (4 mL), 0.65 mmol (0.2 g) της ένωσης **3** και 1.29 mmol (0.078 mL) αιθανολαμίνης. Το σύστημα τοποθετείται σε λουτρό θερμοκρασίας 100°C για χρονικό διάστημα 1.5 ώρα. Στην συνέχεια ακολουθεί ψύξη της σφαιρικής φιάλης σε θερμοκρασία δωματίου και προσθήκη 12 mL διχλωρομεθανίου και 20 mL κορεσμένου

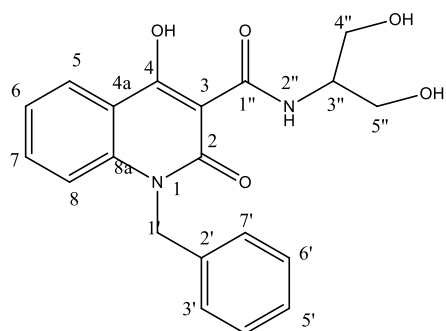
διαλύματος όξινου ανθρακικού νατρίου. Τέλος πραγματοποιείται εκχύλιση με DCM, ξήρανση της οργανικής φάσης με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και εξάτμιση. Λήφθηκε στερεό ποσότητας 0.11 g

Απόδοση: 48.5 %

Σημείο τήξης: 131-132°C

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 16.80 (1H, s, H-4), 10.48 (1H, s, NH), 8.14 (1H, d, J=7.8 Hz, H-6) 7.47 (1H, t, J=8 Hz, H-7) 7.21-7.12 (5H, m, H-3', H-4', H-5', H-6' & H-7') 7.10 (2H, d, J=7.5 Hz, H-5, H-8) 5.45 (2H, s, H-1') 3.80 (2H, t, J=5 Hz, H-3'') 3.59 (2H, q, J=5.3 Hz, H-4'') 2.17 (1H, s, OH-4'')

*B.2.8. Σύνθεση του N-(1,3-διϋδροξυπροπαν-2-υλο)-1,2-διυδρο-4-υδροξυ-1-βενζυλο-2-οξο-3-κινολινονο-καρβοξαμιδίου (7)*



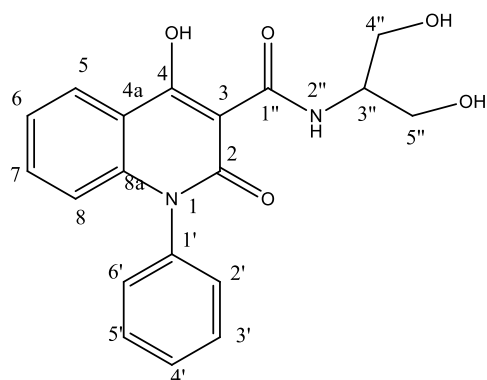
Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 4 mL τολουολίου και στην συνέχεια 0.65 mmol (0.2 g) από την **3**. Όταν ολοκληρωθεί η διάλυση της ένωσης **3** στο διαλύτη, προστίθενται 1.29 mmol (0.12 g) σερινόλης. Το σύστημα τοποθετείται σε λουτρό θέρμανσης 100°C για 1.5 ώρα, όπου παρατηρείται καταβύθιση στερεού τσιχλώδους μορφής. Πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό και έκπλυση με μεθανόλη. Από την διαδικασία αυτή λαμβάνεται στερεό ποσότητας 0.12 g

Απόδοση: 51.6%

Σημείο τήξης: 212-213°C

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 17.11 (1H, br, H-4), 10.41 (1H, d, J=8.1 Hz, NH), 8.09 (1H, d, J=7.8 Hz, H-5), 7.65 (1H, t, J=7.7 Hz, H-7), 7.41 (1H, d, J=8.4 Hz, H-8), 7.33-7.16 (6H, m, H-6, H-3', H-4', H-5', H-6' & H-7'), 5.52 (2H, s, H-1'), 4.91 (2H, t, J=5.1 Hz, OH-4'' & OH-5''), 4.05-3.95 (1H, m, H-3''), 3.57 (4H, m, H-4'' & H-5'')

*B.2.9. Σύνθεση του N-(1,3-διυδροξυπροπαν-2υλ)-4-υδροξυ-2-οξο-1-φενυλ-1,2-διυδροκινολινόνη-3-καρβοξυλαμίδιο (8)*



Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 4 mL τολουολίου και στην συνέχεια 0.68 mmol (0.2 g) από την **(5)**. Όταν το σύνολο της ένωσης διαλύθηκε στον διαλύτη, προστέθηκαν 1.35 mmol (0.12 g) σερινόλης. Το σύστημα τοποθετήθηκε σε λουτρό θέρμανσης 100°C για 1.5 ώρα, όπου παρατηρείται καταβύθιση στερεού κολλώδους μορφής. Πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό και έκπλυση με μεθανόλη. Από την διαδικασία αυτή λαμβάνεται στερεό ποσότητας 0.08 g

Απόδοση: 68.6%

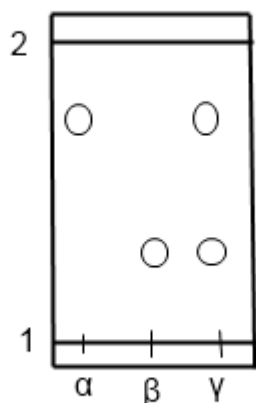
Σημείο τήξης: 221-223°C

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  17.65 (1H, s, H-4), 10.24 (1H, d,  $J=8.4$  Hz, NH), 8.10 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, H-5), 7.58 (4H, q,  $J=8.7$  Hz, H-2', H-3', H-5' & H-6'), 7.32 (3H, t,  $J=7.8$  Hz, H-4', H-6 & H-7), 6.53 (1H, d,  $J=8.4$  Hz, H-8), 4.87 (2H, t,  $J=5.1$  Hz, OH-4'' & OH-5''), 3.96 (1H, m,  $J=4.9$  Hz, H-3''), 3.51 (4H, m,  $J=4.9$ , H-4'' & H-5'')

#### *B.2.10. Σχολιασμός αποτελεσμάτων Σύνθεσης-Συμπεράσματα*

Κατά την διάρκεια των πειραμάτων σύνθεσης, συντέθηκαν μία σειρά από νέες ενώσεις. Η παρακολούθηση της αντίδρασης έγινε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (thin layer chromatography ή TLC). Σύμφωνα με την μέθοδο αυτή, χρησιμοποιείται μία πλάκα (φύλλο αλουμινίου) επιστρωμένες με μια λεπτή στοιβάδα στατικής φάσης (Εικόνα 34). Το διάλυμα του υπο εξέταση δείγματος τοποθετείται υπο τη μορφή κηλίδας στην αρχή της πλάκας σε απόσταση περίπου 2 cm. Στη συνέχεια η πλάκα τοποθετείται όρθια εντός αεροστεγούς θαλάμου στον οποίο έχει ήδη εισαχθεί κατάλληλο σύστημα διαλυτών σε ύψος κάτω από αυτό της κηλίδας. Πιο συγκεκριμένα στην περιοχή 1α, τοποθετείται μικρή ποσότητα διαλύματος που περιέχει το αρχικό αντιδρών, στην περιοχή 1β, τοποθετείται μικρή ποσότητα από το διάλυμα της αντίδρασης, ενώ στην περιοχή 1γ τοποθετούνται και τα δύο διαλύματα.



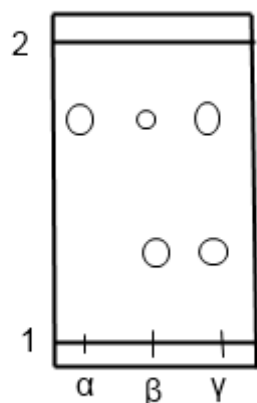


Εικόνα 34: Πάνω: TLC πλάκα Κάτω: Χαρακτηριστικές παράδειγμα πλάκας

Ανάλογα με το σύστημα των διαλυτών που θα χρησιμοποιηθούν, θα παρουσιαστούν διαφορετικά αποτελέσματα. Για παράδειγμα εάν το αντιδρών είναι πιο άπολο μόριο από το προϊόν και χρησιμοποιηθεί ένα σύστημα που περιέχει σε μεγαλύτερο βαθμό τον άπολο διαλύτη, τότε θα ληφθεί η απεικόνιση της Εικόνα 34. Αυτό θα συμβεί για τον εξής λόγο: τοποθετώντας την πλάκα στο σύστημα διαλυτών, οι διαλύτες μέσω τριχωειδών φαινομένων, αρχίζουν να κινούνται από την περιοχή 1 της πλάκας στην περιοχή 2. Καθώς όμως κινούνται παρασύρουν μαζί τους και τις ενώσεις που έχουν ήδη τοποθετηθεί πάνω στην πλάκα. Το αντιδρών που είναι πιο άπολο από το προϊόν θα φτάσει πιο κοντά στην περιοχή 2 από ότι το προϊόν καθώς στο σύστημα των διαλυτών υπερισχύει ο άπολος διαλύτης και οι άπολοι διαλύτες διαλύουν σε μεγαλύτερο βαθμό άπολα μόρια.

Για να διαπιστωθεί ότι μία αντίδραση έχει ολοκληρωθεί θα πρέπει αρχικά να γίνει σωστή επιλογή του συστήματος διαλυτών, με βάση την πολικότητα του αντιδρώντος και του προϊόντος. Εφόσον η όλη διαδικασία έχει πραγματοποιηθεί σωστά, η αντίδραση θεωρείται ότι έχει τελειώσει όταν στην περιοχή 1β δεν παρατηρείται καθόλου ποσότητα από το αντιδρών (Εικόνα 34). Σε διαφορετική περίπτωση η αντίδραση δεν έχει ολοκληρωθεί και επομένως απαιτείται παραπάνω χρόνος (Σχήμα 9).





Σχήμα 9: Παράδειγμα απεικόνισης TLC μη ολοκληρωμένης αντίδρασης

Η απόσταση που έχει διανύσει η κάθε ένωση δεν είναι ορατή με το μάτι. Αυτό μπορεί να γίνει ορατό με δύο τρόπους: με χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας και με χρωματισμό και 'κάψιμο' της πλάκας. Στην πρώτη περίπτωση η πλάκα τοποθετείται κάτω από πηγή υπεριώδους φωτός όπου ανάλογα με την ένωση, παρουσιάζεται ένας διαφορετικός φωτισμός στο σημείο όπου βρίσκεται η ένωση (Εικόνα 35):



Εικόνα 35: Πλάκα TLC κάτω από πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας

Στην δεύτερη περίπτωση, πάνω στην πλάκα τοποθετείται χρωστική ουσία και στην συνέχεια η πλάκα θερμαίνεται. Ορισμένες ενώσεις χρωματίζονται κατά την διαδικασία αυτή με χρώμα που εξαρτάται από την ένωση, ενώ άλλες δεν χρωματίζονται καθόλου (Εικόνα 36):



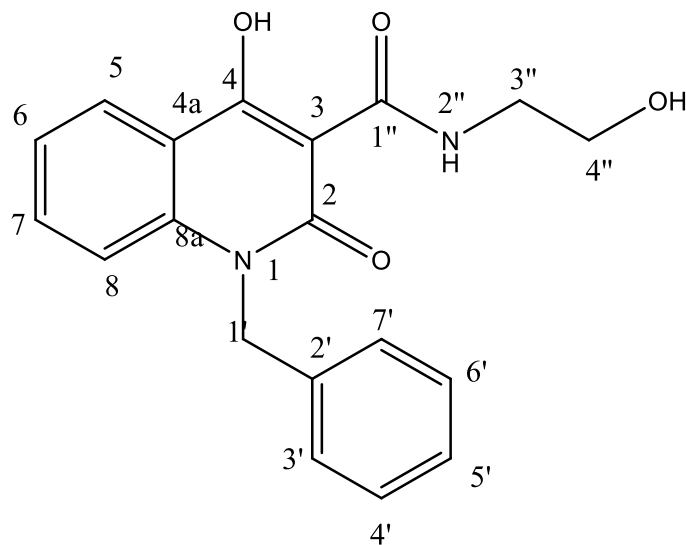
Εικόνα 36: Χρωματισμένη πλάκα TLC

Και στην δύο περιπτώσεις υπάρχει η πιθανότητα να μπορούν να ανιχνευτούν δύο ενώσεις με την ίδια πολικότητα, καθώς μπορεί οι δύο ενώσεις να χρωματίζονται διαφορετικά, είτε κάτω από την πηγή υπεριώδους φωτός, είτε με την χρήση της χρωστικής ουσίας.

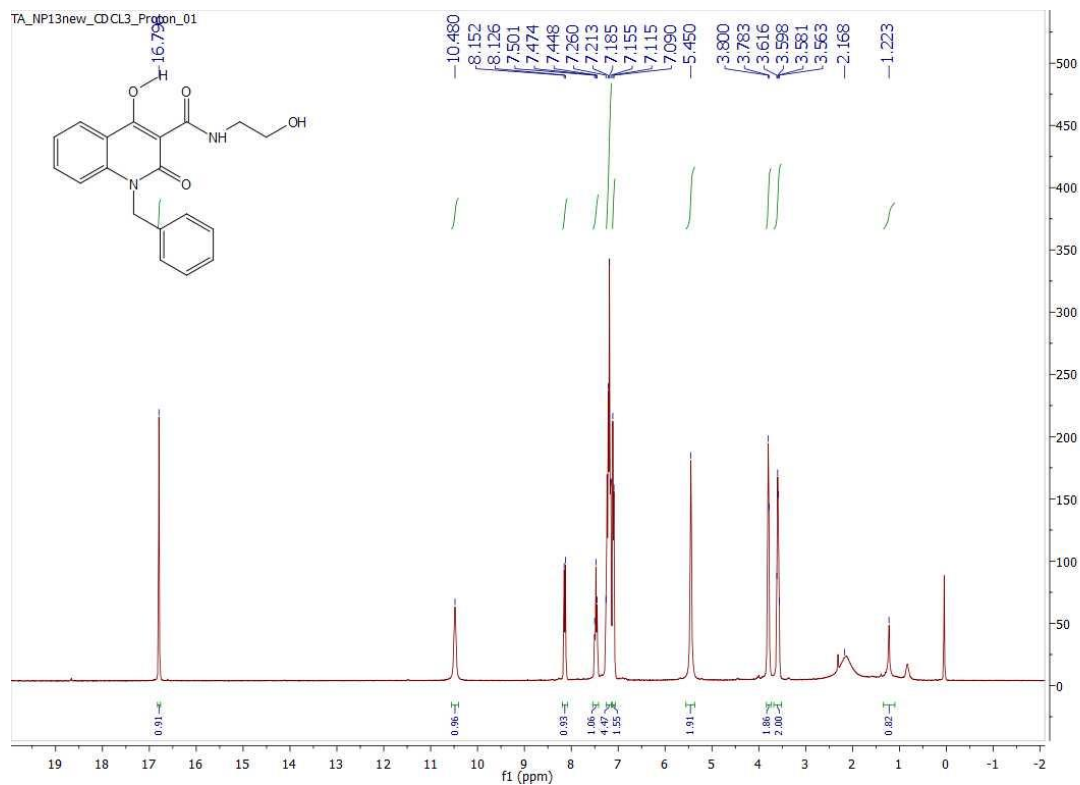
Αφού διαπιστωθεί ότι η αντίδραση έχει ολοκληρωθεί θα πρέπει να ελεγχθεί εάν το προϊόν που παράχθηκε είναι το επιθυμητό. Αυτό πραγματοποιείται με την ανάλυση

του φάσματος NMR. Ενδεικτικά παρουσιάζονται και αναλύονται τα φάσματα δύο ενώσεων από όπου φαίνεται ότι είναι οι επιθυμητές ενώσεις:

- Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης (3)



Σχήμα 10: Η χημική δομή της ένωσης (3)

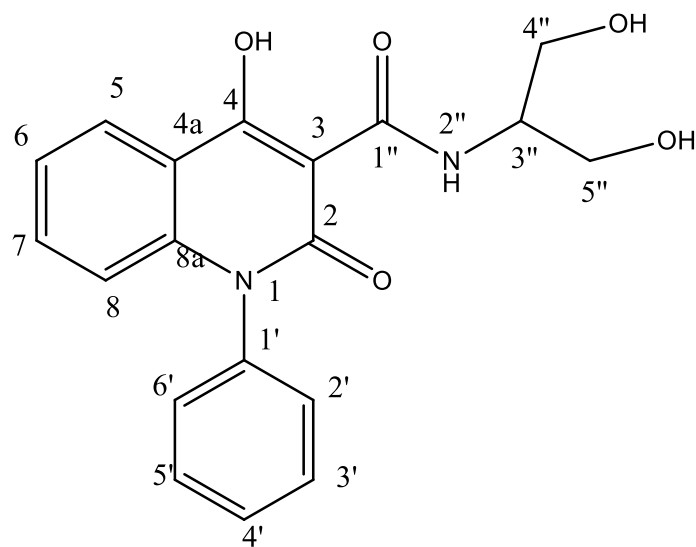


Εικόνα 37: Το φάσμα  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) της ένωσης (3)

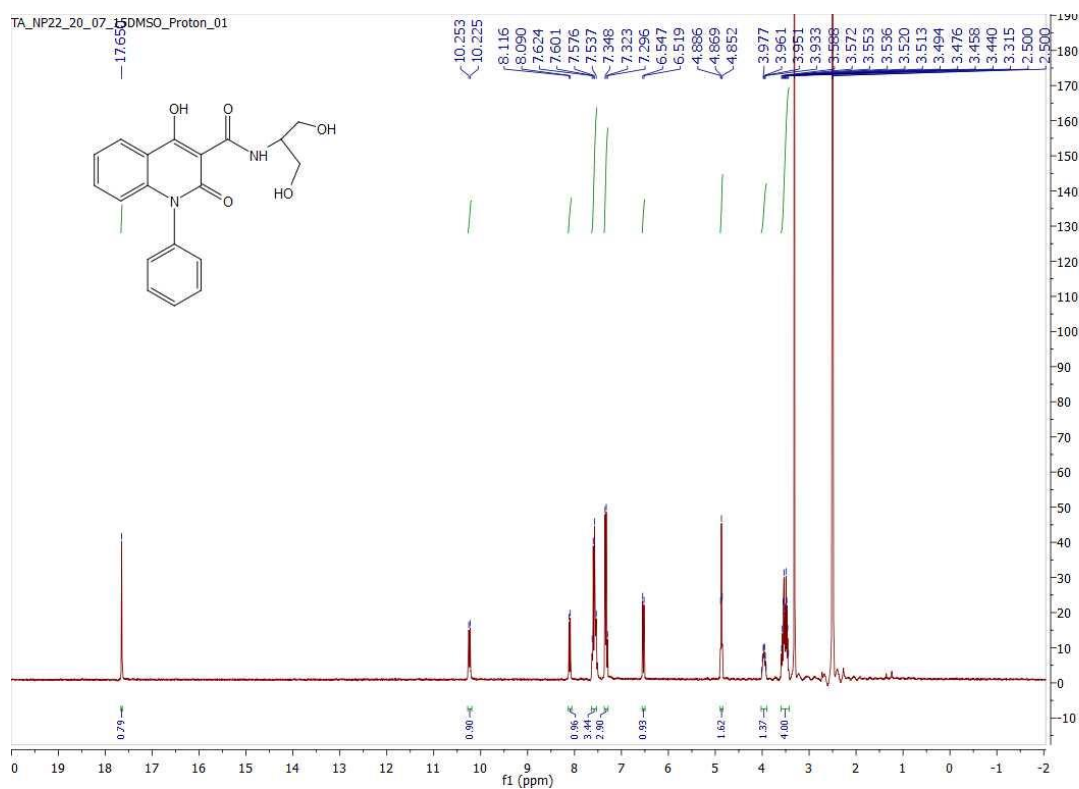
Αρχικά παρατηρείται, μία κορυφή στα 16.80 ppm η αντιστοιχεί στο πρωτόνιο που είναι ενωμένο με το οξυγόνο της θέσης 4. Πρόκειται για ένα αρκετά απόπροστατευμένο πρωτόνιο που εμφανίζεται στα χαμηλά πεδία και στο οποίο δεν επιδρά κάποιο γειτονικό πρωτόνιο. Η εμφάνιση αυτής της κορυφής στα τόσο χαμηλά πεδία εξηγείται από τη δημιουργία δεσμού υδρογόνου με το οξυγόνο της θέσης 1''. Στα 10.48 ppm παρατηρείται μία απλή κορυφή η οποία ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο. Πρόκειται για ένα αρκετά απόπροστατευμένο πρωτόνιο που δεν έχει κανένα γειτονικό πρωτόνιο. Επομένως αντιστοιχεί στο πρωτόνιο που είναι ενωμένο με το άζωτο της θέσης 2''. Γνωρίζοντας βιβλιογραφικά [39] ότι οι κορυφές που βρίσκονται σε περιοχές από 6.5 ppm έως 8.0 ppm είναι κορυφές πρωτονίων αρωματικών δακτυλίων μπορεί να θεωρηθεί ότι όλες αυτές οι κορυφές αφορούν τα πρωτόνια που βρίσκονται συνδεδεμένα στους αρωματικούς δακτύλιους. Πράγματι οι κορυφές που βρίσκονται στο συγκεκριμένο διάστημα ολοκληρώνονται για 9 πρωτόνια, όσα είναι και τα πρωτόνια της επιθυμητής ένωσης. Από αυτές τις κορυφές μπορεί να θεωρηθεί ότι τα πρωτόνια που είναι συνδεδεμένα στους άνθρακες των θέσεων 6 και 7, σχηματίζουν την διπλή κορυφή στα 8.14 ppm και την τριπλή κορυφή στα 7.47 ppm αντίστοιχα, καθώς ο συγκεκριμένος αρωματικός δακτύλιος δεν έχει την ίδια ευελιξία με τον άλλο αρωματικό δακτύλιο (2'-7'C) και πιθανόν τα πρωτόνια αυτά να είναι πιο αποπροστατευμένα. Να σημειωθεί ότι κανονικά τα πρωτόνια του άνθρακα της θέσης 6, αναμενόταν να σχηματίζουν μία τριπλή κορυφή, όμως εδώ δεν πραγματοποιήθηκε η συγκεκριμένη σχάση. Επιπλέον, η πολλαπλή κορυφή η οποία ξεκινάει από τα 7.21 ppm και τελειώνει στα 7.12 ppm, ολοκληρώνεται για 5 πρωτόνια και αφορά τα αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 3'-7'. Αρχικά παρατηρείται ότι στα 3.59 ppm βρίσκεται μια τετραπλή κορυφή. Η κορυφή αυτή ολοκληρώνεται για 2 πρωτόνια. Επομένως η συγκεκριμένη κορυφή αφορά 2 πρωτόνια τα οποία αλληλεπιδρούν με 3 πρωτόνια γειτονικών ατόμων. Τα πρωτόνια αυτά είναι τα πρωτόνια του άνθρακα της θέσης 4'' καθώς είναι τα μόνα πρωτόνια που έχουν 3 γειτονικά πρωτόνια. Τέλος η διπλή κορυφή στα 7.10 ppm που ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια, προκύπτει από τα πρωτόνια των ανθράκων στις θέσεις 5 και 8, καθώς βρίσκεται κοντά στο υδροξύλιο της θέσης 4 και στο άζωτο της θέσης 1, επομένως είναι πιο αποπροστατευμένα από τα άλλα πρωτόνια.

Σχετικά με τις υπόλοιπες κορυφές η απλή κορυφή στα 5.45 ppm που ολοκληρώνεται για 2 πρωτόνια σχηματίζεται από τα πρωτόνια που είναι συνδεδεμένα με τον άνθρακα της θέσης 1' και η τριπλή κορυφή στα 3.80 ppm που ολοκληρώνεται για 2 πρωτόνια, σχηματίζεται από τα πρωτόνια που είναι συνδεδεμένα με τον άνθρακα της θέσης 3''. Τέλος, η απλή κορυφή στα 1.22 ppm πιθανόν να σχηματίζεται από το υδροξύλιο της θέσης 4''. Η κορυφή αυτή εμφανίζεται στα υψηλά πεδία, καθώς η δημιουργία δεσμών υδρογόνου με άλλα μόρια, πιθανόν να προστατεύουν το πρωτόνιο της θέσης 4'.

- Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης (6)



Σχήμα 11: Η χημική δομή της (6)



Εικόνα 38: Το φάσμα  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) της ένωσης (6)

Αρχικά, παρατηρείται μία απλή κορυφή στα 17.65 ppm, η οποία ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο. Η συγκεκριμένη κορυφή, όπως και στην περίπτωση της ένωσης (3)

αντιστοιχεί στο πρωτόνιο που είναι συνδεδεμένο με το άτομο οξυγόνου της θέσης 4. Η διπλή κορυφή στα 10.24 ppm, η οποία ολοκληρώνεται για 1 πρωτόνιο αφορά και στην συγκεκριμένη ένωση στο πρωτόνιο που είναι συνδεδεμένο με το άτομο του αζώτου, καθώς υπάρχει μόνο ένα πρωτόνιο σε γειτονική θέση, ενώ το άτομο του αζώτου επηρεάζει το ηλεκτρονιακό νέφος του πρωτονίου με αποτέλεσμα να είναι αποπροστατευμένο. Στην συνέχεια παρατηρούνται 4 κορυφές οι οποίες οφείλονται στα αρωματικά πρωτόνια. Πιο συγκεκριμένα η διπλή κορυφή στα 8.10 ppm, η οποία ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο, σχηματίζεται από το πρωτόνιο της θέσης 5, καθώς βρίσκεται κοντά στο υδροξύιο της θέσης 4 και κατά συνέπεια είναι πιο αποπροστατευμένο από τα υπόλοιπα αρωματικά πρωτόνια. Επιπλέον, η τετραπλή κορυφή στα 7.58 ppm, η οποία ολοκληρώνεται για 4 πρωτόνια, σχηματίζεται από τα πρωτόνια των θέσεων 2',3',5' και 6'. Ο συγκεκριμένος αρωματικός δακτύλιος σε αντίθεση με την ένωση **3** δεν έχει μεγάλη ελευθερία κινήσεων και επειδή βρίσκονται κοντά σε αυτόν τα άτομα του οξυγόνου και του αζώτου, θεωρείται ότι τα πρωτόνια των θέσεων 2'-6' πιθανόν να είναι πιο αποπροστατευμένα από τα πρωτόνια των θέσεων 6-8. Επίσης η τριπλή κορυφή η οποία εμφανίζεται στα 7.32 ppm και ολοκληρώνεται για 3 πρωτόνια σχηματίζεται από τα αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 4', 6 και 7. Τέλος, παρατηρείται μία διπλή κορυφή στα 6.53 ppm η οποία σχηματίζεται από το αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 8.

Τα υπόλοιπα πρωτόνια είναι πιο προστατευμένα, ακόμα και εκείνα των υδροξυλίων των θέσεων 4'' και 5'', καθώς η δυνατότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνων με άλλα μόρια βοηθά στην προστασία των πρωτονίων. Επομένως, τα πρωτόνια των συγκεκριμένων υδροξυλίων σχηματίζουν μία τριπλή κορυφή στα 4.87 ppm. Τέλος η πολλαπλή κορυφή στα 3.96 ppm, ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αφορά το πρωτόνιο της θέσης 3'', καθώς το συγκεκριμένο πρωτόνιο έχει πολλά γειτονικά πρωτόνια με αποτέλεσμα να παρατηρούνται πολλές σχάσεις στην κορυφή αυτή, ενώ η πολλαπλή κορυφή στα 3.51 ppm ολοκληρώνεται για 4 πρωτόνια και σχηματίζεται από τα πρωτόνια των θέσεων 4'' και 5''.

## Γ. Συμπεράσματα-Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Με βάση τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από την συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, εξάγεται το συμπέρασμα ότι υπάρχουν μία σειρά από ενώσεις που έχουν ήδη συντεθεί στο Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών και στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας, της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου και πιθανόν να είναι επιλεκτικοί παρεμποδιστές της COX-2. Για να μελετηθεί αυτό ωστόσο θα πρέπει να γίνουν *in vitro* δοκιμασίες οι οποίες θα δείχνουν πόσο καλοί παρεμποδιστές είναι της COX-2 και εάν παρεμποδίζουν ή όχι την COX-1. Επομένως, οι δοκιμασίες αυτές θα ήταν σκόπιμο να πραγματοποιηθούν στη συνέχεια. Έτσι, αφού διαπιστωθεί η ικανότητα πρόσδεσης των συγκεκριμένων μορίων, μπορεί να ακολουθήσει η μελέτη τους για τοξικότητα, η μελέτη σε πειραματόζωα και στην συνέχεια να πραγματοποιηθούν κλινικές μελέτες.

Επιπλέον, θα πρέπει να μελετηθούν τα συγκεκριμένα μόρια, *in silico* και *in vitro*, στην δυνατότητα παρεμπόδισης της 5-LOX. Στην περίπτωση που βρεθούν κάποια να παρουσιάζουν καλή παρεμπόδιση και στα δύο ένζυμα, θα πρέπει να μελετηθούν περαιτέρω, για να χρησιμοποιηθούν ως φάρμακα και για τα δύο ένζυμα (dual inhibitors).

Μία άλλη πρόταση η οποία είναι αρκετά ενδιαφέρουσα, είναι η προσθήκη στην ήδη υπάρχουσα βιβλιοθήκη όλων των μορίων που έχουν συντεθεί στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών και του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, προκειμένου να ενοποιηθούν όλα τα δεδομένα και να μπορεί να γίνει πιο εύκολη η διαδικασία εύρεσης πιθανού παρεμποδιστή-φαρμάκου στο μέλλον. Η χρήση τέτοιων βιβλιοθηκών θα μπορούσε να μειώσει ακόμα περισσότερο την διαδικασία παρασκευής νέων φαρμάκων διάφορων ειδών.

Όσον αφορά στο συνθετικό κομμάτι της παρούσας εργασίας, δεδομένου ότι είναι επιθυμητό μία ένωση που παρουσιάζει καλές ιδιότητες να παράγεται και σε υψηλές αποδόσεις, θα πρέπει να μελετηθεί η δυνατότητα αύξησης της απόδοσης των αντιδράσεων με μεταβολή κατάλληλων παραμέτρων.

Τέλος, θα μπορούσε στο μέλλον να μελετηθούν νέα μόρια τα οποία είναι παρόμοια με το μόριο AD 44, προκειμένου να ελεγχθεί εάν υπάρχει κάποιο μόριο που παρουσιάζει καλύτερα αποτελέσματα πρόσδεσης, ενώ επίσης θα πρέπει να μελετηθεί η σύνθεση νέων κινολινονών, προκειμένου να μελετηθούν περαιτέρω.

## Δ. Βιβλιογραφία

- [1] C. Charlier, C. Michaux, *Dual inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) as a new strategy to provide safer non-steroidal anti-inflammatory drugs*, European journal of medical chemistry, 2003, 38, 645-659
- [2] J. Clària, *Cyclooxygenase-2 biology*, Current Pharmaceutical Design, 2003, 9, 2177-2190
- [3] R. N. DuBois, *Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and sporadic colorectal adenomas*, Gastroenterology, 1995, 108 (4), 1310-1314
- [4] N. V. Chandrasekharan, H. Dai, K. Lamar Turepu Roos, N. K. Evanson, J. Tomsik, T. S. Elton, D. L. Simmons, *COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002, 99 (21), 13926-13931
- [5] N. V. Chandrasekharan, *COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression*, Proceedings of the national academy of sciences of the United states of America, 2002, 99 (21), 13926-13931
- [6] D. A. Willoughby, A. R. Moore, P. R. Colville-Nash, *COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease*, The Lancet, 2000, 355, 646-648
- [7] R. N. Dubois, S. B. Abramson, L. Crofford, R. A. Gupta, L. S. Simon, L. B. A. V. S. Putte, P. E. Lipsky, *Cyclooxygenase in biology and disease*, FASEB journal, 1998, 12, 1063-1073
- [8] C. E. Eberhart, R. N. Dubois, *Eicosanoids and the Gastrointestinal Tract*, Gastroenterology, 1995, 109 (1), 285-301
- [9] J. S. Redfern, E. Lee, M. Feldman, *Effect of Indomethacin on Gastric Mucosal Prostaglandins in Humans*, Gastroenterology, 1987, 92 (4), 969-977
- [10] A. K. Banerjee, J. Phillips, W. M. Winning, *E-type Prostaglandins and Gastric Acid Secretion in the rat*, Nature New Biology, 1972, 238 (84), 177-179
- [11] G. L. Kauffman Jr., J. R. Whittle, D. Aures, J. R. Vane, M. I. Grossman, *Effects of Prostacyclin and a Stable Analogue, 6 $\beta$ -PGI<sub>1</sub>, on Gastric Acid Secretion, Mucosal Blood Flow, and Blood Pressure in Conscious Dogs*, Gastroenterology, 1979, 77 (6), 1301-1306
- [12] G. A. Olson, C. W. Leffler, A. M Fletcher, *Gastroduodenal ulceration in rabbits producing antibodies to prostaglandins*, Prostaglandins, 1985, 29, 475-480
- [13] P. K. Moore, *Eicosanoids and gastrointestinal motility*, Advances in Eicosanoid Research, 1988, 2, 145-162
- [14] G. N. Levy, *Prostaglandin H synthases, nonsteroidal anti-inflammatory drugs and colon cancer*, FASEB journal, 1997, 11, 234-247
- [15] N. Kawai, M. Tsujii, S. Tsuji, *Cyclooxygenases and colon cancer*, Prostaglandins Other Lipid Mediat., 2002, 68-69, 187-196
- [16] A. Benntt, A. Civier, C. N. Hensby, P. B. Melhuish, I. F. Stamford, *Measurement of arachidonate and its metabolites extracted from human normal and malignant gastrointestinal tissues*, Gut, 1987, 28, 315-318
- [17] B. Rigas, I. S. Goldman, L. Levine, *Altered eicosanoid levels in human colon cancer*, J Lab Clin Med, 1993, 122 (5), 518-523
- [18] S. Pugh, G. A. O. Thomas, *Patients with adenomatous polyps and carcinomas have increased colonic mucosal prostaglandin E<sub>2</sub>*, Gut, 1994, 35, 675-678



- [19] C. V. Rao, B. Simi, T. Wynn, et al., *Modulating effect of Amount and Types of Dietary Fat on Colonic Mucosal Phospholipase A<sub>2</sub>, Phosphatidylinositol-specific Phospholipase C Activities, and Cyclooxygenase Metabolite Formation during Different Stages of Colon Tumor Promotion in Male F344 Rats*, *Cancer Research*, 1996, 56, 532-537
- [20] C. E. Eberhart, R. J. Coffey, A. Radhika, F. M. Giardiello, S. Ferrenbach, R. N. Dubois, *Up-regulation of Cyclooxygenase 2 Gene Expression in Human Colorectal Adenomas and Adenocarcinomas*, *Gastroenterology*, 1994, 107 (4) 1183-1188
- [21] W. Kutchera, D. A. Jones, N. Matsunami, J. Groden, T. M. McIntyre, G. A. Zimmerman, R. L. White, S. M. Prescott, *Prostaglandin H synthase 2 is expressed abnormally in human colon cancer: Evidence for a transcriptional effect*, *Proc Natl Acad Sci*, 1996, 93, 4816-4820
- [22] C. Gustafson-Svard, I. Lilja, O. Hallbook, R. Sjodahl, *Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 gene expression in human colorectal adenocarcinomas and in azoxymethane induced colonic tumours in rats*, *Gut* 1996, 38, 79-84
- [23] R. N. Dubois, A. Radhika, B. S. Reddy, A. J. Ething, *Increased Cyclooxygenase-2 Levels in Carinogen-Induced Rat Colonic Tumors*, *Gastroenterology*, 1996, 110 (4), 1259-1262
- [24] C. S. Williams, C. Luongo, A. Radhika, T. Z. L. W. Lamps, L. B. Nanney, R. D. Beauchamp, R. N. Dubois, *Elevated Cyclooxygenase-2 Levels in Min Mouse Adenomas*, *Gastroenterology* 1996, 111 (5), 1134-1140
- [25] T. Kawamori, C. V. Rao, K. Seibert, B. S. Reddy, *Chemopreventive Activity of Celecoxib, a Specific Cyclooxygenase-2 Inhibitor, against Colon Carcinogenesis*, *Cancer research*, 1998, 58, 409-412
- [26] M. Tsujli, R. N. DuBois, *Alterations in Cellular Adhesion and Apoptosis in Epithelial Cells Overexpressing Prostaglandin Endoperoxide Synthase 2*, *Cell*, 1995, 83, 493-501
- [27] R. N. DuBois, J. Shao, M. Tsujli, H. Sheng, R. D. Beauchamp, *G<sub>1</sub> Delay in Cells Overexpressing Prostaglandin Endoperoxide Synthase-2*, *Cancer research*, 1996, 56, 733-737
- [28] H. Sheng, J. Shao, S. C. Kirkland, P. Isakson, R. J. Coffey, J. Morrow, R. D. Beauchamp, R. N. DuBois, *Inhibition of Human Colon Cancer Cell Growth by Selective Onhibition of Cyclooxygenase-2*, *The Journal of Clinical Investigation*, 1997, 99, 2254-2259
- [29] J. M. Thun, J. S. Henley, C. Patrono, *Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs as Anticancer Agents: Mechanistic, Pharmacologic and Clinical Issues*, *Journal of the National Cancer Institute*, 2002, 94 (4), 252-266
- [30] M. J. Thun, M. M. Namboodiri, E. E. Calle, W. D. Flanders, C. W. Heath Jr., *Aspirin Use and Risk of Fatal Cancer*, *Cancer research*, 1993, 53, 1322-1327
- [31] E. Giovannucci, K. M. Egan, D. J. Hunter, M. J. Stampfer, G. A. Colditz, W. C. Willett, F. E. Speizer, *Aspirin and the risk of colorectal cancer in women*, *Journal of medicine*, 1995, 333 (10), 609-614
- [32] S. Olgen, E. Akaho, D. Neobioglou, *Synthesis and receptor docking studies of N-substituted indole-2-carboxylic acid esters as a search for COX-2 selective enzyme inhibitors*, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2001, 36, 747-770
- [33] O. Unsal-Tan, K. Ozadali, K. Piskin, A. Balkan, *Molecular Modeling, Synthesis and Screening of some new 4-thiazolidione derivatives with promising selective COX-2 inhibitory activity*, *European Journal of Medical Chemistry*, 2012, 57, 59-64

- [34] G. El-Din, A. A. Abuo-Rahma, M. Abdel-Aziz, N A. Farag, T. S. Kaoud, *Novel 1-[4-(Aminosulfonyl)phenyl]-1H-1,2,4-triazole derivatives with remarkable selective COX-2 inhibition: Design, synthesis, molecular docking, anti-inflammatory and ulcerogenicity studies*, European Journal of medicinal Chemistry, 2014, 83, 398-408
- [35] M. Zheng, Z. Zhang, W. Zhu, H. Liu, X. Luo, K. Xhen, H. Jiang, *Essential structural profile of a dual functional inhibitor against cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX): Molecular docking and 3D-QSAR analyses on DHDMBF analogues*, Bioorganic and medicinal Chemistry, 2006, 14, 3428-3437
- [36] M. A. A. El-Sayed, N. I. Abdel-Aziz, A. A. M. Abdel-Aziz, A. S. El-Azab, Y. A. Asiri, K. E. H. ElTahir, *Design, synthesis, and biological evaluation of substituted hydrazine and pyrazole derivatives as selective COX-2 inhibitors: Molecular docking study*, Bioorganic and medicinal Chemistry, 2011, 19, 3416-3424
- [37] M. A. A. El-Sayed, N. I. Abdel-Aziz, A. A. M. Abdel-Aziz, A. S. El-Azab, K. E. H. ElTahir, *Synthesis, biological evaluation and molecular modeling study of pyrazole and pyrazoline derivatives as selective COX-2 inhibitors and anti-inflammatory agents. Part 2*, Bioorganic and medicinal Chemistry, 2012, 20, 3306-3316
- [38] Α. Ο. Χατζηβασιλείου, *Σχεδιασμός, σύνθεση και χαρακτηρισμός δομής νέων ωρονών με συνδιασμένη βιολογική δράση*, Διπλωματική εργασία, 2013
- [39] Θ. Μαυρομούστακος, Π. Ζουμπουλάκης, *Μοριακή μοντελοποίηση, Εφαρμογές στην Οργανική και Φαρμακευτική Χημεία*, Ιατρικές εκδόσεις Γιάννης Β. Παρισιάνος 2007, 48-77
- [40] J. McMurry, *Οργανική Χημεία*, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης 2010, τόμος I, 560-593
- [41] T. Liptaj, *Mitochondrial Medicine*, Spinger Science and Business Media, 2008, chapter 15, Nuclear Magnetic Resonance, 279-302
- [42] J. P. Michael, *Quinolinone, quinazoline and acridone alkaloids*, Natural product reports, 2000, 17, 603-620
- [43] Π. Γενναίου, *Σχεδιασμός και σύνθεση νέων ετεροκυκλικών βιοδραστικών ενώσεων*, Διπλωματική εργασία, 2013
- [44] M. Heeb, M. P. Fletcher, S. R. Chhabra, S. P. Diggle, P. Williams, M. Camara, *Quinolones: from antibiotics to autoinducers*, Federation of European Microbiological Societies, 2011, 35, 247-274
- [45] Y. Zhang, M. W. Frank, K. Zhu, A. Mayasundari, C. O. Rock, *PqsD is responsible for the synthesis of 2,4-Dihydroxyquinoline, an extracellular metabolite produced by Pseudomonas aeruginosa*, The journal of Biological chemistry, 2008, 283 (43), 28788-28794
- [46] V. P. De La Cruz, P. Carrillo-Mora, A. Santamaria, *Quinolinic Acid, an endogenous molecule combining excitotoxicity, oxidative stress and other toxic mechanisms*, International journal of tryptophan Research, 2012, 5, 1-8
- [47] W. L. Smith, L. J. Marnett, *Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis*, Biochimica et Biophysica Acta, 1991, 1083, 1-17
- [48] J. R. Vane, *Inhibition of Prostaglandin synthesis as a mechanism of action for Aspirin-like drugs*, nature new biology, 1971, 231, 232-235
- [49] G. Dannhardt, W. Kiefer, *Cyclooxygenase inhibitors-current status and future prospects*, European journal of medical chemistry, 2001, 36, 109-126
- [50] E. Fosslie, *Adverse effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the gastrointestinal system*, Annals of clinical and laboratory science, 1998, 28 (2), 67-81

[51] J. L. Wallace, *Commonality of defensive roles of COX-2 in the lung and gut*, American journal of pathology, 2006, 168 (4), 1060-1063

[52] L. Zikou, G. Athanasellis, A. Detsi, A. Zografos, C. Mitsos, O. Igglessi-Markopoulou, *Novel Short-step Synthesis of Functionalized 4-Hydroxy-2-Quinolones Using 1-Hydroxybenzotriazole Methodology*, Bull. Chem. Soc. Japan, 2004, 77 (8), 1505-1508.

