

**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ  
ΤΟΜΕΑΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Σχεδιασμός, σύνθεση και χαρακτηρισμός δομής  
νέων ωρονών με συνδυασμένη βιολογική δράση**

**Αλκιβιάδης Ορφεύς Χατζηβασιλείου**

**Επιβλέπουσα**  
Δρ. Αναστασία Δέτση  
Επίκουρη Καθηγήτρια ΕΜΠ

ΑΘΗΝΑ 2013



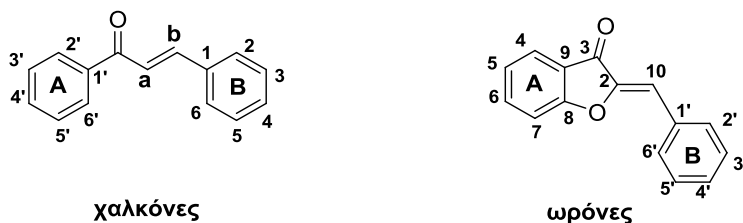
## Περίληψη

Αυτή η διπλωματική εργασία διεξήχθη το ακαδημαϊκό έτος 2012-2013 στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ και ασχολείται με τον σχεδιασμό, την σύνθεση και τον χαρακτηρισμό δομής νέων ωρονών με συνδυασμένη βιολογική δράση

Αρχικά έγιναν προκαταρκτικές *in silico* μελέτες μοριακής πρόσδεσης για την εύρεση δομικών μοτίβων οργανικών ενώσεων που μπορούν να οδηγήσουν σε παρεμπόδιση του ενζύμου τυροσινάση.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα αποτελέσματα αυτών των μελετών, εξήχθη το συμπέρασμα πως οι πιο πρόσφορες προς σύνθεση κατηγορίες ενώσεων ήταν οι χαλκόνες και οι ωρόνες, οι οποίες επιπλέον εμφανίζουν αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση.

Συντέθηκαν συνολικά 19 νέες ενώσεις. Οι 7 ήταν της κατηγορίας των χαλκονών (**3a-g**), οι οποίες συντέθηκαν μέσω αντιδράσεων συμπύκνωσης Claisen-Schmidt μεταξύ κατάλληλα υποκατεστημένων 2-υδροξυ-ακετοφαινονών και βενζαλδευδών, 10 ήταν της κατηγορίας των ωρονών, οι 7 εκ' των οποίων συντέθηκαν από χαλκόνες μέσω οξειδωτικής κυκλοποίησης με χρήση  $\text{Hg}(\text{OAc})_2$  ως καταλύτη (**4a-g**), ενώ οι 3 συντέθηκαν μέσω αποπροστασίας ωρονών (**5a-c**). Επιπλέον συντέθηκαν 2 υβριδικές ενώσεις από δημιουργία εστέρων ωρονών και λιποϊκού οξέος (**7a-b**).



Γενική δομή χαλκονών και ωρονών

Μετά από την σύνθεση των ανωτέρω ακολούθησε η λήψη και αποτίμηση των φασμάτων NMR τους, καθώς και η λήψη και ο πλήρης χαρακτηρισμός φασμάτων NMR δύο διαστάσεων τριών αποπροστατευμένων ωρονών.

Επιπροσθέτως, έγιναν *in silico* μελέτες μοριακής πρόσδεσης για τον προσδιορισμό της ικανότητας πρόσδεσης των μορίων σε διαφορετικές μορφές τυροσινάσης, και συνεπώς και την αναστολή της δράσης της. Ένα δεύτερο σκέλος των *in silico* μελετών ήταν η αναζήτηση δομικών τροποποιήσεων πάνω στα ήδη υπάρχοντα μόρια ούτως ώστε να διερευνηθεί ο τρόπος πρόσδεσης των μορίων στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης αλλά και να βελτιωθεί η ισχύς πρόσδεσης των φαρμακευτικών μορίων στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης και συνεπώς η ικανότητα αναστολής της δράσης της.

Αξιολογήθηκε επίσης και η *in vitro* βιολογική δράση των νέων ωρονών με τέσσερεις τρόπους:

Κατά πρώτον, μελετήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των ωρονών **5a-c**, αλλά και μιας φυσικής ωρόνης, της ωρεοσιδίνης, μέσω μέτρησης της ικανότητας δέσμευσης  $\text{H}_2\text{O}_2$  με χρήση της μεθόδου της χημειοφωταύγειας της λουμινόλης αλλά και μέσω μέτρησης της ικανότητας δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH.

Κατά δεύτερον, αξιολογήθηκε το ηλεκτροχημικό προφίλ των ίδιων ωρονών μέσω κυκλικής βολταμετρίας και έγινε συσχέτιση του δυναμικού ανόδου με την αντιοξειδωτική δράση. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν αλλά και μέσω

σύγκρισης αυτών με το γνωστό δυναμικό ανόδου του L(+) ασκορβικού οξέος, το οποίο είναι γνωστό αντιοξειδωτικό, προκύπτει πως οι ωρόνες **5a-c** έχουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση.

Κατά τρίτον, αξιολογήθηκε η αντικαρκινική δράση των **4b-g**, **5a-c** και της ωρεοσιδίνης όσον αφορά την αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων της σειράς HeLa. Από τα αποτελέσματα προκύπτει πως η ωρεοσιδίνη και οι **5a-c** μπορούν να δράσουν ως ικανοί αναστολείς της ανάπτυξης των κυττάρων HeLa και συνεπώς θα ακολουθήσει πιο ενδελεχής μελέτη της αντικαρκινικής δράσης τους.

Εν τέλει, μελετήθηκε η ικανότητα των ωρονών **4f-g** και **5a-c** να αναστέλλουν την δράση της τυροσινάσης από το μανιτάρι *Agaricus Bisporus*. Παρατηρήθηκε πως οι **5b-c** ενισχύουν την δράση της τυροσινάσης, ενώ οι **4f-g** και **5a** μπορούν να δράσουν ως αναστολείς, και να ταξινομηθούν κατά φθίνουσα ανασταλτική ισχύ ως **4g**, **5a** και **4f**.

**Λέξεις κλειδιά:** χαλκόνες, ωρόνες, μελέτες πρόσδεσης, τυροσινάση, βιολογική δράση



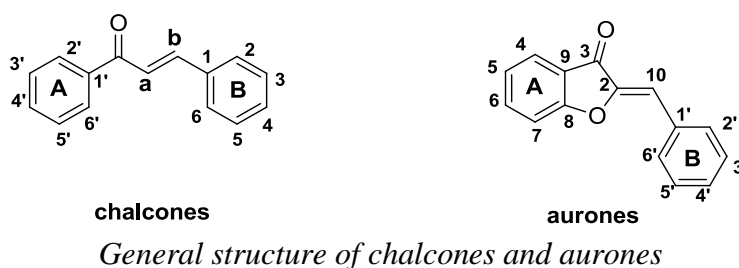
## Abstract

This diploma thesis was conducted in the academic year 2012-2013 at the Laboratory of Organic Chemistry, School of Chemical Engineering at NTUA and deals with the design, synthesis and characterization of new aurones with combined biological activity.

Initially, preliminary *in silico* molecular docking studies were conducted in order to find structural motifs in organic compounds that can lead to the inhibition of the enzyme tyrosinase.

Taking the results of these studies into consideration, it was concluded that the most appropriate compound classes to be synthesized were chalcones and aurones, which also exhibit significant antioxidant activity.

A total of 19 new compounds were synthesized. Of these, 7 were chalcones (**3a-g**), which were synthesized by Claisen-Schmidt condensation reactions between appropriately substituted 2-hydroxy benzaldehydes and acetophenones, 10 were aurones, 7 of which were synthesized by oxidative cyclization of chalcones using  $\text{Hg}(\text{OAc})_2$  as catalyst (**4a-g**), while 3 were synthesized by aurone deprotection (**5a-c**). Moreover, 2 hybrid compounds were synthesized through the creation of aurone-lipoic acid esters (**7a-b**).



The synthesis of the above was followed by characterizing their NMR spectra, as well as completely characterizing the two-dimensional NMR spectra of the three deprotected aurones.

Additionally, *in silico* molecular docking studies were conducted to determine the binding ability of molecules in different tyrosinase forms, thus inhibiting its action. A second part of the *in silico* studies was to search for structural modifications on the existing molecules in order to investigate binding modes of molecules in the tyrosinase active site and to improve the binding strength of pharmaceutical molecules in the active site of the tyrosinase and thus their ability to inhibit it.

Moreover, the *in vitro* biological activity of new aurones was evaluated in four ways:

Firstly, the antioxidant capacity of aurones **5a-c** was studied, as well as that of a natural aurone, aureusidin, by measuring  $\text{H}_2\text{O}_2$  binding ability via the luminol chemiluminescence method and by measuring the capacity to scavenge the free radical DPPH.

Secondly, the electrochemical profiles of the same aurones were evaluated through cyclic voltammetry and the anode potentials were correlated with antioxidant activity. From the results obtained and by comparing these with the known anode potential of L(+) ascorbic acid, which is a known antioxidant, it is shown that aurones **5a-c** have significant antioxidant activity.

Thirdly, the anticancer properties of **4b-g**, **5a-c** and auresidin was evaluated concerning the inhibition of the growth of HeLa cancer cells. The results show that the auresidin and **5a-c** may act as potent inhibitors of the growth of HeLa cells, and therefore more thorough study of their anticancer activity will follow.

Finally, we studied the ability of aurones **4f-g** and **5a-c** to inhibit the activity of tyrosinase taken from mushroom *Agaricus Bisporus*. It was observed that **5b-c** enhance the effect of tyrosinase, while **4f-g** and **5a** can act as inhibitors, and can be ordered with descending inhibitory potency as: **4g**, **5a** and **4f**.

**Key-words:** chalcones, aurones, docking studies, tyrosinase, biological activity

# Περιεχόμενα

<u>Τίτλος</u>	<u>σελ.</u>
Πρόλογος	1
1. Θεωρητικό μέρος / Εισαγωγή	3
1.1. Φυσικά Προϊόντα	3
1.1.1. Εισαγωγή	3
1.1.2. Φλαβονοειδή	3
1.1.2.1. Χαλκόνες	5
1.1.2.2. Ωρόνες	6
1.1.3. Λιποϊκό οξύ	8
1.2. Ταυτοποίηση οργανικών μορίων μέσω φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)	10
1.2.1. Εισαγωγή / Αρχές NMR	10
1.2.2. NMR δυο διαστάσεων (2D-NMR)	12
1.3. Ενδεικτικές θεραπευτικές δράσεις φαρμακευτικών μορίων	15
1.3.1. Παρεμπόδιση ενζύμων	15
1.3.2. Μοριακή προσομοίωση πρόσδεσης φαρμακευτικών μορίων σε ενεργά κέντρα ενζύμων	16
1.3.3. Η τυροσινάση ως υποδοχέας-στόχος	19
1.3.4. Αντικαρκινική δράση φαρμακευτικών μορίων-παρεμπόδιση HDAC-αναστολή ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων	22
2. <i>In silico</i> μελέτη της ικανότητας πρόσδεσης (docking) βιοδραστικών μορίων στο ενεργό κέντρο του ενζύμου τυροσινάση	24
2.1. Εισαγωγή	24
2.1.1. Παράμετροι διεξαγωγής μελετών	24
2.1.2. Οι ενώσεις που υποβλήθηκαν σε μελέτες πρόσδεσης	25
2.2. Αποτελέσματα μελετών μοριακής πρόσδεσης	30
2.2.1. Τρόπος ανάγνωσης των τρισδιάστατων μοντέλων και των διαγραμμάτων αλληλεπιδράσεων	30
2.2.2. Μελέτες ικανότητας πρόσδεσης χαλκονών και αναλόγων τους	30
2.2.3. Μελέτες ικανότητας πρόσδεσης κινολινυλοχαλκονών και αναλόγων τους	33
2.2.4. Μελέτες ικανότητας πρόσδεσης ωρονών	35
2.2.5. Μελέτες ικανότητας πρόσδεσης καρβοξαμιδίων κινολινονών	37
2.3. Συμπεράσματα	38
3. Γενικές μέθοδοι σύνθεσης νέων αναλόγων χαλκονών και ωρονών	39
3.1. Εισαγωγή	39
3.2. Αντιδράσεις συμπύκνωσης Claisen-Schmidt	39
3.3. Αντιδράσεις οξειδωτικής κυκλοποίησης	40
3.4. Αντιδράσεις αποπροστασίας	41
3.5. Αντιδράσεις σχηματισμού εστέρων του λιποϊκού οξέος	41
4. Γενικές μέθοδοι σύνθεσης νέων αναλόγων χαλκονών και ωρονών	42
4.1. Εισαγωγή	42
4.1.1. Γενικά	42
4.1.2. Όργανα και συσκευές	42
4.2. Σύνθεση χαλκονών <b>3a-g</b>	43

4.2.1. (E)-1-(2-υδροξυφαινυλο)-3-(4-μεθοξυφαινυλο)προπ-2-εν-όνη ( <b>3a</b> )	43
4.2.2. (E)-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-1-(2-υδροξυφαινυλο)προπ-2-εν-1-όνη ( <b>3b</b> )	44
4.2.3. (E)-3-(2,3-διμεθοξυφαινυλο)-1-(2-υδροξυφαινυλο)προπ-2-εν-1-όνη ( <b>3c</b> )	45
4.2.4. (E)-1-(5-βρωμο-2-υδροξυφαινυλο)-3-(3,4-διμεθοξυλοφαινυλο)προπ-2-εν-1-όνη ( <b>3d</b> )	45
4.2.5. (E)-1-(5-βρωμο-2-υδροξυφαινυλο)-3-(2,3-διμεθοξυλοφαινυλο)προπ-2-εν-1-όνη ( <b>3e</b> )	46
4.2.6. (E)-4-(3-(5-χλωρο-2-υδροξυφαινυλο)-3-οξοπροπ-1-εν-1-υλ)βενζοϊκό οξύ ( <b>3f</b> )	46
4.2.7. (E)-4-(3-2-υδροξυλφαινυλο)-3-οξοπροπ-1-εν-1-υλ)βενζοϊκό οξύ ( <b>3g</b> )	47
4.3. Σύνθεση ωρονών <b>4a-g</b>	48
4.3.1. (Z)-2-(4-μεθοξυβενζυλιδενο)βενζοφουραν-3(2H)-όνη ( <b>4a</b> )	48
4.3.2. (Z)-2-(3,4-διμεθοξυβενζυλιδενο)βενζοφουραν-3(2H)-όνη ( <b>4b</b> )	48
4.3.3. (Z)-2-(2,3-διμεθοξυβενζυλιδενο)βενζοφουραν-3(2H)-όνη ( <b>4c</b> )	49
4.3.4. (Z)-5-βρωμο-2-(3,4-διμεθοξυβενζυλιδενο)βενζοφουραν-3(2H)-όνη ( <b>4d</b> )	50
4.3.5. (Z)-5-χλωρο-2-(2,3-διμεθοξυβενζυλιδενο)βενζοφουραν-3(2H)-όνη ( <b>4e</b> )	50
4.3.6. (Z)-4-((5-χλωρο-3-οξοβενζοφουραν-2(3H)-υλιδενο)μεθυλοβενζοϊκό οξύ ( <b>4f</b> )	51
4.3.7. (Z)-4-((3-οξοβενζοφουραν-2(3H)υλιδενο)μεθυλοβενζοϊκό οξύ ( <b>4g</b> )	51
4.4. Σύνθεση ωρονών <b>5a-c</b>	52
4.4.1. (Z)-2-(4-υδροξυβενζυλιδενο)βενζοφουραν-3(2H)-όνη ( <b>5a</b> )	52
4.4.2. (Z)-2-(3,4-διυδροξυβενζυλιδενο)βενζοφουραν-3(2H)-όνη ( <b>5b</b> )	53
4.4.3. (Z)-2-(3,4-διυδροξυβενζυλιδενο)βενζοφουραν-3(2H)-όνη ( <b>5c</b> )	53
4.5. Σύνθεση υβριδικών μορίων <b>7a-b</b>	54
4.5.1. 5-(1,2-διθειολαν-3-υλ)πεντανοϊκός (Z)-4-((3-οξοβενζοφουραν-2(3H)-υλιδενο)μεθυλο)φαινυλεστέρας ( <b>7a</b> )	54
4.5.2. δις(5-(1,2-διθειολαν-3-υλ)πεντανοϊκός) (Z)-3-((3-οξοβενζοφουραν-2(3H)-υλιδενο)μεθυλο)-1,2-φαινυλεστέρας ( <b>7b</b> )	55
5. Φασματοσκοπική μελέτη των νέων αναλόγων χαλκονών και ωρονών μέσω NMR	56
5.1. Εισαγωγή	56
5.2. Ενδεικτική παράθεση και σχολιασμός 1D-NMR φασμάτων	56
5.2.1. Φασματοσκοπική μελέτη της ωρόνης <b>4e</b>	56
5.2.2. Φασματοσκοπική μελέτη του υβριδικού μορίου <b>7b</b>	58
5.3. Πλήρης ταυτοποίηση των ωρονών 5a-c μέσω 2D-NMR	59
5.3.1. Φασματοσκοπική μελέτη της ωρόνης <b>5a</b>	59
5.3.2. Φασματοσκοπική μελέτη της ωρόνης <b>5b</b>	67
5.3.3. Φασματοσκοπική μελέτη της ωρόνης <b>5c</b>	75
6. <i>In silico</i> μελέτη ικανότητας πρόσδεσης νέων χαλκονών και ωρονών και νέες προτάσεις για βελτίωση	83
6.1. Εισαγωγή	56
6.1.1. Γενικά	83
6.1.2. Παράμετροι διεξαγωγής μελετών	83