[53] G. L. Beutner, J. T. Kuethe, N. Yasuda, *A practical method for preparation of 4-Hydroxyquinolinone esters*, The journal of organic chemistry, 2007, 72 (18), 7058-7061

## ***E. Παράρτημα***

### *E.1. Κώδικας για την δημιουργία της ομόλογης ανθρώπινης πρωτεΐνης*

```
1  from modeller import *
2  from modeller.automodel import *
3  #from modeller import soap_protein_od
4
5  env = environ()
6  a = automodel(env, alnfile='cox2alignment.pir',
7  knowns='1CX2a', sequence='cox2human',
8  assess_methods=(assess.DOPE,
9  #soap_protein_od.Scorer(),
10  assess.GA341))
11  a.starting_model = 1
12  a.ending_model = 10
13  a.make()
```

#### *E.1.1. Επεξήγηση του κώδικα*

Ο βασικός κορμός του κώδικα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως έχει για την κατασκευή μίας οποιαδήποτε κρυσταλλικής δομής πρωτεΐνης. Για την κάθε περίπτωση συγκεκριμένα θα πρέπει να δίνονται οι πληροφορίες που απαιτούνται για την κατασκευή της επιθυμητής πρωτεΐνης. Πιο συγκεκριμένα, θα πρέπει αρχικά να δοθεί η ακολουθία των αμινοξέων της κρυσταλλικής δομής της πρωτεΐνης, καθώς επίσης και της πρωτεΐνης της οποίας είναι επιθυμητό να κατασκευαστεί η κρυσταλλική της δομή. Η εισαγωγή αυτή γίνεται στην σειρά 6 του κώδικα, όπου συμπληρώνεται το όνομα του αρχείου που περιέχονται και οι δύο ακολουθίες (στην περίπτωση του παραδείγματος 'cox2alignment.pir') . Το αρχείο που θα περιέχει τις αλληλουχίες πρέπει να είναι της μορφής σημειωματάριου (.txt) και να αναγράφονται όπως φαίνεται παρακάτω για την περίπτωση της COX-2:

```
>P1;1CX2a
```

```
structureX:1CX2a.pdb: 33 :A:+590 :A:undefined:undefined:-1.00:-1.00
```

ANPCCSNPCQNRGECMSTGFDQYKCDCTRTRGFYGENCTTPEFLTRIKLLK  
 PTPNTVHYILTHFKGVWNIVNNIPFLRSLIMKYVLTSTRSYLIDSPPTYNVHYGY  
 KSWEAFSNLSYYTRALPPVADDCPTPMGVKGNKELPDSKEVLEKVLRRFEI  
 PDPQGSNMMFAFFAQHFTHQFFKTDHKRGPGFTRGLGHGVDLNHIYGETLD  
 RQHKLRLFKDGLKYQVIGGEVYPPTVKDTQVEMIYPPHIPENLQFAVGQEV  
 FGLVPGLMMYATIWLREHQRVCDILKQEHPEWGDEQLFQTSKLILIGETIKIVI  
 EDYVQHLSGYHFKLKFDPELLFNQFQYQNRRIASEFNTRYHWHPLLPDTFNIE  
 DQEYSFKQFLYNNISILLEHGLTQFVESFTRQIAGRVAGGRNVPIAVQAVAKAS  
 IDQSREMKYQSLNEYRKRFSCLKPYTSFEELTGEKEMAAELKALYSDIDVMEL  
 YPALLVEKPRPDAIFGETMVELGAPFSLKGLMGNPICSPQYWKPSTFGGEVGF  
 KIINTASIQSLICNNVKGCPFTSFNVQ-----\*

>P1;cox2human

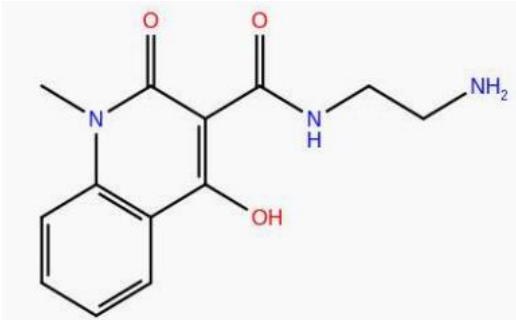
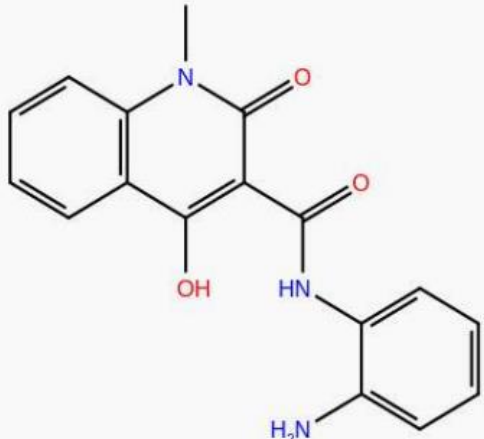
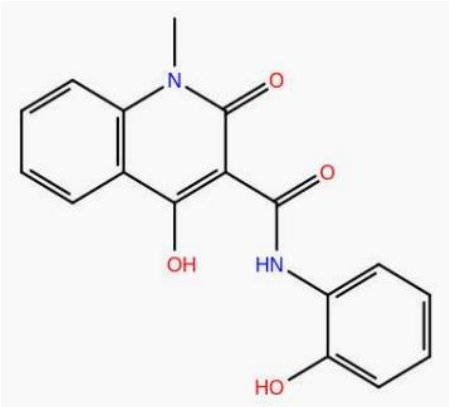
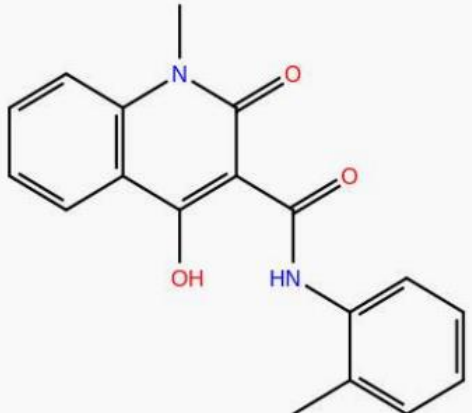
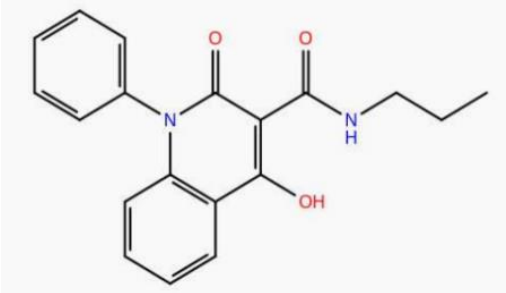
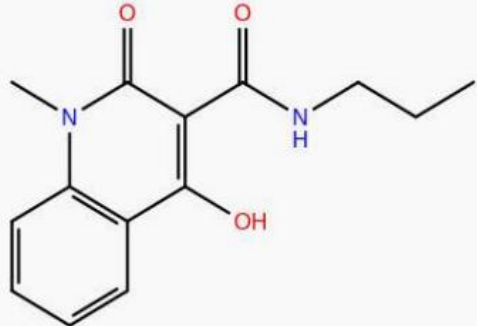
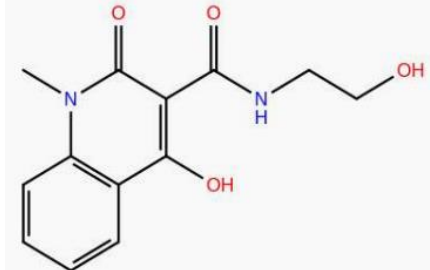

sequence:cox2human: : : : 0.00: 0.00

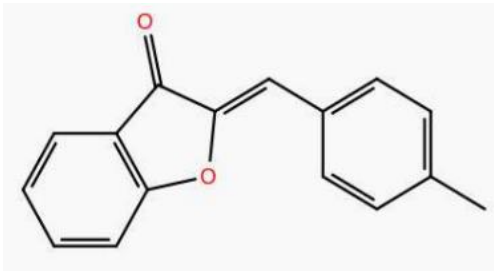
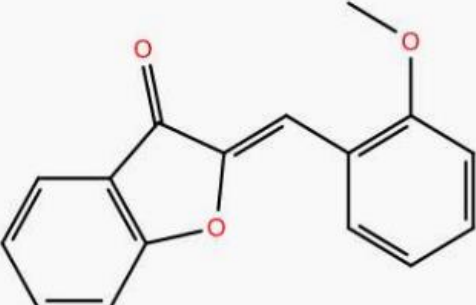
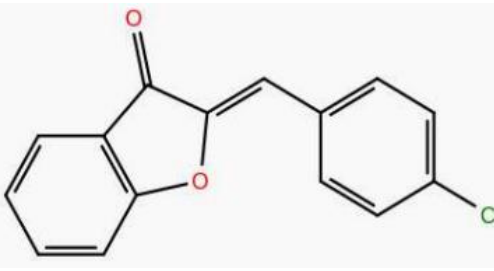
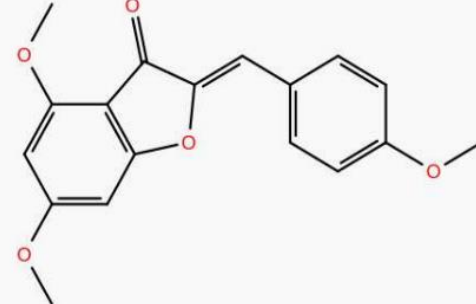
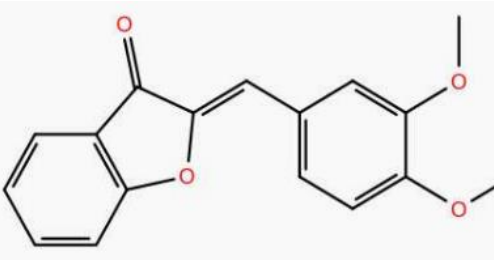
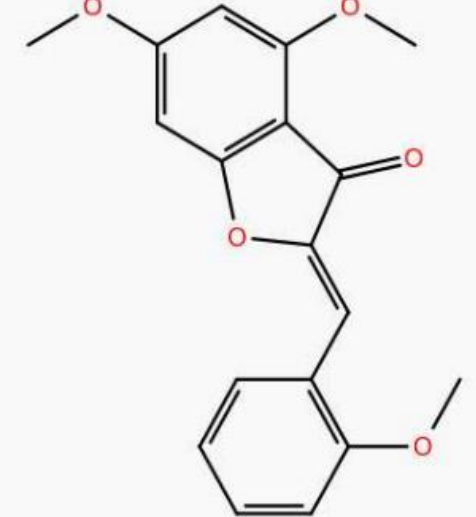
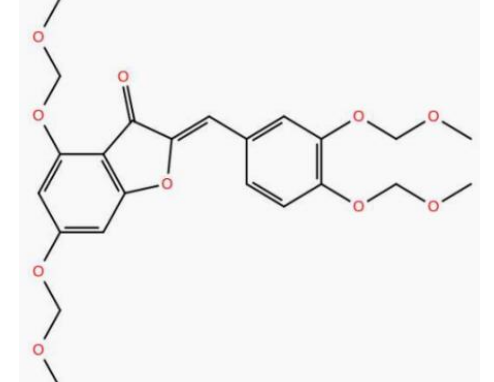
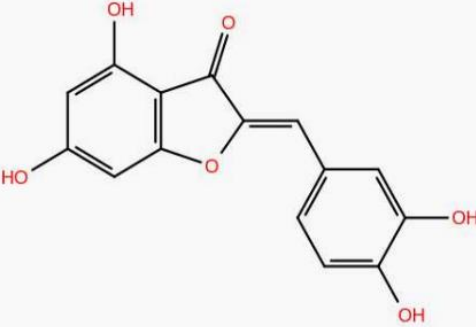
MLARALLCAVLALSHTANPCCSHPCQNRGVCMSVGFDQYKCDCTRTRGF  
 YGENCSTPEFLTRIKLFLKPTPNTVHYILTHFKGFWNVNNIPFLRNAIMSYVL  
 TSRSHLIDSPPTYNADYGYKSWEAFSNLSYYTRALPPVPDDCPTPLGVKGGK  
 QLPDSNEIVEKLLLRRKFIPDPQGSNMMFAFFAQHFTHQFFKTDHKRGPFTN  
 GLGHGVDLNHIYGETLARQRKRLFKDGLKMKYQIIDGEMYPPPTVKDTQAE  
 IYPPQVPEHLRFAVGQEVFGLVPGLMMYATIWLREHNRVCDVLKQEHPEWG  
 DEQLFQTSRLILIGETIKIVIEDYVQHLSGYHFKLKFDPELLFNKQFQYQNR  
 IAAEFNTRYHWHPLLPDTFQIHDQKYNQYQFIYNNISILLEHGITQFVESFTRQIAGR  
 VAGGRNVPPAVQKVSQASIDQSRQMKYQSFNEYRKRFMLKPYESFEELTGEK  
 EMSAELEALYGDIDAVELYPALLVEKPRPDAIFGETMVEVGAPFSLKGLMGN  
 VICSPAYWKPSTFGGEVGFQIINTASIQSLICNNVKGCPFTSFSVPDPELIKTVTI  
 NASSRSGLDDINPTVLLKERSTEL\*

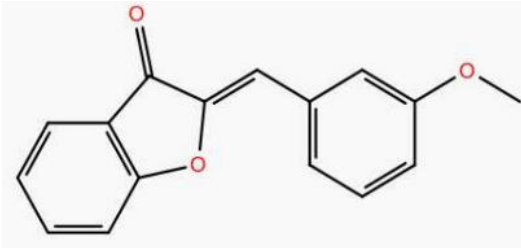
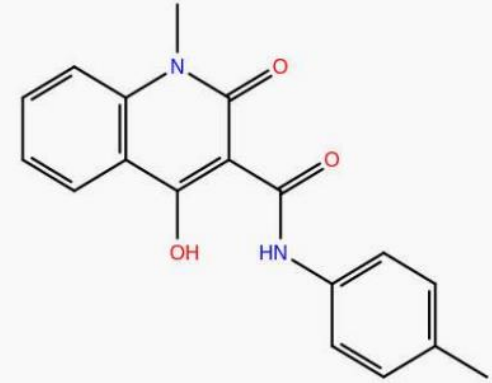
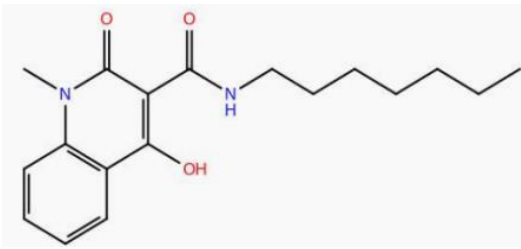
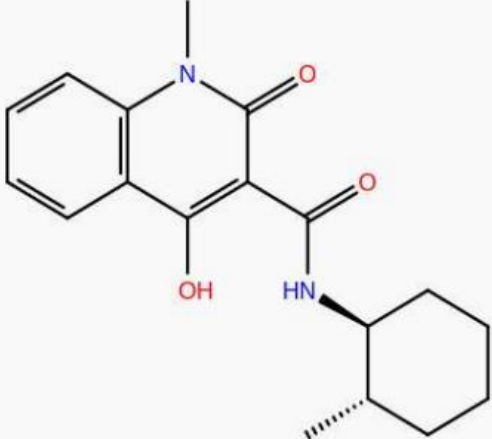
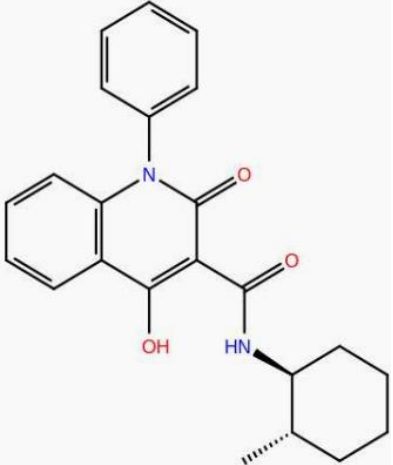
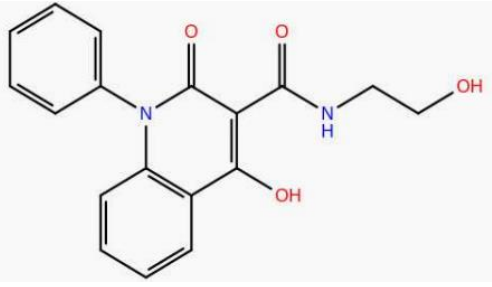
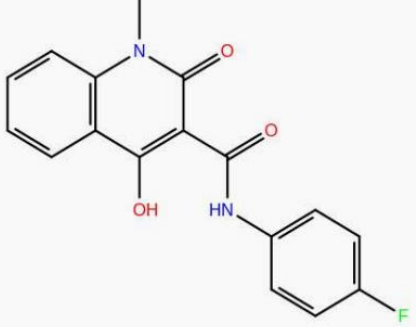
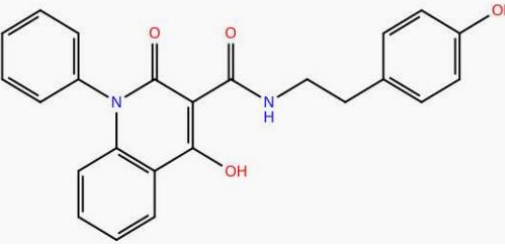
Στην συνέχεια θα πρέπει να δοθεί ποια είναι η κρυσταλλική δομή της πρωτεΐνης. Αυτό μπορεί να γίνει δίνοντας το όνομα του αρχείου στην 7<sup>η</sup> σειρά του κώδικα (στην περίπτωση του παραδείγματος 1CX2a). Το αρχείο αυτό θα πρέπει να είναι της μορφής .pdb και να περιέχει μόνο την πρωτεΐνη. Επομένως θα πρέπει να γίνει επεξεργασία του αρχείου και να αφαιρεθούν οι παρεμποδιστές και οποιοδήποτε άλλο μόριο υπάρχει στο αρχείο.

Επιπλέον, θα πρέπει να δοθεί το όνομα που θα έχουν τα νέα αρχεία που θα δημιουργηθούν. Αυτό δίνεται ως πληροφορία στον κώδικα στην σειρά 7 (στην περίπτωση του παραδείγματος 'cox2human'). Τέλος θα πρέπει να δοθεί στον κώδικα ο αριθμός των κρυσταλλικών δομών που θα δημιουργηθούν. Αυτή η πληροφορία δίνεται στον κώδικα στην σειρά 12. Στην περίπτωση του παραδείγματος έχει επιλεγεί να δοθούν 10 διαφορετικές κρυσταλλικές δομές.

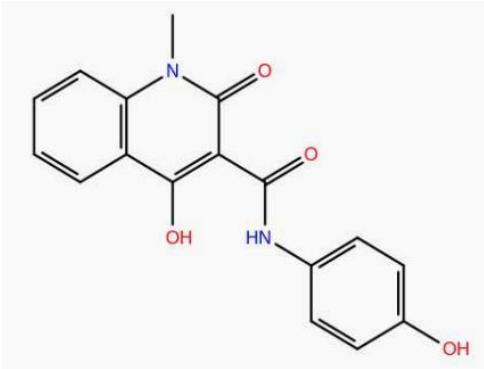
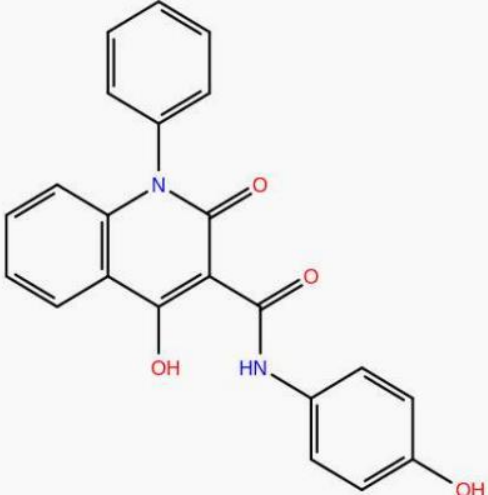
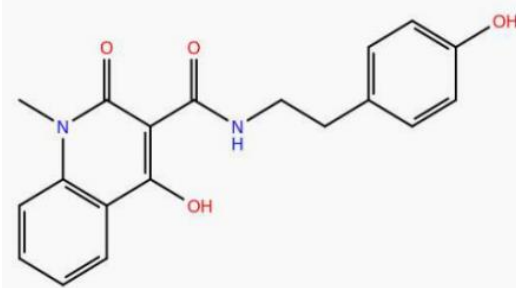
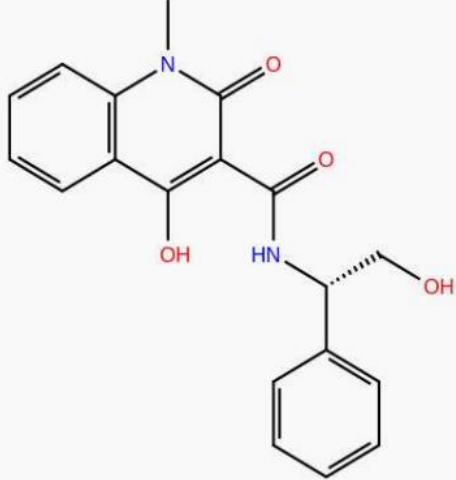
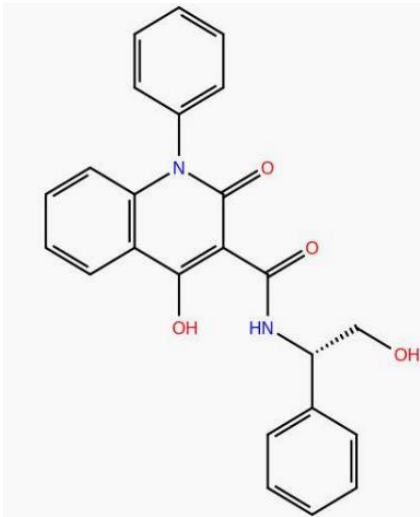
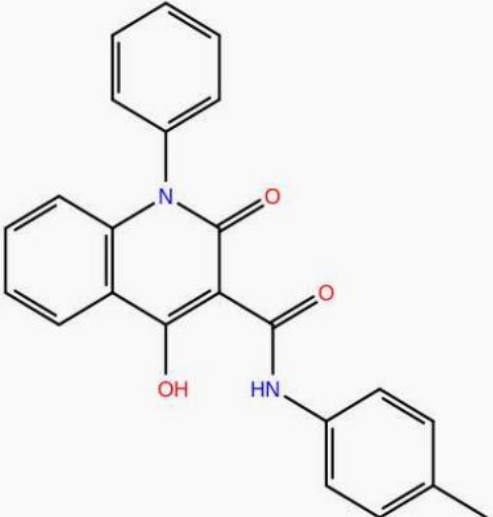
*Ε.2. Μόρια που χρησιμοποιήθηκαν στην μοριακή μοντελοποίηση*

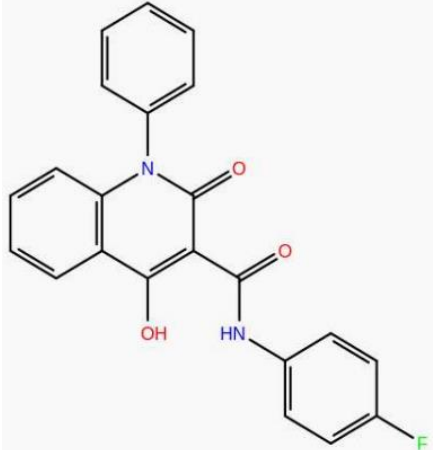
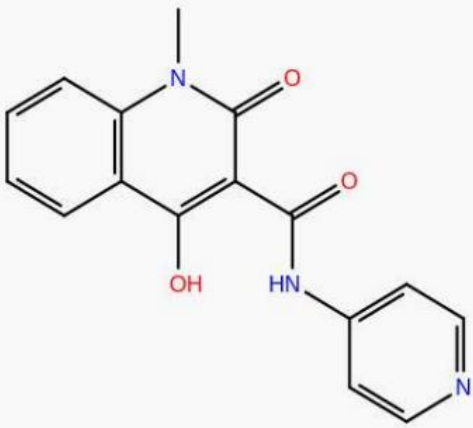
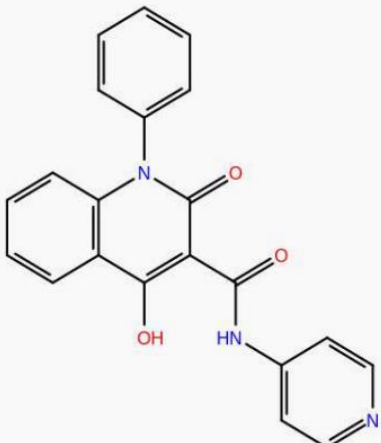
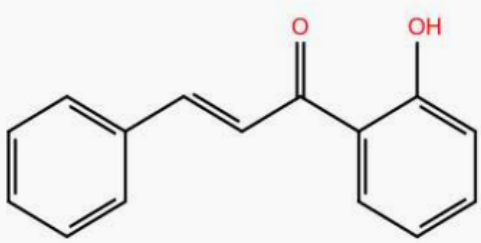
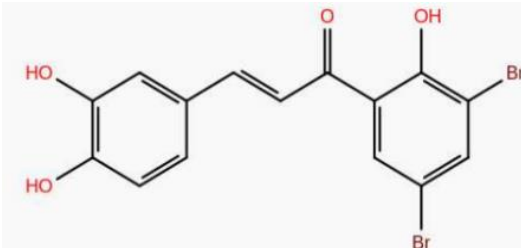
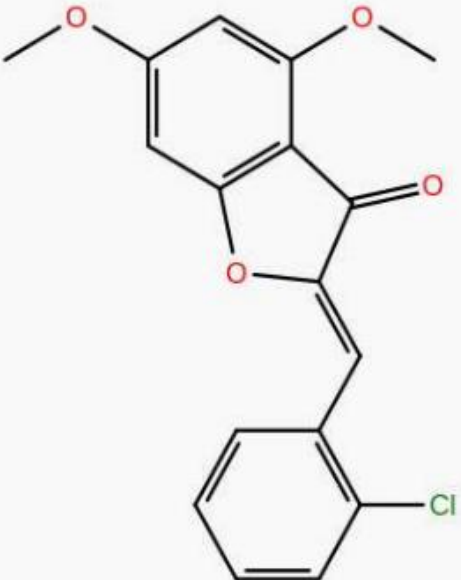
AD 1		AD 2	
AD 3		AD 4	
AD 5		AD 6	
AD 8		AD 15	

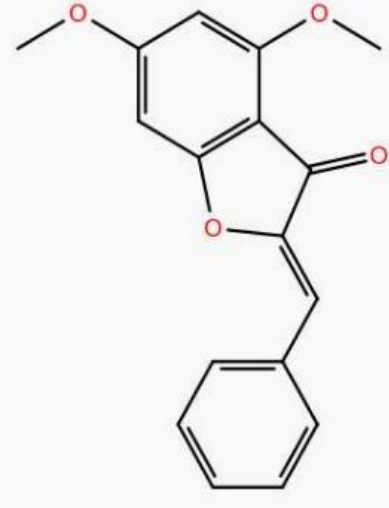
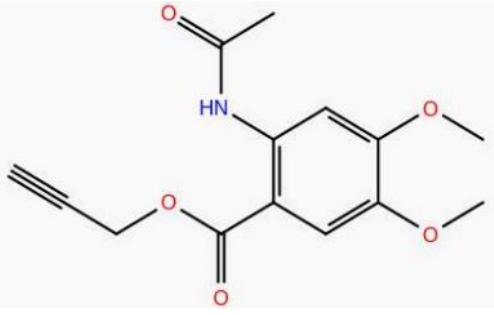
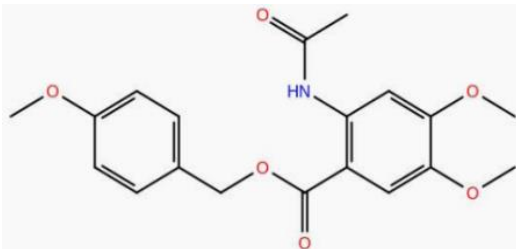
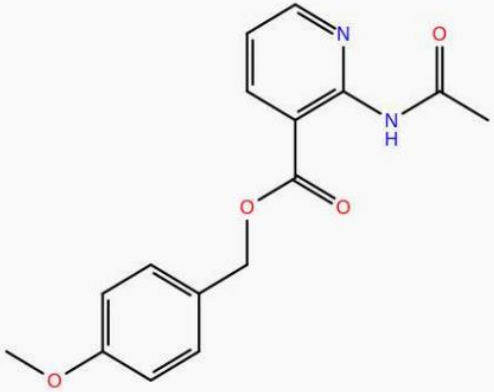
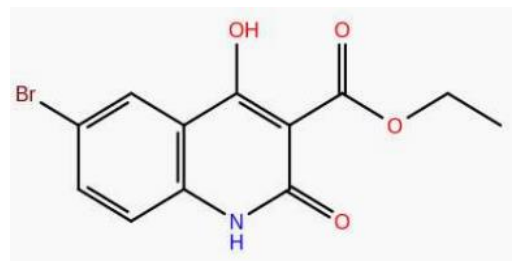
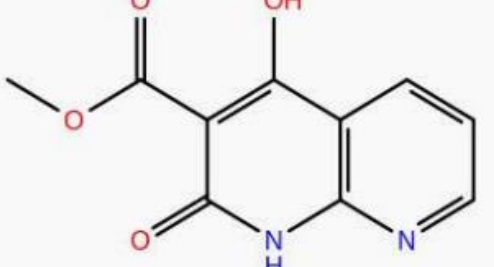
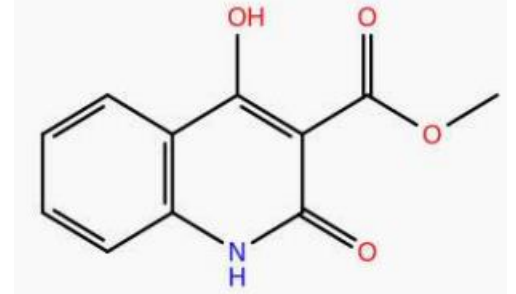

AD 16		AD 17	
AD 18		AD 29	
AD 33		AD 34	
AD 35		AD 37	

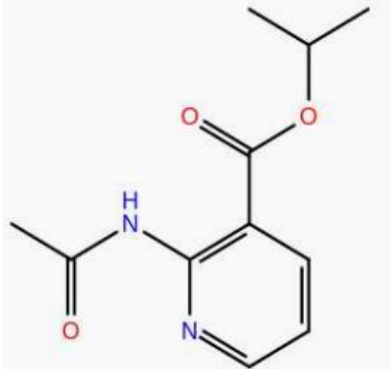
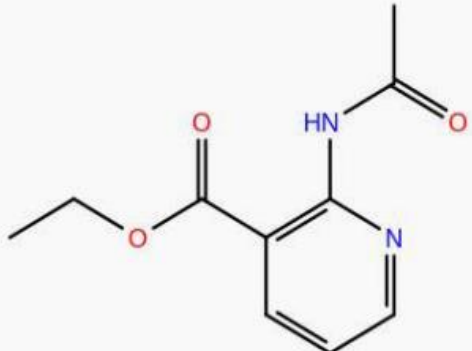
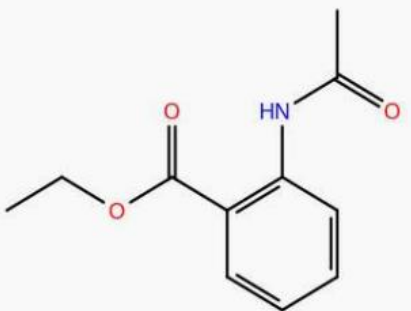
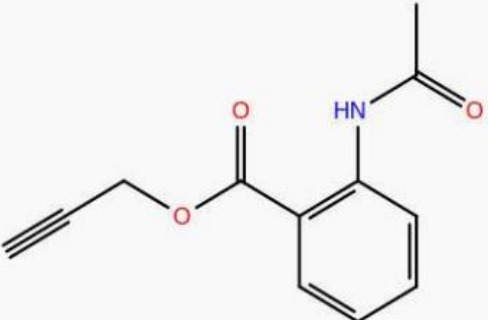
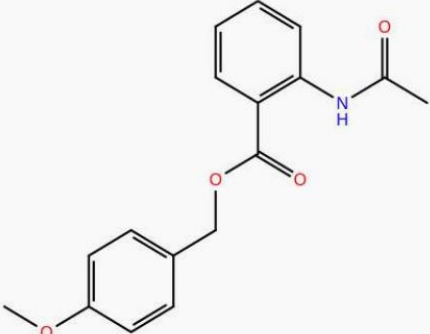
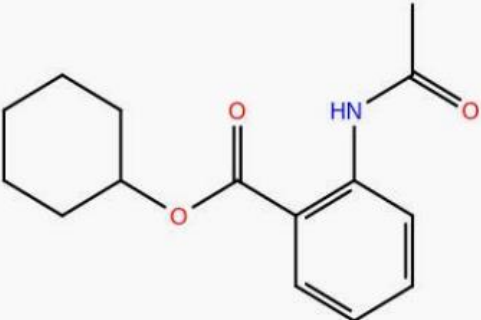
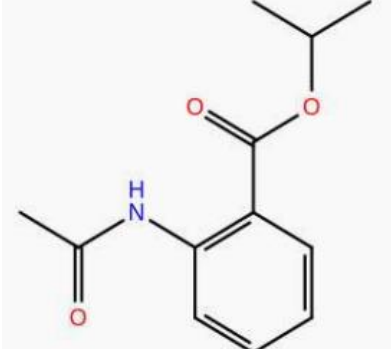
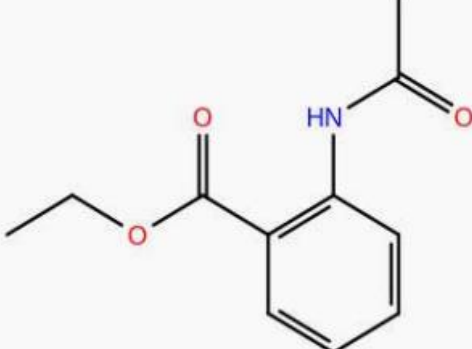


AD 38		AD 40	
AD 41		AD 42	
AD 43		AD 44	
AD 45		AD 46	

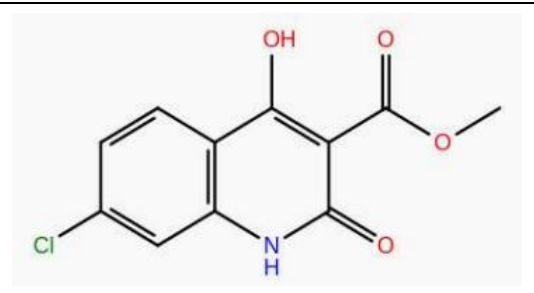
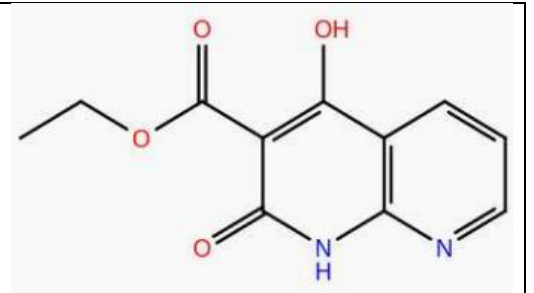
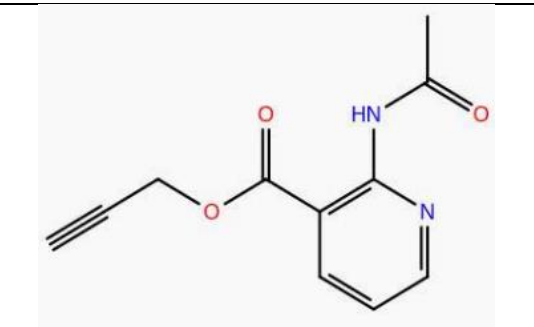
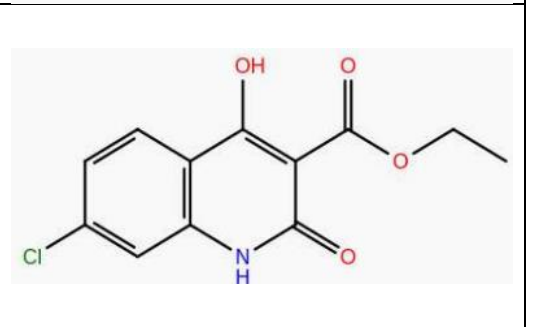
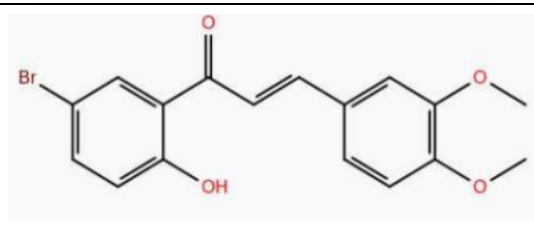
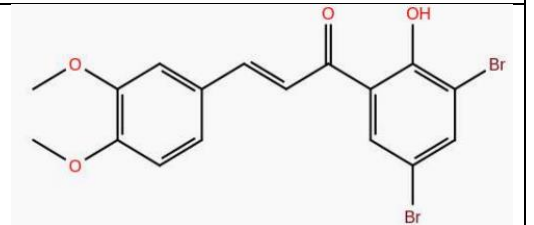
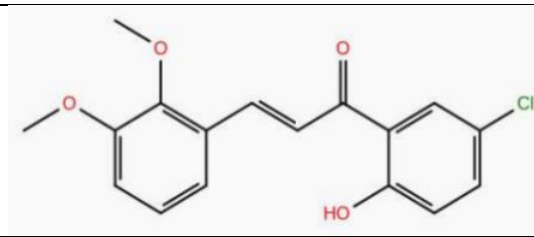
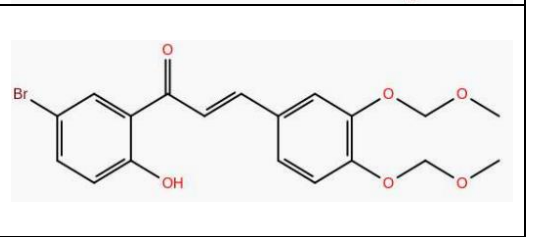