6.1.3. Οι πρωτεΐνες-υποδοχείς	83
6.2. <i>In silico</i> μελέτες πρόσδεσης σε μόρια που έχουν συντεθεί στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας ΕΜΠ	85
6.2.1. Επιλογή υπό μελέτη ενώσεων	85
6.2.2. Πρόσδεση σε τυροσινάση από τον <i>Streptomyces castaneoglobisporus</i> (1WX2)	86
6.2.3. Πρόσδεση σε τυροσινάση από τον <i>Bacillus megaterium</i> (3NM8)	86
6.2.4. Πρόσδεση σε τυροσινάση από τον <i>Agaricus bisporus</i> (2Y9X)	89
6.3. Προτάσεις για νέες δομές με βελτιωμένη ικανότητα πρόσδεσης	92
6.3.1. Νέες προτεινόμενες δομές	92
6.3.2. Υποδοχείς και παράμετροι διεξαγωγής μελετών	94
6.3.3. Πρόσδεση σε τυροσινάση από τον <i>Streptomyces castaneoglobisporus</i> (1WX2)	94
6.3.4. Πρόσδεση σε τυροσινάση από τον <i>Bacillus megaterium</i> (3NM8)	97
6.3.5. Πρόσδεση σε τυροσινάση από τον <i>Agaricus bisporus</i> (2Y9X)	100
6.4. Αναλυτικοί πίνακες αποτελεσμάτων <i>in silico</i> μελετών	104
6.4.1. Εισαγωγή – επεξηγηματικό υπόμνημα	104
6.4.2. Αναλυτικά αποτελέσματα <i>in silico</i> μελετών πρόσδεσης	105
6.5. Συμπεράσματα	112
7. <i>In vitro</i> αξιολόγηση βιολογικής δράσης των νέων ενώσεων	113
7.1. Αντιοξειδωτική δράση νέων ενώσεων	113
7.1.1. Εισαγωγή	113
7.1.2. Μέθοδος χημειοφωταύγειας	113
7.1.3. Μέθοδος DPPH	115
7.1.4. Πειραματικό μέρος	116
7.1.4.1. Υπολογισμός της ικανότητας δέσμευσης του H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> με την μέθοδο της χημειοφωταύγειας της λουμινόλης	116
7.1.4.2. Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής δράσης ενάντια στην ελεύθερη ρίζα DPPH	117
7.1.5. Αποτελέσματα μετρήσεων	117
7.1.6. Συζήτηση αποτελεσμάτων - συμπεράσματα	117
7.2. Ηλεκτροχημικό προφίλ ωρονών	118
7.2.1. Εισαγωγή	118
7.2.2. Συσχέτιση ηλεκτροχημικού προφίλ με αντιοξειδωτικές δράσεις	118
7.2.3. Πειραματικό μέρος	118
7.2.4. Αποτελέσματα μετρήσεων	119
7.2.5. Συζήτηση αποτελεσμάτων - συμπεράσματα	119
7.3. Αντικαρκινική δράση ωρονών	121
7.3.1. Εισαγωγή	121
7.3.2. Αποτελέσματα μετρήσεων	121
7.3.3. Συζήτηση αποτελεσμάτων	122
7.3.4. Συμπεράσματα	122
7.4. <i>In vitro</i> μελέτη της ικανότητας αναστολής της τυροσινάσης	123
7.4.1. Εισαγωγή	123
7.4.2. Προετοιμασία ενζύμου	123
7.4.3. Πειραματική διαδικασία	123
7.4.4. Αποτελέσματα μετρήσεων	123

7.4.5. Συζήτηση αποτελεσμάτων	124
8. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα	126
Βιβλιογραφία	127
Παράρτημα I: Φάσματα NMR	131
Παράρτημα II: Κυκλικά Βολταμμογραφήματα	140
Παράρτημα III: Δομές / Πληροφορίες πρωτεϊνών	148

## Ευρετήριο Πινάκων

A/A	Τίτλος	Σελ.
1	Χαλκόνες και ανάλογά τους	25-26
2	Κινολινυλοχαλκόνες και ανάλογά τους	26-27
3	Ωρόνες	28
4	Καρβοξαμίδια κινολινονών	28-29
5	Σήματα $^1\text{H}$ της <b>5a</b>	59
6	Σήματα $^{13}\text{C}$ της <b>5a</b>	59
7	Συσχετίσεις σημάτων όπως προέκυψαν από το πείραμα COSY για την <b>5a</b>	60
8	Συσχετίσεις σημάτων όπως προέκυψαν από το πείραμα HSQC για την <b>5a</b>	60
9	Συσχετίσεις σημάτων όπως προέκυψαν από το πείραμα HMBC για την <b>5a</b>	60
10	Αντιστοιχίσεις σημάτων NMR σε θέσεις στο μόριο της <b>5a</b>	61
11	Σήματα $^1\text{H}$ της <b>5b</b>	67
12	Σήματα $^{13}\text{C}$ της <b>5b</b>	67
13	Συσχετίσεις σημάτων όπως προέκυψαν από το πείραμα COSY για την <b>5b</b>	67
14	Συσχετίσεις σημάτων όπως προέκυψαν από το πείραμα HSQC για την <b>5b</b>	68
15	Συσχετίσεις σημάτων όπως προέκυψαν από το πείραμα HMBC για την <b>5b</b>	68
16	Αντιστοιχίσεις σημάτων NMR σε θέσεις στο μόριο της <b>5b</b>	69
17	Σήματα $^1\text{H}$ της <b>5b</b>	75
18	Σήματα $^{13}\text{C}$ της <b>5b</b>	75
19	Συσχετίσεις σημάτων όπως προέκυψαν από το πείραμα COSY για την <b>5b</b>	76
20	Συσχετίσεις σημάτων όπως προέκυψαν από το πείραμα HSQC για την <b>5b</b>	76
21	Συσχετίσεις σημάτων όπως προέκυψαν από το πείραμα HMBC για την <b>5b</b>	76
22	Αντιστοιχίσεις σημάτων NMR σε θέσεις στο μόριο της <b>5b</b>	77
23	Τα μόρια που υποβλήθηκαν σε μελέτες <i>in silico</i> docking	85
24	Προτεινόμενες δομές προς υποβολή σε <i>in silico</i> μελέτες πρόσδεσης	92-93
25	Αποτελέσματα <i>in silico</i> μελετών πρόσδεσης μορίων στην 1WX2	105
26	Αποτελέσματα <i>in silico</i> μελετών πρόσδεσης μορίων στην 3NM8	106
27	Αποτελέσματα <i>in silico</i> μελετών πρόσδεσης μορίων στην 2Y9X	107
28	Αποτελέσματα <i>in silico</i> μελετών πρόσδεσης προτεινόμενων μορίων στην 1WX2	108
29	Αποτελέσματα <i>in silico</i> μελετών πρόσδεσης προτεινόμενων μορίων στην 3NM8	109-110
30	Αποτελέσματα <i>in silico</i> μελετών πρόσδεσης προτεινόμενων μορίων στην 2Y9X	110-111
31	Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης των ωρονών <b>5a-c</b>	117
32	Ανοδικά ( $E_{pa}$ ) και καθοδικά ( $E_{pc}$ ) δυναμικά των ωρονών (σε mV)	119
33	Αποτελέσματα αντικαρκινικής δράσης...	121
34	Αποτελέσματα αναστολής της δράσης της τυροσινάσης	124

## Ευρετήριο Σχημάτων

A/A	Τίτλος	Σελ.
1	Βασικές δομές συνήθων υποκατηγοριών των φλαβονοειδών	4
2	Ανασκόπηση της βιοσύνθεσης χαλκονών (I) και δ'-δεοξυχαλκονών (II)...	5
3	Παράδειγμα συμπύκνωσης Claisen-Schmidt	6
4	Δομές της ωρεοσιδίνης (1), σουλφουρετίνης (2) και μαριτιμετίνης (3)	7
5	Παράδειγμα οξειδωτικής κυκλοποίησης με χρήση Hg(OAc) <sub>2</sub>	7
6	Οι δομές του R- και S-α- λιποϊκού οξέος	8
7	Δομές υβριδικών μορίων λιποϊκού οξέος με (1): trolox, (2):κινολινόνη	9
8	Το βιοσυνθετικό μονοπάτι της μελανίνης...	21
9	Σύνθεση των χαλκονών <b>3a-g</b>	39
10	Σύνθεση των ωρονών <b>4a-g</b>	40
11	Σύνθεση των ωρονών <b>5a-c</b>	41
12	Σύνθεση των υβριδικών μορίων <b>7a-b</b>	42
13	Χημικός τύπος της <b>3a</b>	43
14	Χημικός τύπος της <b>3b</b>	44
15	Χημικός τύπος της <b>3c</b>	45
16	Χημικός τύπος της <b>3d</b>	45
17	Χημικός τύπος της <b>3e</b>	46
18	Χημικός τύπος της <b>3f</b>	46
19	Χημικός τύπος της <b>3g</b>	47
20	Χημικός τύπος της <b>4a</b>	48
21	Χημικός τύπος της <b>4b</b>	48
22	Χημικός τύπος της <b>4c</b>	49
23	Χημικός τύπος της <b>4d</b>	50
24	Χημικός τύπος της <b>4e</b>	50
25	Χημικός τύπος της <b>4f</b>	51
26	Χημικός τύπος της <b>4g</b>	51
27	Χημικός τύπος της <b>5a</b>	52
28	Χημικός τύπος της <b>5b</b>	53
29	Χημικός τύπος της <b>5c</b>	53
30	Χημικός τύπος της <b>7a</b>	54
31	Χημικός τύπος της <b>7b</b>	55
32	Χημικός τύπος της <b>5a</b> με αρίθμηση των θέσεων στο μόριο	59
33	Χημικός τύπος της <b>5b</b> με αρίθμηση των θέσεων στο μόριο	67
34	Χημικός τύπος της <b>5c</b> με αρίθμηση των θέσεων στο μόριο	75
35	Αντίδραση Fenton	113
36	Οι αντιδράσεις που συμβαίνουν κατά τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας της λουμινόλης	114
37	Η δομή της ωρόνης <b>Ω</b> (ωρεοσιδίνη)	119



## Ευρετήριο Εικόνων

A/A	Τίτλος	Σελ.
1	Κυτταρικά μονοπάτια για την βιολογική αναγωγή του α-λιποϊκού οξέος προς διυδρολιποϊκό οξύ...	8
2	Παράδειγμα σύζευξης σπιν-σπιν...	12
3	Ταξινόμηση των πειραμάτων 2D-NMR	13
4	Παράδειγμα φάσματος COSY-NMR...	14
5	Παράδειγμα φάσματος HSQC-NMR...	15
6	Το ενεργό κέντρο ενός μορίου oxy-τυροσινάσης...	20
7	Αλληλεπίδραση των ιόντων χαλκού στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X	24
8	Πρόσδεση της ένωσης <b>X12</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X...	30
9	Πρόσδεση της ένωσης <b>X18</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X...	31
10	Πρόσδεση της ένωσης <b>X39</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X...	31
11	Πρόσδεση της ένωσης <b>X27</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X...	32
12	Πρόσδεση της ένωσης <b>KX4</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X...	33
13	Πρόσδεση της ένωσης <b>KX25</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X...	34
14	Πρόσδεση της ένωσης <b>KX13</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X...	34
15	Πρόσδεση της ένωσης <b>Ω4</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X...	35
16	Πρόσδεση της ένωσης <b>Ω11</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X...	36
17	Πρόσδεση της ένωσης <b>Ω5</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X...	36
18	Πρόσδεση της ένωσης <b>KK19</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X...	37
19	Πρόσδεση της ένωσης <b>KK27</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X...	38
20	Πρόσδεση της ένωσης <b>KK16</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X...	38
21	Το <sup>1</sup> H NMR φάσμα της ωρόνης <b>4e</b>	56
22	Το <sup>13</sup> C NMR φάσμα της ωρόνης <b>4e</b>	57
23	Το <sup>1</sup> H NMR φάσμα της ένωσης <b>7b</b>	57
24	Το <sup>13</sup> C NMR φάσμα της ένωσης <b>7b</b>	58
25	Φάσμα <sup>1</sup> H της ωρόνης <b>5a</b>	62
26	Λεπτομέρεια φάσματος <sup>1</sup> H της ωρόνης <b>5a</b>	62
27	Φάσμα <sup>13</sup> C της ωρόνης <b>5a</b>	63
28	Λεπτομέρεια φάσματος <sup>13</sup> C της ωρόνης <b>5a</b>	63
29	Φάσμα COSY ( <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H) της ωρόνης <b>5a</b>	64
30	Λεπτομέρεια φάσματος COSY ( <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H) της ωρόνης <b>5a</b>	64
31	Φάσμα HSQC ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C) της ωρόνης <b>5a</b>	65
32	Λεπτομέρεια φάσματος HSQC ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C) της ωρόνης <b>5a</b>	65
33	Φάσμα HMBC ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C) της ωρόνης <b>5a</b>	66
34	Λεπτομέρεια φάσματος HMBC ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C) της ωρόνης <b>5a</b>	66

A/A	Τίτλος	Σελ.
35	Φάσμα $^1\text{H}$ της ωρόνης <b>5b</b>	70
36	Λεπτομέρεια φάσματος $^1\text{H}$ της ωρόνης <b>5b</b>	70
37	Φάσμα $^{13}\text{C}$ της ωρόνης <b>5b</b>	71
38	Λεπτομέρεια φάσματος $^{13}\text{C}$ της ωρόνης <b>5b</b>	71
39	Φάσμα COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) της ωρόνης <b>5b</b>	72
40	Λεπτομέρεια φάσματος COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) της ωρόνης <b>5b</b>	72
41	Φάσμα HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) της ωρόνης <b>5b</b>	73
42	Λεπτομέρεια φάσματος HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) της ωρόνης <b>5b</b>	73
43	Φάσμα HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) της ωρόνης <b>5b</b>	74
44	Λεπτομέρεια φάσματος HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) της ωρόνης <b>5b</b>	74
45	Φάσμα $^1\text{H}$ της ωρόνης <b>5c</b>	78
46	Λεπτομέρεια φάσματος $^1\text{H}$ της ωρόνης <b>5c</b>	78
47	Φάσμα $^{13}\text{C}$ της ωρόνης <b>5c</b>	79
48	Λεπτομέρεια φάσματος $^{13}\text{C}$ της ωρόνης <b>5c</b>	79
49	Φάσμα COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) της ωρόνης <b>5c</b>	80
50	Λεπτομέρεια φάσματος COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) της ωρόνης <b>5c</b>	80
51	Φάσμα HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) της ωρόνης <b>5c</b>	81
52	Λεπτομέρεια φάσματος HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) της ωρόνης <b>5c</b>	81
53	Φάσμα HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) της ωρόνης <b>5c</b>	82
54	Λεπτομέρεια φάσματος HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) της ωρόνης <b>5c</b>	82
55	Το ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 1WX2	84
56	Το ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 3NM8	84
57	Πόζα πρόσδεσης της <b>5c</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 1WX2...	86
58	Πόζα πρόσδεσης της <b>7x</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 1WX2...	86
59	Πρόσδεση της ένωσης <b>4g</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 3NM8...	87
60	Πρόσδεση της ένωσης <b>4g</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 3NM8...	88
61	Πόζα πρόσδεσης της <b>5b</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 3NM8...	88
62	Πόζα πρόσδεσης της <b>5c</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 3NM8...	88
63	Πόζα πρόσδεσης της <b>7a</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 3NM8...	89
64	Πρόσδεση της ένωσης <b>4g</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X...	89
65	Πρόσδεση της ένωσης <b>4g</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X...	90
66	Πρόσδεση της ένωσης <b>5b</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X...	90
67	Πρόσδεση της ένωσης <b>5a</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X...	91
68	Πρόσδεση της ένωσης <b>5c</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X...	91
69	Πόζα πρόσδεσης της ένωσης <b>10b</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 1WX2...	95
70	Πόζα πρόσδεσης της ένωσης <b>10x</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 1WX2...	95
71	Πόζα πρόσδεσης της <b>9c</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 1WX2...	96
72	Πόζα πρόσδεσης της <b>5b</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 1WX2...	96
73	Πόζα πρόσδεσης της ένωσης <b>12c</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 1WX2...	96
74	Πόζα πρόσδεσης της ένωσης <b>12d</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 1WX2...	96
75	Πόζα πρόσδεσης της ένωσης <b>10x</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 3NM8...	98
76	Πόζα πρόσδεσης της ένωσης <b>10b</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 3NM8...	98

A/A	Τίτλος	Σελ.
77	Πόζα πρόσδεσης της ένωσης <b>12d</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 3NM8 (καλύτερο σκορ πρόσδεσης)...	99
78	Πόζα πρόσδεσης της ένωσης <b>12d</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 3NM8 (χειρότερο σκορ πρόσδεσης)...	99
79	Πρόσδεση της ένωσης <b>11e</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 3NM8...	99
80	Πρόσδεση της ένωσης <b>11e</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 3NM8...	100
81	Πρόσδεση της ένωσης <b>10x</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X...	101
82	Πρόσδεση της ένωσης <b>10a</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X...	102
83	Πόζα πρόσδεσης της ένωσης <b>12d</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 3NM8 (καλύτερο σκορ πρόσδεσης)...	102
84	Πόζα πρόσδεσης της ένωσης <b>12d</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 3NM8 (χειρότερο σκορ πρόσδεσης)...	102
85	Πρόσδεση της ένωσης <b>9b</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X...	103
86	Πρόσδεση της ένωσης <b>12b</b> στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X...	103
87	Η αντίδραση αποχρωματισμού του DPPH	115
88	Κυκλικά βολταμμογραφήματα του μορίου <b>5b</b> σε ρυθμιστικά διαλύματα...	120
89	Επίδραση της συγκέντρωσης αναστολέα στην % εναπομείνασα δραστικότητα της τυροσινάσης...	124



# Πρόλογος

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ κατά το ακαδημαϊκό έτος 2012-2013 υπό την επίβλεψη της Δρ. Α. Δέτση, Επίκουρης Καθηγήτριας ΕΜΠ. Οι *in silico* μελέτες μοριακής πρόσδεσης πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Μοριακής Ανάλυσης του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας & Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών υπό την επίβλεψη του Δρ. Παναγιώτη Ζουμπουλάκη, Ερευνητή Γ'.

Για την πραγματοποίηση της παρούσας ερευνητικής εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω:

- Την υπεύθυνη, Δρ. Αναστασία Δέτση Επίκουρη Καθηγήτρια ΕΜΠ, για την ανάθεση της διπλωματικής εργασίας, για την άποψη συνεργασία, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για την πολύτιμη καθοδήγηση και βοήθεια που μου προσέφερε σε όλη την διάρκεια της εκπόνησης αυτής της εργασίας.
- Τον Δρ. Παναγιώτη Ζουμπουλάκη, Ερευνητή Γ' στο ΕΙΕ, για την πολύτιμη καθοδήγηση και βοήθειά του πάνω στις *in silico* μελέτες μοριακής πρόσδεσης και το NMR.
- Την Κα. Ευτυχία Κρίτση, μεταπτυχιακή φοιτήτρια, για την βοήθειά της κατά την εκπόνηση των μελετών μοριακής πρόσδεσης.
- Την Κα. Μαρίνα Ρουσσάκη και την Κα. Ανδρομάχη Τζάνη, υποψήφιος διδάκτορες στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του ΕΜΠ για την άποψη συνεργασία και πολύτιμη βοήθεια κατά την σύνθεση νέων ενώσεων και την λήψη των NMR φασμάτων τους.
- Την Κα. Όλγα Σερίφη, υποψήφια διδάκτορα στο Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας ΕΜΠ για την *in vitro* μελέτη του ηλεκτροχημικό προφίλ των νέων ενώσεων.
- Τους Δρ. Παναγιώτη Κεφάλα, ερευνητή και συντονιστή του προγράμματος MAICh, και Κο. Boris Petrushevski, φοιτητή, του Τμήματος Ποιότητας Τροφίμων και Χημείας Φυσικών Προϊόντων στο Μεσογειακό Αγρονομικό Ινστιτούτο Χανίων / Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes για την *in vitro* μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης των νέων ενώσεων.
- Τον Δρ. Χαράλαμπο Σταμάτη, Καθηγητή στο Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών της Σχολής Επιστημών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την *in vitro* μελέτη της ικανότητας αναστολής της τυροσινάσης από τις νέες ενώσεις.
- Την Δρ. Muriel Cuendet, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακογνωσίας στην Σχολή Φαρμακευτικών Επιστημών του Πανεπιστημίου της Γενεύης για την *in vitro* μέτρηση της αντικαρκινικής δράσης των νέων ενώσεων.



# 1.Θεωρητικό μέρος / Εισαγωγή

## 1.1. Φυσικά Προϊόντα

### 1.1.1.Εισαγωγή

Ως φυσικά προϊόντα ορίζονται χημικές ενώσεις ή ουσίες που παράγονται από ένα ζωντανό οργανισμό ή που βρίσκονται στη φύση, οι οποίες συνήθως έχουν φαρμακολογική ή βιολογική δραστηριότητα για χρήση στην ανακάλυψη και το σχεδιασμό φαρμάκων. Ως φυσικό προϊόν μπορεί να χαρακτηριστεί μια τέτοια ουσία ακόμη και αν μπορεί να παρασκευασθεί με ολική σύνθεση [1].

### 1.1.2.Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι μια ομάδα φαινολικών ενώσεων που μοιράζονται κοινά δομικά χαρακτηριστικά και φυσικοχημικές ιδιότητες, οι οποίες είναι σημαντικές για την βιολογική τους δράση. Ο όρος "φλαβονοειδή" χρησιμοποιείται γενικά για να περιγράψει μια ευρεία ομάδα φυσικών προϊόντων που περιλαμβάνουν ένα πλαίσιο άνθρακα C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, το οποίο διαθέτει φαινυλβενζοπυρανοζική λειτουργικότητα (phenylbenzopyran functionality) [1].

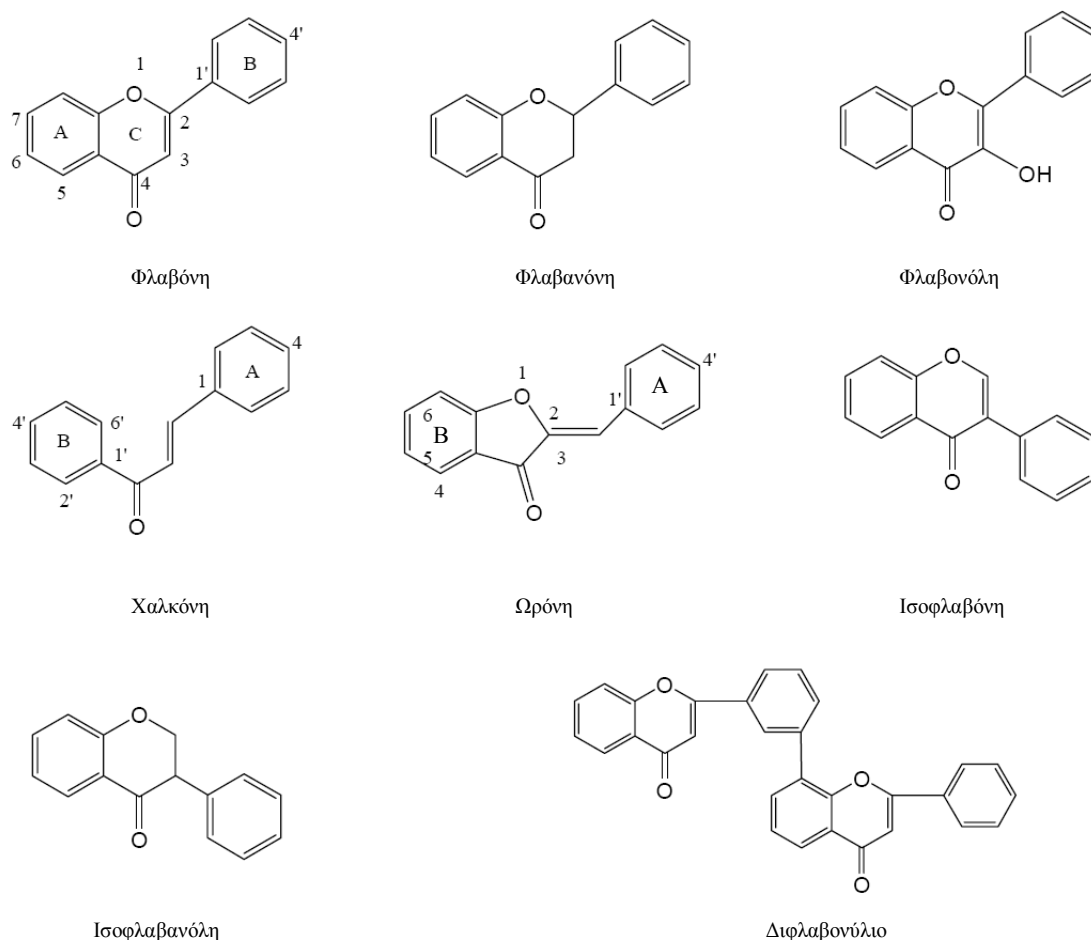
Τα φλαβονοειδή, ευρίσκονται ευρέως στο φυτικό βασίλειο, είναι μία από τις πιο αντιπροσωπευτικές οικογένειες δευτερογενών μεταβολιτών και εμφανίζουν μια αξιοσημείωτη γκάμα βιολογικών δραστηριοτήτων [2]. Τα φλαβονοειδή έχουν λάβει ιδιαίτερη προσοχή κατά τις τελευταίες δεκαετίες, επειδή φαίνεται να έχουν ευρύ φάσμα δραστηριότητας όσον αφορά την άμυνα των φυτών αλλά και όσον αφορά την υγεία του ανθρώπου, όπως αντιαλλεργική, αντιφλεγμονώδη, αντιθρομβωτική, αντικαρκινική, αντιϊική και αντιοξειδωτική δράση. Επίσης έχουν εξεταστεί και για δραστηριότητα ενάντια στον HIV [1,3].

Ιστορικά, οι ευεργετικές επιδράσεις των φλαβονοειδών πιστευόταν ότι οφείλεται στην αντιοξειδωτική ικανότητά τους. Κατά συνέπεια, η ικανότητά τους να δρουν ως δότες υδρογόνου, χρησιμοποιείται για να εξηγήσει τις προστατευτικές επιδράσεις τους κατά νόσων που σχετίζονται με οξειδωτικό στρες. Για παράδειγμα, τα φλαβονοειδή έχουν αποδειχθεί πως δρουν ως κλασικοί δότες ηλεκτρονίων (ή υδρογόνων), ως δεσμευτές των δραστικών μορίων, και ως αναστολείς της οξείδωσης των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας και του DNA. Παρά το γεγονός ότι τα φλαβονοειδή έχουν ταυτοποιηθεί ως ισχυρά αντιοξειδωτικά *in vitro*, η ικανότητά τους να δρουν ως αποτελεσματικά αντιοξειδωτικά *in vivo* μετά την κατανάλωσή τους εξαρτάται από την έκταση της βιομετατροπής τους κατά την απορρόφησή τους από το γαστρεντερικό σωλήνα, στο ήπαρ και, τέλος, στα κύτταρα. Μετά από την κατάποση και κατά την απορρόφηση, τα φλαβονοειδή μεταβολίζονται εκτενώς, με αποτέλεσμα τη σημαντική μεταβολή των δυναμικών οξειδοαναγωγής τους [4].

Σχετικά με την αντικαρκινική τους δράση σημειώνεται πως έχουν αναγνωριστεί κάποιοι μοριακοί μηχανισμοί της δράσης τους, όπως η αδρανοποίηση των καρκινογόνων, η άρση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, η αναστολή του κυτταρικού κύκλου, η επαγωγή της απόπτωσης και διαφοροποίησης, η αναστολή της αγγειογένεσης, η αντιοξειδωτική δράση και η αναστροφή της αντίστασης σε μίγματα φαρμάκων. Επίσης, ορισμένα φλαβονοειδή έχουν εισέλθει σε κλινικές δοκιμές [2].

Τα φλαβονοειδή, έχουν ερευνηθεί τα τελευταία χρόνια με μεγάλη προσοχή για να διερευνηθεί η ικανότητά τους να δράσουν ως νευροπροστατευτικοί παράγοντες. Έχει προταθεί πως ασκούν ένα ευρύ φάσμα από νευροπροστατευτικές δράσεις εντός του

εγκεφάλου, συμπεριλαμβανομένης της δυνατότητας για την προστασία των νευρώνων έναντι της ζημίας που προκαλείται από νευροτοξίνες, της ικανότητα να καταστέλλουν φλεγμονές των νευρών, και πιθανή ικανότητα ενίσχυσης της μνήμης, της μάθησης και των γνωστικών λειτουργιών. Αυτές οι επιδράσεις φαίνεται να στηρίζονται σε δύο κοινές διεργασίες. Πρώτον, τα φλαβονοειδή είναι ικανά να αλληλεπιδράσουν με κρίσιμες αλληλουχίες σηματοδότησης κινασών πρωτεϊνών και λιπιδίων στον εγκέφαλο, κάτι που οδηγεί στην αναστολή της απόπτωσης που προκαλείται από νευροτοξικά είδη και σε προαγωγή της νευρωνικής επιβίωσης και της συναπτικής πλαστικότητας. Δεύτερον, επάγουν ευεργετικά αποτελέσματα στο αγγειακό σύστημα, οδηγώντας σε μεταβολές στην αγγειακή εγκεφαλική ροή του αίματος συνεπώς προκαλώντας αγγειογένεση, νευρογένεση και αλλαγές στην νευρωνική μορφολογία [4].