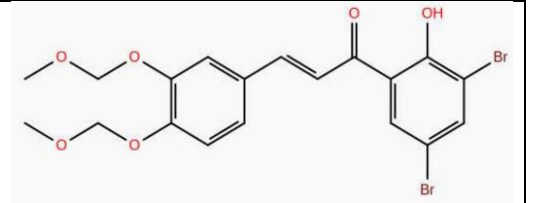
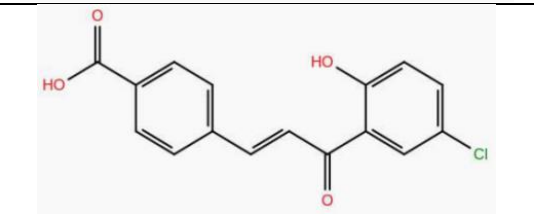
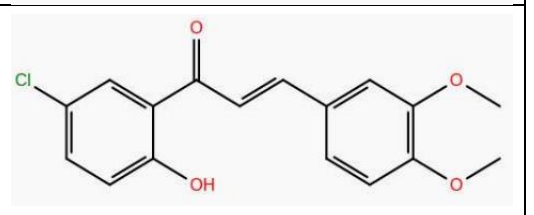
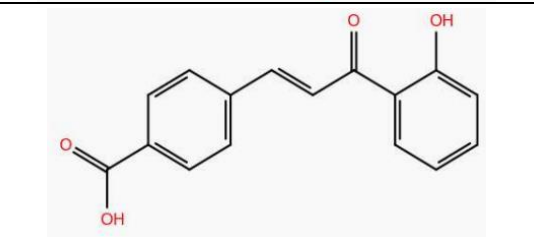
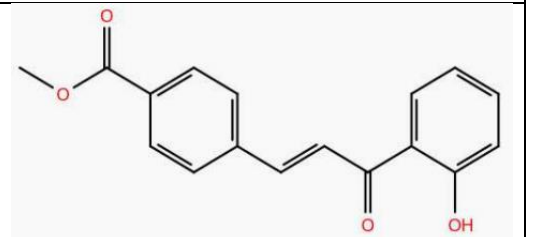


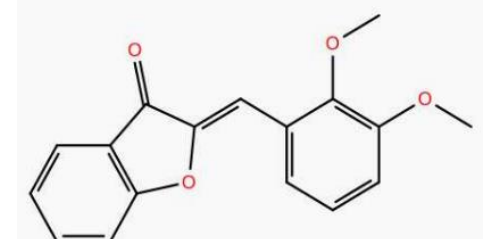

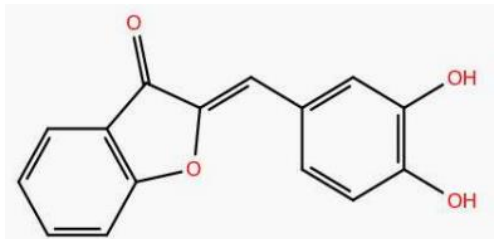
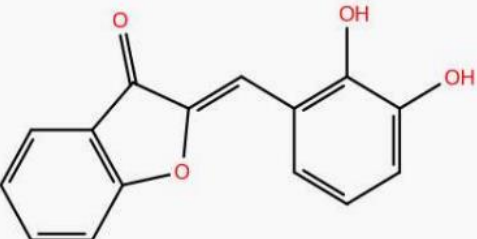
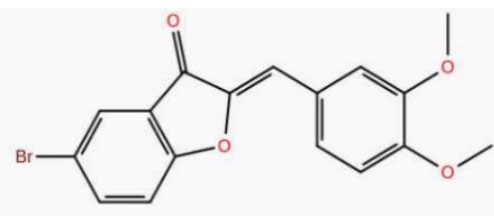
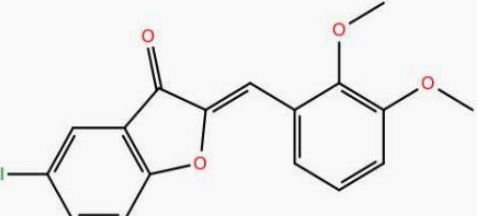
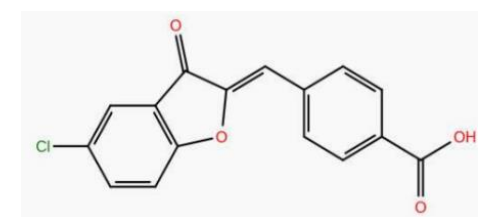
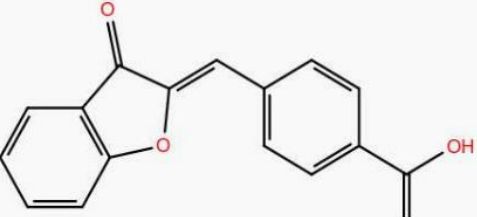
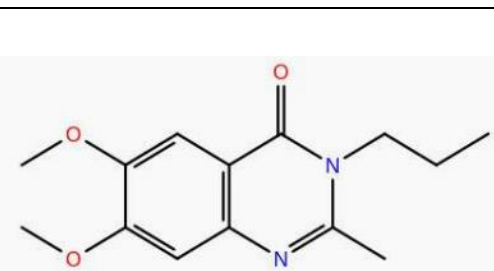
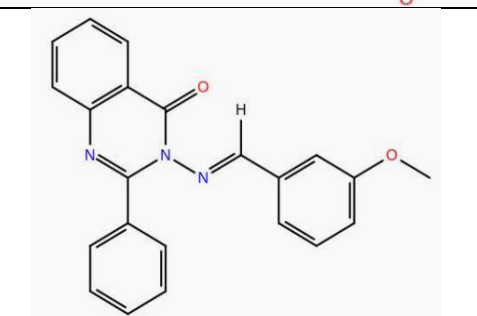
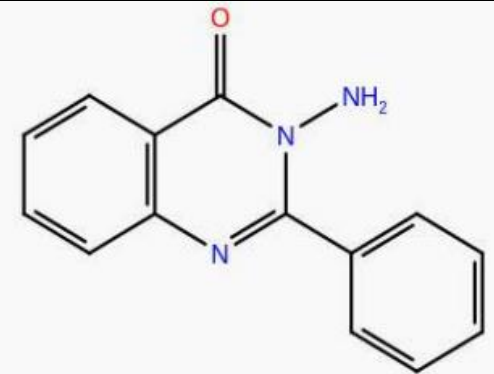
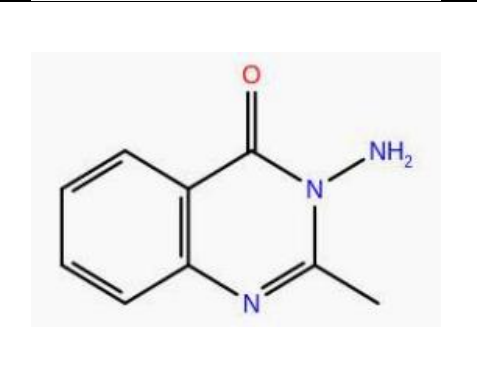
AD 47		AD 48	
AD 50		AD 51	
AD 52		AD 53	

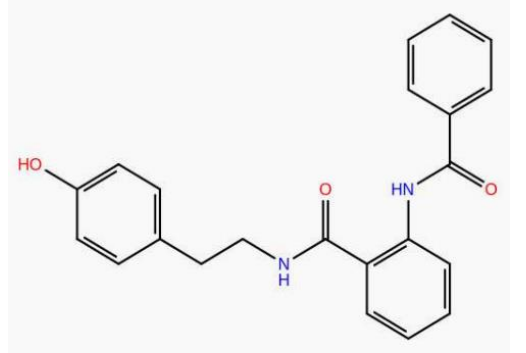
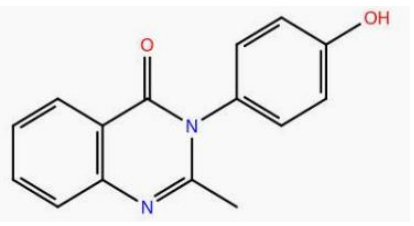
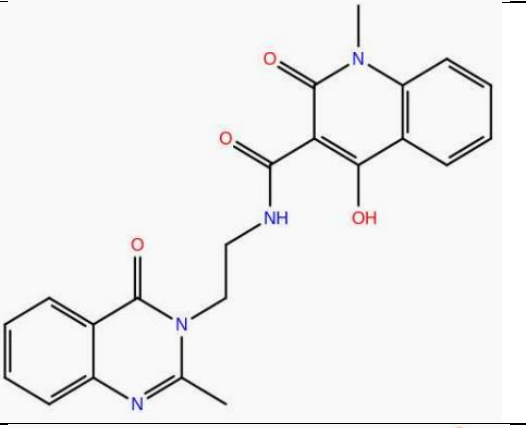
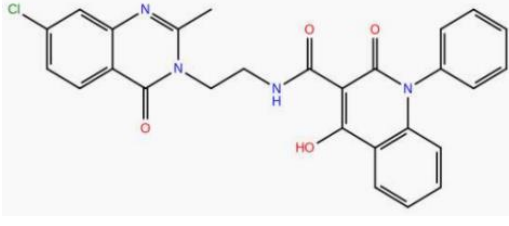

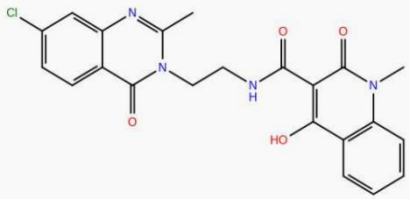
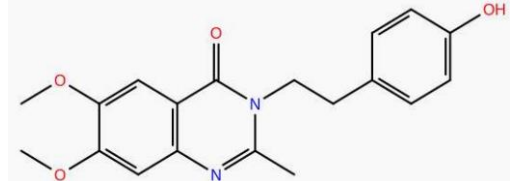
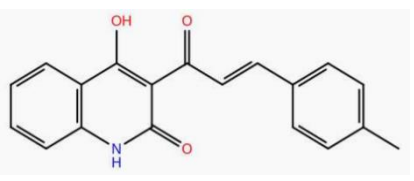
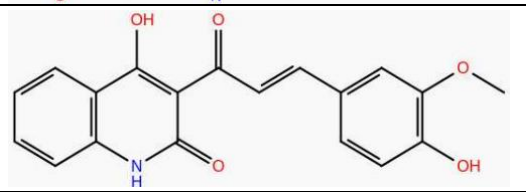
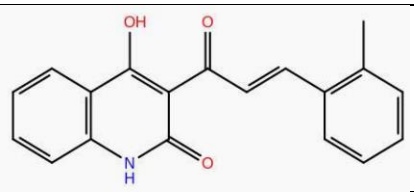
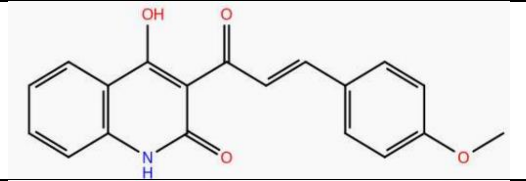
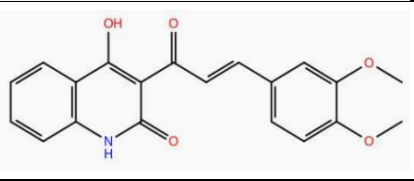
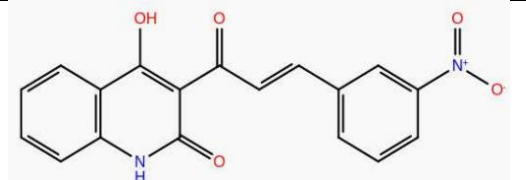
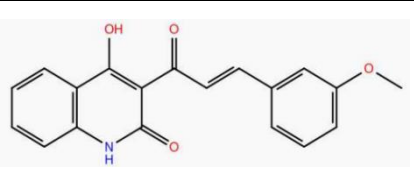
AD 54		AD 55	
AD 56		AD 63	
AD 148		ADAMK 91	

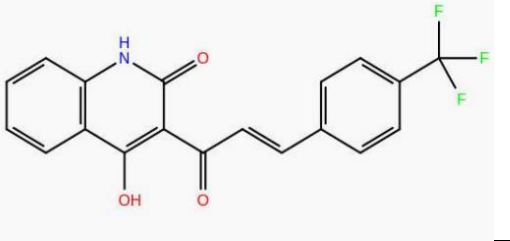
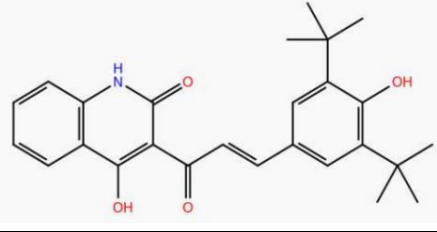
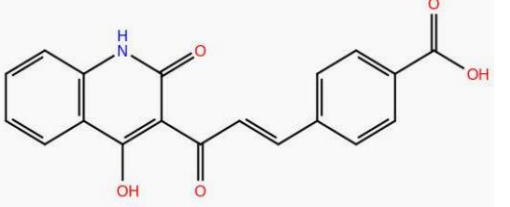
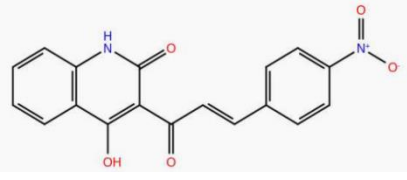
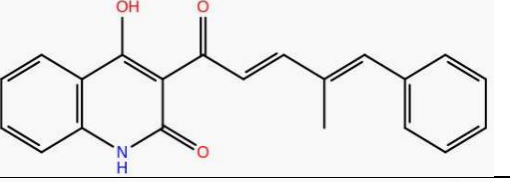
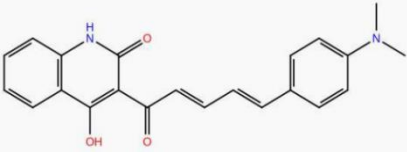
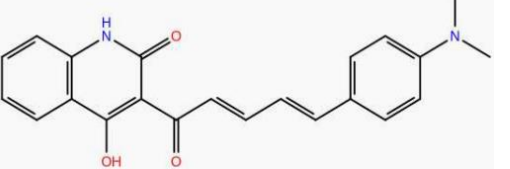
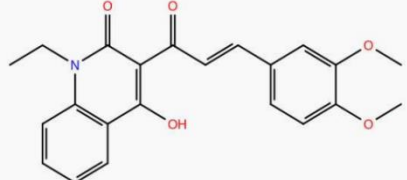
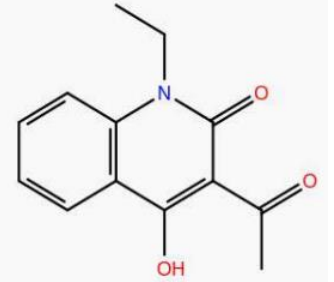
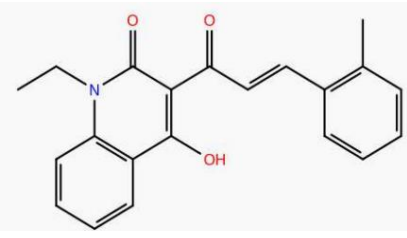
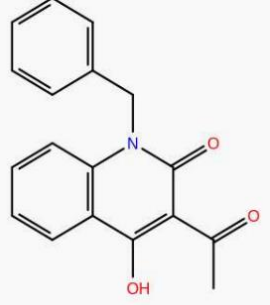
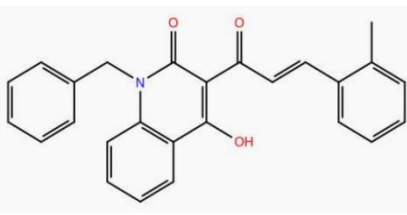
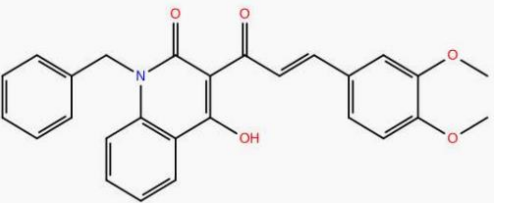
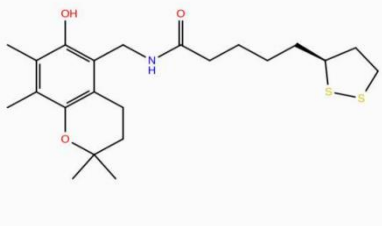
<p>ADAMK 92</p>		<p>ADAT 179</p>	
<p>ADAT 180</p>		<p>ADAT 181</p>	
<p>ADAT 182</p>		<p>ADAT 183</p>	
<p>ADAT 184</p>		<p>ADAT 185</p>	

ADAT 186		ADAT 187	
ADAT 188		ADAT 189	
ADAT 190		ADAT 191	
ADAT 192		ADAT 193	
ADAT 194		ADAT 195	

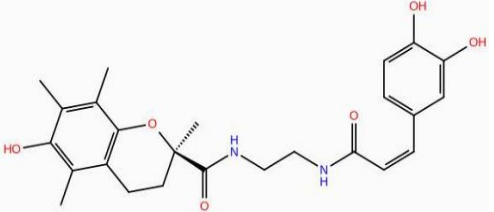
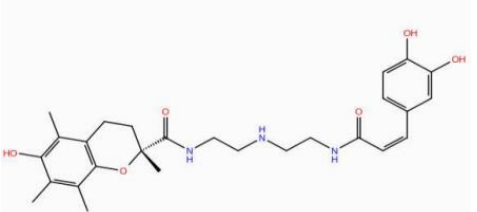
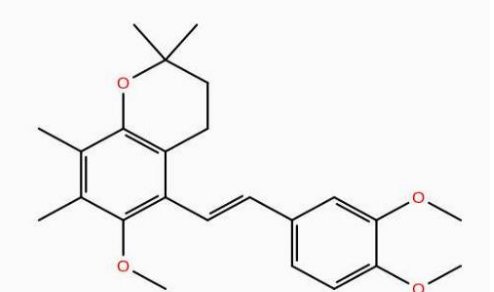
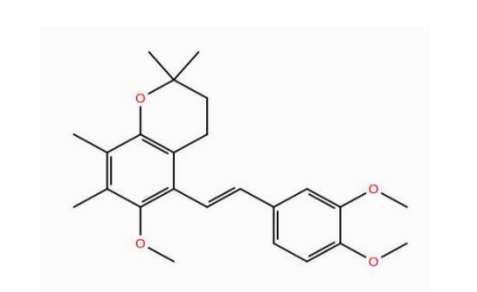
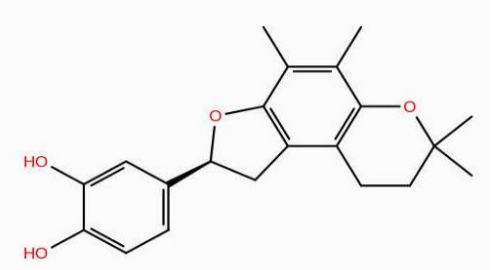
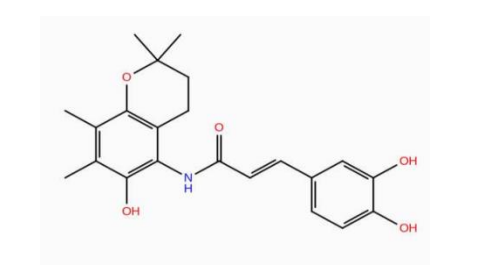
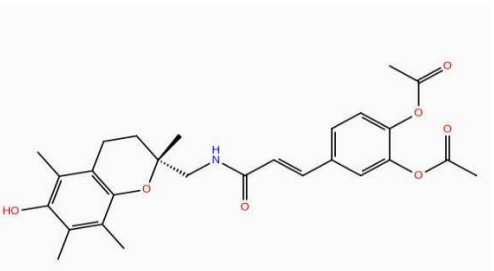
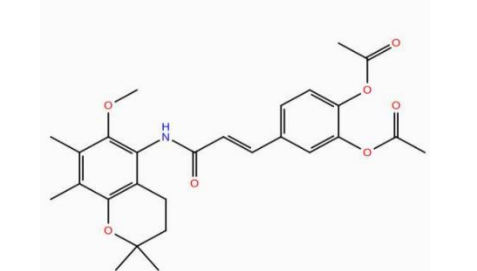
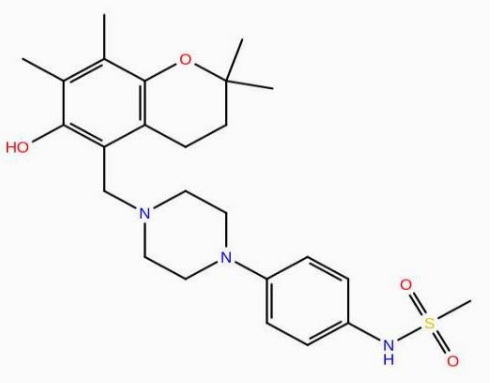

ADAT 196		ADAT 197	
ADAT 198		ADAT 199	
ADDP 76		ADDP 77	
ADDP 79		ADDP 99	
ADDP 100		ADDP 121	
ADGAN 59		ADGAN 60	
ADGAN 61		ADGAN 62	

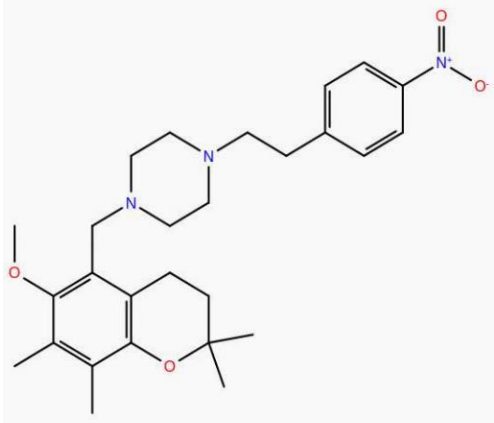
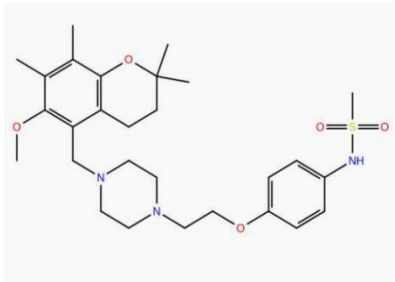
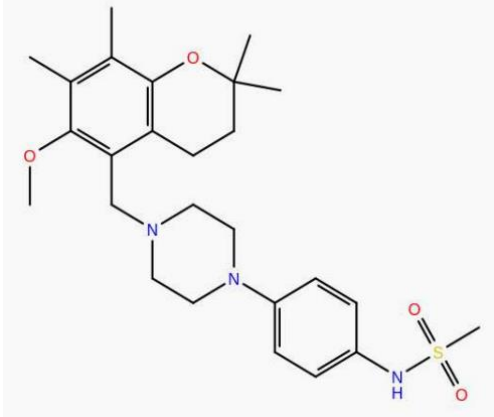
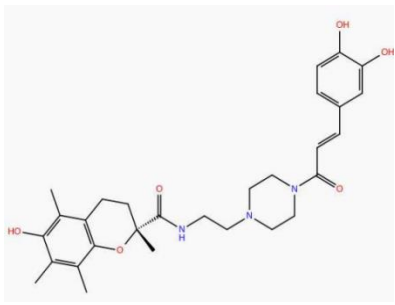
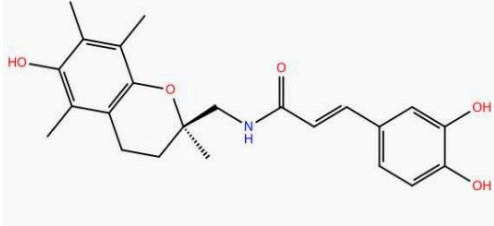
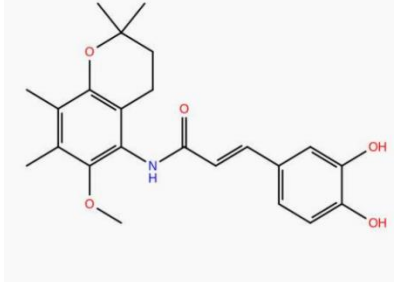
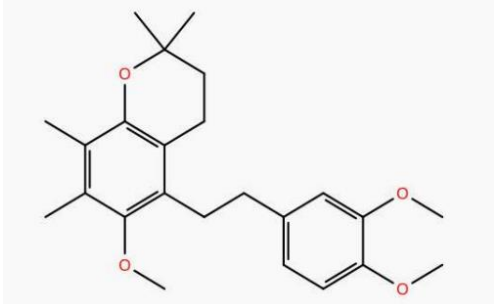
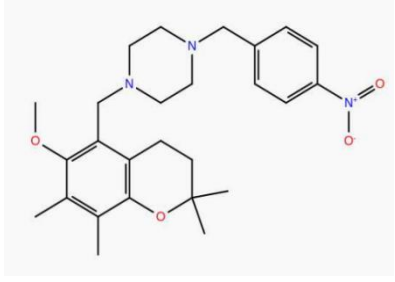
ADOX 173		ADOX 174	
ADOX 175		ADOX 177	
ADOX 204		ADOX 205	
ADOX 206		ADOX 207	
ADTA 122		ADTA 123	
ADTA 124		ADTA 125	

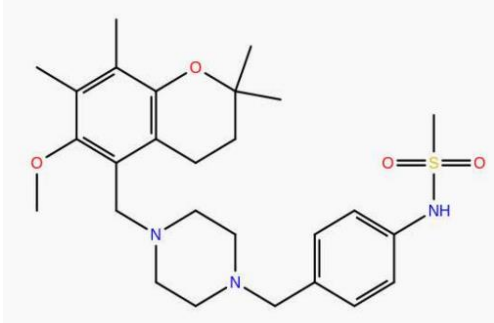
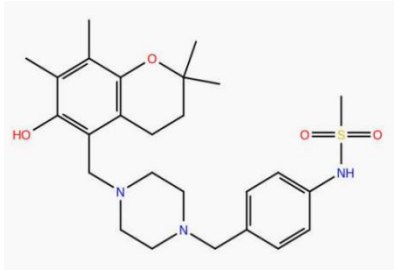
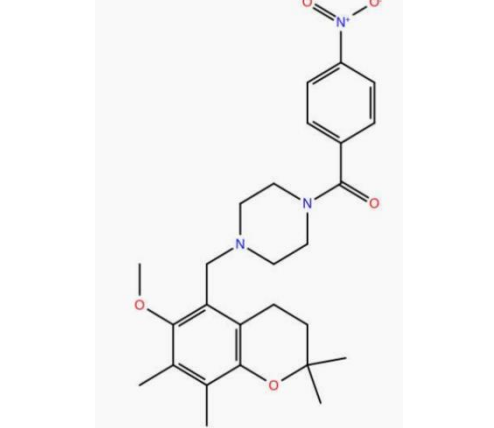
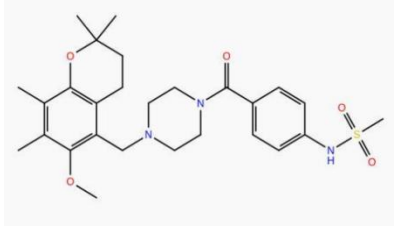

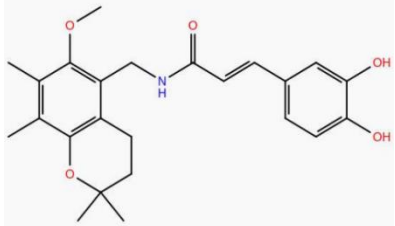
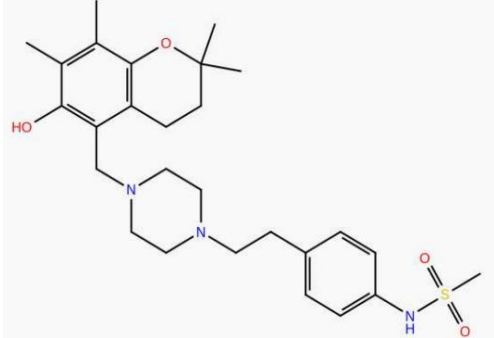
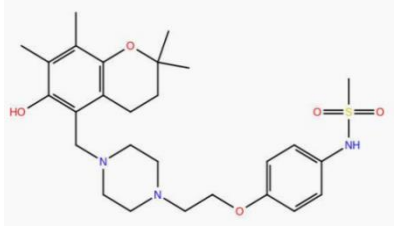
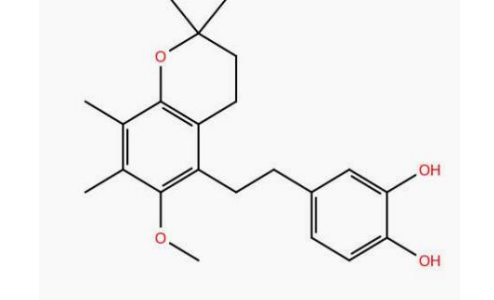
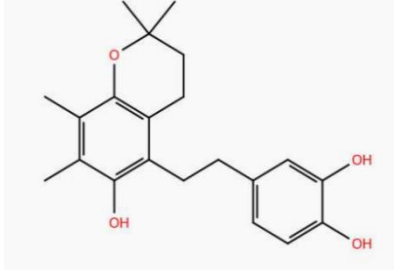
ADTA 126		ADTA 127	
ADTA 129		ADTA 130	
ADTA 131		ADTA 132	
ADTA 133		MR 18	
MR 33		MR 35	
MR 37		MR 39	
MR 40		MR 41	

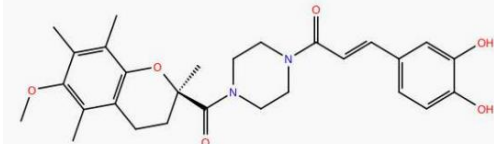
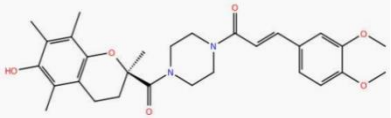
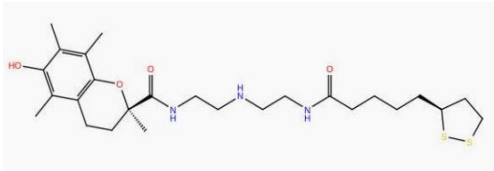
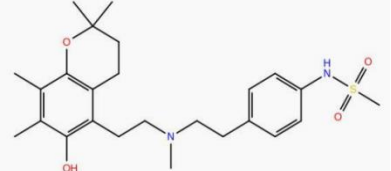
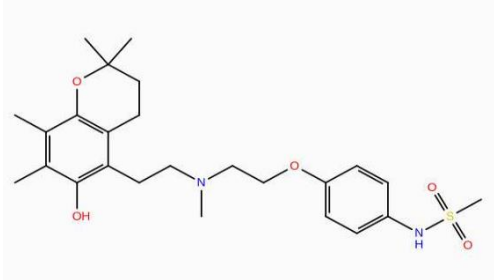
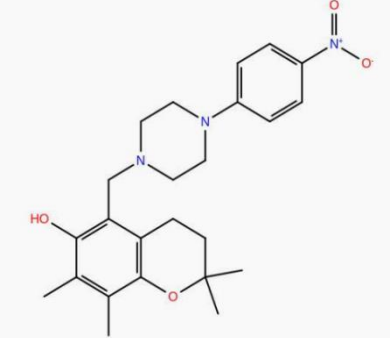
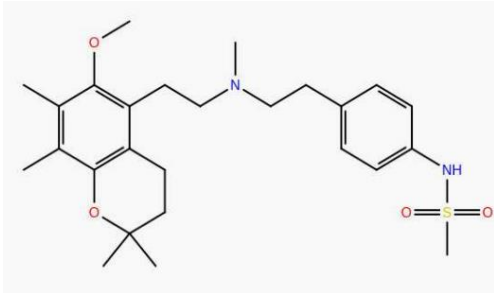
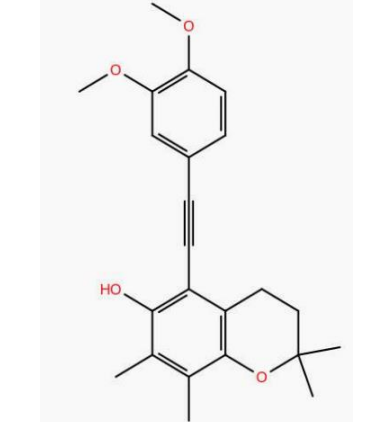
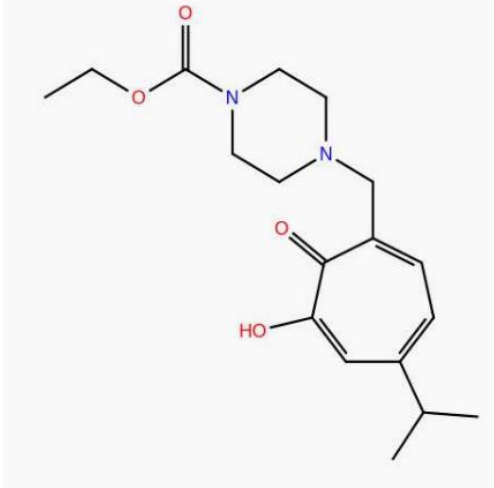
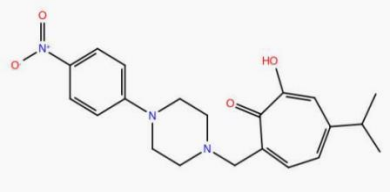
MR 42		MR 43	
MR 44		MR 45	
MR 51		MR 52	
MR 53		MR 93	
MR 103		MR 104	
MR 110		MR 111	
MR 112		MK 1	

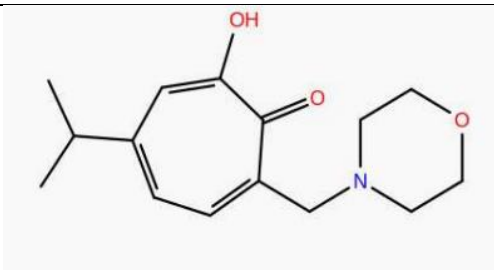
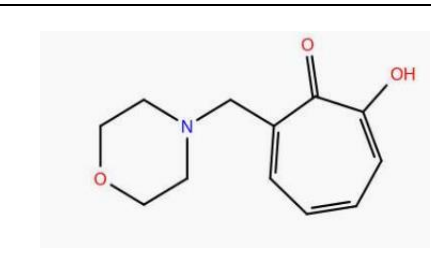
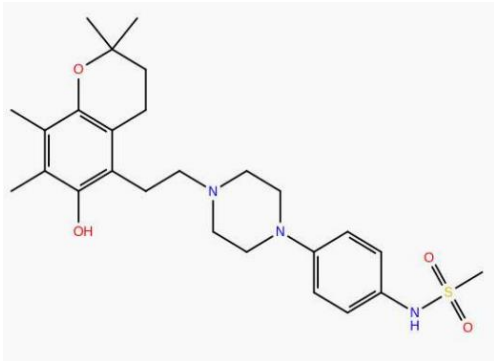
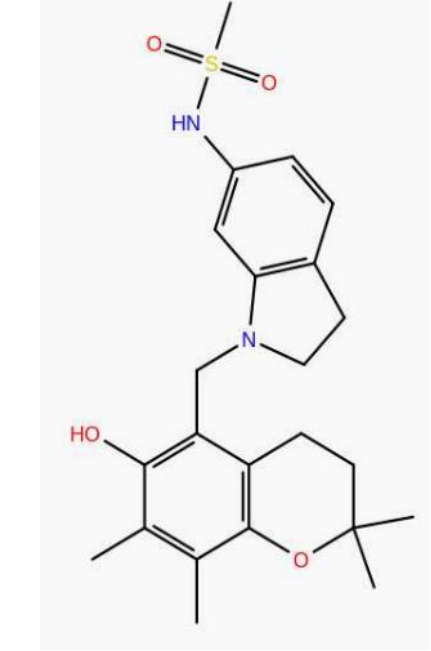
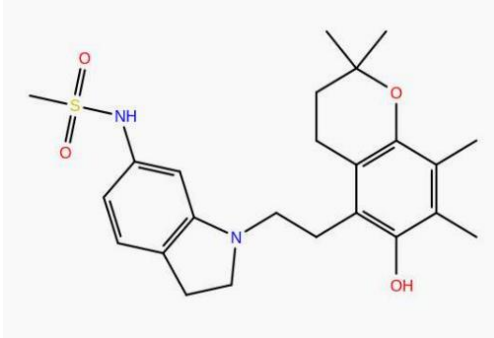
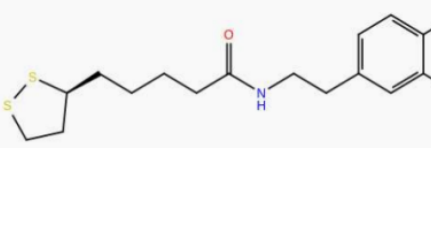
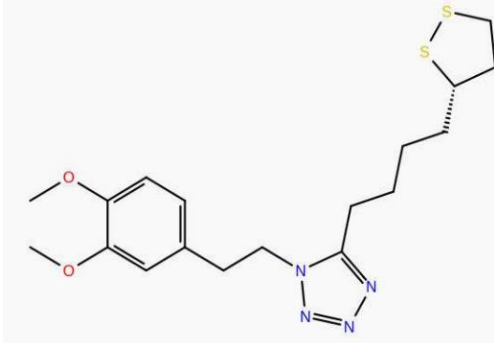
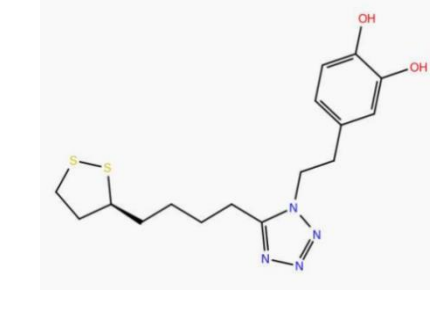