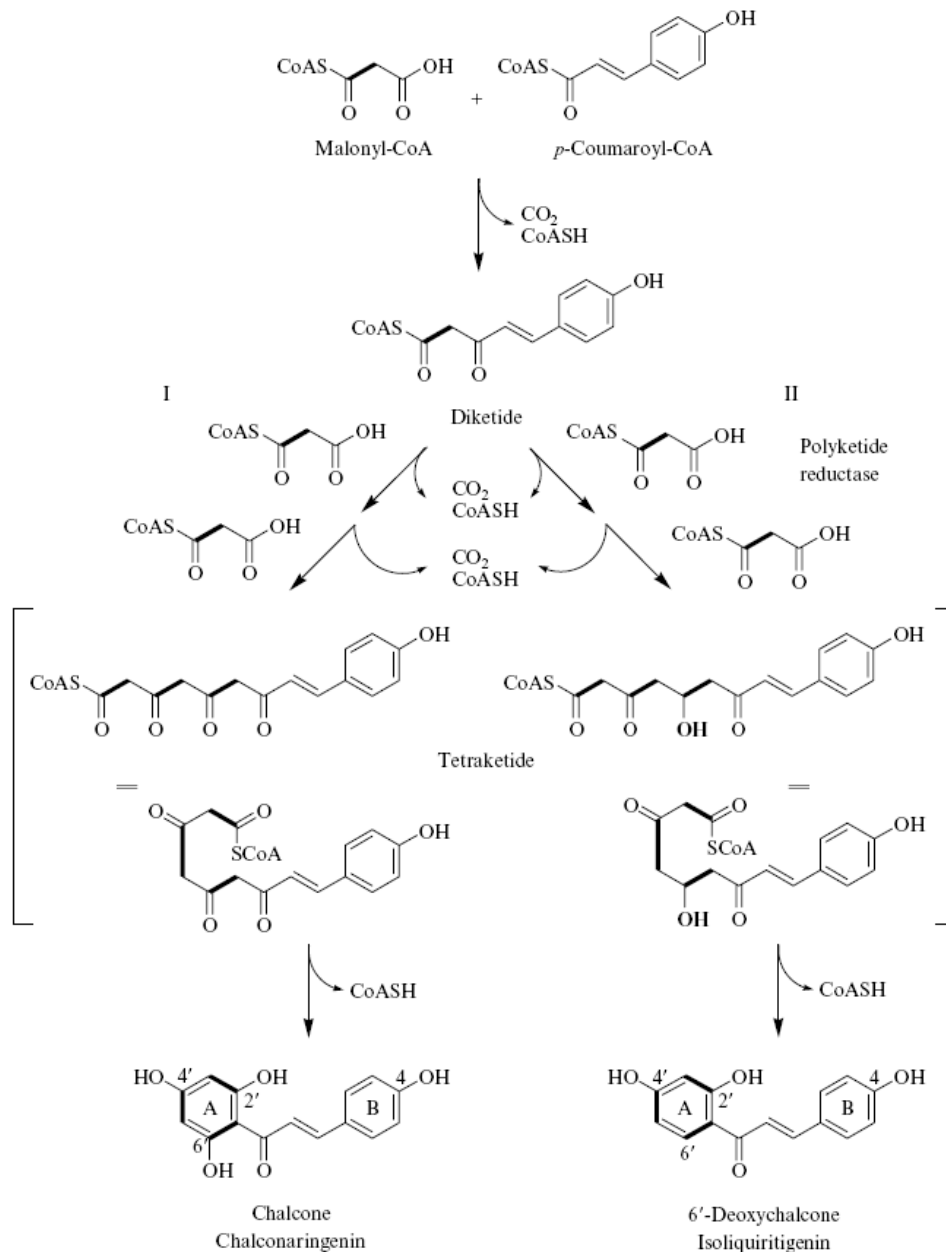
Σχήμα 1: Βασικές δομές συνήθων υποκατηγοριών των φλαβονοειδών [1]

Ειδικού επιστημονικού ενδιαφέροντος είναι δυο κατηγορίες φλαβονοειδών, οι χαλκόνες και οι ωρόνες. Οι χαλκόνες και οι ωρόνες είναι δύο διακριτές κατηγορίες ενώσεων που περιλαμβάνουν περισσότερα από 600 από όλα τα φυσικώς απαντώμενα φλαβονοειδή που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία. Από ιστορική άποψη, οι χαλκόνες και οι ωρόνες είναι καλύτερα γνωστές ως οι κίτρινες έως πορτοκαλί χρωστικές στο λουλούδι ορισμένων ειδών *Coreopsis* και άλλα άνθη του γένους *Asteraceae*. Την ίδια στιγμή όμως, είναι μεγάλης βιοσυνθετικής σημασίας καθώς είναι άμεσοι πρόδρομοι όλων των άλλων κατηγοριών φλαβονοειδών. [5]



### 1.1.2.1. Χαλκόνες

Οι χαλκόνες (1,3-διαφυλ-2-προπεν-1-όνες, δομή παρουσιάζεται στο σχήμα 1) είναι μια σημαντική ομάδα φυσικών προϊόντων, θεωρούνται οι κύριοι πρόδρομοι του πλαισίου ανθράκων C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> και αποτελούν σημαντικά ενδιάμεσα στη σύνθεση των φλαβονοειδών. Το χαρακτηριστικό που διακρίνει τις χαλκόνες από άλλα φλαβονοειδή είναι η δομή ανοιχτής αλυσίδας τριών ανθράκων που συνδέει τους δύο αρωματικούς δακτυλίους αντί τρίτου ετεροκυκλικού δακτυλίου. Η δομή χαλκόνης περιέχει μια αρωματική κετόνη που αποτελεί τον κεντρικό πυρήνα για μια ποικιλία σημαντικών βιολογικών ενώσεων [1,5].

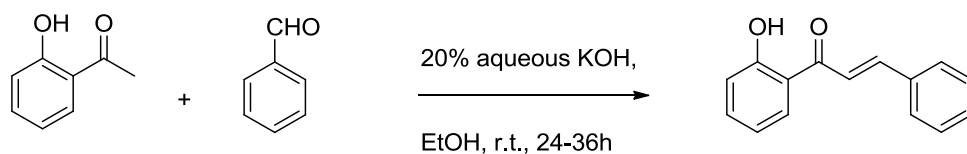


Σχήμα 2: Ανασκόπηση της βιοσύνθεσης χαλκονών (I) και 6'-δεοξυχάλκονών (II). Η διαδοχική συμπίκνωση τριών μορίων μαλόνυλ-CoA και p-κουμαρόνυλ-CoA καταλύεται μέσω του ενζύμου συνθάση της χαλκόνης (chalcone synthase). Η παραγωγή των 6'-δεοξυχάλκονών περιλαμβάνει ένα στάδιο αναγωγής στο στάδιο των τρι- ή τετρακετιδίων από την αναγωγή των πολυκετιδίων (polyketide reductase). Όπου CoA: συνένζυμο A [5]

Οι χαλκόνες και τα παράγωγά τους παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα των φαρμακολογικών δράσεων, συμπεριλαμβανομένης αντιοξειδωτικής, ανθελονοσιακής, αντι-φλεγμονώδους, αντιλείσμανιακής, αντιαγγειογενεσιακής, αντι-μολυσματικής, αντιμυκητιακής, αντιβακτηριακής, αντικαρκινικής, αντι-HIV, και αντι-αλλεργικής δράσης [3,6,7,8,9]. Πολλά παράγωγα χαλκονών έχουν εξεταστεί σχετικά με την αντικαρκινική τους δράση και έχουν βρεθεί να παρουσιάζουν ισχυρές αντικαρκινικές ιδιότητες, με διάφορους τρόπους, όπως παρεμποδίζοντας ένζυμα σχετιζόμενα με τον καρκίνο, ή παρουσιάζοντας κυτταροτοξικότητα και αναστολή της ανάπτυξης ενάντια σε καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων από καρκίνους στις ωοθήκες, στο στομάχι, στο δέρμα και στο στήθος, ή παρεμποδίζοντας μεταγραφικούς παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη του καρκίνου σε συνθήκες απουσίας οξυγόνου [6,7,8,10]. Επίσης, ο πυρήνας των χαλκονών έχει χρησιμοποιηθεί ως αντιοξειδωτικό σε ένα ευρύ φάσμα φαρμάκων για αντιγηραντική δραστηριότητα. Η αντιοξειδωτική δράση στις χαλκόνες αποδίδεται στην φαινολικές ομάδες που απαντώνται στους δακτυλίους [11]. Επίσης έχει εικασθεί πως μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανοί παρεμποδιστές του ενζύμου τυροσινάση [11].

Το αυξανόμενο ενδιαφέρον για αυτές τις ενώσεις και την πιθανή χρήση τους σε ιατρικές εφαρμογές αποδεικνύεται από τον αυξανόμενο αριθμό των δημοσιεύσεων σχετικά με τη σύνθεση και την βιολογική αξιολόγηση των αναλόγων χαλκονών. Λόγω της ευελιξίας τους, η σύνθεση χαλκονών και παραγώγων τους είναι ένας πρωταρχικός στόχος. Αλλαγές στη δομή τους έχουν προσφέρει έναν υψηλό βαθμό ποικιλομορφίας που έχει αποδειχθεί χρήσιμος για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων με βελτιωμένη δραστηριότητα και μικρότερη τοξικότητα [7,9,11].

Σχετικά με την σύνθεση των χαλκονών σε εργαστηριακή κλίμακα, ο πιο συνήθης τρόπος είναι μέσω αντίδρασης συμπύκνωσης (συμπύκνωση Claisen-Schmidt) μιας υποκατεστημένης αλδεύδης (λ.χ. βενζαλδεύδης) και μιας υποκατεστημένης ακετοφαινόνης (λ.χ. 2-υδροξυ-ακετοφαινόνης). Η αντίδραση αυτή γίνεται σε βασικό περιβάλλον, το οποίο επιτυγχάνεται συνήθως με παρουσία μικρού όγκου υδατικού διαλύματος KOH 20% w/v, ενώ ο διαλύτης που χρησιμοποιείται για την εκτέλεση της αντίδρασης είναι η αιθανόλη, η αντίδραση γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου και διαρκεί τυπικά 24-36h. [6,7,9,11]. Επίσης, έχει αναφερθεί μια παραλλαγή της ανωτέρω μεθόδου όπου ως διαλύτης χρησιμοποιείται άνυδρη αιθανόλη, ως βάση χρησιμοποιείται NaOH αντί διαλύματος KOH και η αντίδραση διαρκεί τυπικά 6-12h [12].

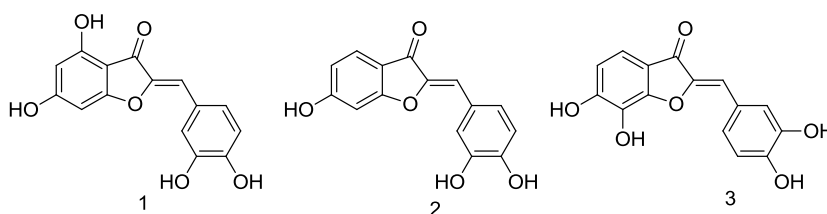


Σχήμα 3: Παράδειγμα συμπύκνωσης Claisen-Schmidt

#### 1.1.2.2. Ωρόνες

Οι ωρόνες, ((Z)-2-βένζυλιδενεβενζοφουραν-3-(2H)-όνες, δομή παρουσιάζεται στο σχήμα 1), ευρίσκονται πιο σπάνια στη φύση και είναι λιγότερο μια μελετημένη υποκατηγορία φλαβονοειδών. Οι ωρόνες συμβάλλουν στο χρώμα φωτεινό κίτρινο χρώμα κάποιων ανθοφόρων φυτών, όπως λ.χ. η ντάλια. Βιοσυντίθενται από χαλκόνες μέσω του ενζύμου συνθάση της ωρεοσιδίνης (aureusidin synthase). Μερικές αντιπροσωπευτικές φυσικές ωρόνες είναι η ωρεοσιδίνη η σουλφουρετίνη και η μαριτιμετίνη (aureusidin, sulfuretin και maritimetin), οι οποίες παρουσιάζουν διάφορους τρόπους υδροξυλίωσης. Έχουν αναφερθεί και λίγες φυσικές ωρόνες που

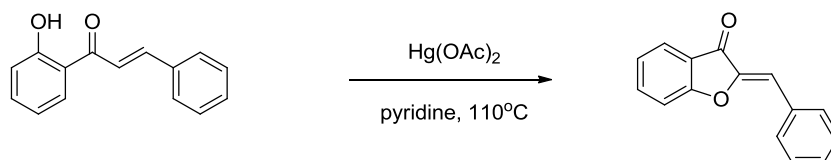
φέρουν μεθόξυ υποκαταστάτες είτε στον ένα μόνο είτε και στους δύο δακτυλίους. Τα υπάρχοντα δεδομένα σχετικά με την βιοδραστητικότητα φυσικών και συνθετικών ωρονών είναι πολύ ελπιδοφόρα, έτσι ώστε αυτές οι ετεροκυκλικές ενώσεις να μπορούν να θεωρηθούν ως ένα ελκυστικό ικρίωμα για το σχεδιασμό και την ανάπτυξη φαρμάκων. Αυτές οι ετεροκυκλικές ενώσεις έχουν βρεθεί από διάφορες μελέτες να έχουν αντικαρκινικές, αντιλεϊσμνιακές, αντιοξειδωτικές και αντιβακτηριακές ιδιότητες, όπως και ανασταλτική δραστηριότητα έναντι μιας ποικιλίας ενζύμων και πρωτεϊνών [9,11].



Σχήμα 4: Δομές της ωροσειδίνης (1), σουλφουρετίνης (2) και μαριτιμετίνης (3)

Όσον αφορά την θεραπευτική τους δράση, σημειώνονται αποτελέσματα ερευνών για την αντιοξειδωτική τους δράση, που δείχνουν υψηλές ικανότητες απομάκρυνσης της ελεύθερης ρίζας DPPH καθώς και του  $H_2O_2$ , όπως και γενικότερα ισχυρό χαρακτήρα δότη ηλεκτρονίων. [9,11]. Επίσης έχει αναφερθεί η ικανότητα ωρονών να παρεμποδίσουν τα ένζυμα της λιποξυγονάσης [9] και της πολυφαινολικής οξειδάσης [11], αλλά και η ικανότητά τους να δρουν ως ισχυροί και επιλεκτικοί παρεμποδιστές του ενζύμου ακετυλχολινεστεράση, του οποίου η δράση συνδέεται με την πρόοδο της νόσου του Alzheimer [13]. Επιπλέον, έχει αναφερθεί κυτταροτοξικότητα ωρονών ενάντια σε σειρές καρκινικών κυττάρων που προέρχονται από όγκους στο ήπαρ, στον λάρυγγα, στους αδένες του στήθους και στο παχύ έντερο [2].

Σχετικά με την σύνθεση ωρονών σε εργαστηριακή κλίμακα, έχουν προταθεί διάφορες μέθοδοι. Μια συνήθης μέθοδος είναι μέσω της οξειδωτικής κυκλοποίησης 2-υδροξυχαλκονών, η οποία μπορεί να γίνει παρουσία οξικού υδραργύρου σε διαλύτη πυριδίνη ή οξικό οξύ ή διμέθυλο-σουλφοξείδιο (κοινώς: DMSO) σε υψηλή θερμοκρασία (π.χ.  $110^\circ C$ ) [9,11].

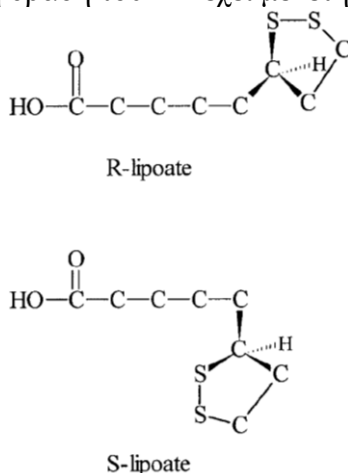


Σχήμα 5: Παράδειγμα οξειδωτικής κυκλοποίησης με χρήση  $Hg(OAc)_2$

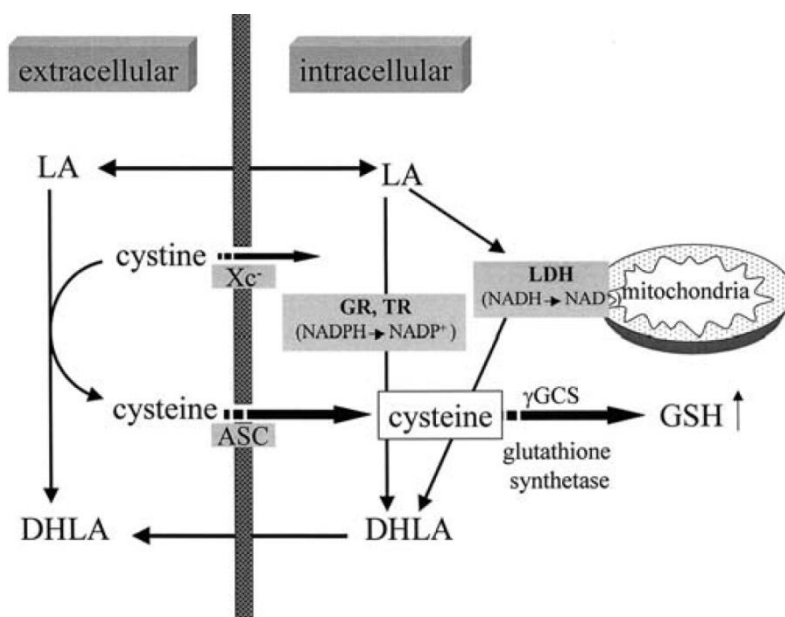
Εναλλακτικές μέθοδοι σύνθεσης αναλόγων ωρονών είναι μέσω αντίδρασης εστέρων του βενζοϊκού οξέος με 5,6-διμεθοξυ-ινδαν-1-όνη ή 5,6-διμεθοξυ-βενζοφουραν-3(2H)-όνη παρουσία KOH (σε διαλύτη  $CHCl_3$  για 2-4h) ή  $Al_2O_3$  (σε διαλύτη  $CH_2Cl_2$  για 2-4h) [13], ή μέσω αντίδρασης αμινών με 3-βρώμο-χρωμόνη σε θερμοκρασία  $70^\circ C$ , παρουσία  $K^+(CH_3)_3CO^-$  με ταυτόχρονη ακτινοβολία με μικροκύματα [2]. Άλλες προταθείσες μέθοδοι περιλαμβάνουν την κυκλοποίηση α-βρωμο-6-αλκοξυδιυδροχαλκονών παρουσία βάσης (σύνθεση Wheeler), την βρωμίωση και κυκλοποίηση 2-ακετοξυχαλκονών, την συμπύκνωση βενζοφουραν-3(2H)-ονών με βενζαλδεϋδες ή την κυκλοποίηση 2-(1-υδροξυπροπ-2-υνυλ)φαινολών σε καταλύτη χρυσό [9].

### 1.1.3. Λιποϊκό οξύ

Το R-α-λιποϊκό οξύ (lipoic acid, LA) είναι ένα φυσικό προϊόν που απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1951 από τον L. Reed από βόειο ήπαρ. Το LA είναι ένας μιτοχονδριακός συμπαράγοντας ενζύμου και παίζει σημαντικό ρόλο στο μιτοχονδριακό μεταβολισμό της ενέργειας. Το εξωγενώς παρεχόμενο LA μεταφέρεται στους ιστούς και ανάγεται προς διυδρολιποϊκό οξύ (DHLA). Λόγω του υψηλού δυναμικού αναγωγής (-320mV) το ζεύγος DHLA και LA είναι ιδιαίτερα δραστικό έναντι ποικιλίας από δραστικά είδη οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και δραστικά είδη αζώτου (RNS Reactive Nitrogen Species) in vitro. Το LA παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση, όχι μόνο με άμεση παγίδευση ριζών και/ή συμπλοκοποίησης με μέταλλα, αλλά επίσης δρα ως ρυθμιστής σε σημαντικά μεταβολικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος, όπως η συνθετική οδός της γλουταθειόνης και τα αντι-φλεγμονώδη και αντιαποπτωτικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Η αντιοξειδωτική δράση του LA έχει μελετηθεί εκτενώς και αξιολογηθεί.

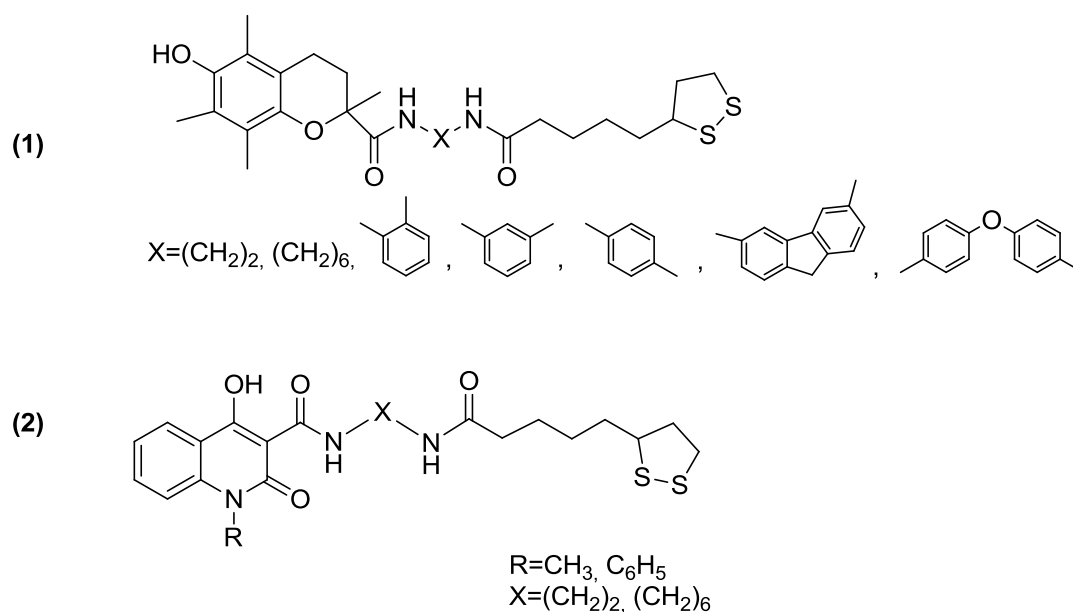


Σχήμα 6: Οι δομές του R- και S-α- λιποϊκού οξέος



Εικόνα 1: Κυτταρικά μονοπάτια για την βιολογική αναγωγή του α-λιποϊκού οξέος προς διυδρολιποϊκό οξύ και η ρύθμιση μέσω του λιποϊκού οξέος της βιοσύνθεσης της κυτταρικής γλουταθειόνης (GSH) μέσω αύξησης της βιοδιαθεσιμότητας της κυστεΐνης. Όπου TR: αναγωγή τηςθειορεντοξίνης GR: αναγωγή της γλουταθειόνης, γGCS: συνθάση της γ-γλουταμυλ κυστεΐνης, LDH: λιποαμιδική αφυδρογονάση

Το LA επίσης αντιπροσωπεύει μια ιδανική χημική ένωση για να συνδεθεί ομοιοπολικά σε μια ευρεία ποικιλία άλλων βιοδραστικών μορίων. Ο σχεδιασμός και η σύνθεση υβριδικών μορίων που περιλαμβάνουν δύο διαφορετικά φαρμακοφόρα σε ένα μοριακό κρίωμα είναι μια καλά καθιερωμένη προσέγγιση στη φαρμακευτικά χημεία. Ο σχεδιασμός και η σύνθεση υβριδικών μορίων με το LA έχει αποτελέσει αντικείμενο έρευνας κατά την τελευταία δεκαετία. Τα μόρια που προκύπτουν έχει αναφερθεί ότι έχουν αντιοξειδωτική δραστηριότητα καθώς και μια ευρεία ποικιλία άλλων δραστηριοτήτων όπως: προστασία από αρρυθμίες, αναστολή συνθάσης νιτρικού οξειδίου, προστασία ερυθροκυττάρων από αιμόλυση, αντιδιαβητική δράση, αντιπολλαπλασιαστική δραστηριότητα, αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης, αναστολή της βουτυρυλχολινεστεράσης, αναστολή EGFR, ακτινοπροστασία, νευροπροστατευτική δράση και αντι-φλεγμονώδη δράση [14,15,16,17]. Σημειώνεται πως συνήθως, η σύνδεση LA με άλλο φαρμακευτικό μόριο οδηγεί σε ενισχυμένη φαρμακευτική δράση από αυτήν που εμφανίζει έκαστο μόριο [16].



Σχήμα 7: Δομές υβριδικών μορίων λιποϊκού οξέος με (1): trolox, (2):κινολινόνη

Έχουν γίνει ποικίλες και εκτενείς μελέτες σχετικά με τις θεραπευτικές δράσεις του λιποϊκού οξέος και των υβριδικών μορίων που περιλαμβάνουν LA. Για παράδειγμα, το LA έχειδειχθεί να έχει μια ποικιλία από ιδιότητες οι οποίες μπορούν να παρέμβουν με τις αρχές της παθογένειας της νόσου Alzheimer (AD). Για παράδειγμα, το LA αυξάνει την παραγωγή ακετυλοχολίνης (ACh) μέσω ενεργοποίησης της ακετυλοτρανσφεράσης της χολίνης και αυξάνει την πρόσληψη της γλυκόζης συνεπώς προμηθεύοντας περισσότερο ακέτυλο-συνένζυμο A για την παραγωγή της ACh. Το LA δημιουργεί χημικά σύμπλοκα με οξειδοαναγωγικά ενεργά μέταλλα, αναστέλλοντας έτσι το σχηματισμό ριζών υδροξυλίου και επίσης συλλέγει δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), αυξάνοντας έτσι τα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η προ-κατεργασία των νευρώνων με LA ή DHLA πριν την έκθεση σε Fe/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> μειώνει σημαντικά το οξειδωτικό στρες και αυξάνει την επιβίωση των κυττάρων [14].

Επίσης, έχουν συντεθεί υβριδικά μόρια LA-trolox (το trolox είναι το υδατοδιαλυτό ανάλογο της βιταμίνης E) τα οποία βρέθηκε να έχουν ισχυρή καρδιοπροστατευτική δράση, μέσω αναστολής του μιτοχονδριακού αποπτωτικού μονοπατιού και της

σταθεροποίηση υποξικώς επαγόμενου παράγοντα-1α (hypoxia inducible factor-1a). Επίσης, βοηθούν στην καταστολή αρρυθμιών επαναιμάτωσης, λόγω της ισχυρής αντιοξειδωτικής δραστικότητάς τους ενάντια στην υπεροξειδωση των λιπιδίων. Αυτές οι ενώσεις προστατεύουν κατά πάσα πιθανότητα τα φωσφολιπίδια του μυοκαρδίου, διατηρώντας της επιλεκτική διαπερατότητας των κυτταρικών μεμβρανών και αποφεύγοντας έτσι την καταστροφή των διαμεμβρανικών ιοντικών βαθμίδων και την ανάπτυξη απειλητικών για τη ζωή αρρυθμιών και/ή ινιδισμών [14,17].

Επιπροσθέτως έχουν γίνει πολλές μελέτες πάνω στην αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση του LA καθώς και των υβριδικών μορίων που το περιλαμβάνουν στην δομή τους. Αυτές οι μελέτες έχουν δείξει πως αυτές οι ενώσεις παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη δράση στο δέρμα, οδηγούν σε αποτελεσματική καταστολή αλλεργικών φλεγμονών των αεραγωγών σε μοντέλα άσθματος [14], δρουν ως συλλέκτες της ρίζας DPPH, αναστολείς της λιποξυγονάσης, ανάγουν το καταλυτικώς ενεργό  $Fe^{3+}$  προς το ανενεργό  $Fe^{2+}$  [15] καθώς και μπορούν να δεσμεύσουν ρίζες OH [16].

## 1.2. Ταυτοποίηση οργανικών μορίων μέσω φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

### 1.2.1. Εισαγωγή / Αρχές NMR

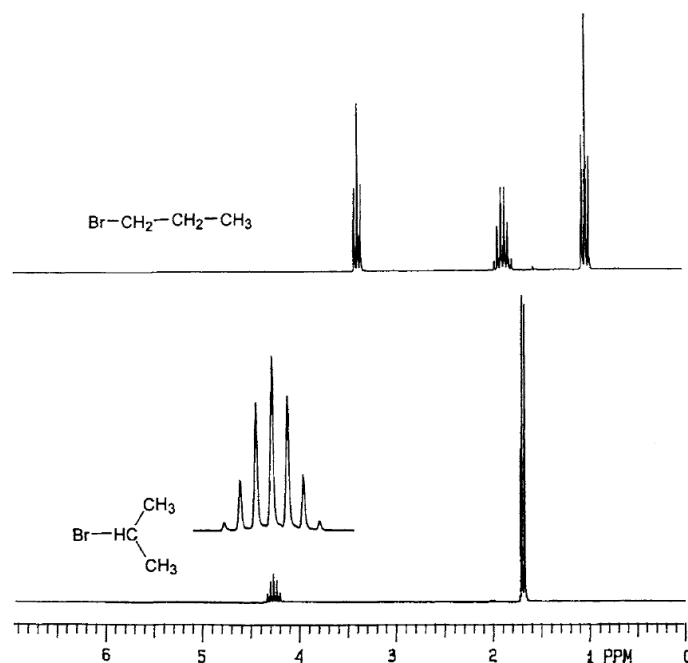
Όπως υποδηλώνει το όνομα, το πείραμα του NMR ασχολείται με τις μαγνητικές ιδιότητες των πυρήνων, οι οποίες προκαλούν και το παρατηρούμενο φαινόμενο. Ο NMR είναι ένα φυσικό φαινόμενο, το οποίο βασίζεται στις μηχανικές και μαγνητικές ιδιότητες των ατομικών πυρήνων, οι οποίες εκδηλώνονται όταν οι πυρήνες εκτίθενται σε εξωτερικό μαγνητικό πεδίο. Σε ένα πείραμα NMR, τα δείγματα τοποθετούνται σε ισχυρό, ομογενές μαγνητικό πεδίο και ακτινοβολούνται με ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων (RF). Κάποιοι πυρήνες απορροφούν αυτήν την ενέργεια σε δεδομένες συχνότητες και ο προσανατολισμός αυτών των πυρήνων στο μαγνητικό πεδίο αλλάζει. Το σήμα που παράγεται στη συνέχεια ανιχνεύεται, ενισχύεται, και παρουσιάζεται ως φάσμα συχνοτήτων. Η ακτινοβολία RF είναι πολύ αδύναμη, έχει χαμηλή ενέργεια, δεν μπορεί να διαταράξει οποιοδήποτε χημικό δεσμό, και ως εκ τούτου το πείραμα είναι ασφαλές (μη καταστρεπτικό) για τα περισσότερα συστήματα. Σε όλες τις εφαρμογές NMR, η NMR-ενεργοί πυρήνες ενεργούν ως "κατάσκοποι", αναφέροντας σχετικά με τα μαγνητικά πεδία, τα οποία "αισθάνονται" [18,19]. Τα φάσματα NMR των μορίων σε υγρά περιέχουν ουσιαστικά πέντε πηγές πληροφοριών: τις εντάσεις των επιμέρους συντονισμών (οι οποίες εξαρτώνται από τον αριθμό των πυρήνων), τις χημικές μετατοπίσεις (η αλληλεπίδραση των πυρηνικών σπιν με ένα εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο), τη σύζευξη σπιν-σπιν (τις αλληλεπιδράσεις του ενός πυρήνα με τον άλλο), τη χαλάρωση σπιν (αποκατάσταση της θερμικής ισορροπίας), και οι χημικές ανταλλαγές (οι επιπτώσεις των διαμορφωτικών και χημικών ισορροπιών) [20].

Οι πυρήνες με άρτια μάζα και ατομικό αριθμό δεν έχουν πυρηνικό σπιν και κατά συνέπεια δεν εμφανίζουν το φαινόμενο NMR. Από τους υπόλοιπους πυρήνες, αυτοί με περιττό μαζικό αριθμό και άρτιο αριθμό πυρηνικού φορτίου έχουν κβαντικούς αριθμούς σπιν I, οι οποίοι είναι περιττά πολλαπλάσια του 1/2, ενώ αυτοί με άρτιους μαζικούς αριθμούς και περιττό πυρηνικό φορτίο έχουν ακέραιες τιμές του I. Το σύνολο των μαγνητικών κβαντικών αριθμών το οποίο δίνεται από τη σειρά  $m = I, I-1, I-2, \dots, -I$ , περιγράφει τις επιτρεπόμενες τιμές του διανύσματος μαγνητικής ορμής.

Έτσι, υπάρχουν  $(2I+1)$  πιθανές καταστάσεις σπιν για ένα συγκεκριμένο πυρήνα. Για την απλούστερη περίπτωση εκείνων πυρήνων με  $I=1/2$  αυτό αντιστοιχεί σε δύο καταστάσεις σπιν. Ένα μέγεθος που συνδέεται στενά με πυρηνικό σπιν είναι η πυρηνική μαγνητική ροπή:  $\mu = \sqrt{I(I+1)}\hbar$ , η οποία είναι παράλληλη ή μερικές φορές αντιπαράλληλη σε  $I$ , με μια σταθερά αναλογίας  $\gamma$  που ονομάζεται γυρομαγνητικός λόγος. Κατά συνέπεια, τόσο το μέγεθος και ο προσανατολισμός του  $\mu$  είναι κβαντισμένα. Εν απουσία ενός μαγνητικού πεδίου, όλες  $2I+1$  καταστάσεις ενός πυρήνα με σπιν  $I$  είναι εκφυλισμένες και η κατεύθυνση του άξονα κβάντωσης είναι αυθαίρετη, αλλά αντιστοιχούν σε καταστάσεις διαφορετικής δυναμικής ενέργειας υπό την παρουσία ενός ομοιόμορφου μαγνητικού πεδίου,  $B_0$ . Για πυρήνες με σπιν  $1/2$  οι δύο καταστάσεις σπιν αντιστοιχούν στην μαγνητική ροπή παράλληλη με είτε αντιπαράλληλη στο εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο ( $m=1/2$  ή  $m=-1/2$ ). Η επιβολή και η ανίχνευση μεταβάσεων μεταξύ αυτών των δύο καταστάσεων αποτελούν τη βάση των πειραμάτων NMR. Η αλληλεπίδραση μεταξύ του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου,  $B_0$ , και της πυρηνική μαγνητική ροπή,  $\mu$ , προκαλεί τον συντονισμό του πυρήνα περί την κατεύθυνση του εφαρμοσμένου πεδίου. Η συχνότητα του συντονισμού δίνεται από την εξίσωση Larmor:  $\nu_0 = |\gamma/2\pi|B_0$  όπου  $\nu_0$  είναι η συχνότητα Larmor του πυρήνα και είναι γραμμικά εξαρτάται από την ισχύ του μαγνητικού πεδίου,  $B_0$ . Εάν ένα μικρό μαγνητικό πεδίο,  $B_1$ , εφαρμοστεί κάθετα προς  $B_0$ , και τεθεί σε περιστροφή με συχνότητα  $\nu_0$ , η ενέργεια απορροφάται από το πεδίο  $B_1$  στο σύστημα. Αυτή είναι η συνθήκη συντονισμού [19,20].