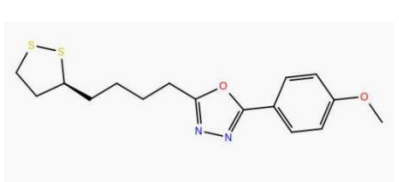
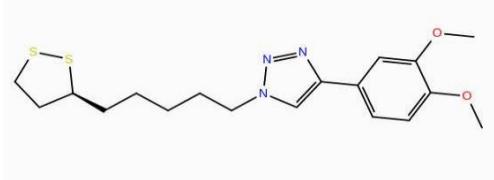
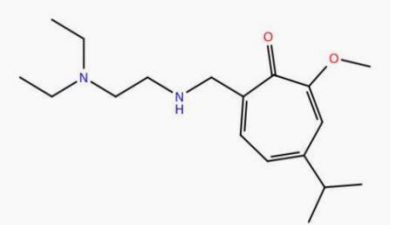
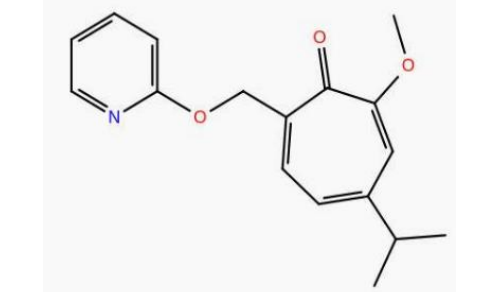
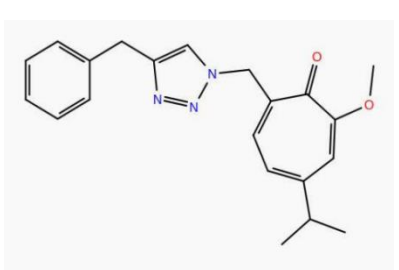
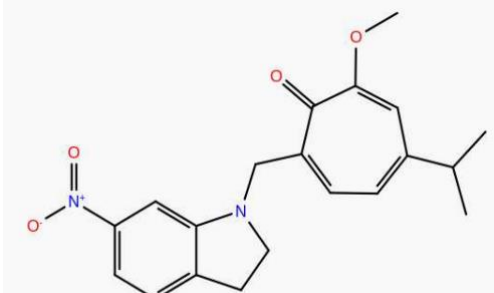
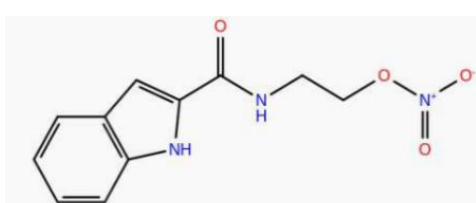
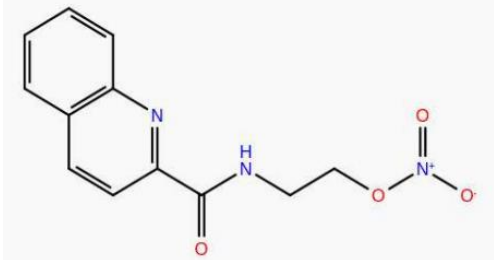
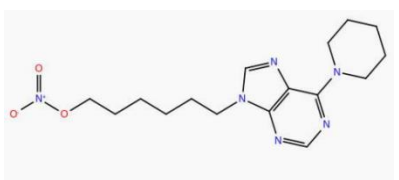
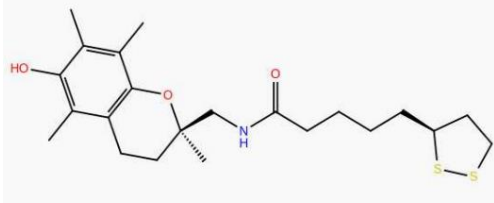
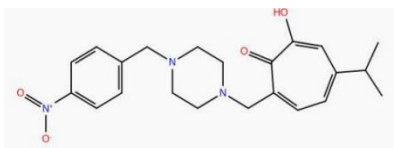
MK 2		MK 3	
MK 4		MK 5	
MK 6		MK 7	
MK 8		MK 9	
MK 10		MK 11	


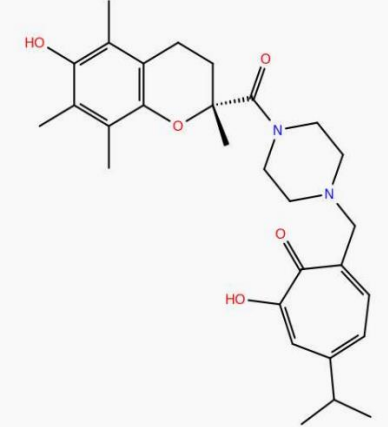
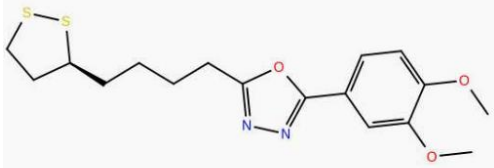

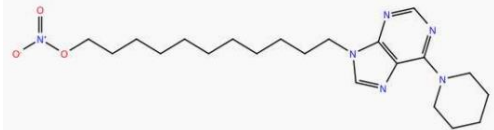
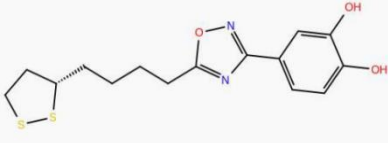
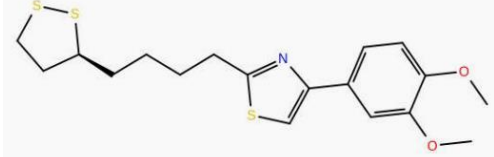
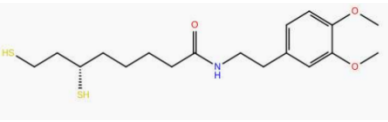
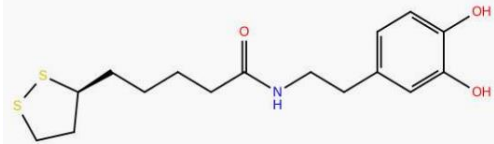
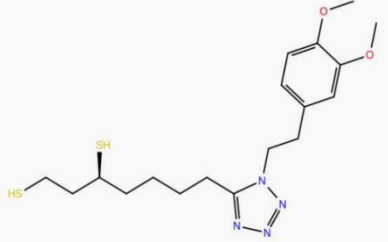
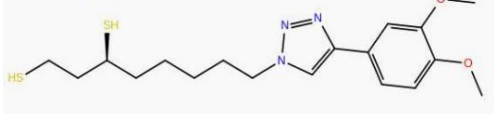
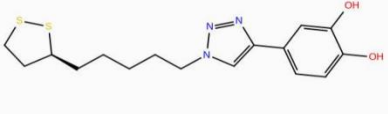

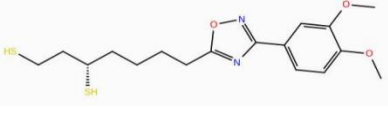
MK 12		MK 13	
MK 14		MK 15	
MK 16		MK 17	
MK 18		MK 19	

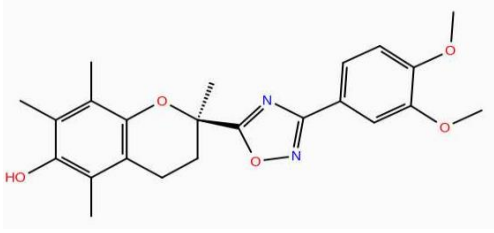
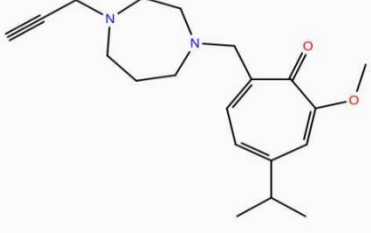
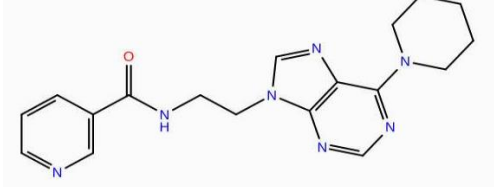
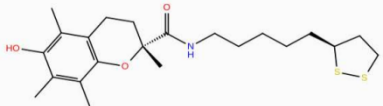
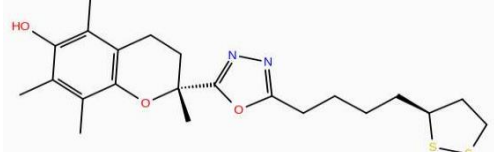
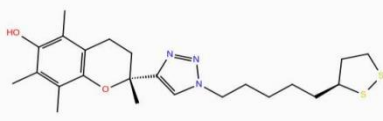
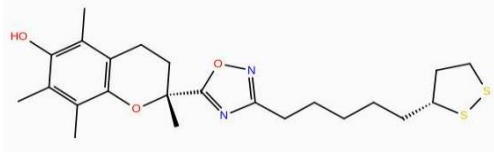
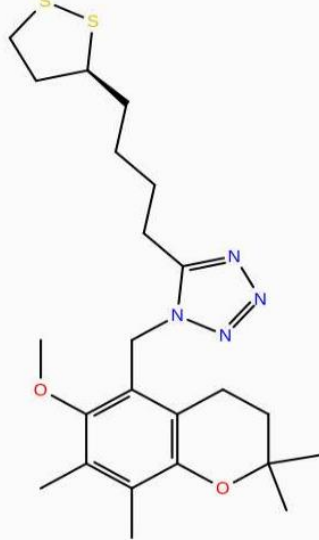
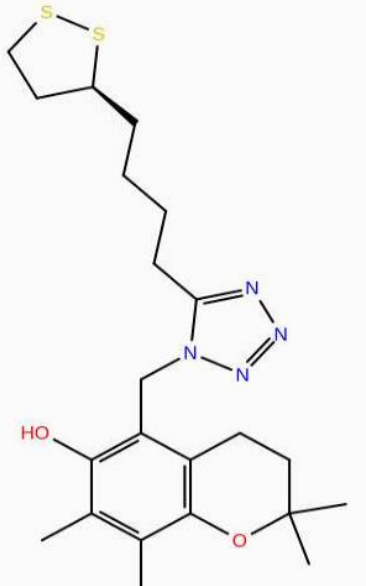
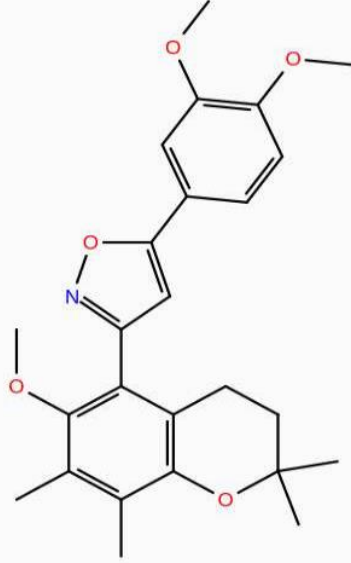
MK 20		MK 21	
MK 22		MK 23	
MK 24		MK 25	
MK 26		MK 27	
MK 28		MK 29	

MK 30		MK 31	
MK 32		MK 33	
MK 34		MK 35	
MK 36		MK 37	
MK 38		MK 39	

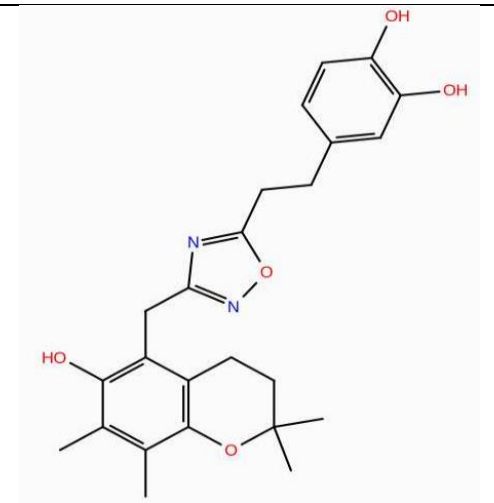
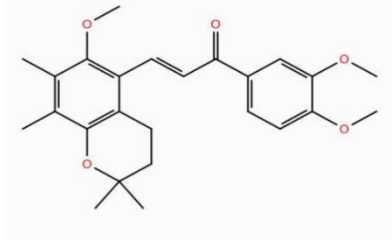
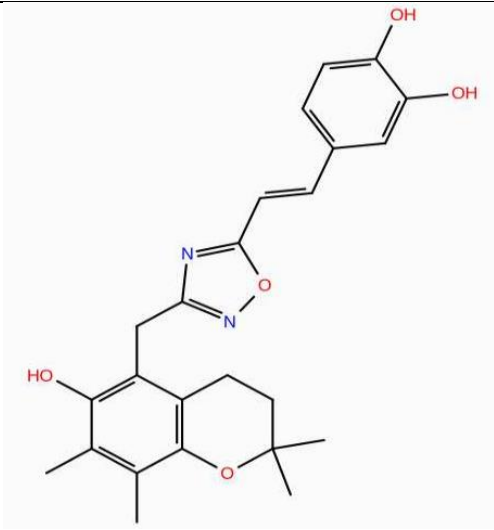
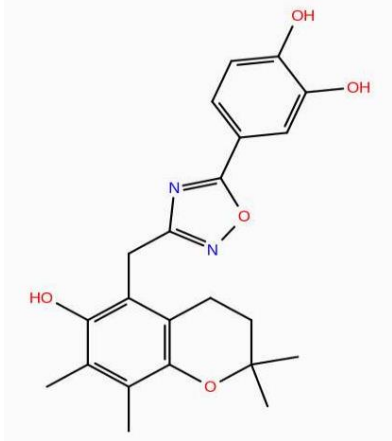
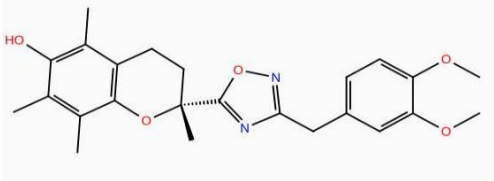
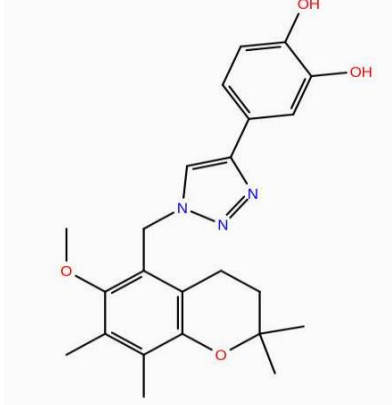
MK 40		MK 41	
MK 42		MK 43	
MK 44		MK 45	
MK 46		MK 47	

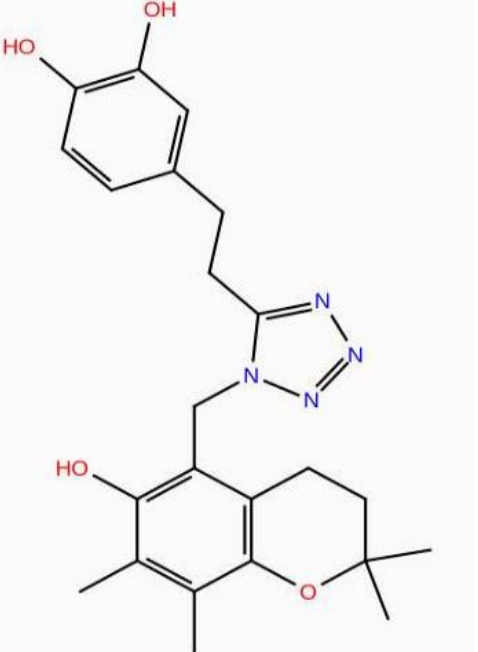
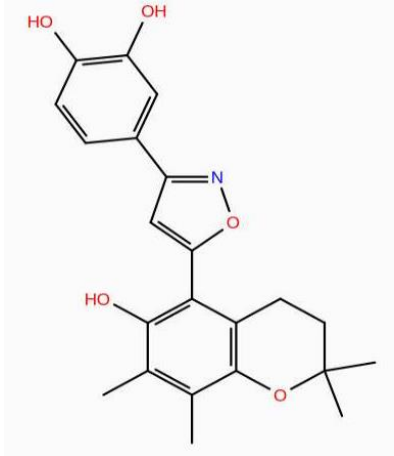
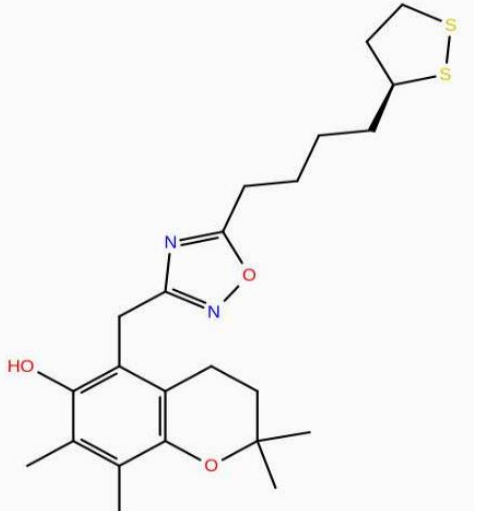
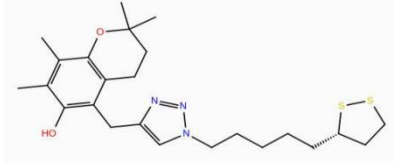

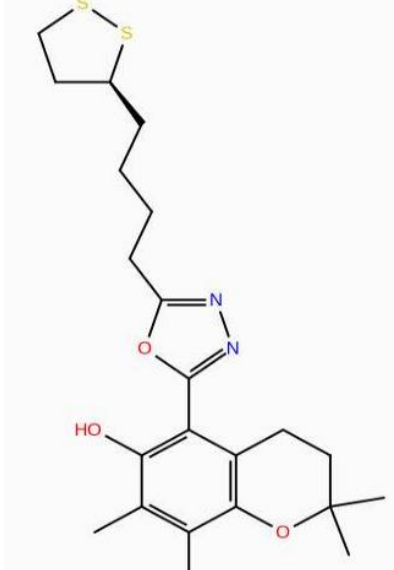
MK 48		MK 49	
MK 50		MK 51	
MK 52		MK 53	
MK 54		MK55	
MK 56		MK 57	
MK 58		MK 59	

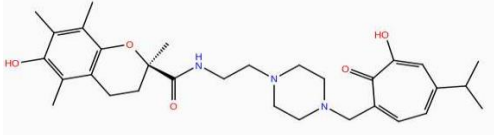
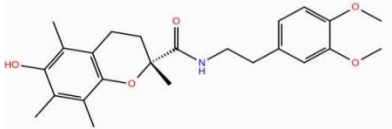
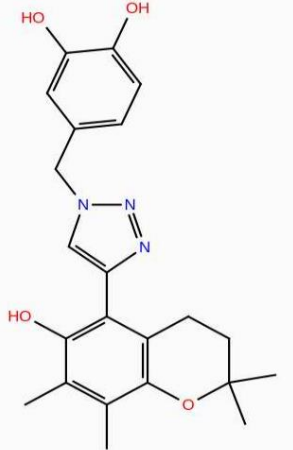
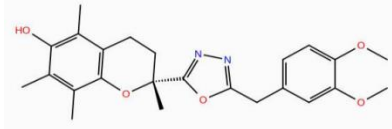
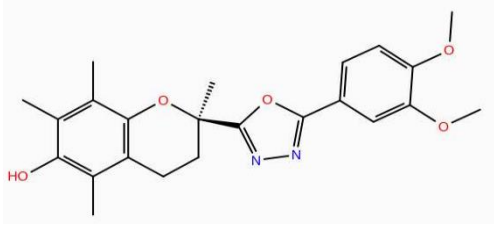
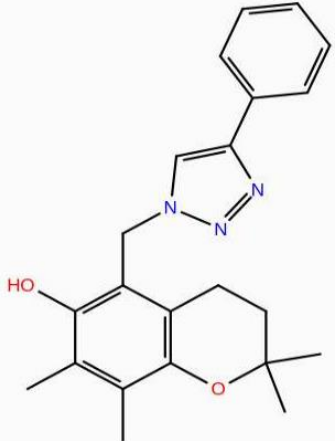
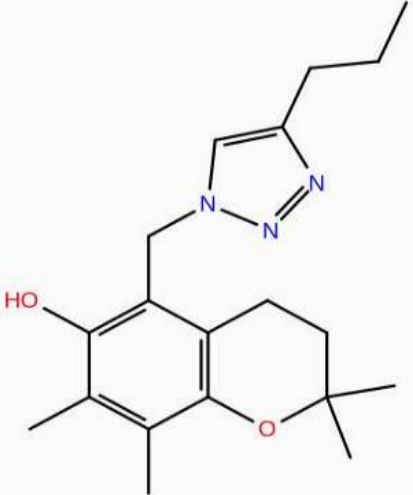
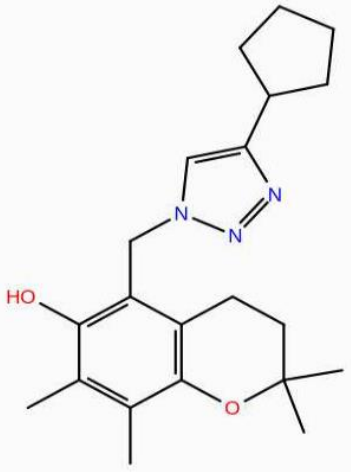
MK 60		MK 61	
MK 62		MK 63	
MK 64		MK65	
MK 66		MK67	
MK 68		MK 69	
MK 70		MK 71	
MK 72		MK 73	

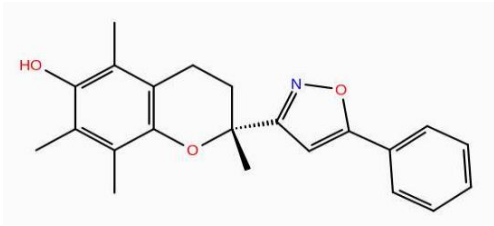
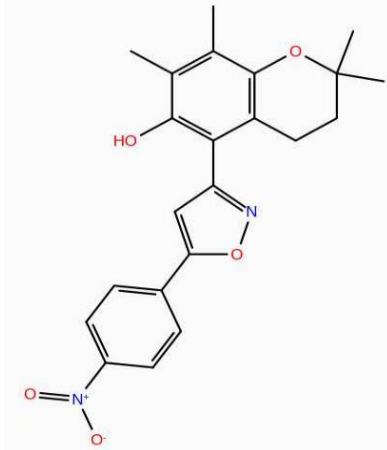
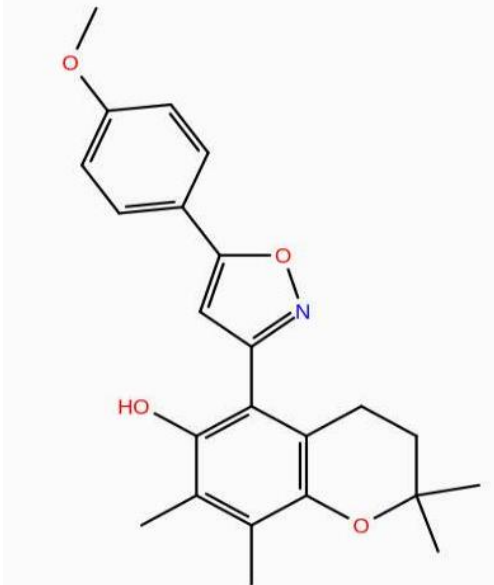
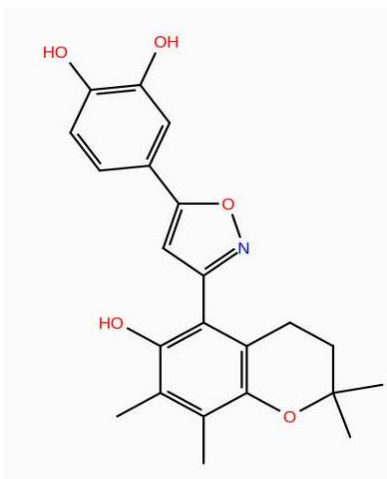
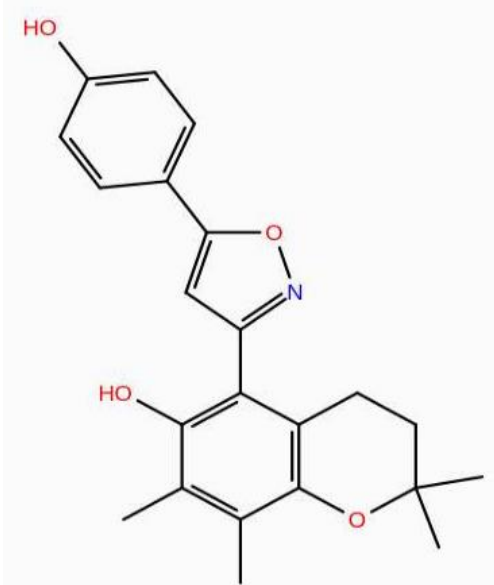
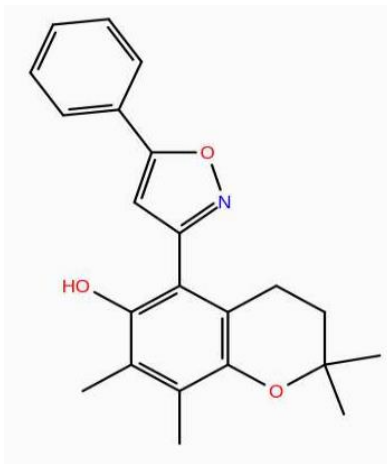
MK 74		MK 75	
MK 76		MK 77	
MK 78		MK 79	
MK 80		MK 81	
MK 82		MK 83	


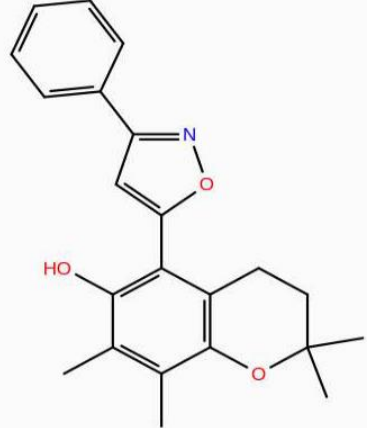
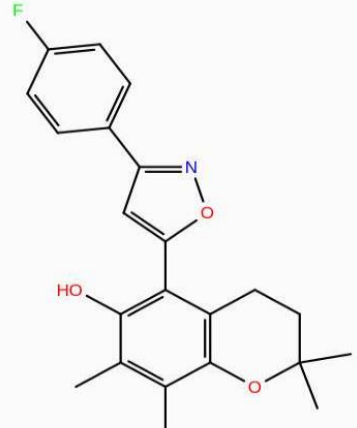
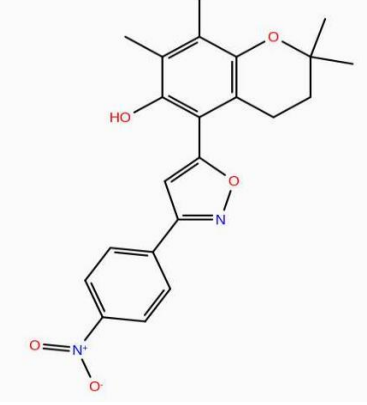
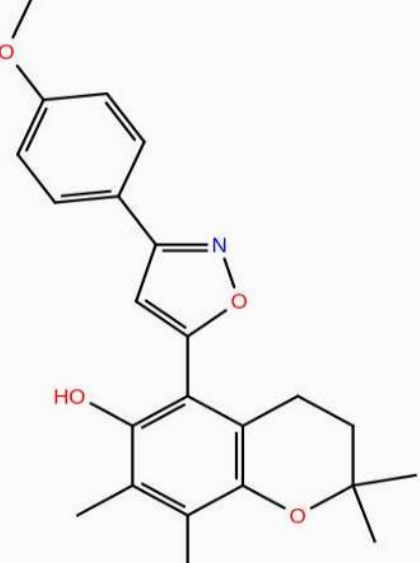
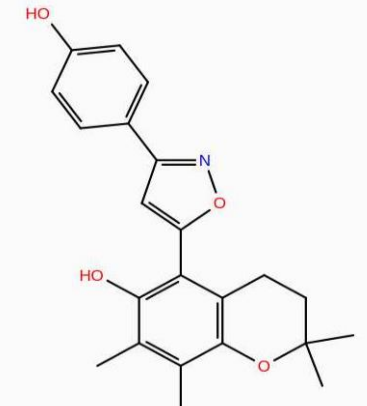


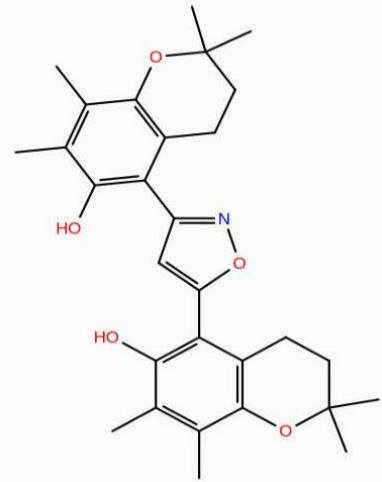
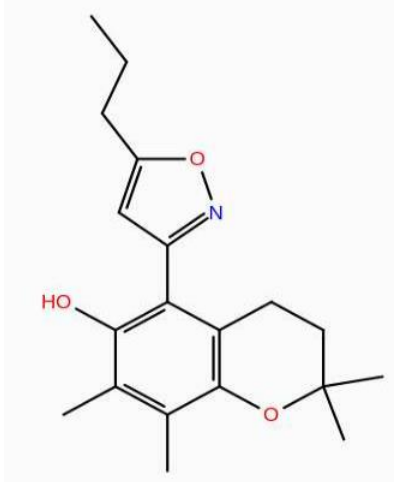
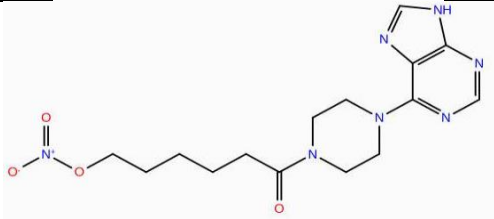

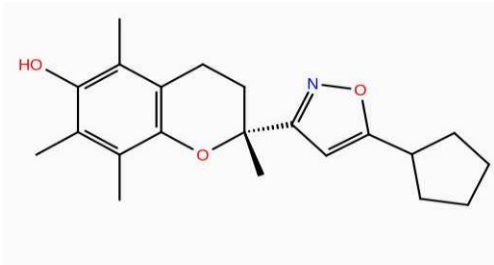
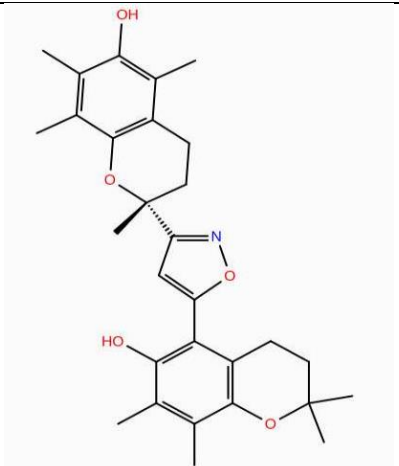
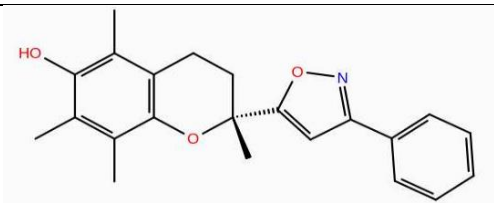
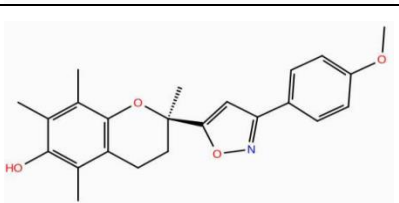
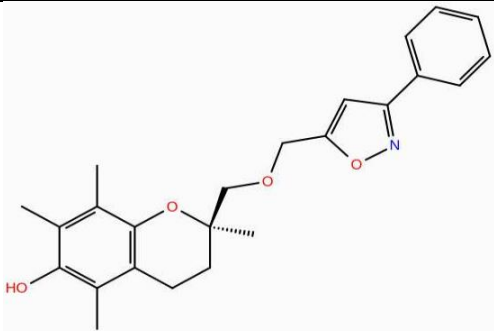
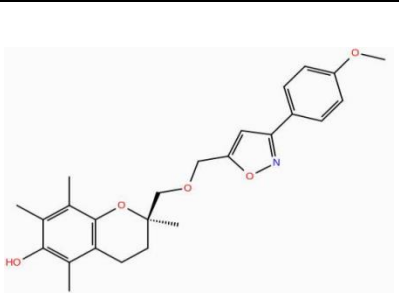
MK 84		MK 85	
MK 86		MK87	
MK 88		MK89	

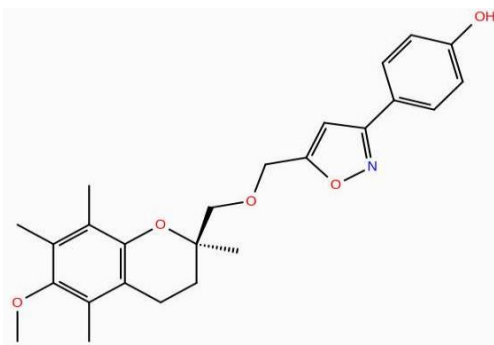
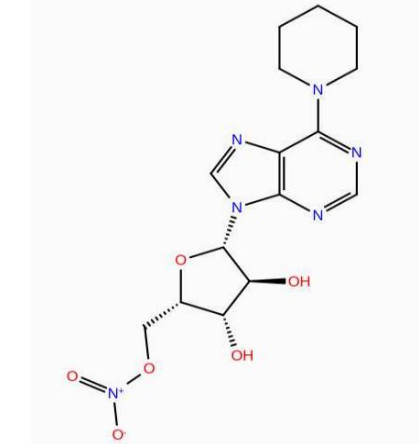
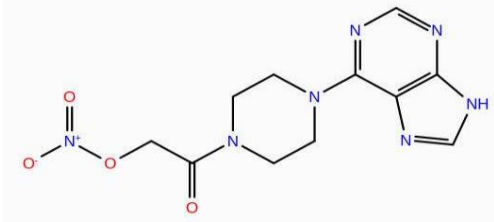
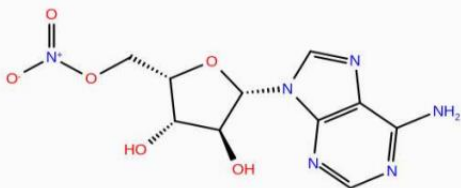
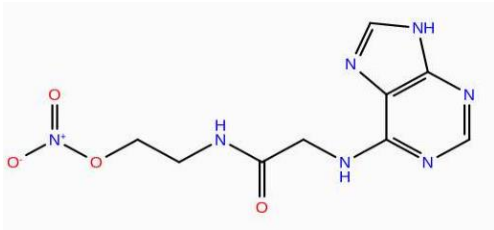
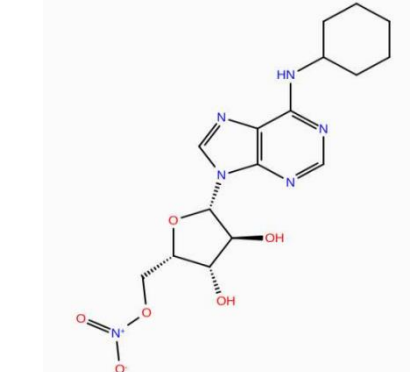
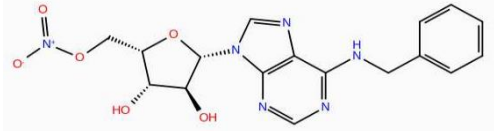
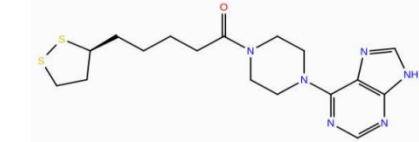
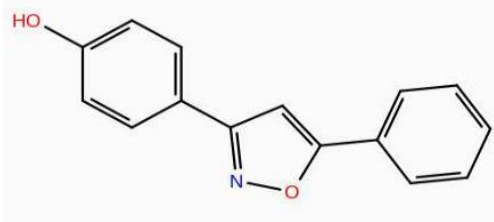
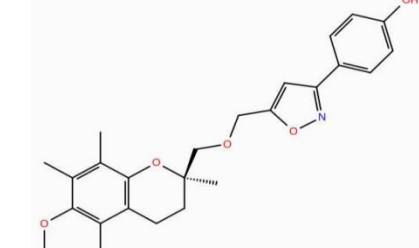
<p>MK 90</p>		<p>MK91</p>	
<p>MK 92</p>		<p>MK 93</p>	
<p>MK 94</p>		<p>MK 95</p>	

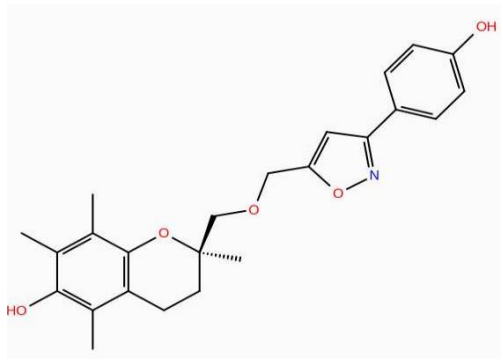
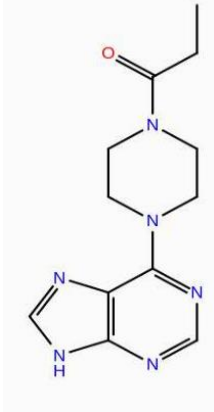
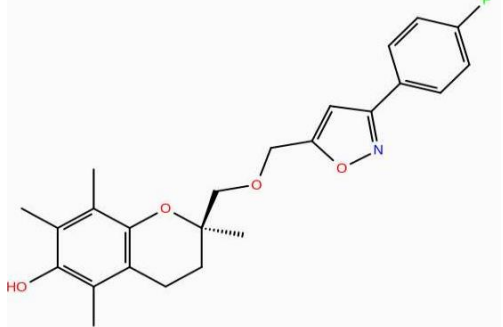
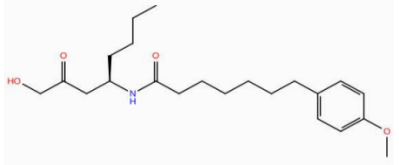
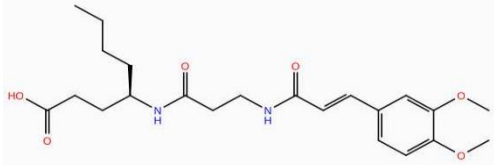
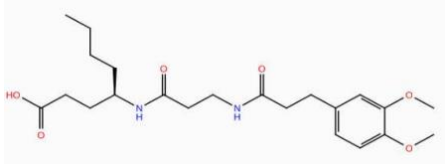
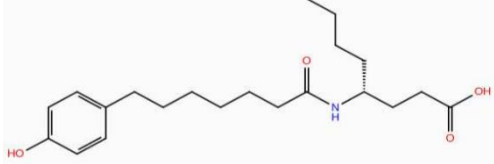
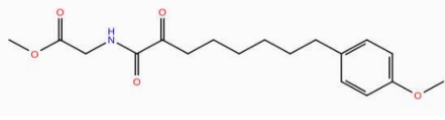

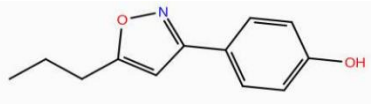
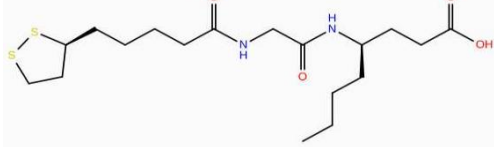
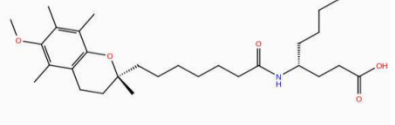
MK 96		MK 97	
MK 98		MK 99	
MK 100		MK 101	
MK 102		MK 103	