Η συχνότητα NMR ενός πυρήνα είναι ανάλογη με το  $\gamma$  του και την ισχύ του πεδίου. Τα τυπικά μαγνητικά πεδία που χρησιμοποιούνται στη σύγχρονη φασματοσκοπία NMR είναι στο εύρος 4,7 έως 20 T. Παρά το γεγονός ότι η συχνότητα συντονισμού ενός πυρήνα σε ένα μαγνητικού πεδίου εξαρτάται κυρίως από το  $\gamma$ , εξαρτάται επίσης, ελαφρά, από το άμεσο περιβάλλον του πυρήνα. Αυτή η επίδραση, η χημική μετατόπιση, είναι ζωτικής σημασίας για τις χημικές εφαρμογές του NMR, διότι επιτρέπει σε κάποιον να διακρίνει πυρήνες σε διαφορετικά περιβάλλοντα. Η χημική μετατόπιση υφίσταται επειδή το εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο  $B_0$  προκαλεί στα ηλεκτρόνια των ατόμων και των μορίων να μετακινούνται γύρω από τους πυρήνες και η συνεπαγόμενη αλλαγή της ηλεκτρονιακής πυκνότητας δημιουργεί ένα μικρό τοπικό μαγνητικό πεδίο που ενισχύει ή εξασθενεί το  $B_0$ . Το προκαλούμενο επαγόμενο μαγνητικό πεδίο  $B_{ind}$  είναι ανάλογο προς τη δύναμη του  $B_0$  και, στα άτομα, είναι αντιπαράλληλο σε αυτό. Το καθαρό πεδίο  $B$  το οποίο νιώθει ο πυρήνας είναι έτσι ελαφρώς διαφορετικό από  $B_0$ :  $B = B_0 - B_{ind} = B_0 - \sigma B_0 = B_0(1 - \sigma)$ , όπου η σταθερά αναλογίας  $\sigma$  είναι γνωστή ως η σταθερά θωράκισης. Η κατάσταση συντονισμού, έτσι γίνεται  $\nu = |\gamma/2\pi|B_0(1 - \sigma)$ . Η σταθερά θωράκισης καθορίζεται από την ηλεκτρονική δομή του μορίου στην περιοχή του πυρήνα: το  $\nu$  είναι επομένως χαρακτηριστικό του χημικού περιβάλλοντος. Η χημική μετατόπιση ποσοτικοποιείται συνήθως μέσω της παραμέτρου  $\delta$ , η οποία είναι αδιάστατη και ανεξάρτητη από  $B_0$  και εκφράζεται σε μονάδες ppm. Η  $\delta$  ορίζεται σε σχέση με τις συχνότητες συντονισμού του πυρήνα που μας ενδιαφέρει και μιας ένωσης αναφοράς:  $\delta = 10^6 (\nu - \nu_{ref}/\nu_{ref})$ . Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη ένωση αναφοράς για  $^1H$  και  $^{13}C$  NMR είναι η τετραμεθυλοσιλάνη. Στα φάσματα NMR το  $\delta$  αυξάνεται από δεξιά προς τα αριστερά, με την ένωση αναφοράς σε  $\delta=0$ . Κατά συνέπεια, οι πυρήνες με υψηλότερες συχνότητες συντονισμού (δηλ. εκείνες που είναι λιγότερο θωρακισμένοι) φαίνονται προς την αριστερή πλευρά του φάσματος. Οι σχετικές εντάσεις των σημάτων σε ένα φάσμα NMR είναι ανάλογες με τις διαφορές πληθυσμού, και ως εκ τούτου με τους αριθμούς των πυρήνων που είναι υπεύθυνοι για κάθε σήμα [20].

Οι μαγνητικοί πυρήνες αλληλεπιδρούν όχι μόνο με τα εφαρμοζόμενα και τα επαγόμενα μαγνητικά πεδία, αλλά επίσης και μεταξύ τους. Το αποτέλεσμα, για μόρια σε υγρά, είναι το φαινόμενο γνωστό ως σύζευξη σπιν-σπιν [20]. Η εξήγηση για το φαινόμενο αυτό, έγκειται στο γεγονός ότι τα γειτονικές πρωτόνια μπορούν επίσης να είναι σε διαφορετικούς προσανατολισμούς σε σχέση με το εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο. Δεδομένου ότι το πρωτόνιο είναι ένας πυρήνας με  $I = 1/2$ , δύο πιθανές τιμές σπιν υπάρχουν για κάθε πρωτόνιο. Ανάλογα με το αν το γειτονικό πυρηνικό σπιν είναι ευθυγραμμισμένο με (παράλληλο) ή σε αντίθεση με (αντιπαράλληλο) το πρωτόνιο που συντονίζεται, είτε θα αυξήσει ή να μειώσει το καθαρό μαγνητικό πεδίο που αισθάνεται από το παρατηρούμενο πρωτόνιο. Συνεπώς για έναν δεδομένο πυρήνα, η μία γραμμή του φάσματος, "σπάει" σε περισσότερες γραμμές ανάλογα με τους πυρήνες με τους οποίους συζεύγονται τα σπιν. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις λειτουργούν μέσω του δικτύου δεσμών μεταξύ των ατόμων. Η επίδραση είναι αρκετά ισχυρή κατά τη διάρκεια των πρώτων λίγων δεσμών, αλλά εξασθενεί σημαντικά στη συνέχεια. Ο αριθμός των γραμμών που παράγονται με σύζευξη σπιν-σπιν δίνεται από την εξίσωση: Πολλαπλότητα =  $2nI+1$ , όπου  $n$  είναι ο αριθμός των πρωτονίων στη γειτονική ομάδα. Ο διαχωρισμός μεταξύ των γραμμών μιας πολλαπλής κορυφής αναφέρεται ως η σταθερά σύζευξης,  $J$ . Η τιμή αυτή, που εκφράζεται σε μονάδες συχνότητας (Hz), αντικατοπτρίζει το μέγεθος της αλληλεπίδρασης σπιν-σπιν και είναι ανεξάρτητη του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου. Χαρακτηριστικές σταθερές σύζευξης έχουν μεγάλη αξία στην αποσαφήνιση της δομής ενός μορίου [19].



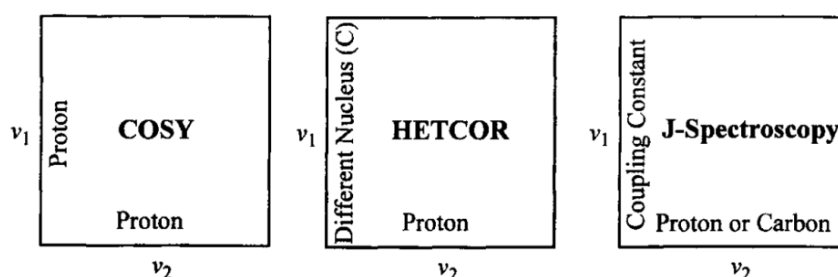
Εικόνα 2: Παράδειγμα σύζευξης σπιν-σπιν: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του *n*-πρότυλ βρωμιδίου και του *i*-πρότυλ βρωμιδίου σε  $\text{CDCl}_3$  [21]

### 1.2.2. NMR δυο διαστάσεων (2D-NMR)

Μια σημαντική εξέλιξη στο NMR ήταν η εισαγωγή της έννοιας της φασματοσκοπίας NMR δύο διαστάσεων (2D NMR) στις αρχές του 1970. Στο πρότυπο μονοδιάστατο πείραμα NMR, η εφαρμογή ενός παλμού RF οδηγεί στην ταλάντωση των πυρηνικών μαγνητικών ροπών περί την κατεύθυνση του μαγνητικού πεδίου. Αυτή η απόκριση στον παλμό RF επάγει ένα σήμα στο πηνίο του δέκτη του ανιχνευτή το οποίο παρακολουθείται για ένα χρονικό διάστημα (ο χρόνος



απόκτησης). Έτσι, το ανιχνευόμενο σήμα NMR (ή αποσύνθεση ελεύθερης επαγωγής, free-induction decay, FID) είναι συνάρτηση μιας μεταβλητής χρόνου. Μετασχηματισμός Fourier αυτού του σήματος παράγει το κανονικό μονοδιάστατο φάσμα συχνοτήτων. Εάν το σύστημα σπιν αφηθεί να εξελιχθεί υπό ένα άλλο σύνολο πειραματικών συνθηκών (π.χ., το χρονικό διάστημα κατά το οποίο ο αποσυζευκτής πρωτονίων είναι ενεργοποιημένος) για ένα χρονικό διάστημα πριν από την ανίχνευση του FID, και εάν αυτή η περίοδος εξέλιξης μεταβάλλεται συστηματικά, το σήμα NMR είναι τώρα μία συνάρτηση δύο μεταβλητών χρόνου. Τα δεδομένα που συλλέγονται ως μια σειρά από FIDs, καθένα από τα οποία έχει το ίδιο χρόνο απόκτησης,  $t_2$ , αλλά διαφορετική περίοδο εξέλιξης,  $t_1$ . Δύο μετασχηματισμοί Fourier που εκτελούνται σε αυτή τη μήτρα δεδομένων, μία για τις σειρές της μήτρας ( $t_1$ ), και η δεύτερη για τις στήλες των δεδομένων ( $t_2$ ). Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι τώρα μια μήτρα (το δισδιάστατο φάσμα), η οποία είναι μία συνάρτηση δύο συχνοτήτων,  $\nu_1$  και  $\nu_2$ , και για την οποία η ένταση του σήματος σε κάθε ζεύγος συχνοτήτων είναι μια τρίτη διάσταση. Η ειδική ταυτότητα αυτών των συχνοτήτων εξαρτάται από το δισδιάστατο πείραμα που εκτελείται [20]. Ο ένας από αυτούς τους άξονες παρουσιάζει πάντα τον πυρήνα που εντοπίστηκε κατά τη διάρκεια του χρόνου κτήσης ( $t_2$ ). Ο άλλος άξονας, ο οποίος εξαρτάται από το  $t_1$ , μπορεί να αντιπροσωπεύει είτε τον ίδιο πυρήνα ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ή  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  ομοπυρηνική συσχέτιση, COSY) ή άλλο πυρήνα ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  ετεροπυρηνική συσχέτιση, HETCOR) ή την σταθερά σύζευξης J (J-επιλελυμένη φασματοσκοπία) [21].



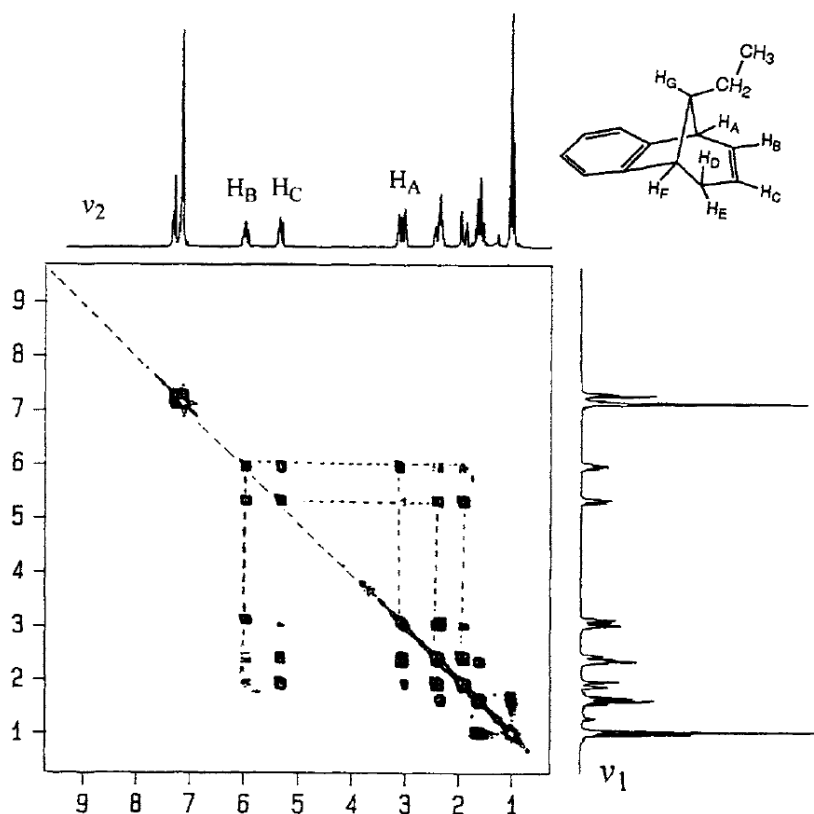
Εικόνα 3: Ταξινόμηση των πειραμάτων 2D-NMR [21]

Τα πειράματα μπορούν αυθαίρετα να ταξινομηθούν σε τέσσερις ομάδες: ομοπυρηνική συσχέτιση χημικής μετατόπισης (homonuclear chemical shift correlation), ετεροπυρηνική συσχέτιση χημικής μετατόπισης, (heteronuclear chemical shift correlation) J-επιλελυμένα (J-resolved), και πολλαπλά κβαντικά πειράματα (multiple quantum experiments). Οι δύο τελευταίες κατηγορίες δεν θα μας απασχολήσουν στο παρόν. Συνήθως, γίνονται δύο ή περισσότερα πειράματα και οι συσχετισμοί σε κάθε πείραμα παρέχουν ένα σύνολο δεδομένων δομής. Τα συνδυασμένα δεδομένα μπορούν στη συνέχεια να ταιριάξουν μεταξύ τους, όπως τα κομμάτια ενός παζλ, και, στις περισσότερες περιπτώσεις, ο σωστός συνδυασμός των δεδομένων πολυδιάστατων πειραμάτων μπορούν να παρέξουν πλήρεις πληροφορίες σχετικά με τη δομή ενός άγνωστου μορίου [22].