MK 104		MK 105	
MK 106		MK 107	
MK 108		MK 109	

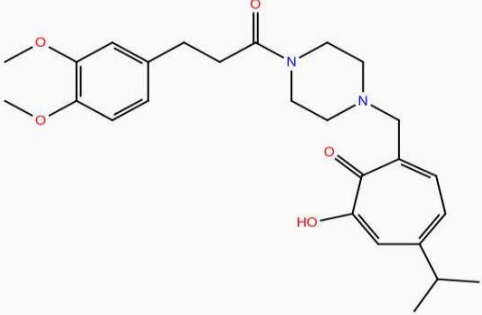
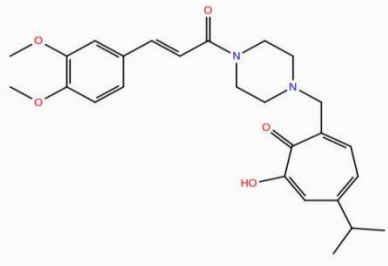
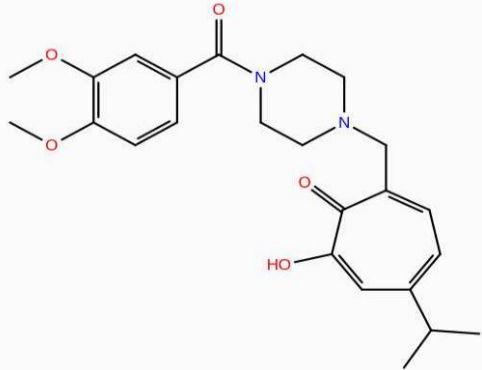
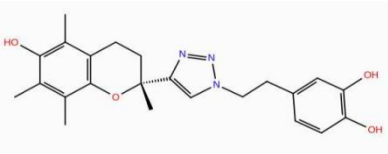
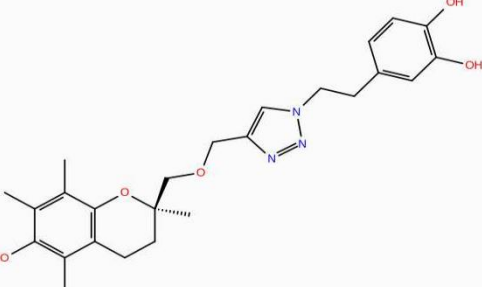
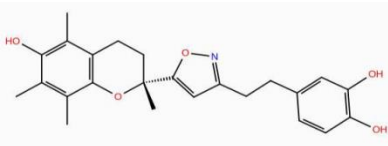
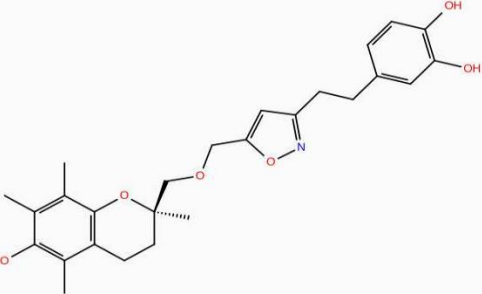
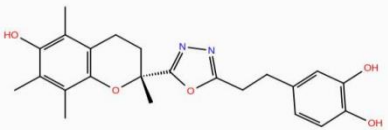
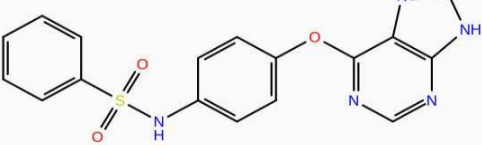
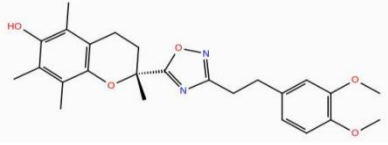
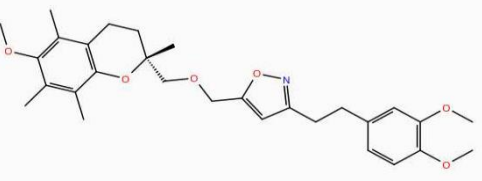
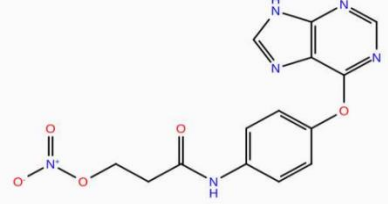
MK 110		MK 111	
MK 112		MK 113	
MK 114		MK 115	

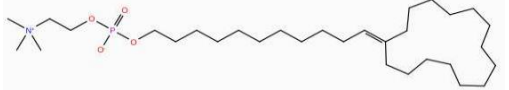
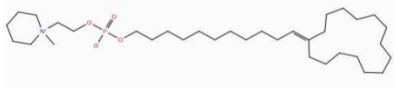
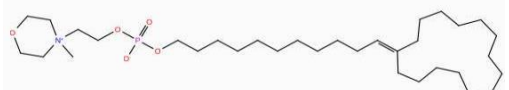
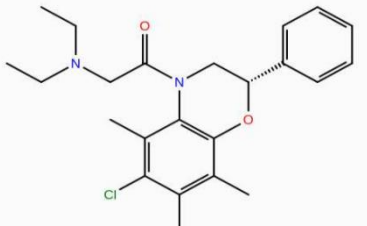
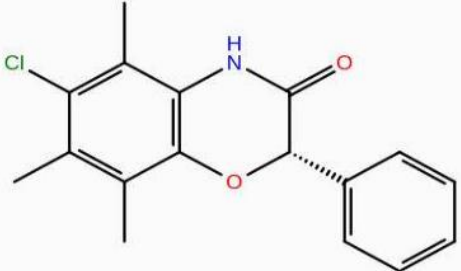


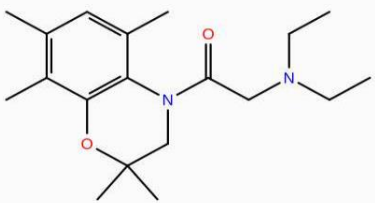
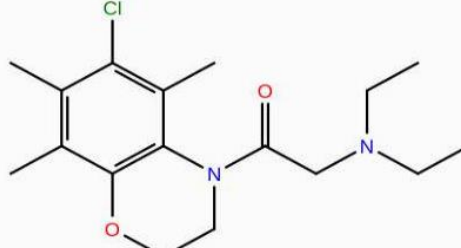
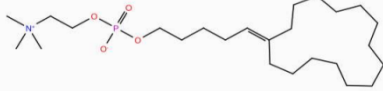
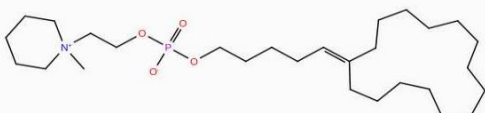
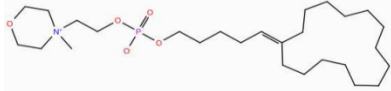
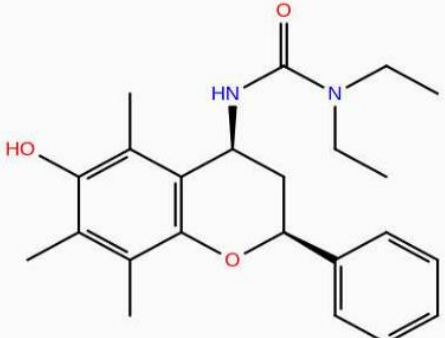
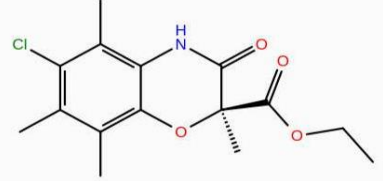
MK 116		MK 117	
MK 118		MK119	
MK 120		MK 121	
MK 122		MK 123	
MK 124		MK 125	

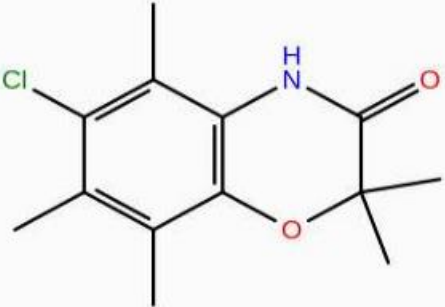
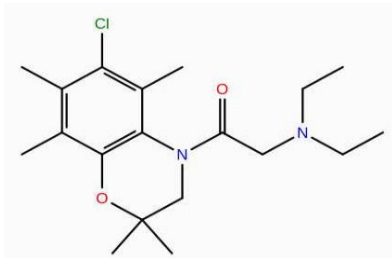
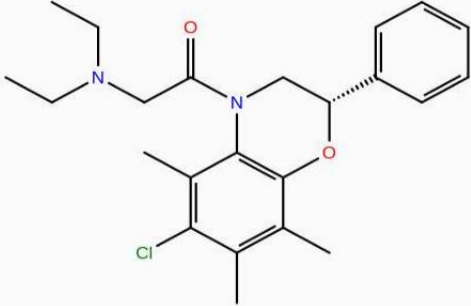
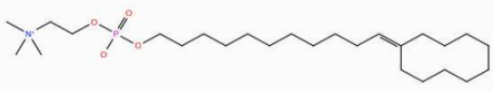
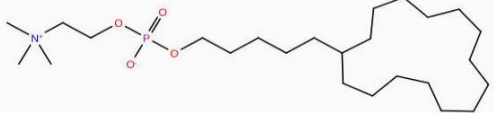
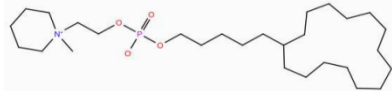
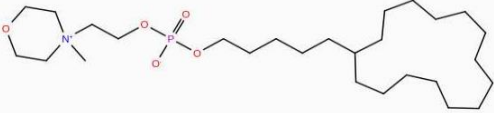
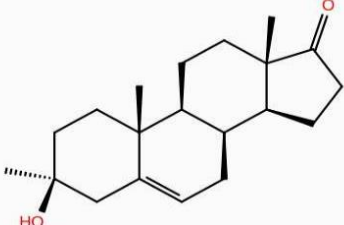
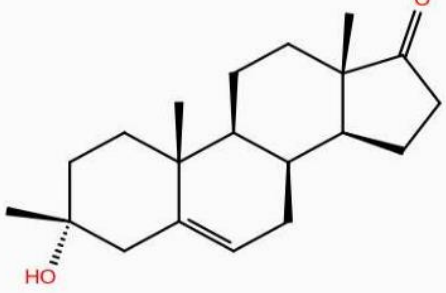
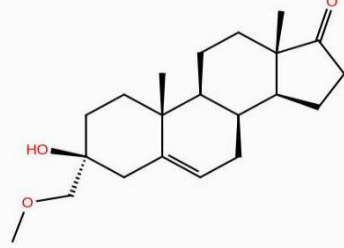
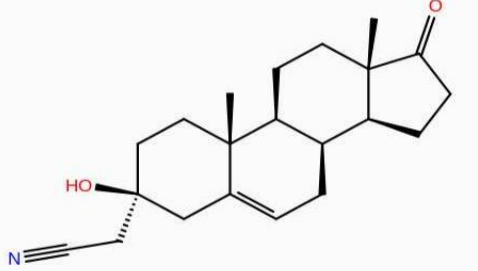
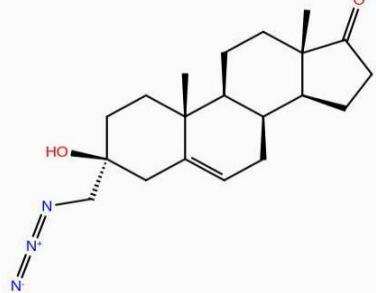
MK 126		MK 127	
MK 128		MK 129	
MK 130		MK 131	
MK 132		MK 133	
MK 134		MK 135	

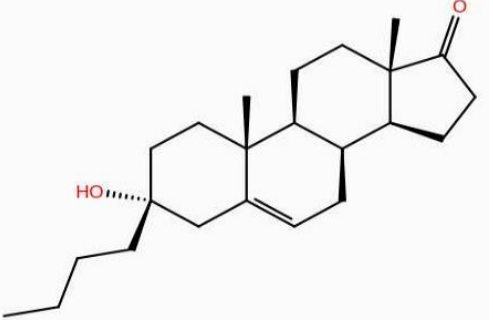
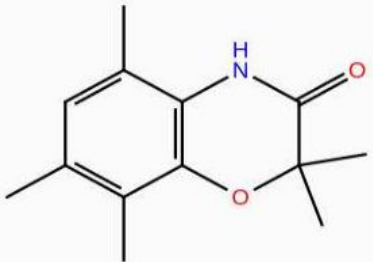
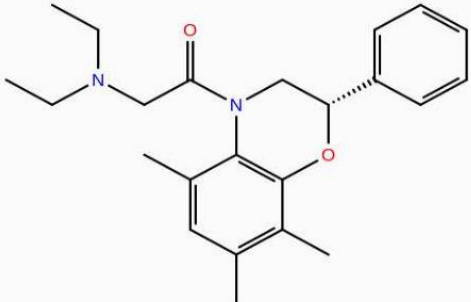
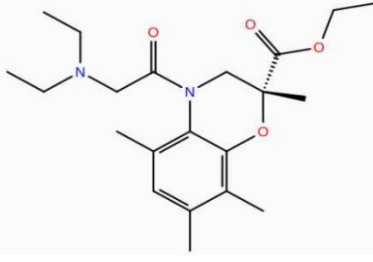
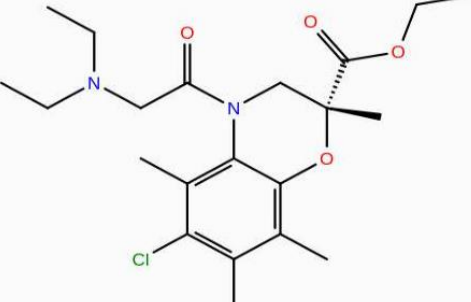
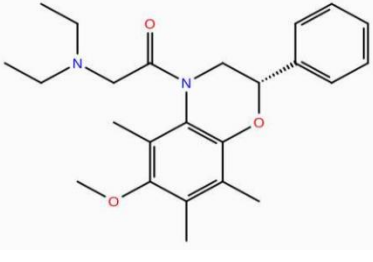
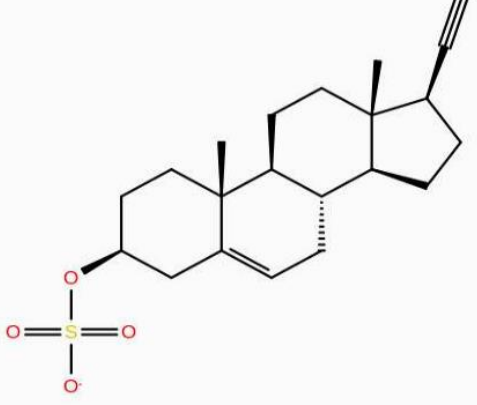
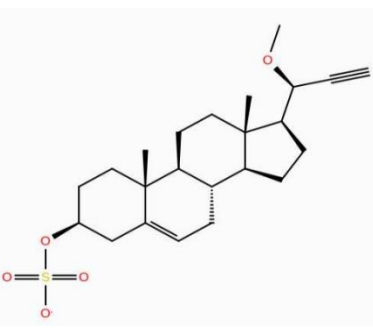
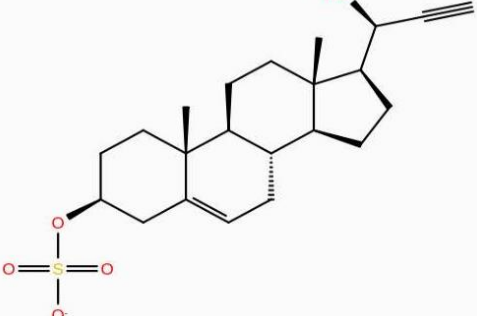
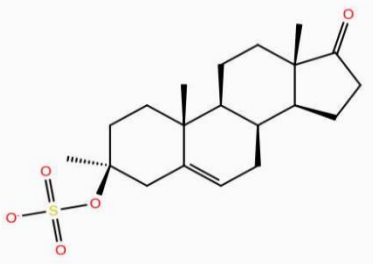
MK 136		MK 137	
MK 138		MK 139	
MK 140		MK 141	
MK 142		MK 143	
MK 144		MK 145	
MK 146		MK 147	

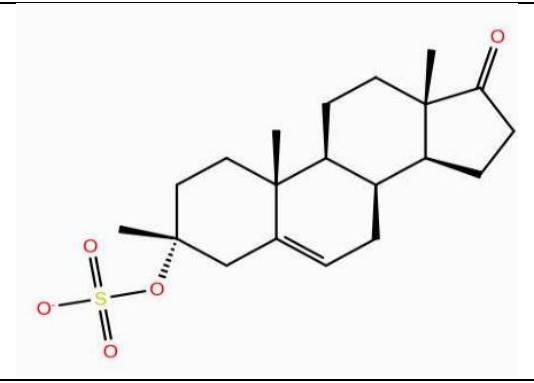
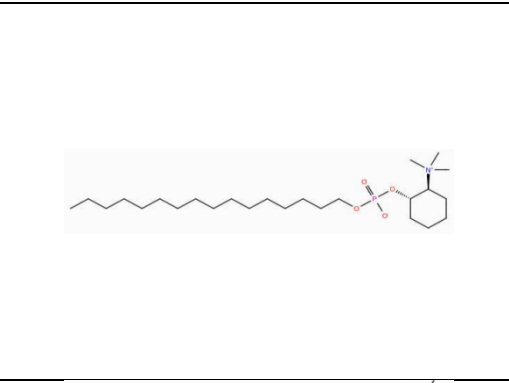
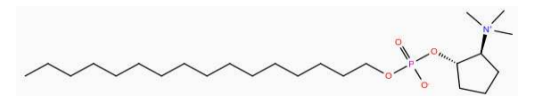
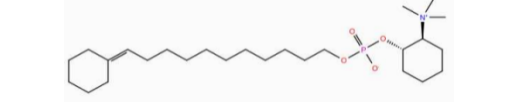
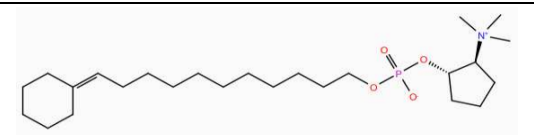
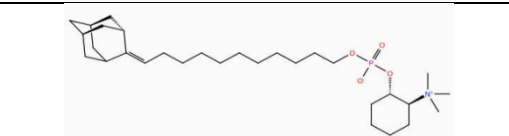
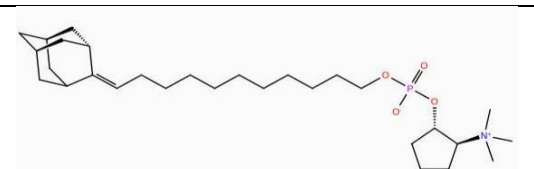
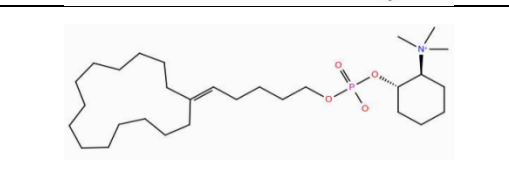
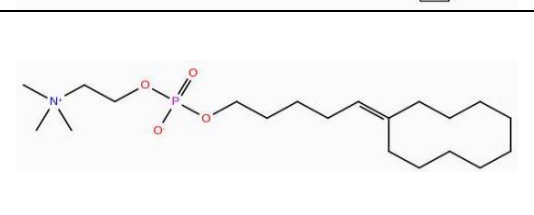
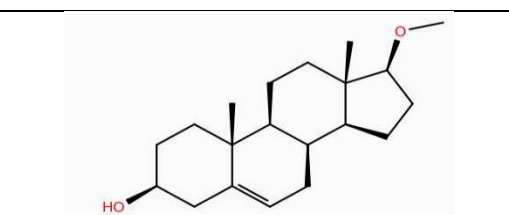
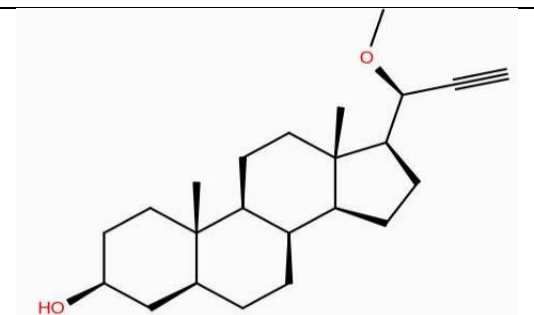
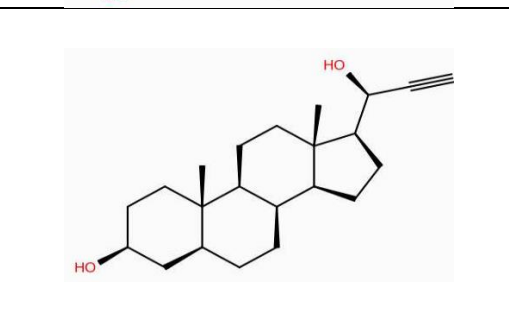
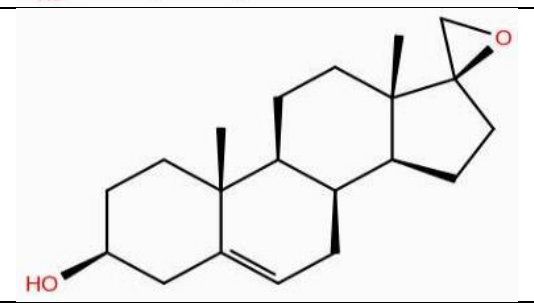
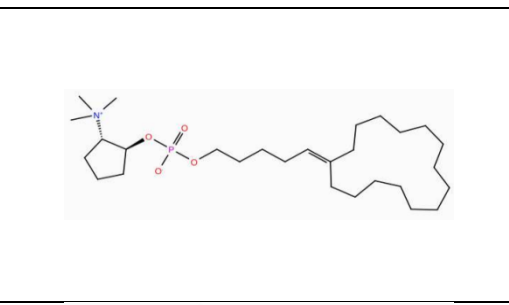
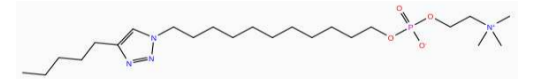
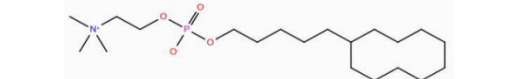


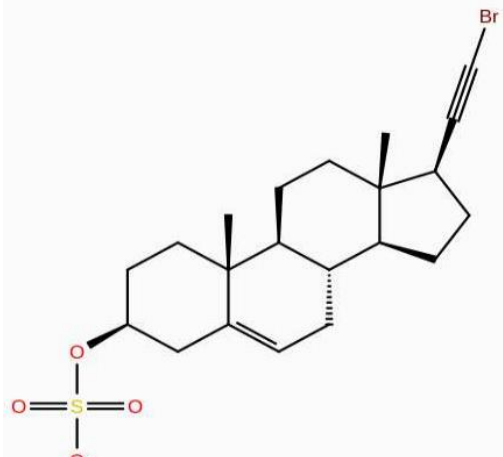
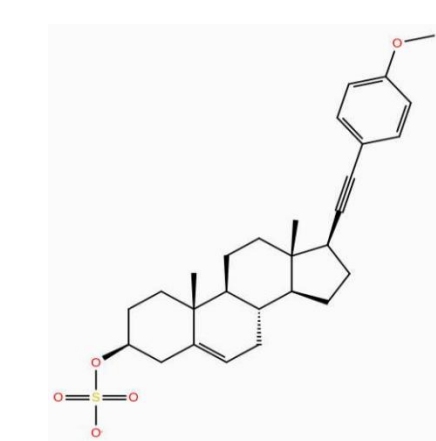
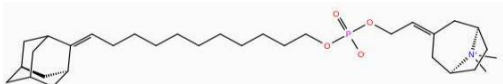
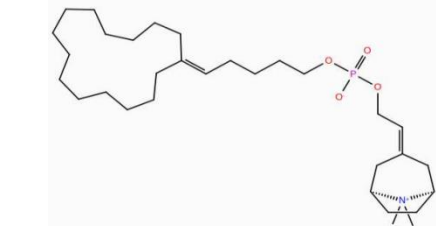
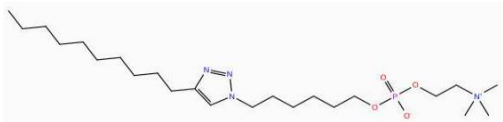
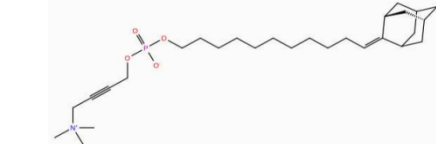
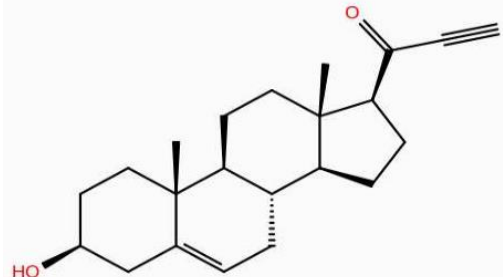
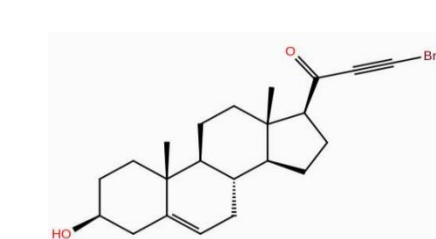
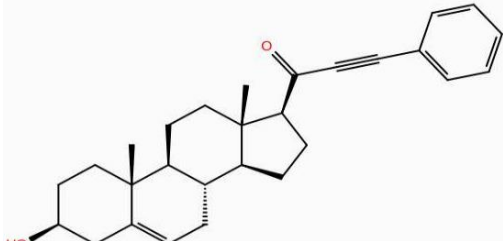
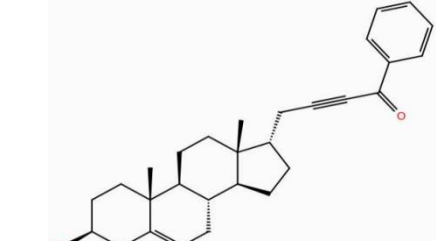
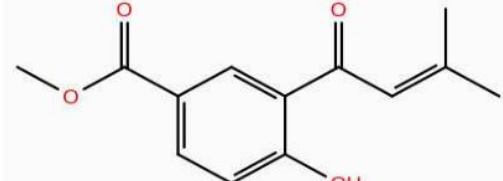
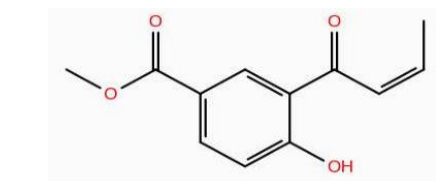
MK 148		MK 149	
MK 150		MK 151	
MK 152		MK 153	
MK 154		MK 155	
MK 156		MK 157	
MK 158		MK 159	

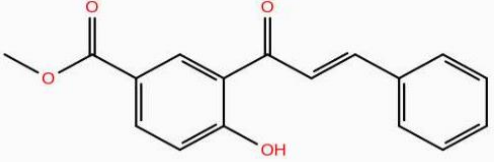
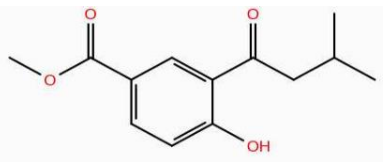
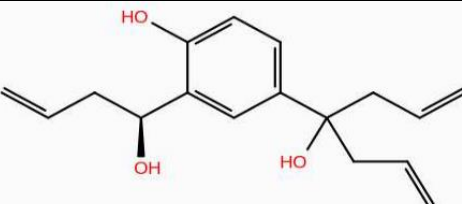
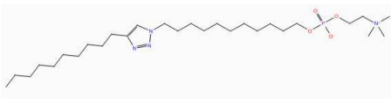
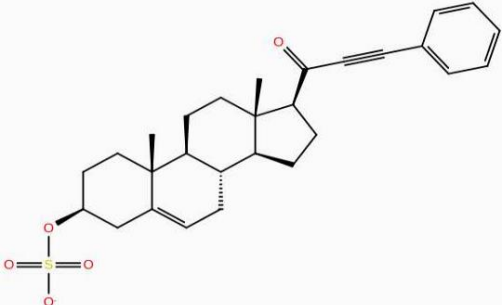
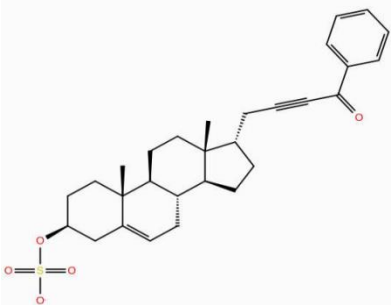
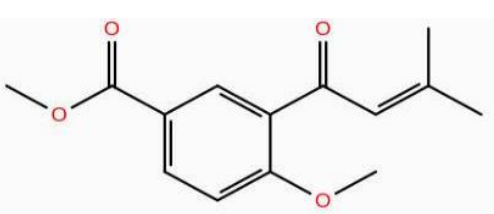

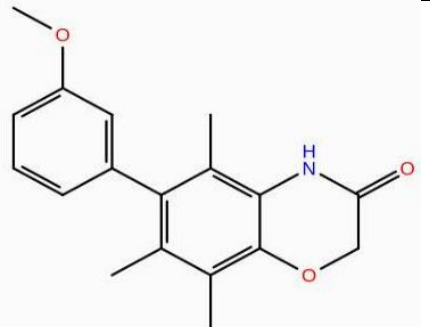
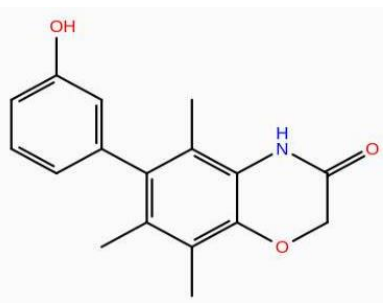
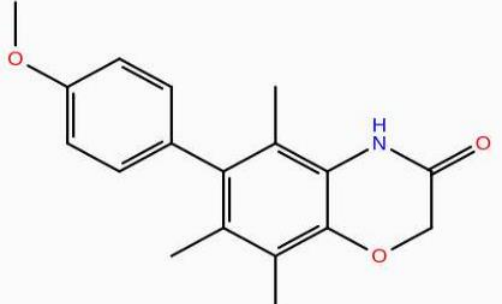
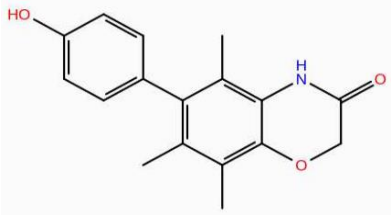
TC 1		TC 2	
TC 3		TC 4	
TC 5		TC 6	
TC 7		TC 8	
TC 9		TC 10	
TC 11		TC 12	
TC 13		TC 14	

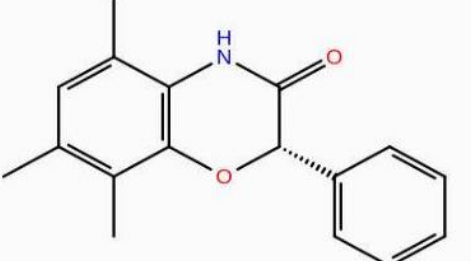

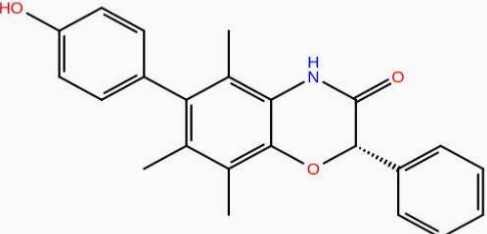
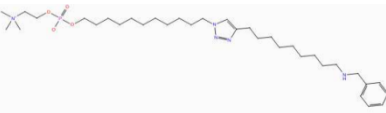
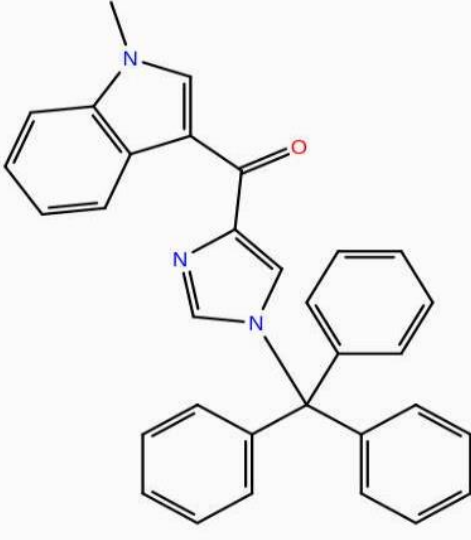
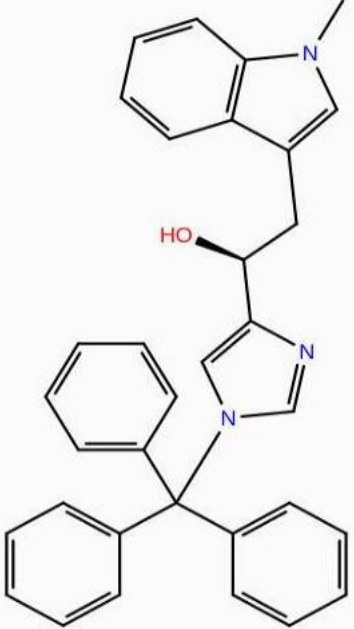
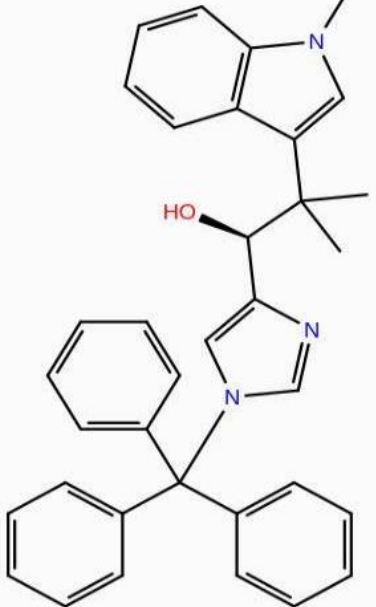
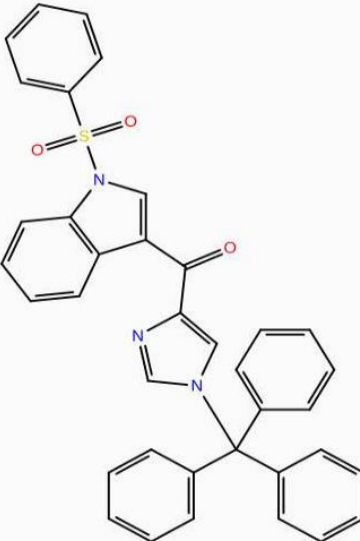
TC 15		TC 16	
TC 17		TC 18	
TC 19		TC 20	
TC 21		TC 22	
TC 23		TC 24	
TC 25		TC 26	

TC 27		TC 28	
TC 29		TC 30	
TC 31		TC 32	
TC 33		TC 34	
TC 35		TC 37	

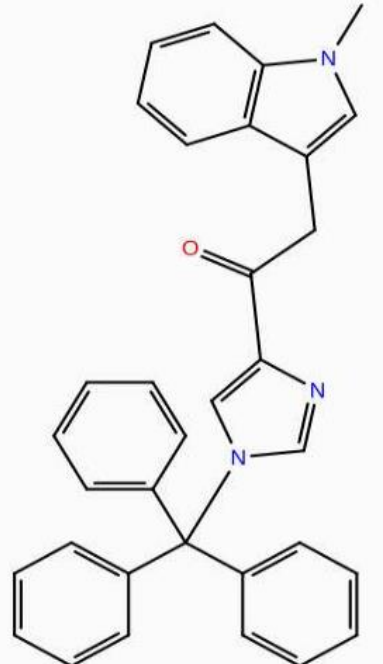
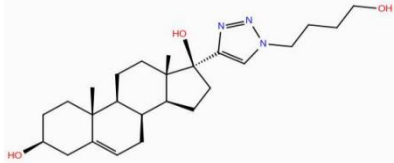
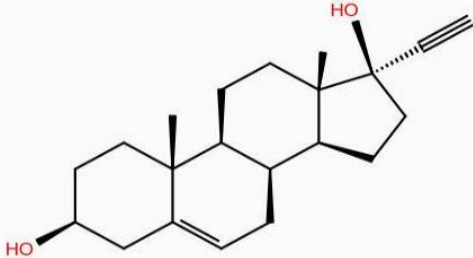
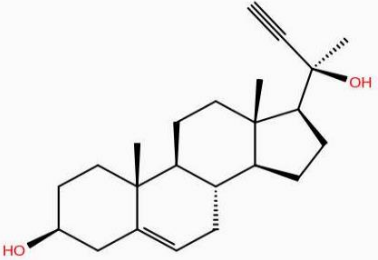
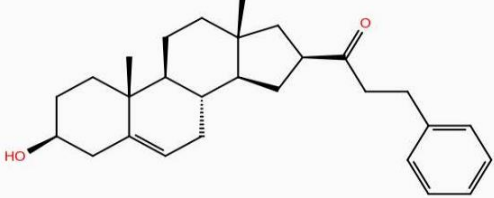
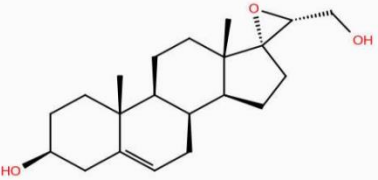
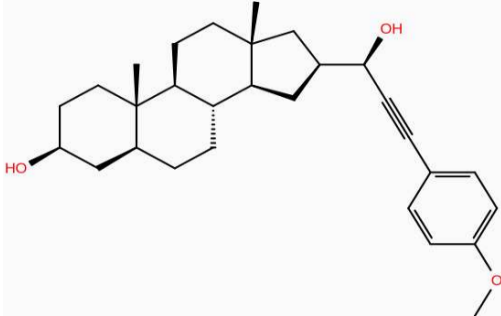
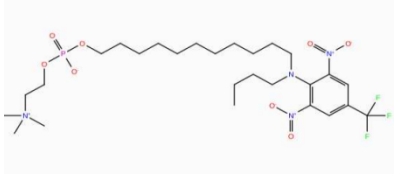
TC 38		TC 39	
TC 40		TC 41	
TC 42		TC 43	
TC 44		TC 45	
TC 46		TC 47	
TC 48		TC 49	
TC 50		TC 51	
TC 52		TC 53	

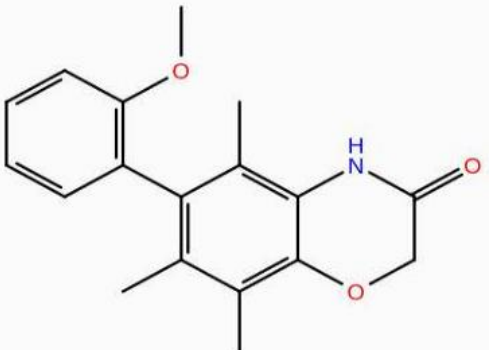
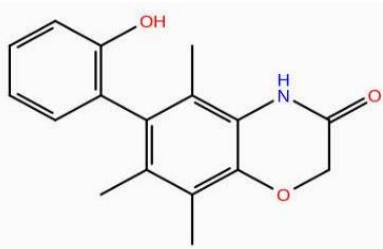
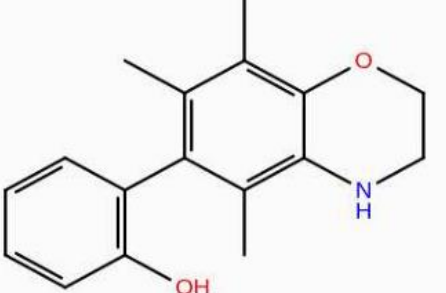
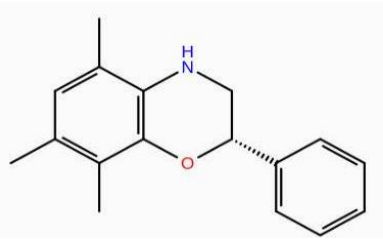

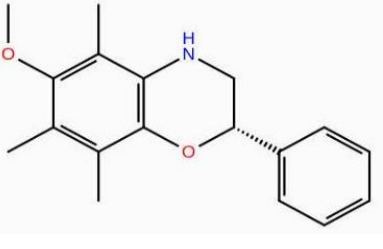
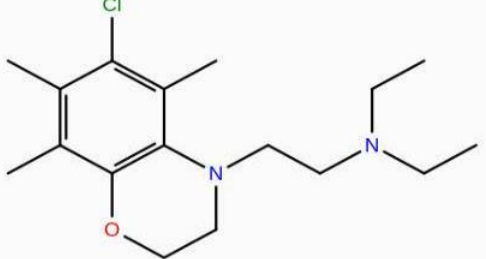
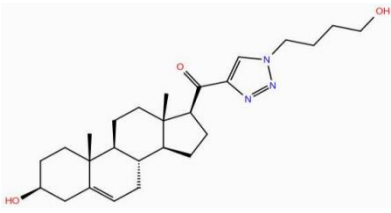
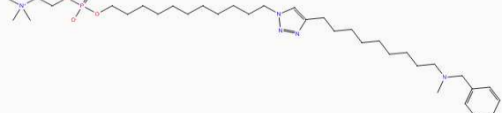
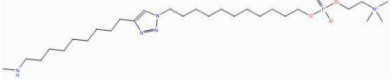
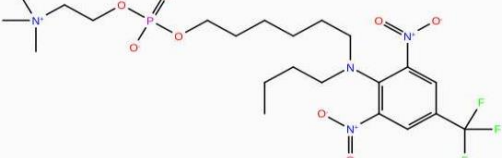
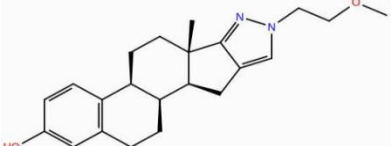
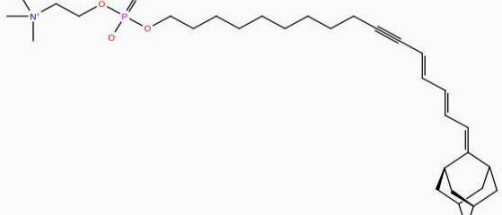
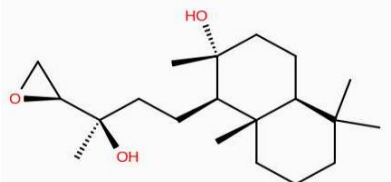
TC 54		TC 55	
TC 56		TC 57	
TC 58		TC 59	
TC 60		TC 61	
TC 63		TC 64	
TC 65		TC 66	

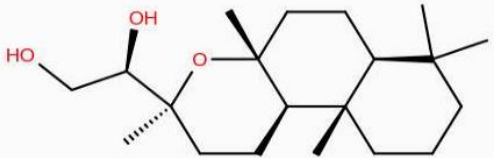
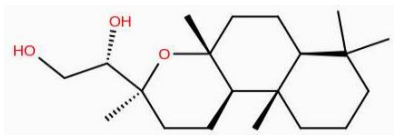
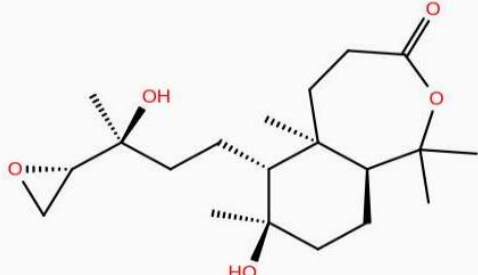
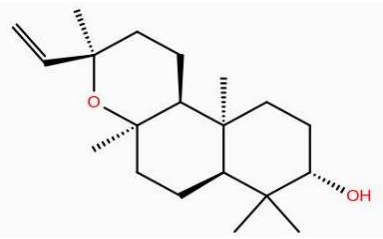
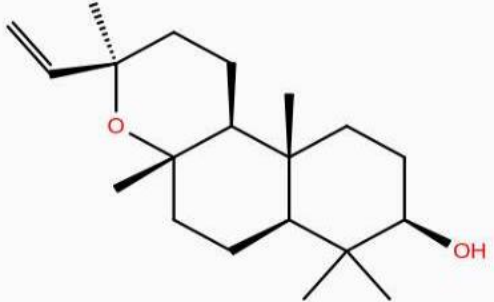
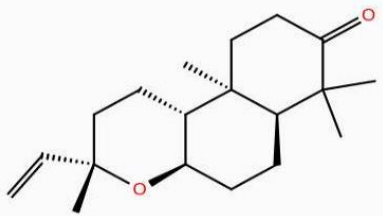
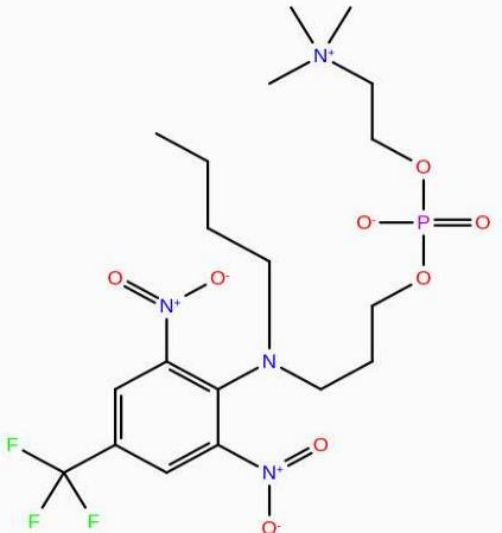
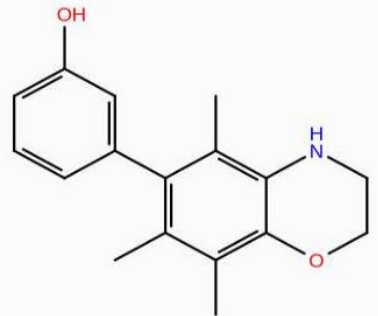
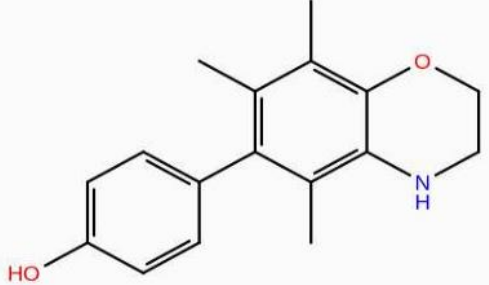
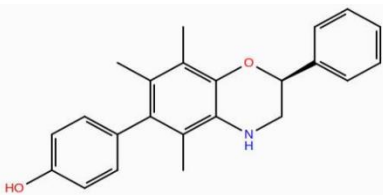
TC 67		TC 68	
TC 69		TC 70	
TC 71		TC 72	
TC 74		TC 75	
TC 76		TC 77	
TC 78		TC 79	

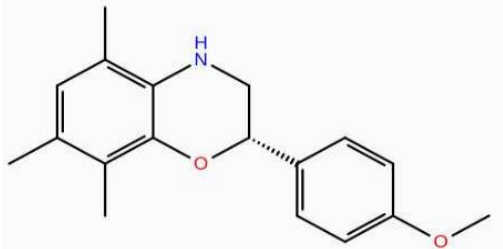
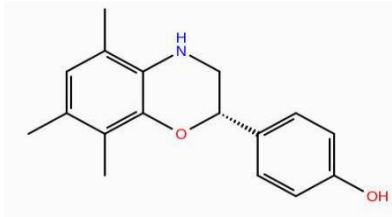
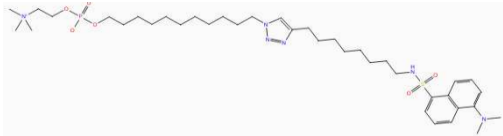
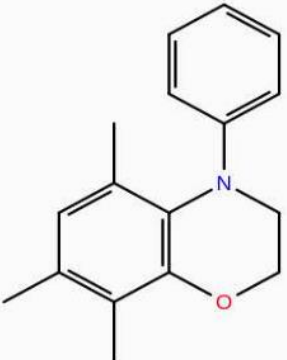
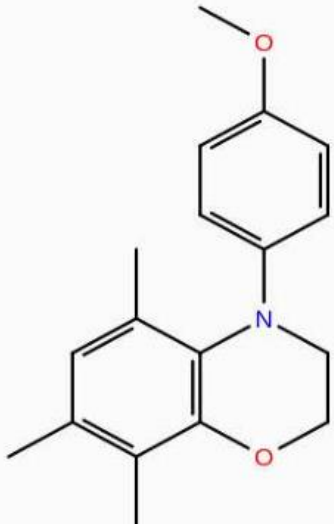
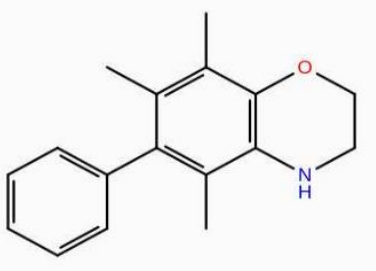
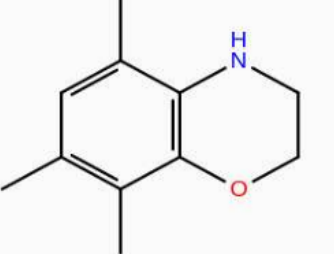
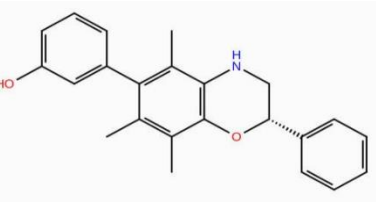
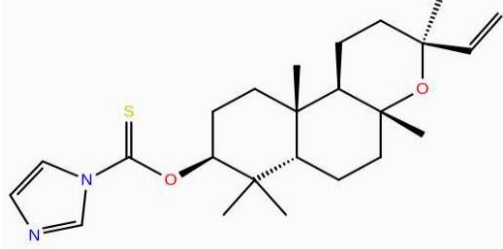
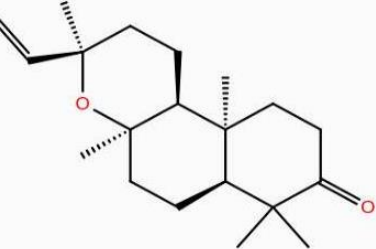
TC 80		TC 81	
TC 82		TC 83	
TC 84		TC 85	
TC 86		TC 87	

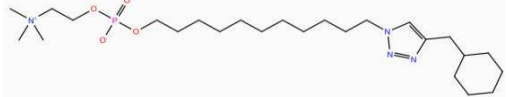
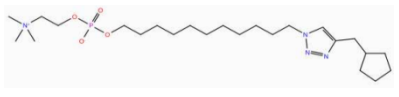
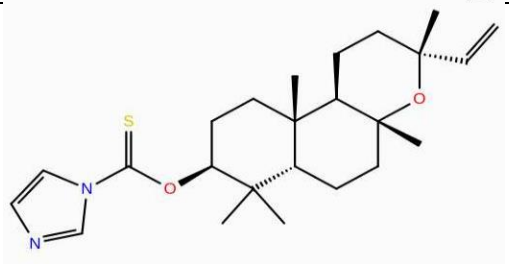
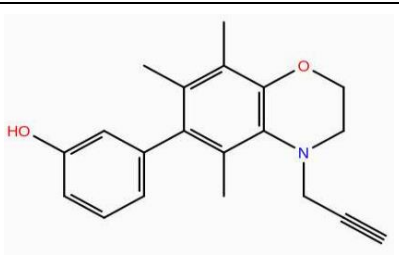
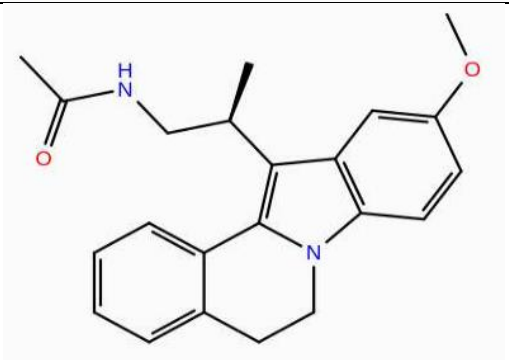
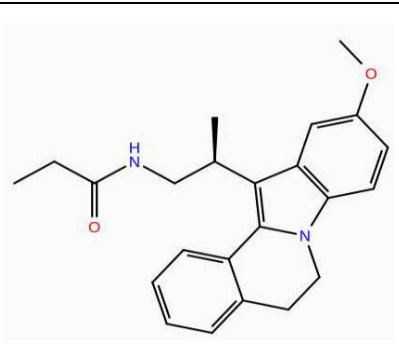
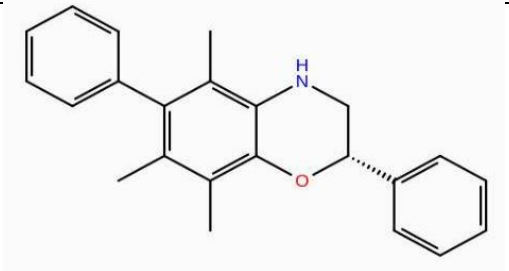
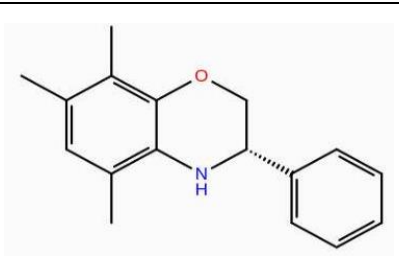
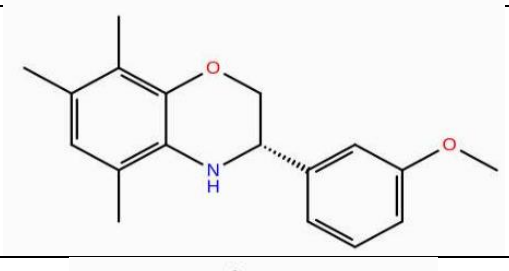
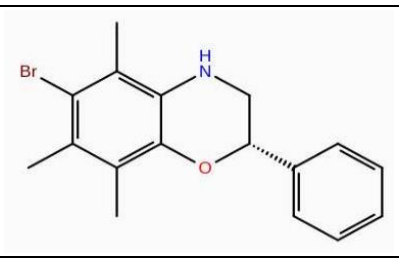
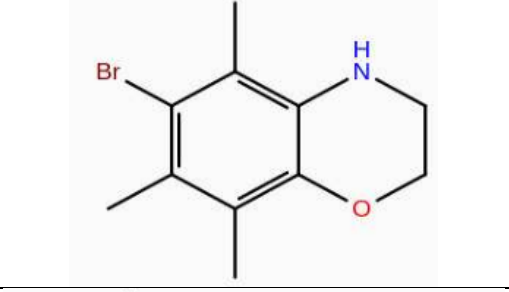
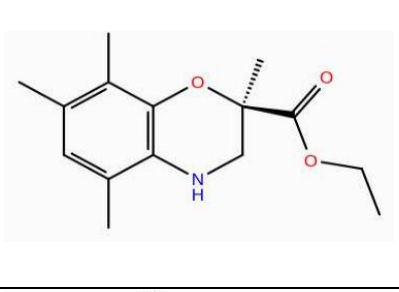
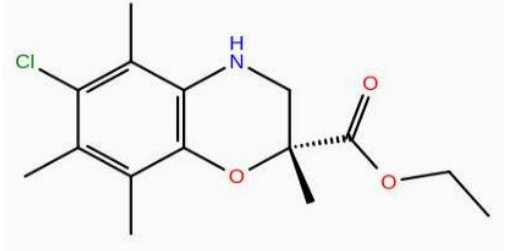
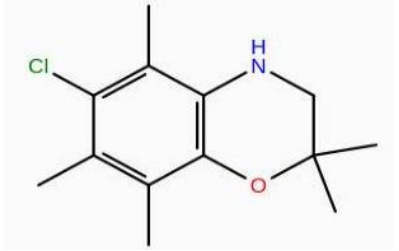


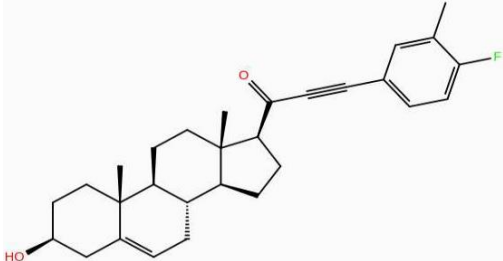
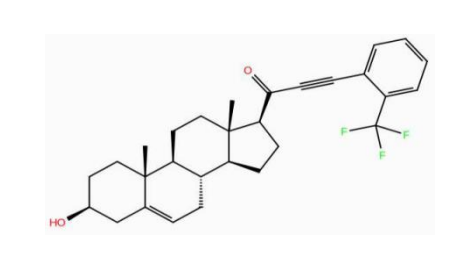
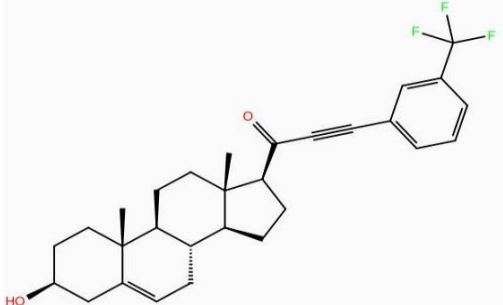
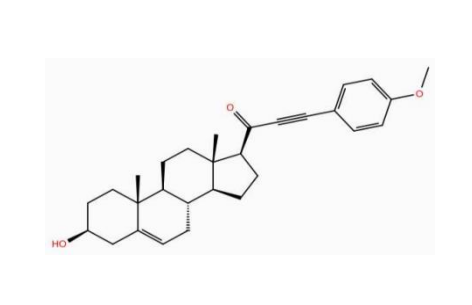
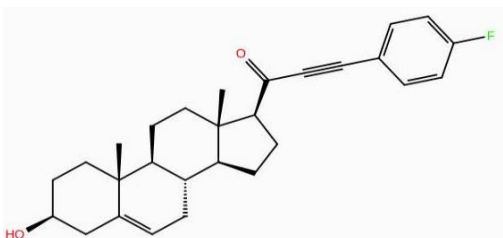
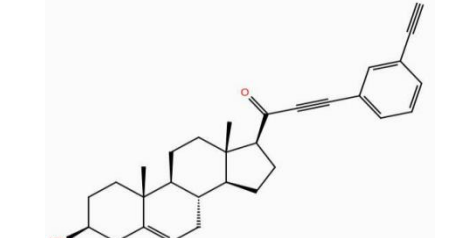
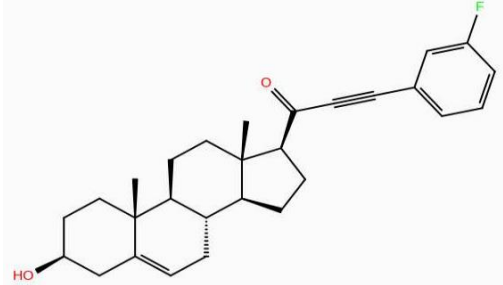
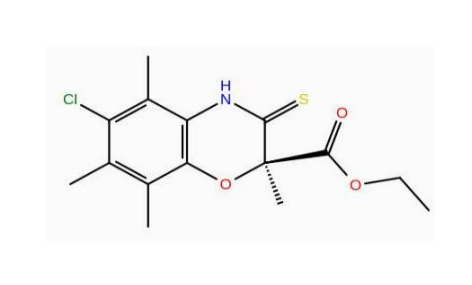
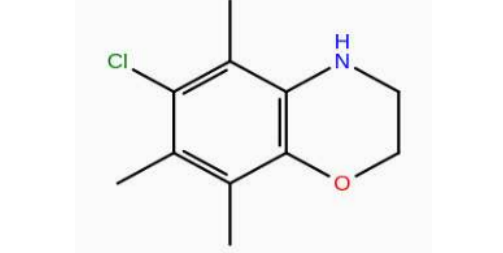
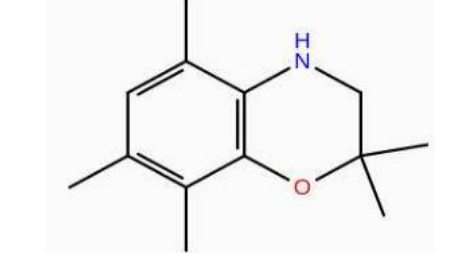
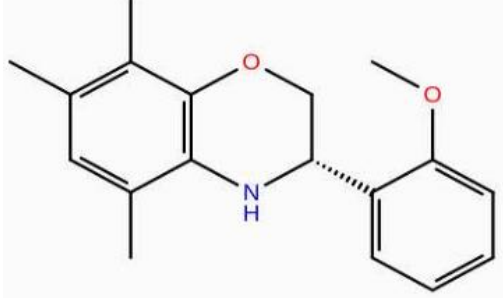
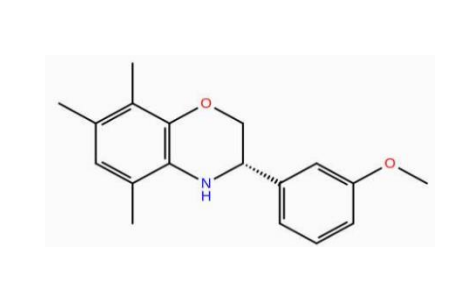
TC 88		TC 89	
TC 90		TC 91	
TC 92		TC 93	
TC 94		TC 95	

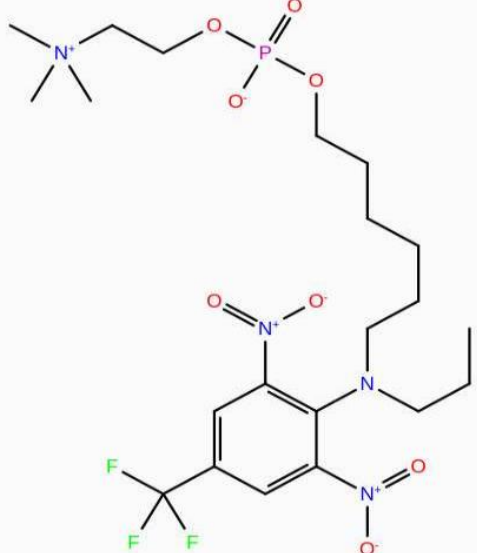
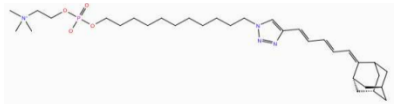
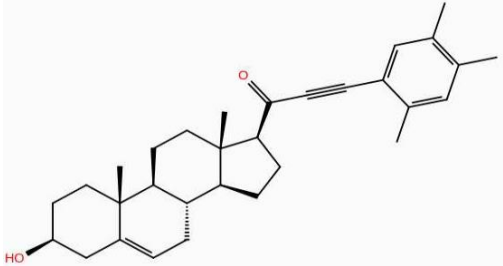
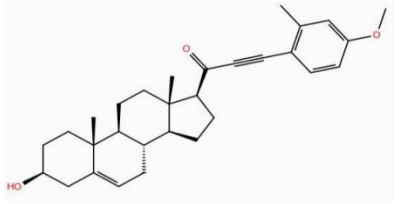
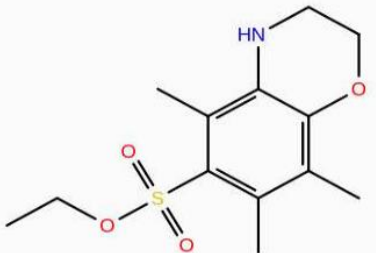
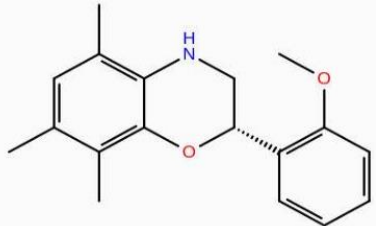
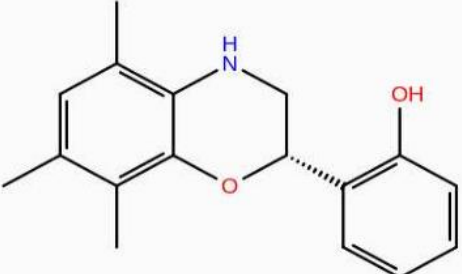
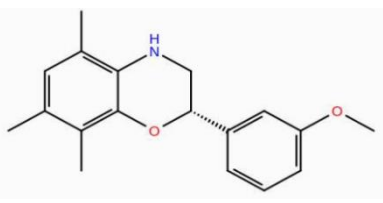

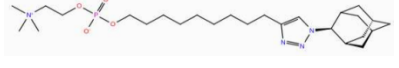
TC 96		TC 97	
TC 98		TC 99	
TC 100		TC 101	
TC 102		TC 103	
TC 104		TC 105	
TC 106		TC 107	
TC 108		TC 109	

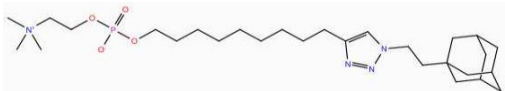
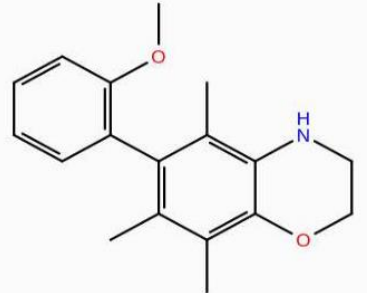
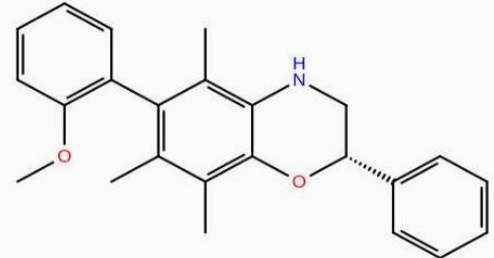
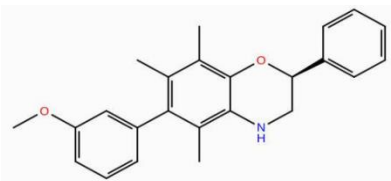
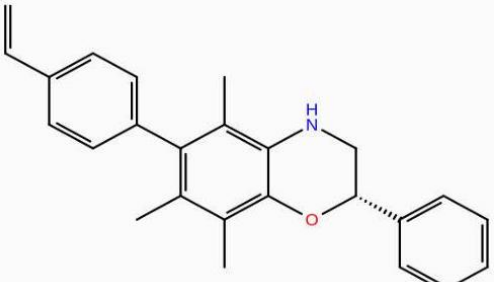
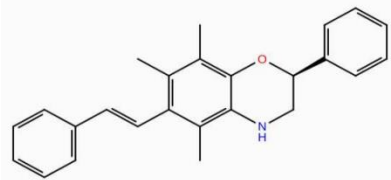
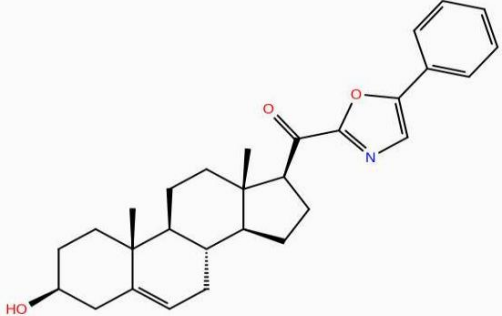
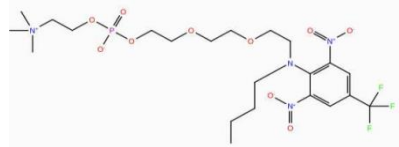
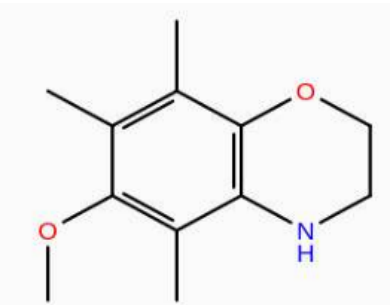
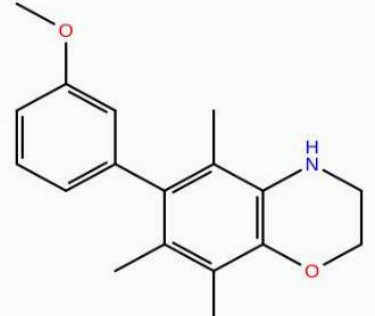
TC 110		TC 111	
TC 113		TC 114	
TC 115		TC 116	
TC 117		TC 118	
TC 119		TC 120	

TC 121		TC 122	
TC 126		TC 127	
TC 128		TC 129	
TC 130		TC 131	
TC 132		TC 133	

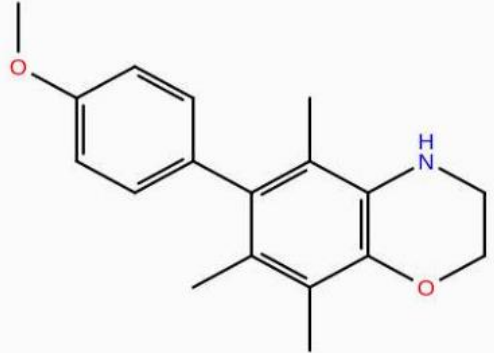
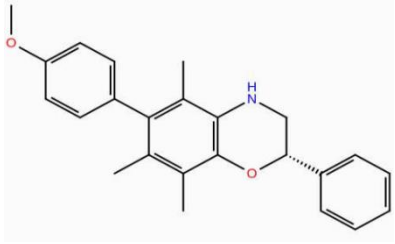
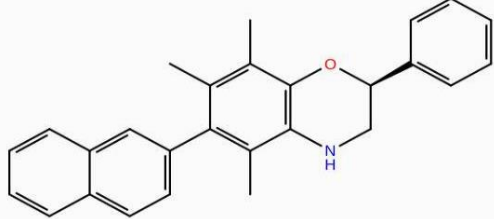
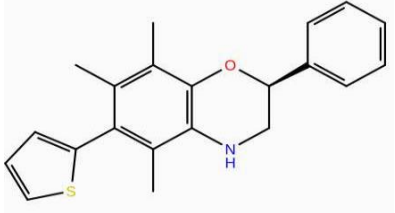
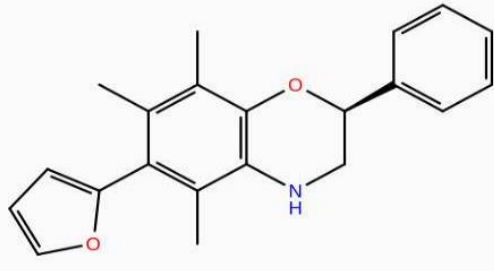
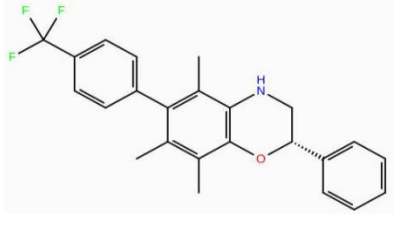
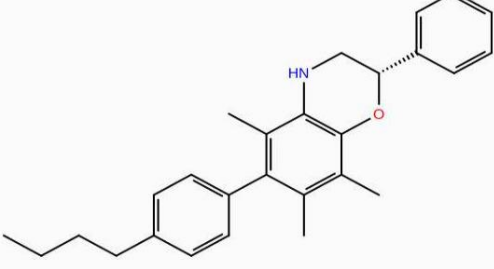
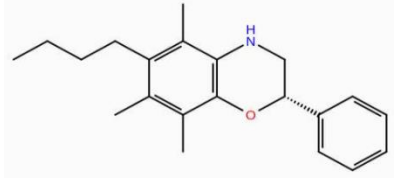
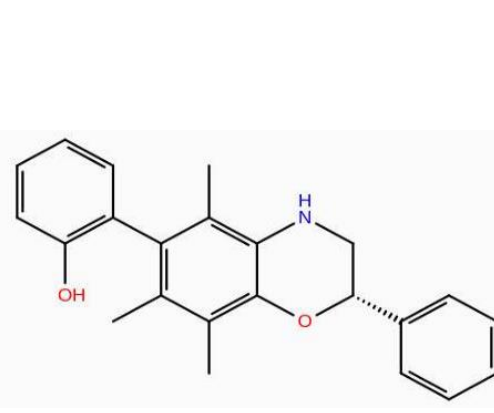
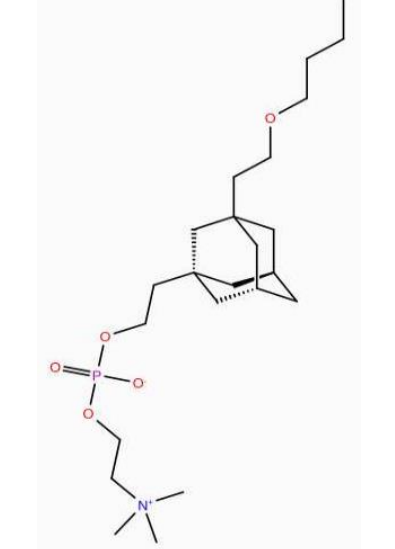
TC 135		TC 136	
TC 137		TC 138	
TC 139		TC 140	
TC 141		TC 142	
TC 143		TC 144	
TC 145		TC 146	
TC 147		TC 148	

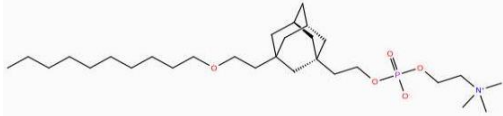
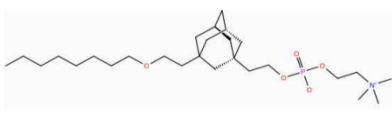
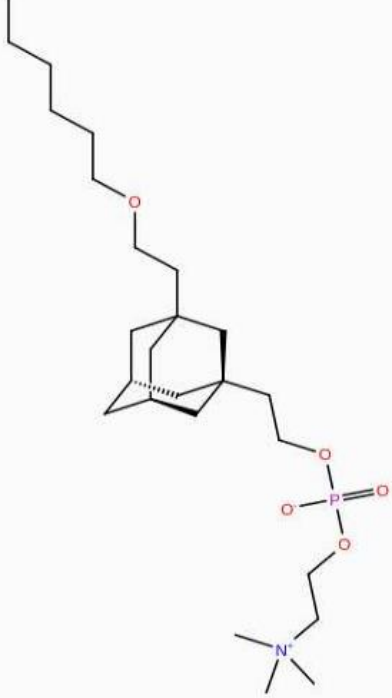
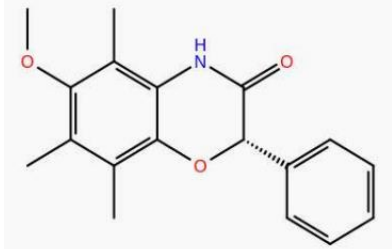
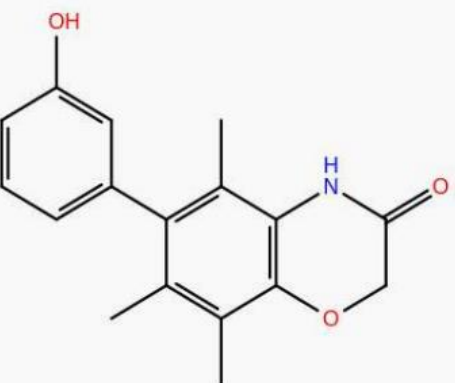
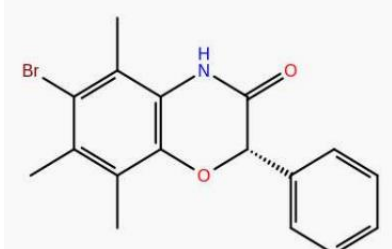
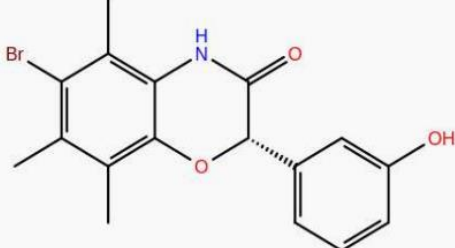
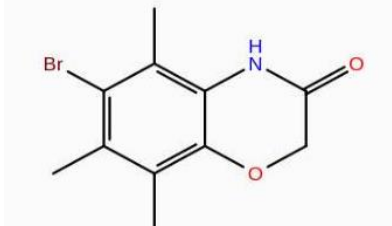
TC 149		TC 150	
TC 151		TC 152	
TC 153		TC 154	
TC 155		TC 157	
TC 158		TC 159	
TC 160		TC 161	

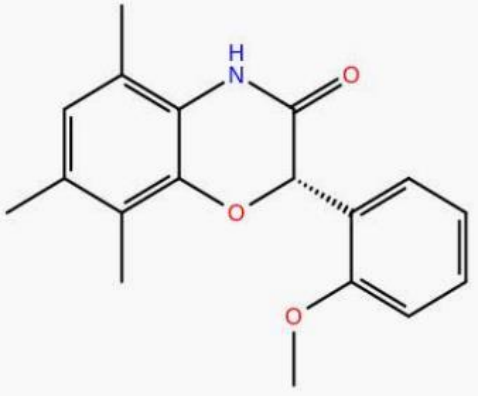
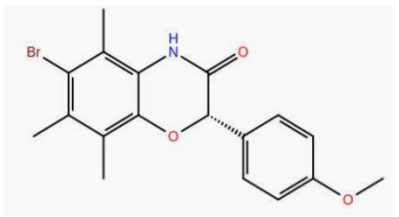
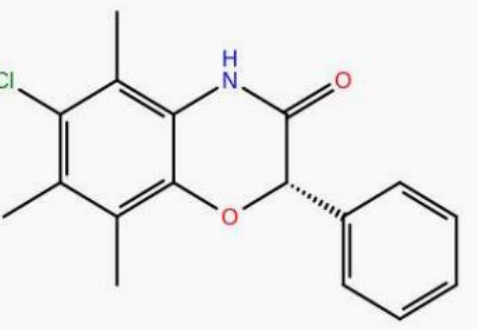
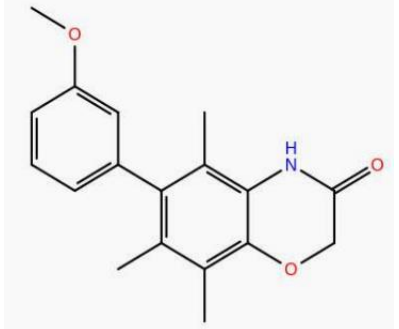
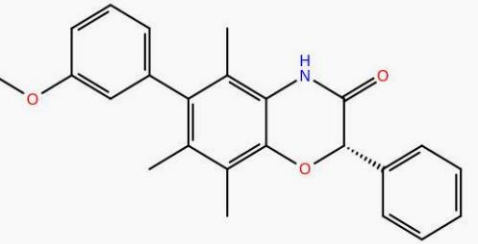
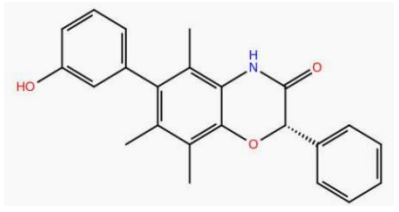