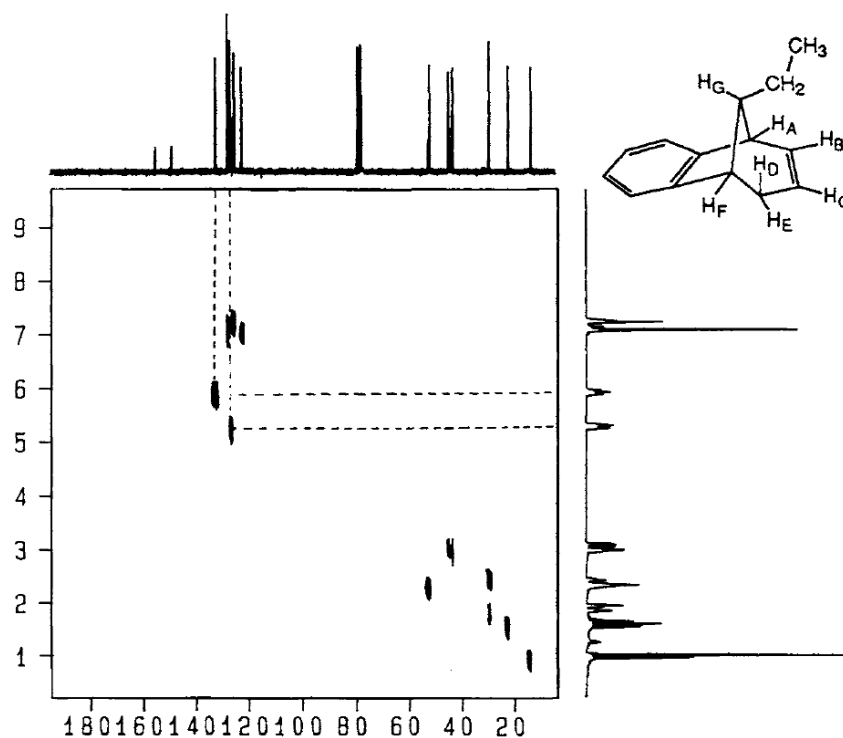
Ένα από τα απλά πειράματα 2D-NMR είναι το COSY (correlated spectroscopy). Στο πείραμα COSY, οι ίδιες χημικές μετατοπίσεις (συνήθως εκείνες του  $^1\text{H}$ ) σχεδιάζονται κατά μήκος των αξόνων  $\nu_1$  και  $\nu_2$ . Το φάσμα αυτό μας δείχνει τη συσχέτιση μεταξύ συζευγμένων πρωτονίων και με αυτή την τεχνική μπορεί εύκολα να προσδιοριστεί αν υπάρχει σύζευξη μεταξύ δύο πρωτονίων ή όχι. Το φάσμα αποτελείται από δύο άξονες συχνότητας όπου εμφανίζονται τα 1D φάσματα. Αυτά 1D φάσματα δεν αποτελούν μέρος του COSY φάσματος. Από τη άνω αριστερά ως την κάτω δεξιά γωνία (ή από την άνω δεξιά ως της κάτω αριστερή) φέρεται η διαγώνιος,

η οποία έχει μια σειρά σημάτων πάνω της. Οι διαγώνιες κορυφές δεν παρέχουν καμία χρήσιμη πληροφορία πέρα από την 1D φάσμα  $^1\text{H-NMR}$ . Στη συνέχεια, εάν υπάρχει J-σύζευξη μεταξύ δύο πυρήνων, σε εκτός της διαγωνίου κορυφές τότε αυτές μπορούν να συνδεθούν με αυτές της διαγωνίου για να σχηματιστεί ένα κουτί. Η παρατήρηση σύζευξης μεταξύ δύο πυρήνων σημαίνει πως αυτοί οι πυρήνες απέχουν 3 δεσμούς μεταξύ τους (όσον αφορά το πιο συνηθισμένο φάσμα COSY  $^1\text{H-}^1\text{H}$  σε μια οργανική ένωση: σημαίνει πως οι δύο συζευγμένοι πυρήνες  $^1\text{H}$  βρίσκονται συνδεδεμένοι σε γειτονικούς C) [21,22,23].

Στο πείραμα HSQC (heteronuclear single-bond correlation), το οποίο είναι πείραμα ετεροπυρηνικής συσχέτισης χημικής μετατόπισης, παράγεται φάσμα στο οποίο ο μεν άξονας  $\nu_1$  περιέχει τις χημικές μετατοπίσεις ενός είδους πυρήνα (συνήθως  $^1\text{H}$ ) ο δε άξονας  $\nu_2$  περιέχει τις χημικές μετατοπίσεις ενός διαφορετικού είδους πυρήνα (συνήθως  $^{13}\text{C}$ ). Σε αυτό το φάσμα παρατηρούνται συσχετίσεις μεταξύ σημάτων της διάστασης  $\nu_1$  και σημάτων της διάστασης  $\nu_2$ , οι οποίες μπορούν να ερμηνευτούν ως την ύπαρξη ενός μόνο δεσμού που συνδέει τους δυο συσχετιζόμενους πυρήνες (όσον αφορά το πιο συνηθισμένο φάσμα HSQC  $^1\text{H-}^{13}\text{C}$  σε μια οργανική ένωση: σημαίνει πως ο πυρήνας  $^1\text{H}$  βρίσκεται συνδεδεμένος στον  $^{13}\text{C}$  με τον οποίο παροσιάζεται συσχετισμός στο φάσμα) [23].



Εικόνα 4: Παράδειγμα φάσματος COSY-NMR: το φάσμα του αίθυλομοβενζονορβοραδιενίου [21]



Εικόνα 5: Παράδειγμα φάσματος HSQC-NMR: το φάσμα του αίθυλομοβενζονορβοραδιενίου [21]

Υπάρχουν επίσης συζεύξεις σε αποστάσεις δύο, τριών η και τεσσάρων δεσμών στην φασματοσκοπία NMR. Η HMBC (heteronuclear multiple-bond correlation) είναι μια 2D τεχνική NMR, που αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους Bax και Summers, στην οποία οι πυρήνες  $^1\text{H}$  συσχετίζονται με απομακρυσμένους πυρήνες  $^{13}\text{C}$  (συνήθως δύο ή τρεις δεσμούς μακριά) σε 2D πείραμα μέσω των μεγάλου βεληνεκούς ετεροπυρηνικών συζεύξεων σπιν. Το πείραμα είναι σχεδιασμένο για να καταστέλλει τις συζεύξεις ενός δεσμού σύνδεσμοι, αλλά μερικοί παρατηρούνται στα περισσότερα φάσματα. Δεν υπάρχει τρόπος να γνωρίζουμε πόσους δεσμούς απέχουν ένα πρωτόνιο και ένα άτομο άνθρακα, όταν παρατηρείται μια κορυφή συσχέτισης. Αυτά τα φάσματα συσχέτισης πολλαπλών δεσμών μας δίνουν πολύ χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με τη δομή. Αποκτούμε σε έμμεσο τρόπο, πληροφορίες σχετικά με τον αριθμό των δεσμών που έχει ο κάθε άνθρακας. Επιπλέον, μπορούμε να παρατηρήσουμε συσχετισμούς μεταξύ των τεταρτοταγών ανθράκων με κοντινά πρωτόνια, και συνεπώς μπορούμε να εντοπίσουμε τις θέσεις των τεταρτοταγών ατόμων άνθρακα [21,24].

### 1.3. Ενδεικτικές θεραπευτικές δράσεις φαρμακευτικών μορίων

#### 1.3.1. Παρεμπόδιση ενζύμων

Πολλές ασθένειες, ή τουλάχιστον τα συμπτώματα ασθενειών, προέρχονται από έλλειψη ή υπερβολική παρουσία ενός συγκεκριμένου μεταβολίτη μέσα στο σώμα, από μόλυνση από ξένο μικροοργανισμό ή από ανώμαλη ανάπτυξη των κυττάρων. Αν ο μεταβολίτης μπορεί να οδηγηθεί σε κανονικές ποσότητες και αν οι ξένοι οργανισμοί ή τα ανώμαλα κύτταρα μπορούν να καταστραφούν, τότε η ασθένεια μπορεί να ιαθεί. Αυτά τα προβλήματα μπορούν πολλές φορές να αντιμετωπιστούν μέσω παρεμπόδισης συγκεκριμένων ενζύμων [25]. Η δραστηριότητα των ενζύμων

οφείλεται στο ενεργό τους κέντρο, όπου και γίνονται οι αντιδράσεις. Το ενεργό κέντρο είναι μια μικρή περιοχή, μια κοιλότητα ή οπή στην επιφάνεια του ενζύμου. Το ενεργό κέντρο αποτελείται από 10-15 αμινοξέα τα οποία έρχονται σε κοντινές αποστάσεις μέσω της αναδίπλωσης της πρωτοταγούς δομής της πρωτεΐνης. Ένα μέρος του ενεργού κέντρου είναι υπεύθυνο για την στερεοειδική σύνδεση του υποστρώματος σε εγγύτητα με δεύτερο μέρος του ενεργού κέντρου στο οποίο γίνεται η αντίδραση [26]. Όταν η ενεργότητα ενός ενζύμου παρεμποδίζεται, τα υποστρώματα αυτού του ενζύμου δεν μπορούν πλέον να μεταβολιστούν και δεν μπορούν να παραχθούν μεταβολικά προϊόντα από αυτό το ένζυμο. Αυτό είναι σημαντικό στον σχεδιασμό φαρμάκων επειδή, αν σε ένα κύτταρο παρουσιάζεται έλλειψη υποστρώματος για ένα ένζυμο-στόχο και αυτή η έλλειψη προκαλεί ασθένεια, η παρεμπόδιση του ενζύμου θα σταματήσει την καταστροφή/μεταβολισμό του υποστρώματος από το ένζυμο και ως συνέπεια θα αυξηθεί η συγκέντρωσή του. Αν πάλι ένα κύτταρο παρουσιάζεται υπερπαραγωγή ενός μεταβολίτη και αυτή η περίσσειά προκαλεί ασθένεια, η παρεμπόδιση του ενζύμου που το παράγει θα φέρει τη συγκέντρωσή του σε κανονικά επίπεδα. Στην περίπτωση ξένων οργανισμών ή ανώμαλων κυττάρων (όπως ογκοκυττάρων) η παρεμπόδιση των ενζύμων τους μπορεί να οδηγήσει στην αναστολή των ζωτικών λειτουργιών τους και συνεπώς στον θάνατό τους [25].

Στον φαρμακευτικό τομέα, ήταν πολύ γνωστό ότι πολλά φάρμακα δρουν μέσω αναστολής κάποιου ενζύμου σε κάποιο στάδιο, και μερικές (φυσικής προέλευσης) φαρμακευτικές ενώσεις έχουν χρησιμοποιηθεί ειδικά για το σκοπό αυτό για μεγάλο χρονικό διάστημα [27]. Οι αναστολείς ενζύμων είναι σημαντικοί για τον έλεγχο των παθογόνων μικροοργανισμών, την αποθήκευση και συντήρηση των τροφίμων. Πολλά σύγχρονα φαρμακευτικά προϊόντα έχουν σχεδιαστεί να αναστέλλουν ειδικά μικροβιακά ενζυμικά συστήματα. Τα μυκητοκτόνα, ζιζανιοκτόνα και εντομοκτόνα στοχεύουν σε συγκεκριμένα ένζυμα [26]. Ένας παρεμποδιστής ενός ενζύμου, σε γενικές γραμμές, είναι μια ένωση που προκαλεί μη αναστρέψιμη αναστολή του ενζύμου, δηλαδή, αποτρέπει μη αντιστρεπτά την κατάλυση μιας αντίδρασης από αυτό το ένζυμο. "Μη αντιστρεπτό" σε αυτό το πλαίσιο, ωστόσο, δεν σημαίνει απαραίτητα ότι η δραστηριότητα του ενζύμου δεν επανέρχεται ποτέ, απλώς ότι το ένζυμο καθίσταται δυσλειτουργικό για μια εκτεταμένη (αλλά απροσδιόριστη) χρονική περίοδο. Μία ένωση σχηματίζει ομοιοπολικό δεσμό με το ένζυμο συχνά καταστρέφει την ενζυμική δραστηριότητα επ' αόριστον, ωστόσο, υπάρχουν πολλές περιπτώσεις όπου ο ομοιοπολικός δεσμός που σχηματίζεται είναι αναστρέψιμος, και η δραστηριότητα του ενζύμου επιστρέφει αργά. Υπάρχουν και άλλες περιπτώσεις μη αναστρέψιμης αναστολής στην οποία δεν υπάρχει σχηματισμός ομοιοπολικού δεσμού, αλλά η ένωση συνδέεται τόσο σφιχτά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου που η σταθερά ρυθμού για την απελευθέρωση της ένωσης από το ένζυμο είναι εξαιρετικά μικρή. Αυτό, στην πράξη, παράγει μη αναστρέψιμη αναστολή. Ωστόσο, ένας άλλος τύπος μη αναστρέψιμου αναστολέα είναι αυτός που μετατρέπεται από το ένζυμο προς προϊόν που δεσμεύεται πολύ στενά με το ένζυμο και, ως εκ τούτου, έχει ένα πολύ αργό ρυθμό αποσύνδεσης από το ένζυμο [28].

### 1.3.2. Μοριακή προσομοίωση πρόσδεσης φαρμακευτικών μορίων σε ενεργά κέντρα ενζύμων

Η μοριακή πρόσδεση (Molecular Docking-MD) ορίζεται ως η *in silico* πρόβλεψη της δομής ενός συμπλόκου, που προκύπτει από την πρόσδεση ενός μορίου προσδέτη σε ένα μεγαλύτερο μόριο υποδοχέα (Y). Συνήθως ο υποδοχέας είναι μια πρωτεΐνη και ο προσδέτης είναι κάποιο μικρότερο μόριο, όχι αναγκαία πρωτεΐνη. Στους τομείς της

βιολογίας και της βιοχημείας, η πρόσδεση του μορίου προσδέτη στο υποδοχέα επάγει συγκεκριμένο σήμα, που μεταφράζεται σε βιολογικό αποτέλεσμα. Έτσι, όταν μιλάμε για μόριο προσδέτη, εννοούμε κάποια ένωση, που συντίθεται από τον οργανισμό είτε κάποιο άλλο βιομόριο. Στον τομέα της φαρμακοχημείας, ο προσδέτης περιορίζεται σε φαρμακευτικά μόρια (ΦΜ) ή εν δυνάμει φαρμακευτικά μόρια. Η γνώση των αλληλεπιδράσεων του φαρμακευτικού μορίου με τον υποδοχέα σε μοριακό επίπεδο είναι ουσιαστική, προκειμένου να σχεδιασθούν καινοτόμα προϊόντα με βελτιωμένη φαρμακευτική δράση. Δεδομένου ότι ο υποδοχέας είναι ένα μεγάλο μόριο είναι λογικό πως το ΦΜ θα προσδένεται σε κάποια συγκεκριμένη περιοχή του, η οποία ονομάζεται θήκη πρόσδεσης ή ενεργό κέντρο του υποδοχέα [29].

Με την αύξηση του αριθμού των θεραπευτικών στόχων/υποδοχέων, η ανάγκη για γρήγορη αναζήτηση για μικρά μόρια που μπορούν να συνδεθούν με τους υποδοχείς αυτούς είναι καθοριστικής σημασίας στην διαδικασία ανακάλυψης φαρμάκων. Ένας τρόπος για να επιτευχθεί αυτό είναι η *in silico* ή εικονική διαλογή (virtual screening-VS) μεγάλων συλλογών από ενώσεις [30]. Το πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι ότι η δομή του στόχου παρέχει ένα πρότυπο για την ανακάλυψη νέων προσδετών. Η ουσία της τεχνικής είναι πως μπορεί να ξεκινήσει κανείς με μια βάση δεδομένων που περιέχει χημικές ενώσεις και τη δομή ενός υποδοχέα και να ρωτήσει: "Από τις ενώσεις στη βάση δεδομένων, ποιά είναι πιο πιθανό να συνδέεται με τον υποδοχέα;" Εδώ, ένα πρόγραμμα πρόσδεσης χρησιμοποιείται για να τοποθετήσει πολλές διαφορετικές αναπαραστάσεις ενός μικρού μορίου σε μια δομή-στόχο (ή σε ένα τμήμα αυτού, π.χ., το ενεργό κέντρο ενός ενζύμου) σε μία ποικιλία θέσεων και προσανατολισμών. Κάθε τέτοιος τρόπος πρόσδεσης ονομάζεται «πόζα» [31]. Ο καθορισμός του σωστού τρόπου πρόσδεσης ενός μορίου περιλαμβάνει την εύρεση του σωστού προσανατολισμού και, καθώς τα περισσότερα μόρια-προσδέτες είναι εύκαμπτα, τη σωστή διαμόρφωση του μορίου κατά την πρόσδεση. Αυτό σημαίνει ότι οι βαθμοί ελευθερίας που πρέπει να αναζητηθούν περιλαμβάνει βαθμούς ελευθερίας μετακίνησης και περιστροφής του προσδέτη στο σύνολό του, καθώς και τους εσωτερικούς του βαθμούς ελευθερίας που κατά κύριο λόγο είναι οι περιστρεφόμενοι δεσμοί. Προκειμένου να προσδιοριστεί η πιο ευνοϊκή πόζα, κάθε πόζα βαθμολογείται (σκοράρεται) με βάση την συμπληρωματικότητά της ως προς τον στόχο όσον αφορά το σχήμα και τις φυσικοχημικές ιδιότητες όπως οι ηλεκτροστατικές επιδράσεις (η διαδικασία αυτή λέγεται και "πρόβλεψη πόζας"). Μια καλή βαθμολογία δείχνει ότι το μόριο είναι πιθανώς ένας καλός προσδέτης. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για όλα τα μόρια στη συλλογή, οι οποίες στη συνέχεια κατατάσσονται με βάση βαθμολογίες τους (τις προβλεπόμενες συγγένειες τους προς τον στόχο). Αυτή η λίστα χρησιμοποιείται στη συνέχεια για την επιλογή για την αγορά, σύνθεση, ή βιολογική έρευνα μόνον εκείνων των ενώσεων που έχουν προβλεφθεί πως είναι οι πιο ενεργές. Υποθέτοντας ότι τόσο οι πόζες και τα σκορ συγγένειας έχουν προβλεφθεί με ακρίβεια, αυτή η επιλογή θα περιέχει ένα σχετικά μεγάλο ποσοστό ενεργών μορίων, δηλαδή, θα είναι «εμπλουτισμένο» με δραστικά σε σύγκριση μια τυχαία επιλογή [30].