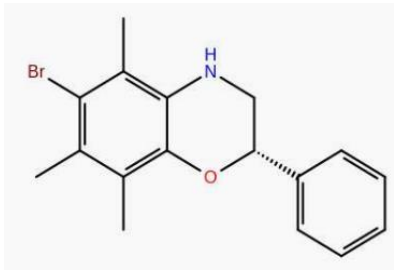
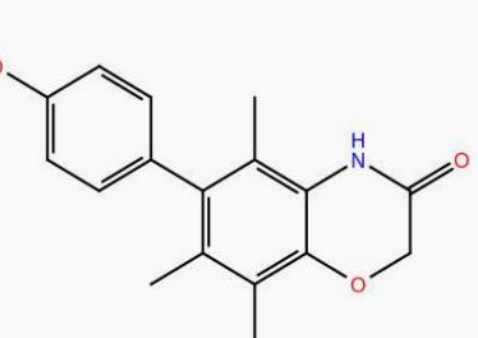
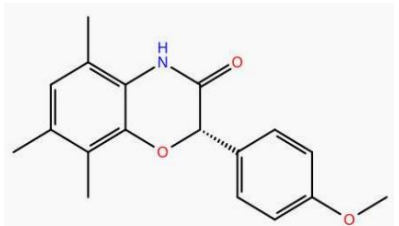
TC 162		TC 163	
TC 164		TC 165	
TC 166		TC 167	
TC 168		TC 169	
TC 170		TC 171	

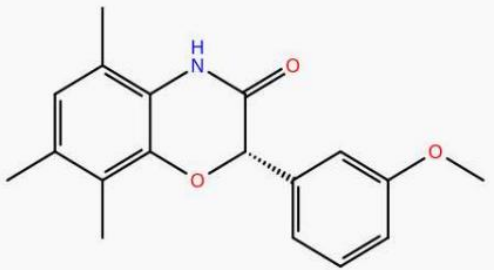
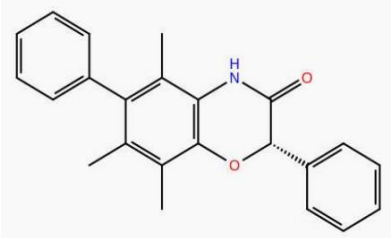
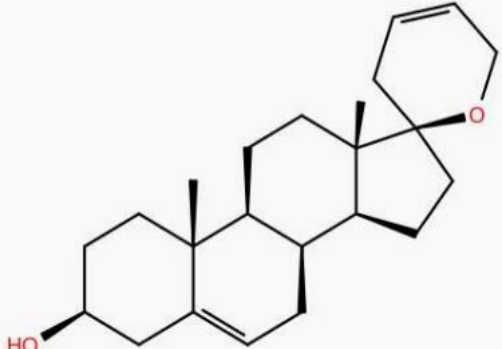
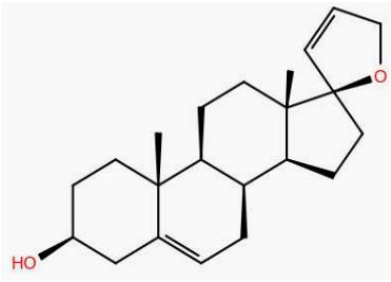
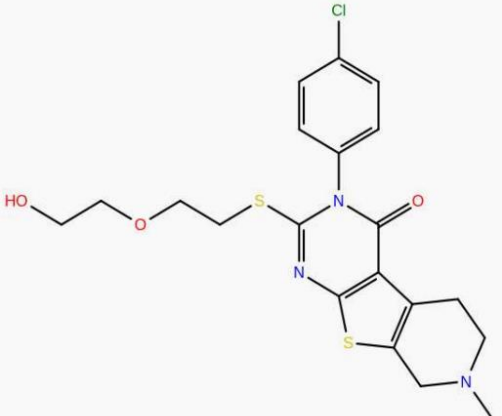
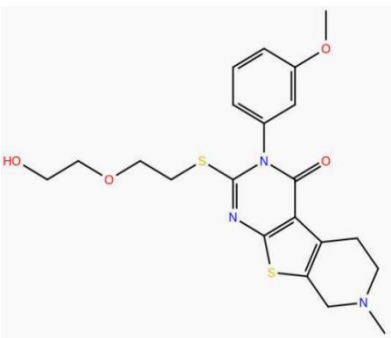
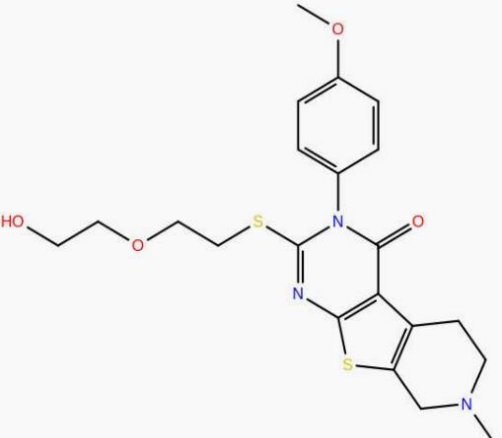
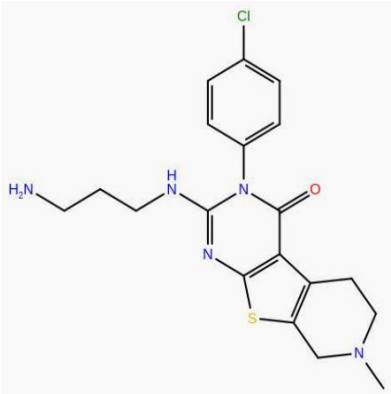
TC 172		TC 173	
TC 174		TC 176	
TC 177		TC 178	
TC 179		TC 182	
TC 183		TC 184	

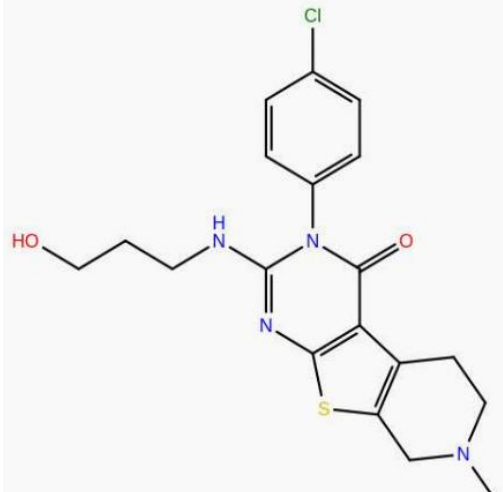
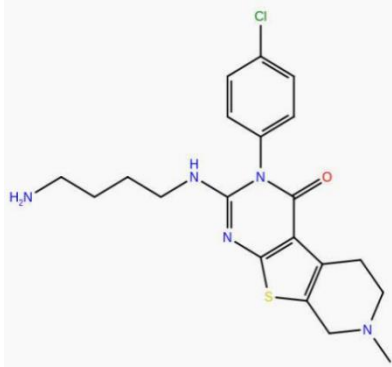
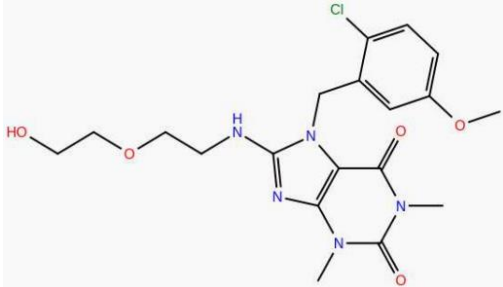
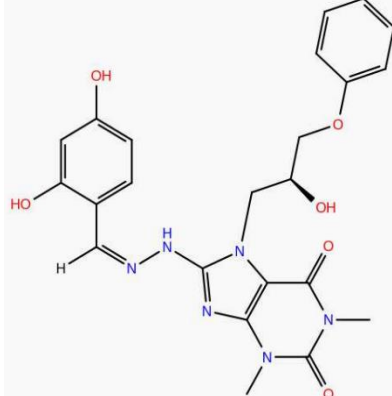
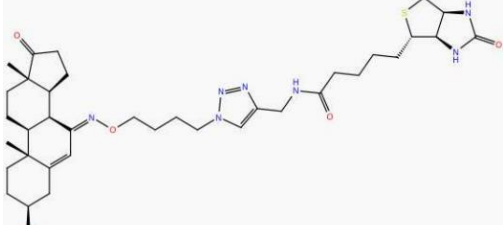
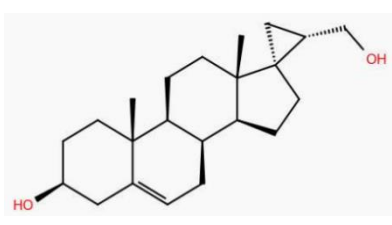
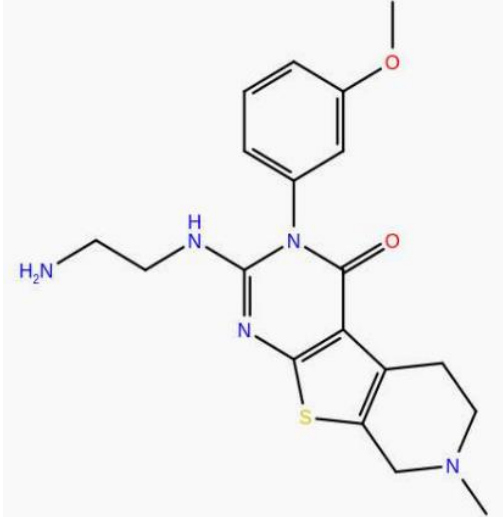



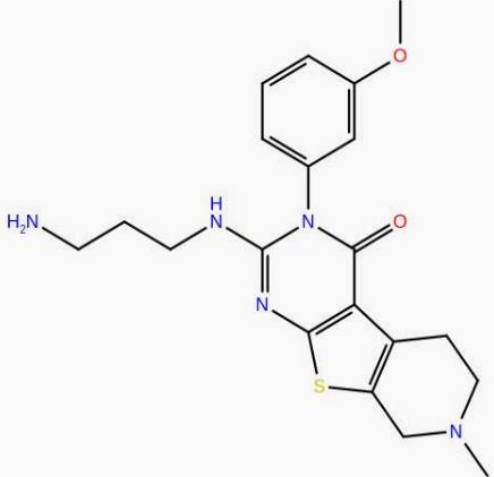
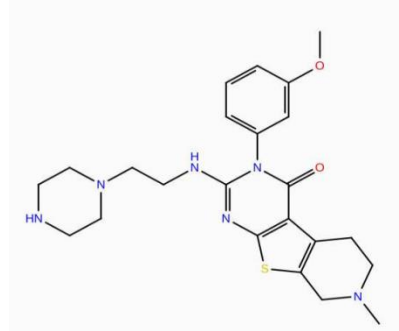
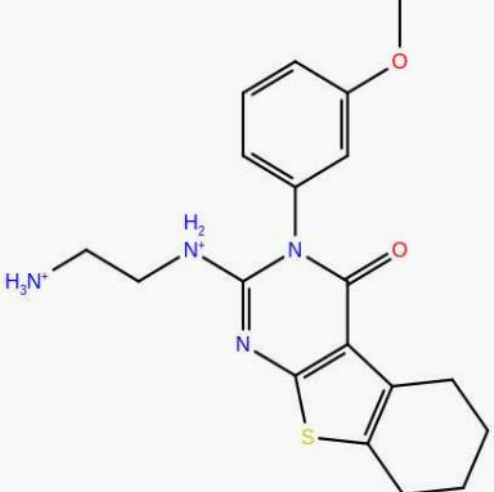
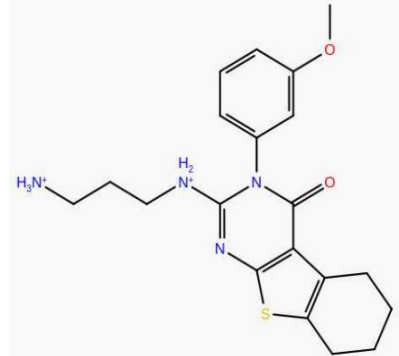
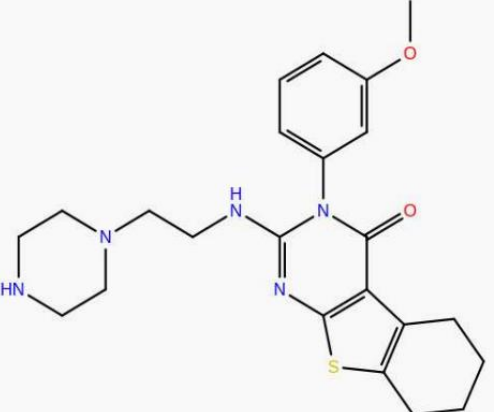
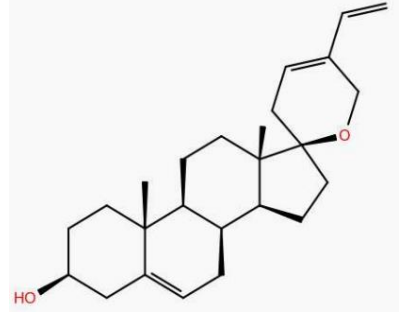
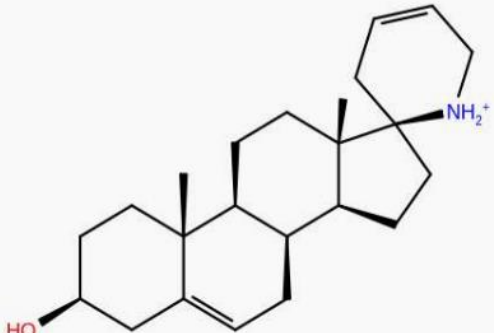
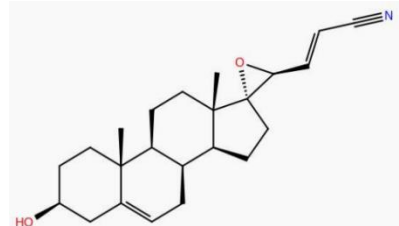
TC 185		TC 186	
TC 187		TC 188	
TC 189		TC 190	
TC 191		TC 192	
TC 193		TC 195	

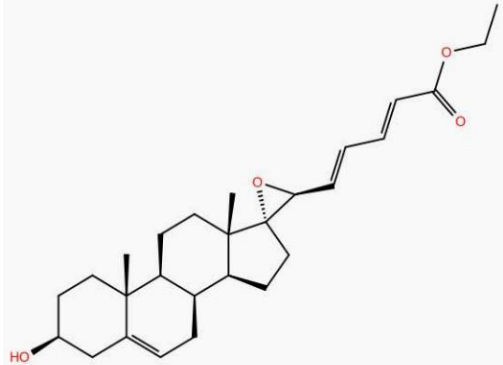
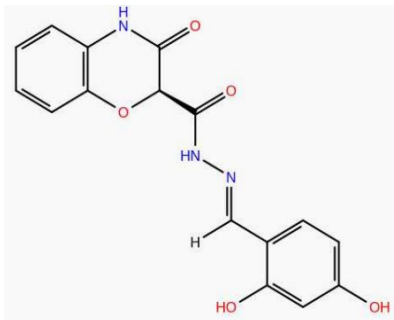
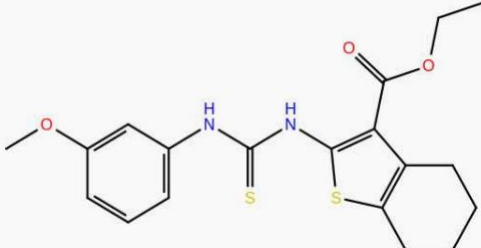
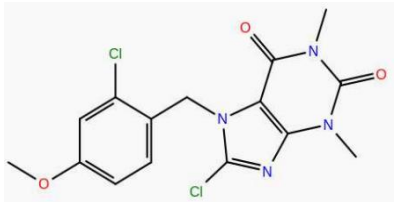

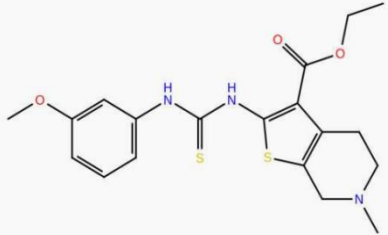
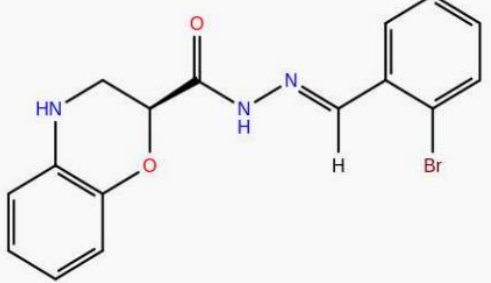
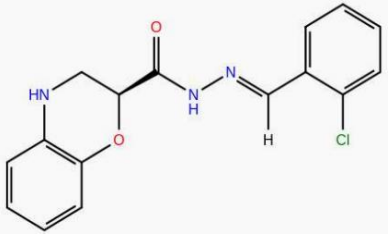
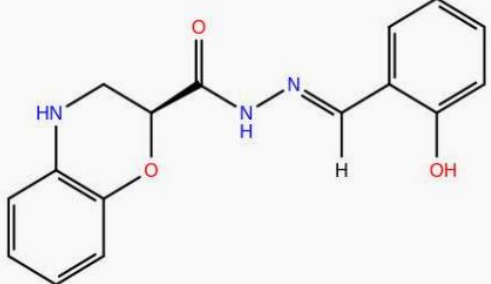

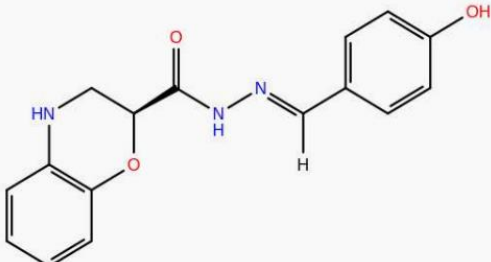
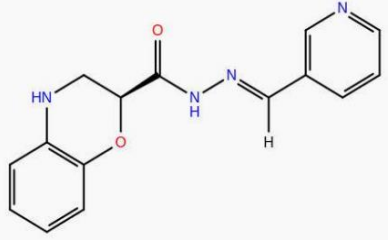
TC 196		TC 199	
TC 200		TC 201	
TC 202		TC 203	
TC 204		TC 205	

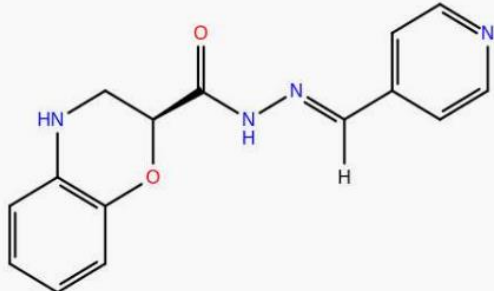
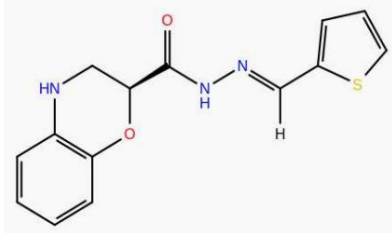
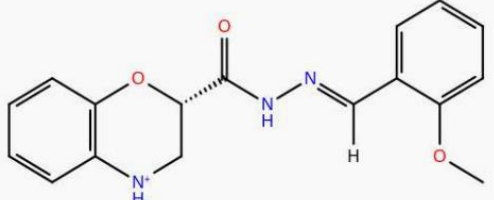
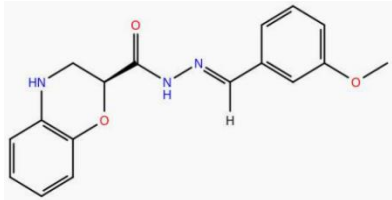
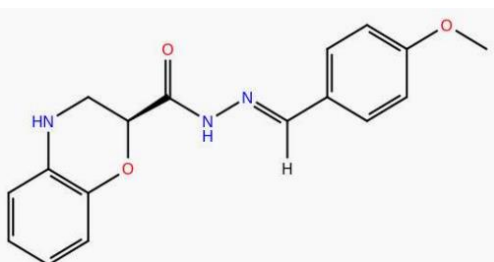
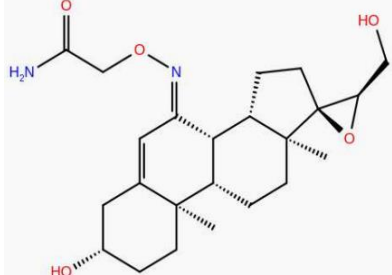
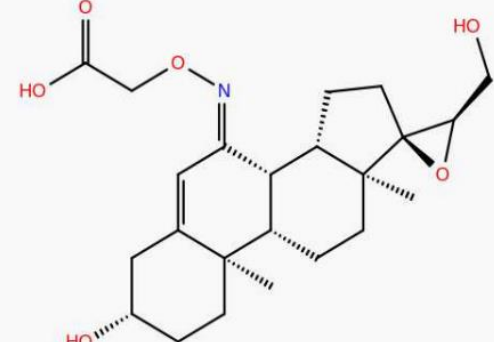
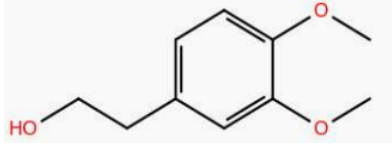
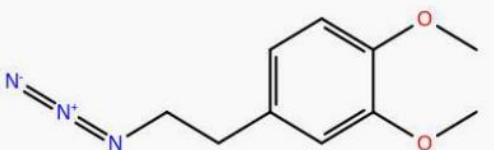
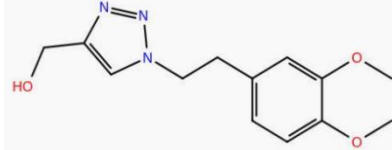
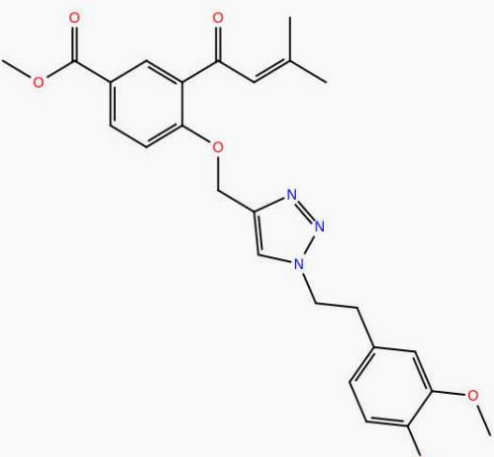
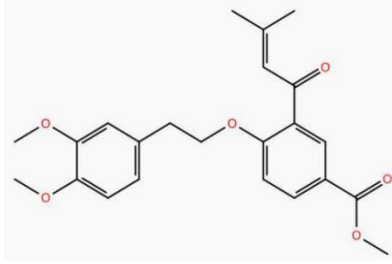
TC 206		TC 207	
TC 208		TC 209	
TC 210		TC 211	
TC 212		TC 213	
TC 214		TC 215	

TC 216		TC 217	
TC 218		TC 219	
TC 220		TC 221	
TC 222		TC 223	

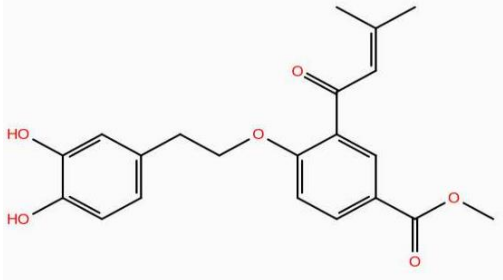
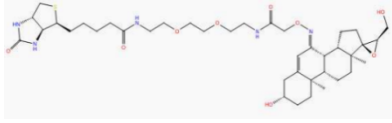
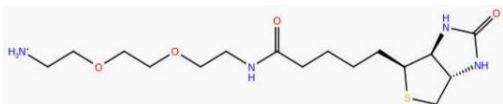
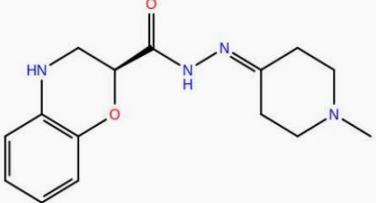
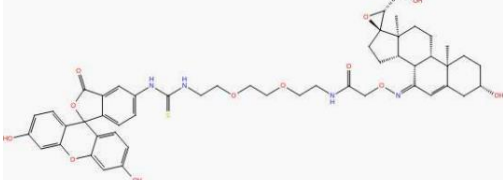
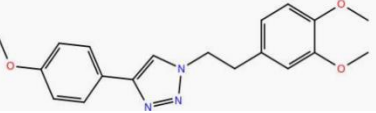
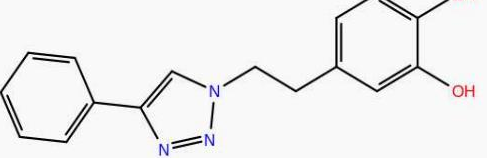
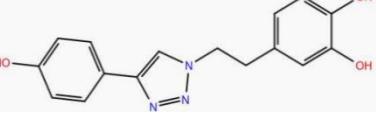

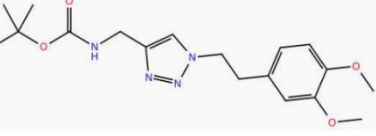
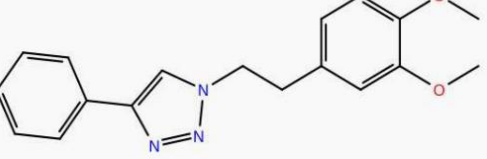
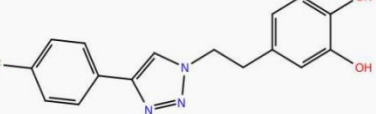

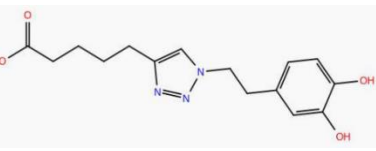
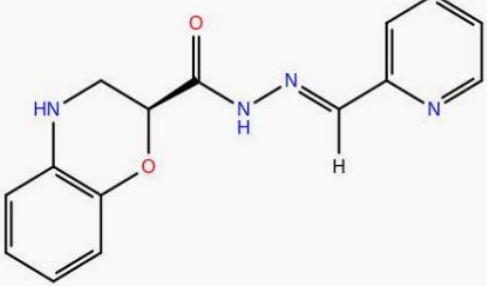
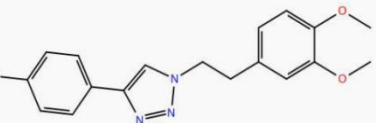
TC 224		TC 225	
TC 226		TC 227	
TC 228		TC 229	
TC 230		TC 231	

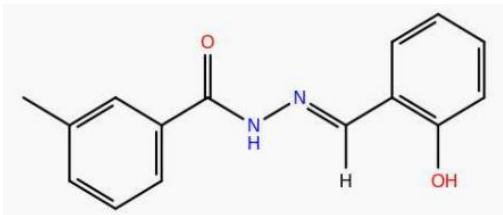
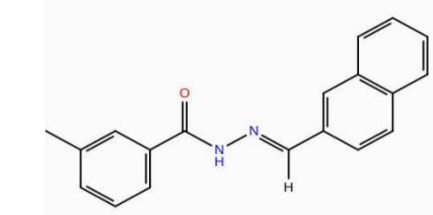
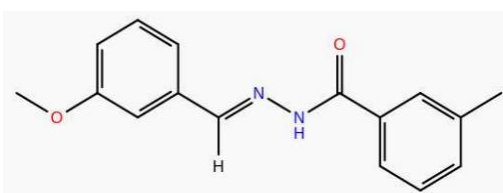

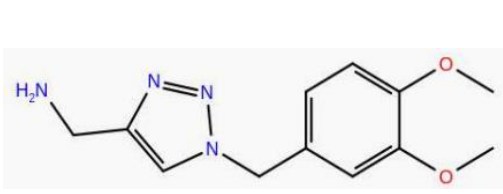
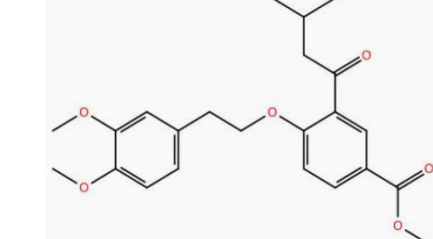
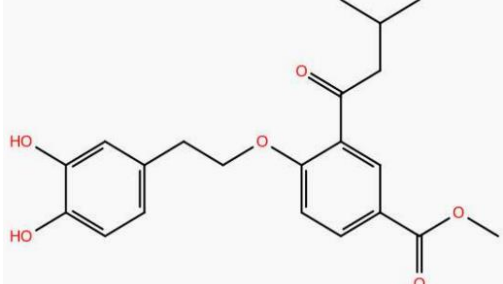
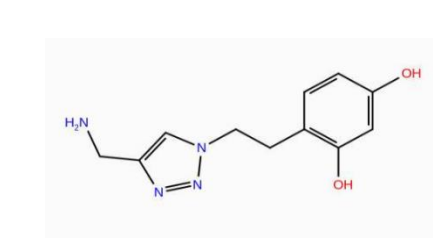
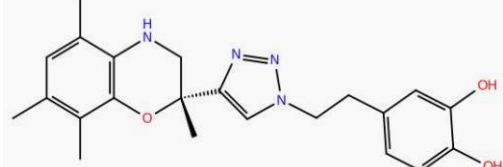
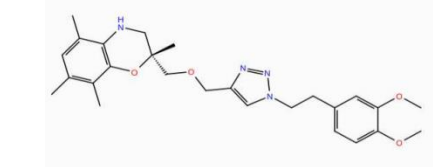
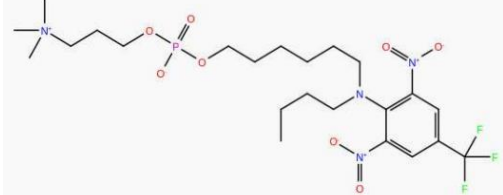
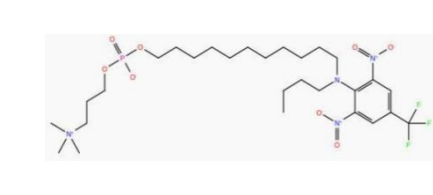
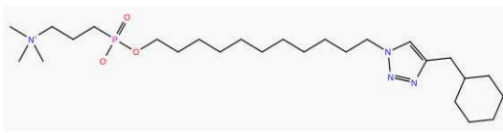
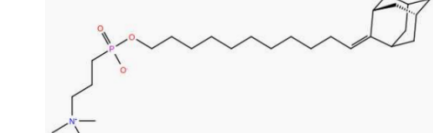
TC 232		TC 233	
TC 234		TC 235	
TC 236		TC 237	
TC 238		TC 239	

TC 240		TC 241	
TC 242		TC 243	
TC 244		TC 245	
TC 246		TC 247	
TC 248		TC 249	
TC 250		TC 251	

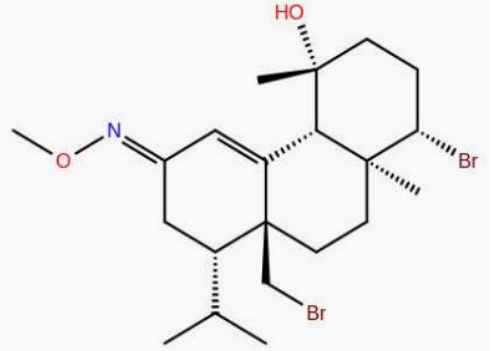
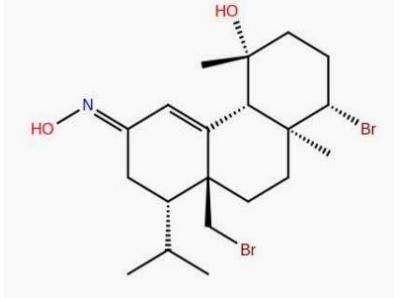
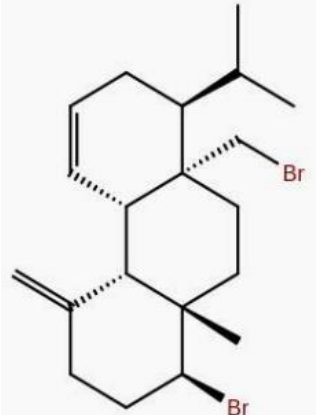
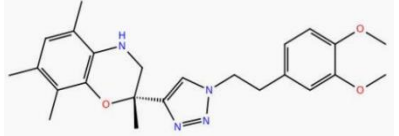
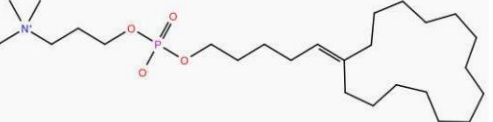
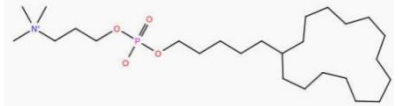
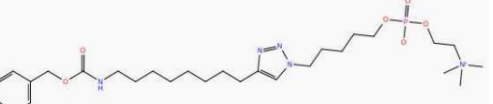
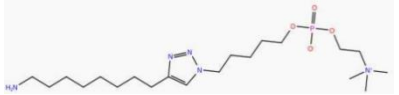
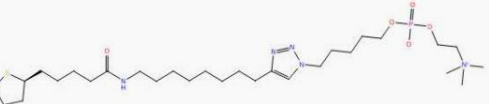
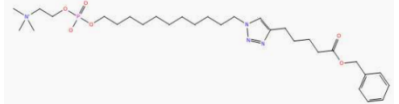
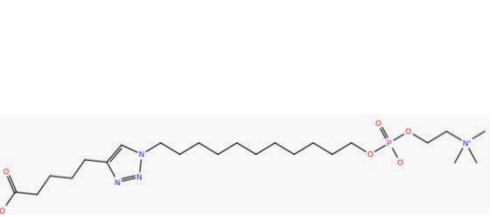
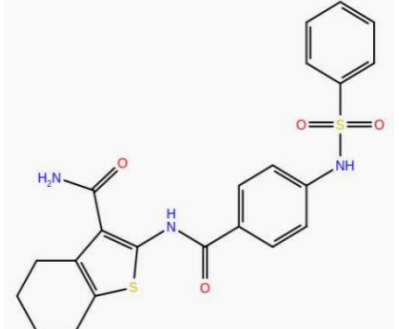
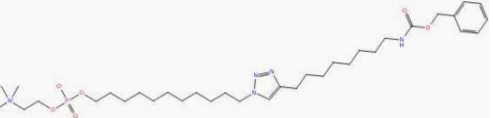
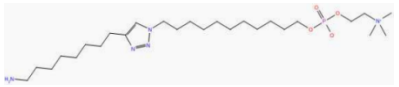
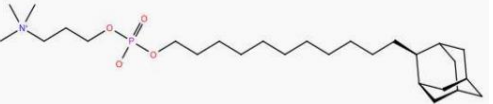
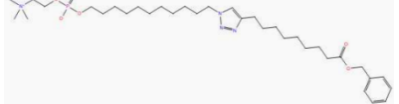
TC 252		TC 253	
TC 254		TC 255	
TC 256		TC 257	
TC 258		TC 259	
TC 260		TC 261	
TC 262		TC 263	

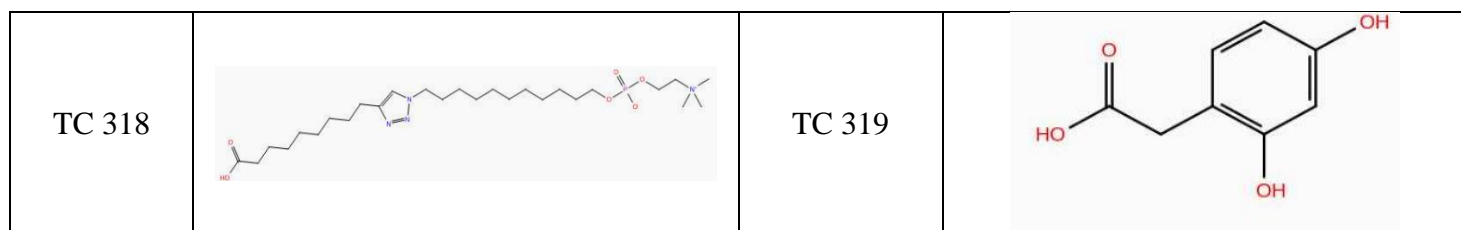


TC 264		TC 265	
TC 266		TC 267	
TC 268		TC 269	
TC 270		TC 271	
TC 272		TC 273	
TC 274		TC 275	
TC 276		TC 277	
TC 278		TC 279	

TC 280		TC 281	
TC 282		TC 283	
TC 284		TC 285	
TC 286		TC 287	
TC 288		TC 289	
TC 290		TC 291	
TC 292		TC 293	

TCVR 294		TCVR 295	
TCVR 296a		TCVR 296b	
TCVR 297		TCVR 298	
TCVR 299		TCVR 301	

TCVR 302		TCVR 303	
TCVR 304		TC 305	
TC 306		TC 307	
TC 308		TC 309	
TC 310		TC 311	
TC 312		TC 313	
TC 314		TC 315	
TC 316		TC 317	



*E.3. Αποτελέσματα πρόσδεσης των μορίων στο ενεργό κέντρο της κυκλοξυγονάσης απλής ακρίβειας*

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα μόρια τα οποία παρουσιάζουν καλή πρόσδεση με το ενεργό κέντρο της COX-2, καθώς επίσης και τα αποτελέσματα υπολογισμού απλής ακρίβειας (SP)

**Πίνακας 9:** Αποτελέσματα μελέτης πρόσδεσης με την μέθοδο SP

Κωδικός	Docking score	Glide emodel
TC 139	-10.509	-41.716
AD 44	-9.767	-70.282
AD 8	-9.083	-64.578
MK110	-9.024	-82.789
TC 184	-8.964	-55.272
AD 51	-8.926	-32.600
TC 77	-8.830	-61.318
TC 235	-8.828	-43.747
TC 118	-8.819	-57.274
ADGAN 61	-8.752	-57.899
MK 94	-8.698	-74.389
AD 33	-8.611	-32.143
AD 6	-8.558	-59.017
ADOX 174	-8.459	-54.050
MK 47	-8.438	-61.667
MK 63	-8.421	-61.287
TC 243	-8.402	-43.022
ADOX 175	-8.368	-55.604
MK 71	-8.241	-54.246
ADGAN 60	-8.219	-29.873
TC 101	-8.207	-26.415
TC 244	-8.187	-27.373
MK 72	-8.145	-61.145
MK 65	-8.126	-55.591
MR 104	-8.089	-39.523
AD 56	-8.087	-32.368
AD 1	-8.020	-61.658

TC 209	-8.006	-39.984
ADAT 184	-8.003	-55.215
AD 17	-7.965	-50.516
AD 63	-7.965	-48.856
MK 137	-7.919	-50.914
TC 78	-7.915	-29.080
MK 28	-7.912	-30.761
ADOX 177	-7.873	-48.533
TC 275	-7.856	-48.933
TC 122	-7.827	-33.134
MR 53	-7.819	-24.291
TC 261	-7.739	-52.421
TC 271	-7.701	-49.069
TC 287	-7.645	-57.628
ADAT 180	-7.621	-40.187
TC 270	-7.565	-49.190
TC 284	-7.482	-55.523
MK 128	-7.465	-54.020
AD 47	-7.344	-42.407
ADDP 100	-7.340	-53.652
ADGAN 59	-7.321	-36.830
MK 52	-7.282	-43.423
AD 50	-7.244	-24.076
ADOX 206	-7.173	-29.564
ADTA 133	-7.131	-19.195
MK 144	-7.116	-48.509
AD 148	-6.972	-41.995
MK 50	-6.964	-32.940
MK 159	-6.931	-72.273
TC 285	-6.928	-19.218
TC 121	-6.898	-27.971
MK 6	-6.895	-41.050
TC 251	-6.868	-49.678
MK 111	-6.845	-42.650
MK 109	-6.831	-42.208
TC 274	-6.822	-34.007
AD 37	-6.739	-50.127
MK 156	-6.721	-37.410
MK 18	-6.683	-47.036
MK 48	-6.673	-29.084
MK 55	-6.649	-56.398
TC 286	-6.641	-35.552
TC 276	-6.621	-54.533
MK 46	-6.587	-27.772
ADDP 121	-6.576	-26.753
MK 131	-6.485	-29.706
ADAT 190	-6.464	-29.056
TC 250	-6.448	-26.203

TC 252	-6.434	-28.131
TC 230	-6.409	-48.867
TC 248	-6.394	-28.386
TC 278	-6.353	-35.407
MK 62	-6.351	-21.741
TC 313	-6.346	-34.622
TC 266	-6.303	-43.602
TC 241	-6.253	-39.189
TC 256	-6.233	-29.435
TC 255	-6.203	-31.971
TC 277	-6.178	-44.166
TC 259	-6.170	-38.987
ADAT 181	-6.159	-28.808
MK 129	-6.136	-45.930
MK 29	-6.128	-30.988
TC 253	-6.124	-38.898
ADOX 204	-6.097	-24.541
TC 53	-6.080	-6.080
MK 57	-6.052	-31.296
TC 247	-5.956	-23.404
MR 33	-5.938	-11.051
MK 68	-5.914	-53.359
MK 118	-5.862	-40.554
MK 66	-5.847	-3.603
AD 55	-5.829	-22.873
AD 56	-22.873	-12.748
MK 70	-5.763	-29.469
TC 234	-5.606	-26.550
TC 281	-5.496	-32.959
ADOX 207	-5.488	-29.939
ADDP 76	-5.403	-20.120
MK 132	-5.177	-30.600
MR 18	-5.152	-28.006
MR 35	-5.130	-15.401
TC 212	-5.125	-17.845
MR 40	-5.112	-9.981
ADDP 99	-5.051	-10.505
MR 37	-5.033	-10.980
ADTA 126	-4.964	-24.612
AD 45	-4.927	-14.713
TC 248	-4.909	-22.668
MK 142	-4.881	-36.947
TC 245	-4.822	-15.829
TC 272	-4.820	-46.792
MK 49	-4.769	-21.471
MK 130	-4.667	-60.317
AD 40	-4.641	-2.117
TC 283	-4.528	-14.692

MK 156	-4.509	-31.191
TC 254	-4.409	-11.769
TC 232	-4.338	-43.689
TC 249	-3.805	-37.074
TC 273	-3.739	-27.382
MK 73	-3.362	-38.323
MK 76	-2.607	-22.239
ADAT 126	-2.313	-48.659
TC 96	-2.181	-37.947
MK 67	-2.059	-21.460
TC 79	-2.045	-42.331
TC 203	-1.017	-17.372
ADTA 179	-0.962	-44.458

*Ε.4. Αποτελέσματα πρόσδεσης των μορίων στο ενεργό κέντρο της κυκλοζυγενάσης αυξημένης ακρίβειας*

Στο παράρτημα αυτό παρουσιάζονται τα μόρια που εμφανίζονται ως υποσχόμενοι COX-2 παρεμποδιστές. Για το κάθε μόριο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μοριακής πρόσδεσης (docking score και glide emodel) ενώ παρουσιάζεται ο δεσμός που σχηματίζει το κάθε μόριο με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της COX-2. Στην περίπτωση που ένα μόριο σχηματίζει δεσμό με ένα από τα αμινοξέα, καταγράφεται με έναν κωδικό, ο οποίος απεικονίζει τον δεσμό που σχηματίζεται ενώ στην συνέχεια παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά του δεσμού, όπως το μήκος του και η γωνία του δότη και του δέκτη.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται η επεξήγηση του κάθε κωδικού που χρησιμοποιείται στον πίνακα αποτελεσμάτων καθώς επίσης και απεικόνιση που έχει ο κάθε δεσμός στις εικόνες όπου παρουσιάζεται η πρόσδεση του κάθε μορίου:

**Πίνακας 10:** Επεξήγηση των κωδικών του πίνακα αποτελεσμάτων

Κωδικός	Επεξήγηση	Απεικόνιση δεσμού
1	Γέφυρα άλατος	Συνεχής μωβ γραμμή
2a	Δεσμός υδρογόνου με το κύριο κορμό του αμινοξέος	Διακεκομμένη ροζ γραμμή
2b	Δεσμός υδρογόνου με πλευρική ομάδα του αμινοξέος	Συνεχής ροζ γραμμή
3	Pi-cation αλληλεπίδραση	Συνεχής κόκκινη γραμμή
4	Pi-Pi αλληλεπίδραση	Συνεχής πράσινη γραμμή
AA	Γωνία δότη	
DA	Γωνία δέκτη	
A	γωνία	



Εφόσον έγιναν οι παραπάνω επεξηγήσεις, μπορεί να παρουσιαστούν τα αποτελέσματα πρόσδεσης με την μέθοδο XP:

**Πίνακας 11:** Αποτελέσματα πρόσδεσης μορίων με την μέθοδο XP και δεσμοί που σχηματίζονται

Ονομασία ένωσης	docking score	glide emodel	HIS 90	ARG 513	ARG 120	TYR 355	LEU 352
TC 121	-7.544	-6.781	-	2b (2.02 A) DA (101.17)	-	4 (5.07 A) A (71.93)	-
TC 122	-7.955	-23.227	2a (2.09 A) AA (154.99) DA (103.15)	-	-	-	-
TC 139	-10.63	-61.163	-	2b (2.09 A) DA (165.18)	3 (5.73 A) A (25.71)	-	2a (1.91 A) AA (169.34) DA (130.89)
TC 243	-6.552	-32.049	-	2b (2.25 A) DA (129.67)	-	4 (5.37 A) A (83.96)	-
TC 249	-4.462	-50.904	2a (1.78 A) AA (164.25) DA (103.78)	-	-	-	-
TC 259	-5.007	-34.365	2a (1.97 A) AA (150.50) DA (133.16)	2b (2.09 A) DA (94.19)	-	2b (2.51 A) DA (109.72)	-
TC 261	-7.739	-58.749	2a (1.90 A) AA (155.78) DA (143.22)	2b (2.14 A) DA (98.14)	-	4 (5.25 A) A (84.85)	-
TC 270	-10.137	-55.995	2a (1.98 A) AA (140.02) DA (162.16)	2b (2.29 A) DA (113.81)	-	-	2a (1.86 A) AA (150.97) DA (155.78)
TC 274	-7.765	-35.814	-	2b (2.16 A) DA (102.27)	4 (5.21 A) A (66.96)	-	-
TC 275	-9.562	-50.268	2a (1.91 A) AA (150.09) DA (162.72)	2b (2.29 A) DA (106.91)	-	4 (5.44 A) A (89.75)	2a (2.44 A) AA (122.97) DA (159.19)
TC 277	-7.213	-56.139	2a (1.73 A) AA (174.02) DA (118.79)	-	1 (4.35 A)	2b (1.86) DA (153.61)	-
TC 284	-6.471	-53.22	2a (2.29 A) AA (155.72) DA (120.68)	-	-	4 (5.48 A) A (88.13)	-
TC 285	-8.297	-20.057	-	2b (2.01 A) DA (111.62)	2b (2.59 A) DA (91.49)	-	-
TC 286	-8.376	-59.144	2a (1.74 A) AA (172.40) DA (130.61)	-	-	-	-
TC 287	-6.639	-54.307	2a (2.20A) AA (130.28) DA (146.69)	2b (2.63 A) DA (123.95)	-	-	-
MK 6	-8.239	16.789	-	3 (6.24 A)	3 (6.08 A)	-	-

				A (26.77)	A (21.12)		
MK 28	-10.107	-13.06	2a (1.82 A) AA (151.87) DA (160.28)	2b (2.26 A) AA (107.45)	-	4 (5.44 A) A (80.49)	2a (2.31 A) AA (130.39) DA (161.77)
MK 29	-7.689	-25.226	2a (1.88 A) AA (163.93) DA (105.26)	-	-	-	-
MK 47	-10.14	-75.148	2a (1.96 A) AA (164.80) DA (122.91)	-	2 δεσμοί: 3 (5.02 A) A (14.20) + 4 (4.92 A) A (70.98)	2b (2.45 A) DA (129.78)	2a (2.05 A) AA (140.92) DA (158.34)
MK 50	-7.686	-44.646	-	2b (1.85 A) DA (117.94)	4 (4.95 A) A (62)	-	-
MK 52	-7.606	-38.06	-	2b (2.22 A) DA (99.22)	-	-	-
MK 62	-7.188	-39.431	4 (5.46 A) A (64.42)	-	-	-	-
MK 65	-9.894	-60.95	2a (1.96 A) AA (164.08) DA (122.22)	-	-	-	2a (2.08 A) AA (139.32) DA (157.66)
MK 68	-10.853	-59.483	2a (2.06 A) AA (161.50) DA (118.90)	-	2b (2.12 A) DA (162.50)	-	2a (1.98 A) AA (141.94) DA (163.83)
MK 71	-10.663	-61.113	2a (2.08 A) AA (162.89) DA (129.30)	-	3 (6.06 A) A (17.19)	4 (5.47 A) A (82.67)	2a (1.85 A) AA (147.00) DA (156.52)
MK 72	-9.511	-62.606	2a (1.74 A) AA (175.21) DA (117.35)	-	-	2b (2.40 A) DA (159.51)	-
MK 94	-7.586	-79.52	-	2b (2.02 A) DA (132.99)	-	-	-
MK 110	-8.267	-85.006	-	2b (2.07 A) DA (158.88)	-	-	2a (1.87 A) AA (168.01) DA (144.18)
MK 128	-5.867	-48.679	-	2b (2.16 A) DA (98.74)	2 δεσμοί: 1 (3.81 A) 3 (4.09 A) A (23.57)	2b (1.98 A) DA (98.73)	-
MK 132	-6.278	-40.337	2a (1.76 A) AA (156.72) DA (113.15)	-	-	4 (5.23 A) A (82.78)	-
MK 137	-6.215	-42.515	-	2b (2.06 A) DA (154)	-	-	-
MK 144	-7.339	-41.825	2a (1.98 A) AA (148.07) DA (154.39)	-	-	-	-
MK 159	-6.703	-85.928	-	2b (1.85 A)	-	-	-

				DA (158.11)			
AD 1	-4.207	-54.944	2a (2.15 A) AA(148.32) DA (115.72)	-	-	-	-
AD 8	-8.359	-59.527	2a (1.98 A) AA (152.02) DA (135.59)	-	-	-	-
AD 37	-8.204	-47.777	2a (1.69 A) AA (169.50) DA (125.19)	-	-	-	-
AD 44	-11.195	-68.349	2a (1.85 A) AA(150.08) DA (136.71)	2b (2.05 A) DA (110.24)	3 (5.91 A) A (29.51)	-	-
AD 47	-6.47	-54.453	2a (1.81 A) AA (163.58) DA (102.90)	2 δεσμοί: 3 (5.23 A) DA (15.28) + 4 (5.15 A) DA (89.83)	-	-	-
AD 51	-5.601	-46.647	-	2b (2.68 A) DA (109.86)	4 (4.89) A (74.07)	2b (1.79 A) AA (148.47) DA (99.9)	-
AD 56	-8.206	-33.161	4 (4.91 A) A (68.16)	-	-	-	-
ADTA 133	-8.047	-30.023	-	2b (1.94 A) DA (104.30)	-	-	-
MR 33	-6.585	-16.160	2a (1.58 A) AA (160.67) DA (104.39)	-	-	-	-
MR 53	-3.434	-34.742	-	3 (6.24 A) A (23.60)	-	-	-
MR 104	-5.653	-32.522	-	3 (6.26 A) A (18.59)	-	4 (5.18) A (87.24)	-
ADDP 100	-8.308	-61.497	2a (1.73 A) AA (164.81) DA (112.08)	-	-	-	2a (2.13 A) AA (130.94) DA (168.69)
ADGAN 59	-5.078	-40.915	-	2b (2.29 A) DA (121.98)	-	-	-
AD 148	-7.194	-49.139	2a (1.78 A) AA (179) DA (117.77)	-	2 δεσμοί: 2b (2.09 A) DA (99.97) και 4 (5.44 A) A (79.94)	2b (2.22 A) DA (116.23)	-
ADOX 174	-8.21	-56.058	2a (1.79 A) AA (165.98) DA (124.54)	-	-	-	-
ADOX 175	-8.908	-59.058	2a (1.74 A) AA (168.66)	-	-	-	2a (2.36 A) AA (125.33)

			DA (123.88)				DA (161.68)
ADAT 180	-7.709	-47.779	-	2b (2.17 A) DA (118.15)	2b (2.22 A) DA (96.06)	2b (2.38 A) DA (127.87)	-

Πίνακας 12: Αποτελέσματα πρόσδεσης μορίων με την μέθοδο XP και δεσμοί που σχηματίζονται (συνέχεια)

Όνομασία ένωσης	TYR 385	SER 353	ASP 515	SER 530	TRP 387	GLN 192
TC 121	-	-	-	-	-	-
TC 122	-	-	-	-	-	-
TC 139	-	-	-	-	-	-
TC 243	-	-	-	-	-	-
TC 249	-	-	-	-	-	-
TC 259	-	-	-	-	-	-
TC 261	2b (2.35 A) DA (97.85)	-	-	-	-	-
TC 270	-	-	-	-	-	-
TC 274	-	-	-	-	-	-
TC 275	-	-	-	-	-	-
TC 277	-	-	-	-	-	-
TC 284	-	2a (2.15 A) AA (145.92) DA (108.70)	-	-	-	-
TC 285	2b (1.95 A) DA (95.51)	-	-	-	-	-
TC 286	2b (2.24 A) DA (153.92)	-	-	-	-	-
TC 287	-	-	-	2b (2.16 A) AA(151.53) DA (116.64)	-	-
MK 6	-	-	-	-	-	2b (1.71 A) AA (159.03) DA (125.29)
MK 28	-	-	-	-	-	-
MK 29	-	-	-	-	-	2b (2.20 A) AA (156.39) DA (157.43)
MK 47	-	-	-	-	-	-
MK 50	-	-	-	-	-	-
MK 52	-	-	-	-	-	-
MK 62	-	-	-	-	-	-
MK 65	-	-	-	-	-	-
MK 68	-	-	-	-	-	-
MK 71	-	-	-	-	-	-
MK 72	-	-	-	-	-	-
MK 94	-	2a (1.63 A)	2a (2.40 A)	-	-	-

		AA (164.29) DA (115.18)	DA (162.30)			
MK 110	-	-	-	-	-	-
MK 128	-	-	-	-	-	-
MK 132	-	-	-	-	-	-
MK 137	-	-	-	-	-	-
MK 144	-	-	-	-	-	-
MK 159	-	-	-	-	-	-
AD 1	-	2a (1.82 A) DA (165.73) AA (121.57)	-	-	-	-
AD 8	-	-	-	-	-	-
AD 37	-	-	-	2b (1.84 A) AA (153.63) DA (113.13)	-	-
AD 44	-	-	-	-	-	-
AD 47	-	-	-	-	-	-
AD 51	4 (5.10 A) A (87.80)	-	-	-	4 (5.15 A) A (75.60)	-
AD 56	-	-	-	-	-	-
ADTA 133	-	-	-	-	-	-
MR 33	-	-	-	-	-	-
MR 53	4 (5.26 A) A (86.81)	-	-	-	4 (5.35 A) A (69.06)	-
MR 104	-	-	-	-	4 (5.21 A) A (75.46)	-
ADDP 100	-	-	-	-	-	-
ADGAN 59	4 (5.50 A) A (74.14)	-	-	-	-	-
AD 148	-	-	-	-	-	-
ADOX 174	-	-	-	-	-	-
ADOX 175	-	-	-	-	-	-
ADAT 180	-	-	-	-	-	-

Πίνακας 13: Αποτελέσματα πρόσδεσης μορίων με την μέθοδο XP και δεσμοί που σχηματίζονται (συνέχεια)

Όνομασία ένωσης	MET 522	PHE 518
TC 121	-	-
TC 122	-	-
TC 139	-	-
TC 243	-	-

TC 249	-	-
TC 259	-	-
TC 261	-	-
TC 270	-	-
TC 274	-	-
TC 275	-	-
TC 277	-	-
TC 284	-	-
TC 285	-	-
TC 286	-	-
TC 287	-	-
MK 6	-	-
MK 28	-	-
MK 29	-	2a (2.76 A) DA (99.27)
MK 47	-	-
MK 50	-	-
MK 52	-	-
MK 62	-	-
MK 65	-	-
MK 68	-	-
MK 71	-	-
MK 72	-	-
MK 94	-	-
MK 110	-	-
MK 128	-	-
MK 132	-	-
MK 137	-	-
MK 144	-	-
MK 159	-	-
AD 1	-	-
AD 8	-	-
AD 37	-	-
AD 44	-	-
AD 47	-	-
AD 51	-	-
AD 56	-	-
ADTA 133	2a (1.97 A) AA (161.07) DA (111.82)	-
MR 33	-	-
MR 53	-	-
MR 104	-	-
ADDP 100	-	-
ADGAN 59	-	-

AD 148	-	-
ADOX 174	-	-
ADOX 175	-	-
ADAT 180	-	-

*E.5. Αποτελέσματα πρόσδεσης των μορίων που σχεδιάστηκαν στο ενεργό κέντρο της κυκλοζυγενάσης αυξημένης ακρίβειας*

**Πίνακας 14:** Αποτελέσματα πρόσδεσης νέων μορίων με την μέθοδο XP

Κωδικός μορίου	Docking score	Glide emodel	HIS 90	ARG 513	ARG 120	LEU 352
N 26	-11.136	-60.858	2a (2.00 A) AA (146.59) DA (96.44)		3 (5.83 A) A (29.38)	2a (2.04 A) AA (175.22) DA (178.05)
N 10	-10.851	-62.993		2b (1.87 A) DA (99.09)	3 (5.85 A) A (28.79)	
N 9	-10.811	-55.812		2b (1.84 A) DA (103.09)	3 (5.89 A) A (27.44)	
N 40	-10.806	-68.380	2a (1.97 A) AA (149.08) DA (97.42)			2a (2.04 A) AA (176.61) DA (178.35)
N 7	-10.244	-45.743	2a (2.13 A) AA (169.81) DA (122.27)		4 (5.39 A) A (83.55)	
N 8	-10.200	-64.230		2b (1.75 A) DA (92.03)		
N 39	-10.092	-51.171	2a (2.06 A) AA (169.03) DA (125.22)	2b (1.81 A) DA (90.41)	3 (5.98 A) A (28.85)	
N 11	-9.824	-65.539		2b (2.01 A) DA (166.64)	4 (5.92 A) A (29.56)	
N 22	-9.634	-60.221	2a (2.12 A) AA (131.27) DA (97.28)	4 (6.37 A) A (27.87)		
N 32	-9.404	-46.237		2b (2.46 A) DA (97.35)	3 (5.98 A) A (27.09)	
N 38	-9.306	-33.867	2a (1.77 A) AA (161.15) DA (135.97)	2b (1.93 A) DA (106.70)		
N 37	-9.221	-24.371		2b (2.36 A) DA (112.91)	3 (5.93 A) A (28.59)	
N 33	-9.212	-48.274		2b (2.52 A) DA (112.63)	3 (5.85 A) A (28.65)	
N 5	-9.133	-55.353	2a (2.06 A) AA (165.37) DA (122.87)	2b (2.09 A) DA (93.61)		

N 21	-9.114	-65.696		2 δεσμοί: 1 (4.98 A) και 2b (2.43 A) DA (94.33)	3 (5.89 A) A (27.41)	
N 15	-9.018	-45.499		2b (2.46 A) DA (94.93)		
N 41	-8.956	-57.716	2a (1.88 A) AA (149.95) DA (106.78)			
N 19	-8.702	-67.828		2b (2.72 A) DA (103.20)		
N 20	-8.675	-60.410		2b (2.51 A) DA (96.82)		
N 25	-8.391	-33.807	2a (2.20 A) AA (157.36) DA (119.66)	2b (2.11 A) DA (91.32)	2 δεσμοί: 3 (5.45 A) A (18.04) Και 4 (5.47 A) A (85.76)	
N 4	-8.301	-56.645	2a (1.96 A) AA (169.11) DA (122.10)	2b (1.94 A) DA (91.03)		
N 12	-8.161	-65.760		2b (2.41 A) DA (125.13)		
N 1	-7.960	-57.059	2a (1.93 A) AA (168.57) DA (141.69)			
N 3	-7.939	-55.338	2a (1.98 A) AA (172.43) DA (122.99)			
N 34	-7.747	-50.278		2b (2.53 A) DA (103.49)	4 (5.05 A) A (88.39)	
N 6	-7.668	-65.114	2a (2.05 A) AA (163.14) DA (119.79)		4 (4.98 A) A (89.25)	
N 2	-7.210	-58.107	2a (2.01 A) AA (152.34) DA (136.78)			
N 35	-6.439	-55.774		3 (6.22 A) A (17.65)	4 (5.02 A) A (83.16)	
N 36	-4.423	-8.309		2b (2.77 A) DA (95.15)		
N 18	-2.646	-36.916		2b (2.23 A) DA (90.73)		
N 31	-2.538	-17.364		2b (2.22 A) DA (93.21)		
N 30	-2.391	-32.014		2 δεσμοί: 2b (2.01 A)	1 (3.25 A)	



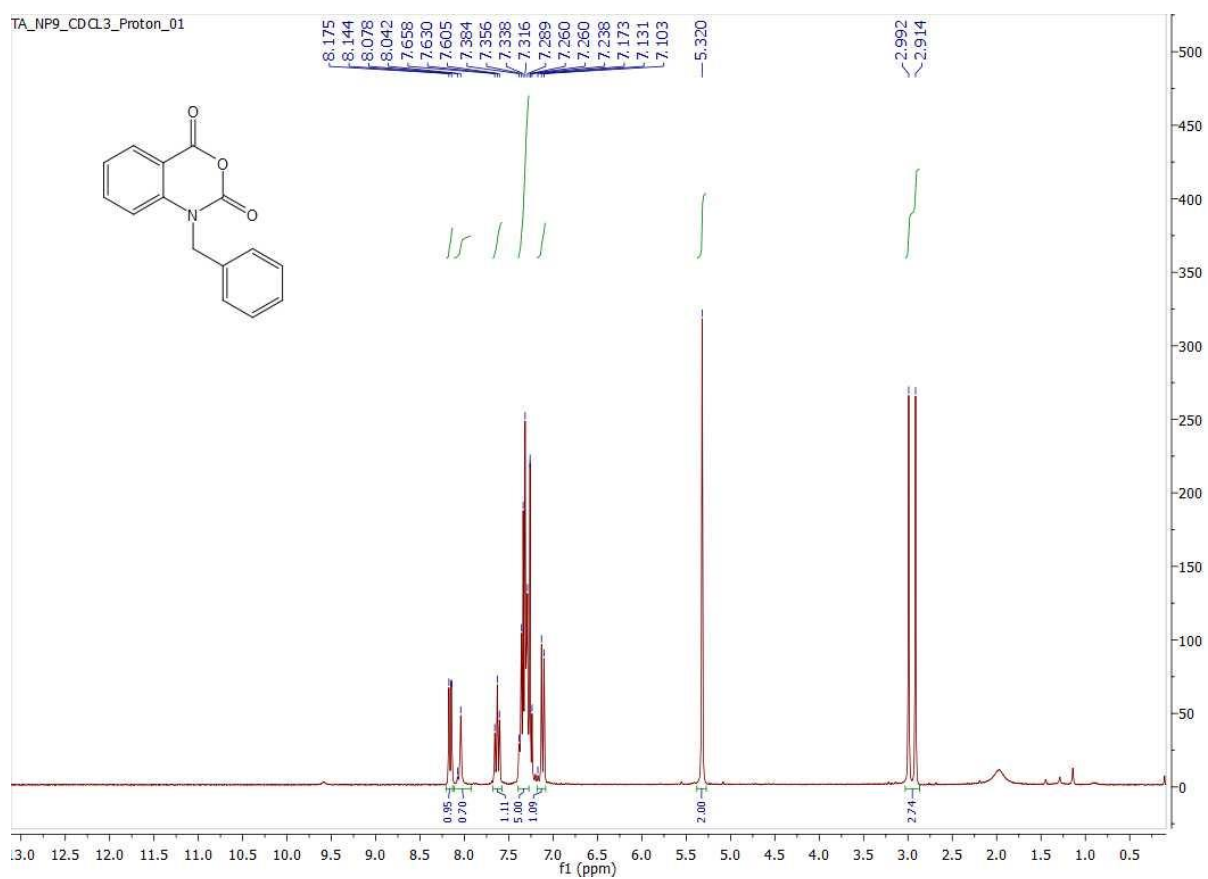
				DA (91.74) Και 2b (2.60 A) DA (101.13)		
--	--	--	--	---	--	--

Πίνακας 15: Αποτελέσματα πρόσδεσης νέων μορίων με την μέθοδο ΧΡ (συνέχεια)

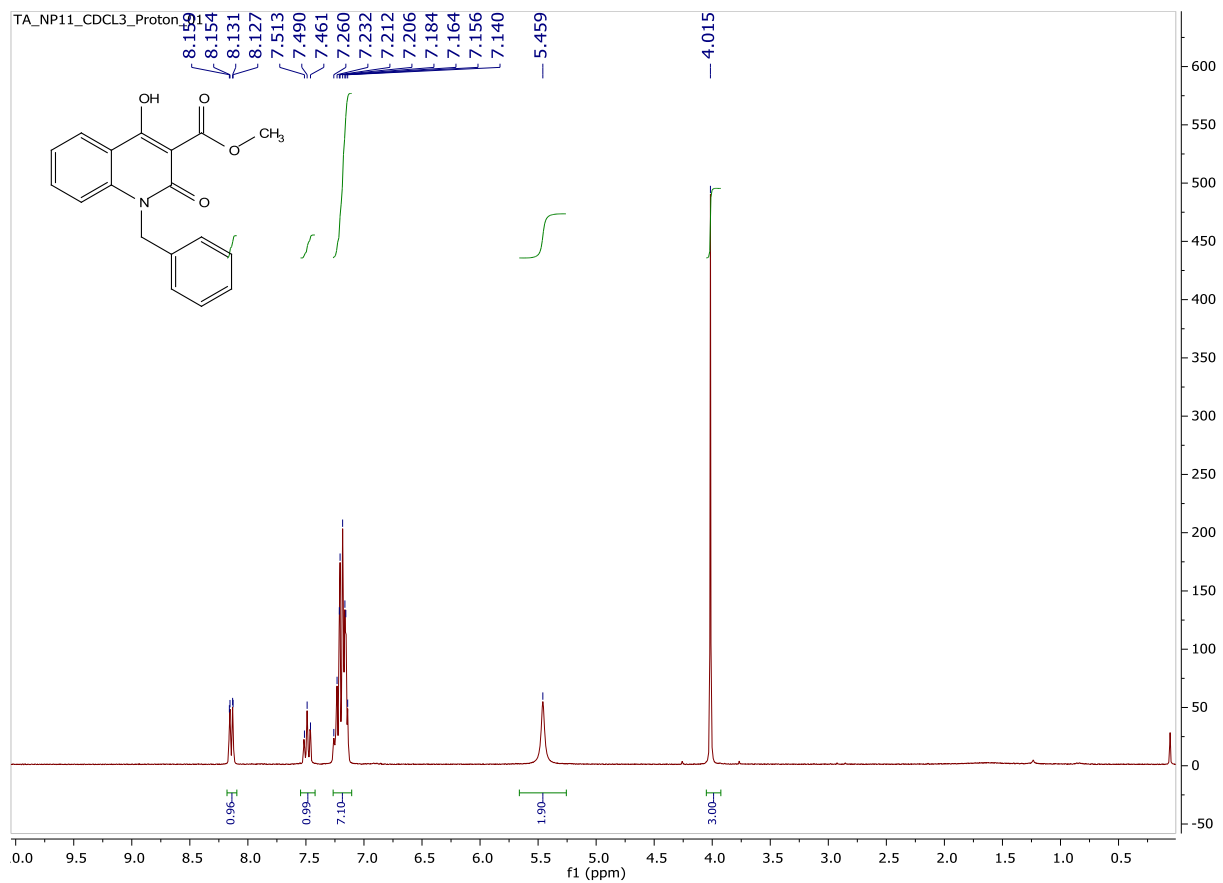
Κωδικός μορίου	TYR 385	TRP 387	SER 353	PHE 518	TYR 355	GLU 524
N 26						
N 10						
N 9						
N 40						
N 7	4 (5.40 A) A (81.47)	4 (5.32 A) A (63.14)				
N 8						
N 39						
N 11						
N 22			2a (2.64 A) AA (123.29) DA (151.02)			
N 32	4 (5.23 A) A (66.97)					
N 38						
N 37						
N 33						
N 5						
N 21						
N 15				2a (2.75 A) DA (150.58)		
N 41				2a (2.46 A) DA (98.22)		
N 19						
N 20						
N 25						
N 4						
N 12						
N 1						
N 3						
N 34						
N 6						
N 2						
N 35			2a (1.92 A) AA (155.70) DA (128.65)			
N 36					2b (2.02 A) DA (121.79)	

N 18					2 δεσμοί: 2b (1.76 A) DA (141.98) Και 4 (5.46 A) A (66.35)	2b (1.74 A) AA (167.95) DA (110.04)
N 31		4 (5.50 A) A (73.56)			2b (1.81 A) DA (135.99)	2b (1.70 A) DA (110.47)
N 30		4 (5.46 A) A (70.30)			2b (1.83 A) DA (135.40)	

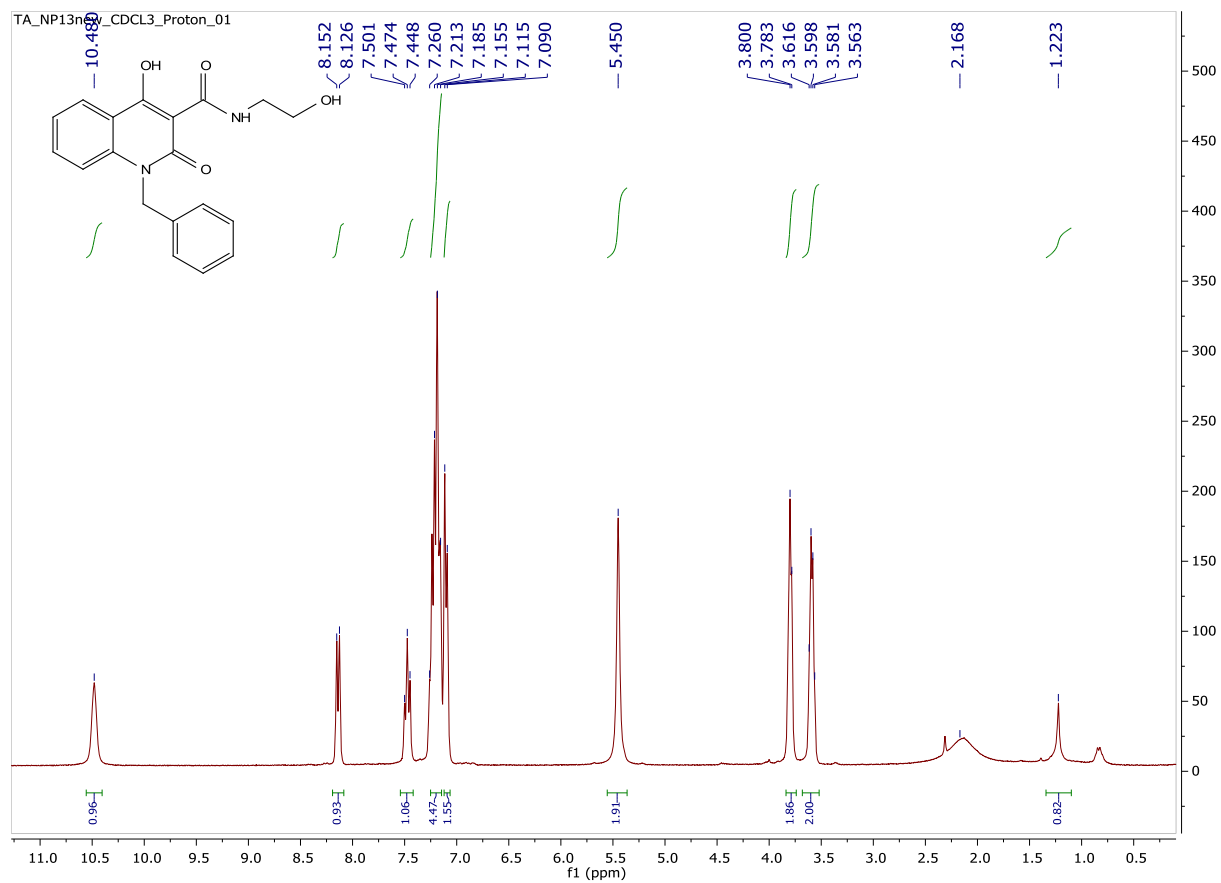
### Ε.6. Φάσματα NMR



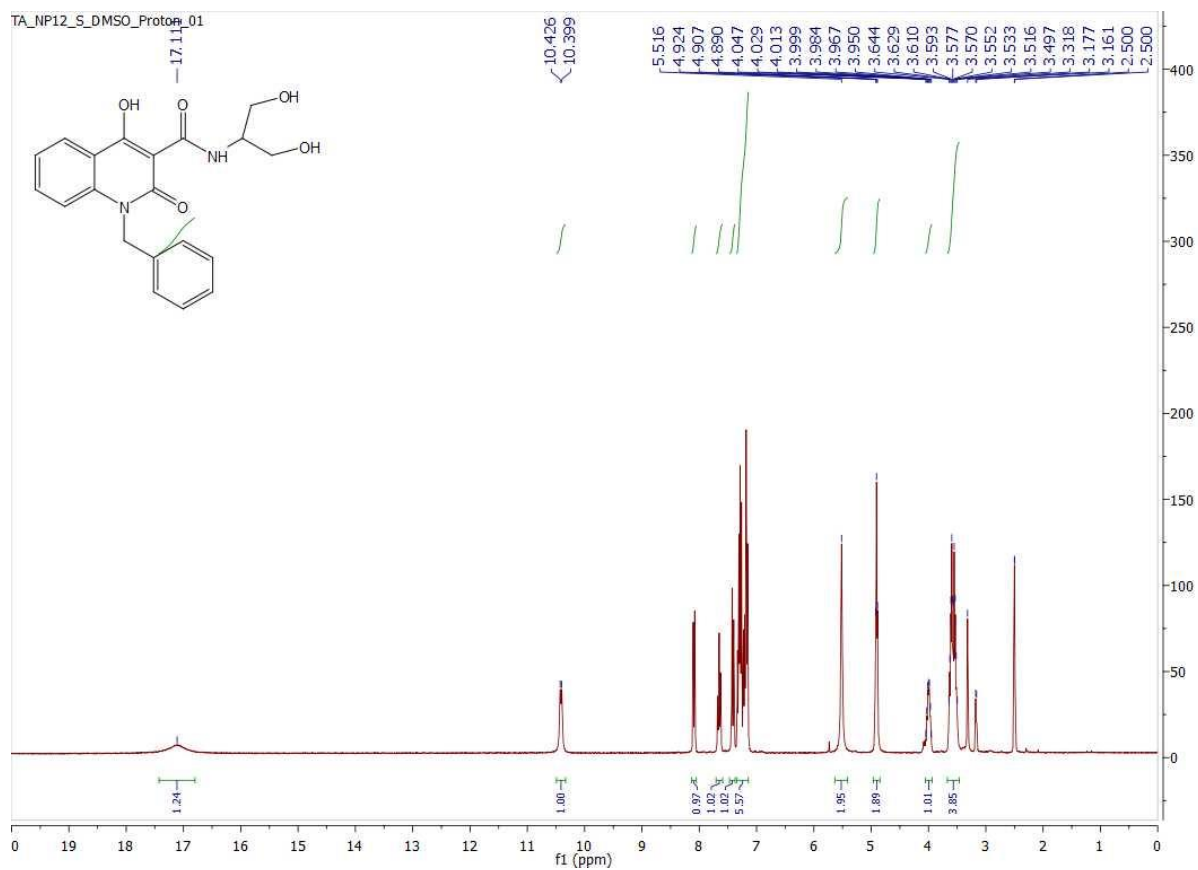
Εικόνα 39: Το φάσμα <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) της ένωσης (1)



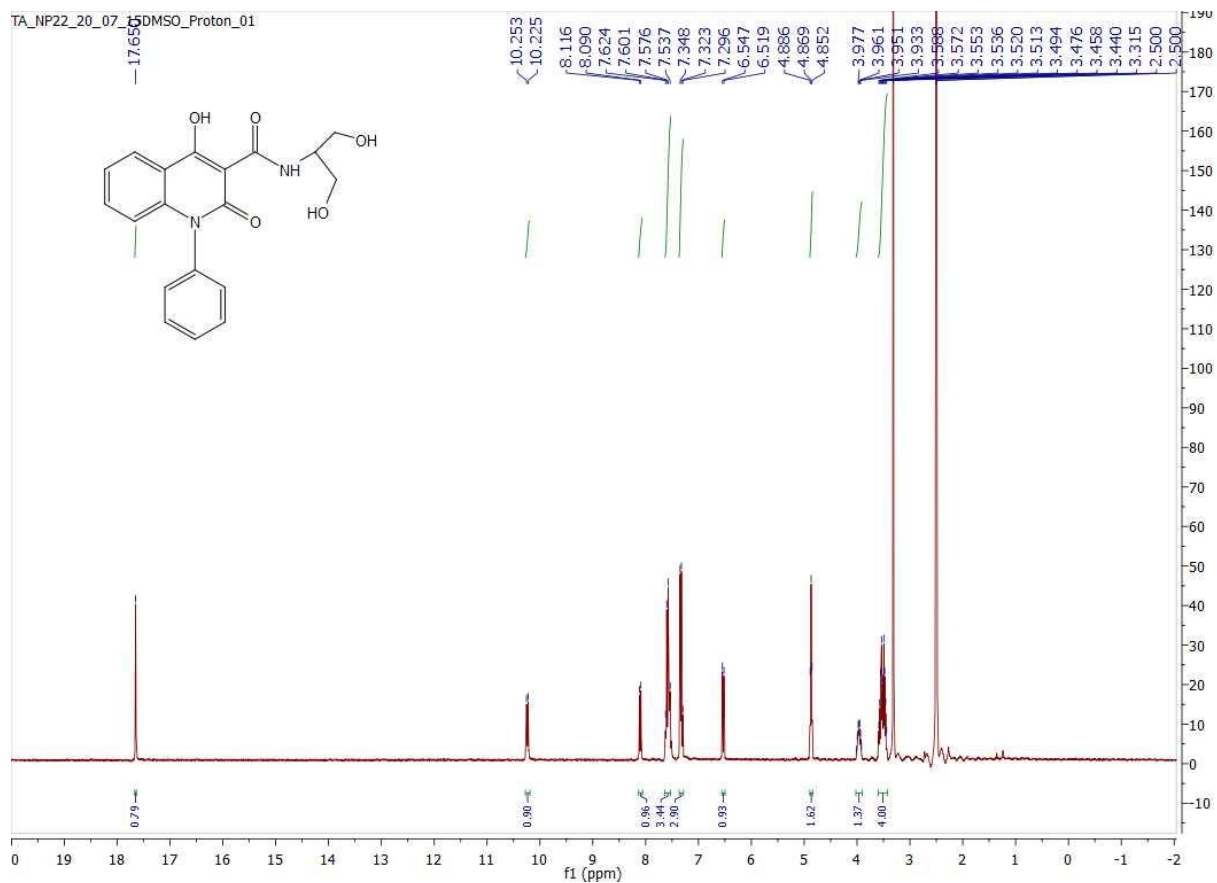
Εικόνα 40: Το φάσμα  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) της ένωσης (2)



Εικόνα 41: Το φάσμα  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) της ένωσης (3)



Εικόνα 42: Το φάσμα  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) της ένωσης (4)



Εικόνα 43: Το φάσμα  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) της ένωσης (6)