Πριν γίνει η προσομοίωση της πρόσδεσης, είναι απαραίτητο οι δομές τόσο του μακρομορίου/υποδοχέα όσο και του προσδέτη να είναι κατάλληλα προετοιμασμένες. Οι λεπτομέρειες της προετοιμασίας του υποδοχέα είναι ειδικές για το πρόγραμμα που χρησιμοποιείται, ωστόσο, υπάρχουν αρκετές γενικές αρχές που πρέπει να έχουμε κατά νου. Αυτές περιλαμβάνουν την κατάσταση πρωτονίωσης της πρωτεΐνης και των αμινοξέων, την ορθή αντιμετώπιση των όποιων μη συνήθων αμινοξέων και μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων, καθώς και τη συμπερίληψη των τυχόν απαιτούμενες συνδετικών μορίων, νουκλεοτιδίων, ιόντων, και ούτω καθεξής. Εάν οι θέσεις αυτών των τροποποιήσεων είναι γνωστές ή πιστεύεται ότι είναι κοντά στην θέση σύνδεσης,

αυτές μπορεί να είναι κρίσιμες για την επιτυχία της πρόσδεσης, εάν είναι πιο απομακρυσμένες από τη θέση σύνδεσης, μπορούν να αγνοηθούν. Οι προσδέτες, όπως τα ΦΜ και τα μικρά πεπτίδια, από την άλλη μεριά τείνουν να έχουν πιο περιορισμένους βαθμούς ελευθερίας και συνεπώς μπορούν να αντιμετωπίζονται με μια πιο συστηματική προσέγγιση. Με λίγα λόγια, όσο λιγότερους περιστρεφόμενους δεσμούς, τόσο πιο εύκολο είναι να ληφθούν όλες οι απαιτούμενες πόζες πρόσδεσης. Ανάλογα με το λογισμικό, τα πακέτα docking που επιτρέπουν στο χρήστη να ορίσει σταθερούς ή περιστρεφόμενους δεσμούς είναι συνήθως επαρκή, αν και είναι σημαντικό να βεβαιωθεί κανείς εάν κάποιες διαμορφώσεις που χρησιμοποιούνται στο docking δεν είναι στερεοχημικά παρεμποδισμένες. Ακριβώς όπως και για το μακρομόριο, οι ηλεκτροστατικές επιδράσεις προσδέτη-υποδοχέα είναι οι πιο σημαντικές και αν δεν εκπροσωπούνται σωστά, τα αποτελέσματα επηρεάζονται δραστικά [32].

Σχετικά με την συνάφεια των προσδετών στον υποδοχέα, η συνάφεια πρόσδεσης μπορεί να εκτιμηθεί πειραματικά με κινητικά πειράματα που μετρούν την αναστολή της πρωτεΐνης ή του ενζύμου με την παρουσία τόσο του αναστολέα και του υποστρώματος, και αναφέρεται ως σταθερά αναστολής  $K_i$ . Κάτω από συνθήκες ισορροπίας, η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης δίδεται ως σταθερά διάστασης  $K_d$  η οποία είναι ο λόγος της συγκέντρωσης των αντιδρώντων (πρωτεΐνες και προσδέτη) προς προϊόντα (σύμπλοκο):  $K_d = [P][L]/[PL]$ . Η ελεύθερη ενέργεια της πρόσδεσης σχετίζεται με την διάσταση του [PL] με την εξίσωση  $\Delta G = \Delta G_0 - RT \cdot \ln(K_d)$  όπου η  $\Delta G$  είναι η μεταβολή στην ελεύθερη ενέργεια για την αντίδραση, το  $R$  η σταθερά των αερίων, και  $T$  η θερμοκρασία.  $\Delta G_0$  είναι η μεταβολή στην ελεύθερη ενέργεια που σχετίζεται με αντίδραση σε πρότυπες συνθήκες όπου όλες οι συγκεντρώσεις είναι στο 1 M, η θερμοκρασία είναι 298 K, και η πίεση είναι 1 atm. Ως εκ τούτου, η ελεύθερη ενέργεια της αντίδρασης που υπολογίζεται από την σταθερά διάστασης  $K_d$  μπορεί να συγκριθεί με την θεωρητικά υπολογισμένες ελεύθερες ενέργειες πρόσδεσης. Η ελεύθερη ενέργεια της πρόσδεσης μπορεί να υπολογιστεί ως διαφορά μεταξύ της ελεύθερης ενέργειας των αντιδρώντων (πρωτεΐνης και προσδέτη) και η ελεύθερη ενέργεια του προϊόντος ως  $\Delta G_{bind} = \Delta G_{complex} - (\Delta G_{protein} + \Delta G_{ligand})$  όπου  $\Delta G_{bind}$  είναι η ελεύθερη ενέργεια της πρόσδεσης,  $\Delta G_{complex}$  η ελεύθερη ενέργεια του συμπλόκου πρωτεΐνης-συνδετήρα, και  $\Delta G_{protein}$ ,  $\Delta G_{ligand}$  οι ελεύθερες ενέργειες της πρωτεΐνης και προσδέτη, αντίστοιχα. Υπολογιστικά, η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης συνήθως διασπάται σε διαφορετικές συνιστώσες ελεύθερης ενέργειας που είναι αθροιστικές και εκπροσωπούνται από μια ενιαία εξίσωση [33]. Μια τέτοια ενιαία εξίσωση στηρίζεται στην φυσικοχημική βάση των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων που χαρακτηρίζουν την αλληλεπίδραση φαρμακευτικού μορίου και υποδοχέα και μπορεί να γραφεί ως το άθροισμα των ηλεκτροστατικών (EI), επαγωγικών (II), μη-πολικών (NPI) και υδροφοβικών (HI) αλληλεπιδράσεων μεταξύ των δυο μορίων, ελαττωμένο κατά τον όρο που εκφράζει την απώλεια ενέργειας ή εντροπίας κατά την σύνδεσή τους ( $\Delta G^*$ ):  $\Delta G_{total} = \Delta G_{EI} + \Delta G_{II} + \Delta G_{NPI} + \Delta G_{HI} - \Delta G^*$  [29].

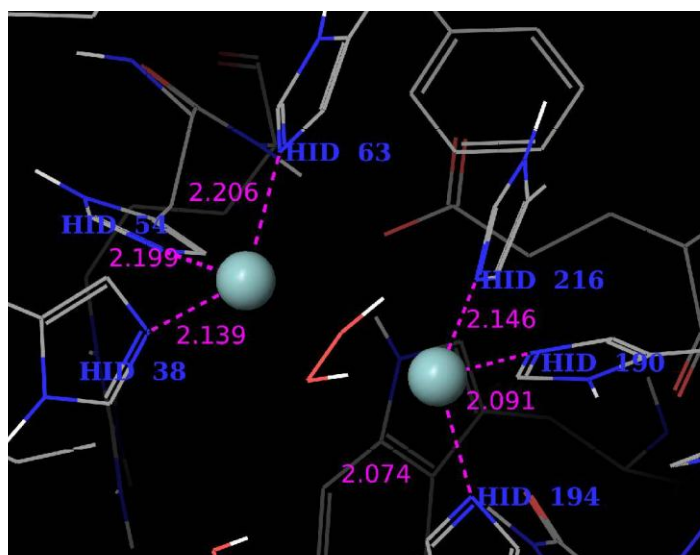
Οι ενιαίες εξισώσεις χρησιμοποιούνται να κατευθύνουν την ανάπτυξη συναρτήσεων βαθμολόγησης (σκοραρίσματος). Οι συναρτήσεις βαθμολόγησης έχουν επίσης σχεδιαστεί για να προβλέπουν τρόπους δέσμευσης των αναστολέων και να διακρίνουν ανάμεσα στον πραγματικό και ψευδή τρόπο δέσμευσης [33]. Αυτές οι συναρτήσεις μπορούν να ταξινομηθούν χαλαρά σε τρεις κατηγορίες: μέθοδοι δυναμικού πεδίου (force-field methods), μέθοδοι με βάση τη γνώση (knowledge-based) και τις μεθόδους εμπειρικές-παλινδρόμησης (empirical-regression). Οι μέθοδοι δυναμικού πεδίου χρησιμοποιούν δυναμικά παρόμοια με αυτά που βρίσκονται στη μοριακή μηχανική και συνδέονται με πιο αξιόπιστες τεχνικές όπως η

μοριακή δυναμική και θερμοδυναμική ολοκλήρωση. Από την άλλη πλευρά, είναι επιρρεπείς σε υπολογισμό ενεργειών αλληλεπίδρασης μεγάλο μεγέθους και υψηλού σφάλματος. Τόσο οι μέθοδοι που βασίζονται στην γνώση και εμπειρικές συναρτήσεις βαθμολόγησης προέρχονται από πειραματικά δεδομένα, η πρώτη από τις δομές ατομικών επαφών που παρατηρούνται στις κρυσταλλογραφικές δομές, η δεύτερη από προσαρμογές σε ενέργειες πρόσδεσης. Και οι δύο είναι λιγότερο εκτεθειμένες σε υπολογισμό υπερβολικά μεγάλων ενεργειών αλληλεπίδρασης, αλλά μπορεί να υποφέρουν από τα προβλήματα της επαγωγής, συμπεριλαμβανομένων των σφαλμάτων στα δεδομένα από τα οποία προέρχονται. Στις συναρτήσεις βαθμολόγησης δυναμικού πεδίου η πολύ πρόσφατη εργασία έχει επικεντρωθεί σε ανάπτυξη αποτελεσματικών μεθόδων για την ενσωμάτωση πηγών ενέργειας ενυδάτωσης στο σκορ πρόσδεσης. Πολλές μέθοδοι χρησιμοποιούν ένα γενικευμένο μοντέλο Born/επιφάνειας ή άλλες προσεγγίσεις της ηλεκτροστατικής. Αρκετές μελέτες υποδεικνύουν ότι οι μελέτες πρόσδεσης μπορούν να βελτιωθούν με τη χρήση πιο ακριβών τιμών μερικών φορτίων για τους προσδέτες. Οι πρόσφατες βελτιώσεις τόσο στις εμπειρικές συναρτήσεις βαθμολόγησης καθώς και αυτών που βασίζονται στη γνώση έχουν επικεντρωθεί στη βελτίωση της ισορροπίας μεταξύ πολικών και μη πολικών αλληλεπιδράσεων, λαμβάνοντας υπόψη το ρόλο του διαλύτη, και τη διόρθωση για τις επαφές μεταξύ προσδετών στις δομές από τις οποίες προέρχονται οι γνώσεις για τα δυναμικά. Δεν υπάρχει, προς το παρόν, υπάρχει ομοφωνία ως προς το είδος της συνάρτησης βαθμολόγησης που είναι η καλύτερη για μελέτες docking, καθώς καλά αποτελέσματα έχουν επιτευχθεί με τις τρεις προσεγγίσεις. Παρομοίως, ενώ και τα τρία μοντέλα μπορούν να αποκλείσουν "παράλογα" μόρια από τους καταλόγους των αποτελεσμάτων πρόσδεσης, για παράδειγμα, τα μόρια που είναι πάρα πολύ μεγάλα ή πολύ φορτισμένα για μια περιοχή-στόχο, κανένα δεν μπορεί να ταξινομήσει αξιόπιστα τις "λογικές" πόζες πρόσδεσης, εκτός από ειδικές περιπτώσεις [31].

Εν κατακλείδι, σημειώνεται πως το docking έχει χρησιμοποιηθεί για να ανακαλυφθούν νέοι προσδέτες για πάνω από 30 στόχους, οι οποίοι είναι συνήθως ένζυμα. Οι αναστολείς που ανακαλύφθηκαν ήταν νέα μόρια με μικρή ομοιότητα με τους ως τότε γνωστούς προσδέτες. Σε πολλές περιπτώσεις τα αποτελέσματα του docking ακολούθησαν και βιολογικές μελέτες [31].

### 1.3.3. Η τυροσινάση ως υποδοχέας-στόχος

Η τυροσινάση είναι μια πολυλειτουργική, γλυκοζυλιωμένη οξειδάση που περιέχει χαλκό, η οποία καταλύει τα πρώτα δύο βήματα μελανογένεσης σε θηλαστικά και είναι υπεύθυνη για ενζυμικές αντιδράσεις αμαύρωσης στα χτυπημένα φρούτα κατά το χειρισμό μετά τη συγκομιδή και την επεξεργασία. Ο όρος τυροσινάση αναφέρεται στο τυπικό υπόστρωμά της, την τυροσίνη [34]. Η τυροσινάση, η οποία είναι επίσης γνωστή ως πολυφαινολική οξειδάση περιέχει ενεργό κέντρο με ένα ισχυρά συζευγμένο ζεύγος ιόντων χαλκού και λειτουργεί τόσο ως μονο-φαινολάση και ως ο-διφαινολάση [35]. Αυτό το ένζυμο δηλαδή χρησιμοποιεί μοριακό οξυγόνο για την κατάλυση της οξείδωσης μονοφαινολών στις αντίστοιχες ο-διφαινόλες τους και την επακόλουθη οξείδωση προς ο-κινόνες. Αυτό το ένζυμο είναι υπεύθυνο για στο χρωματισμό σε φυτά και ζώα, η οποία οδηγεί στην ανεπιθύμητη αμαύρωση των γεωργικών προϊόντων και τον χρωματισμό του δέρματος, των ματιών, του εσωτερικού του αυτιού, και των μαλλιών ενός ζώου [36].



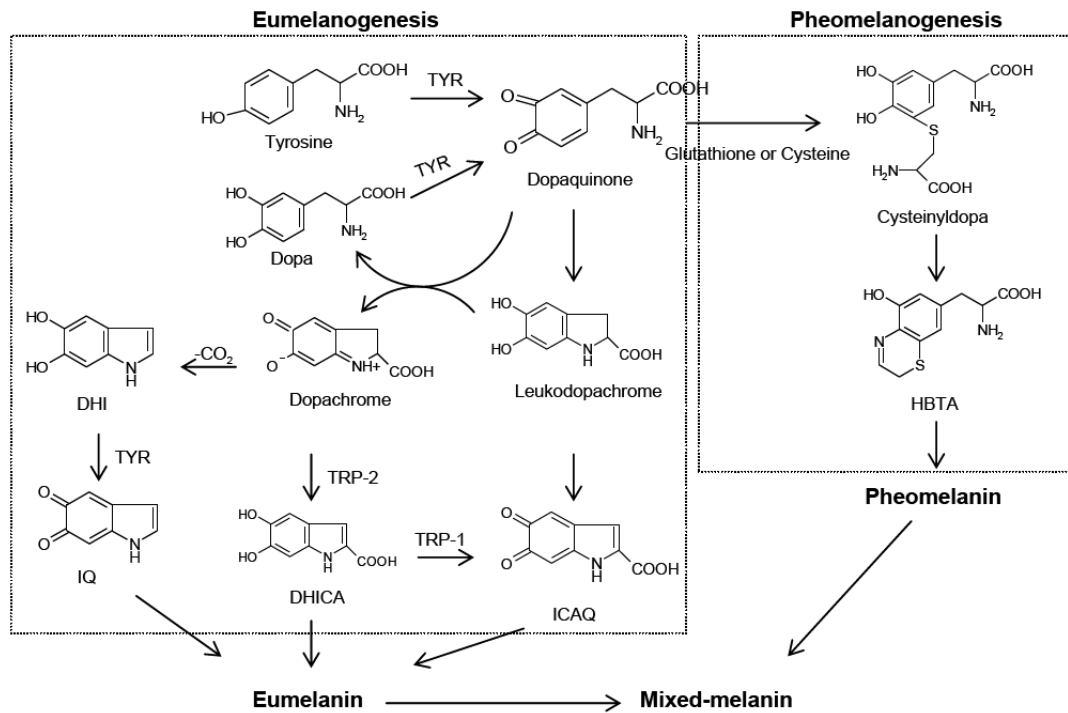
Εικόνα 6: Το ενεργό κέντρο ενός μορίου oxy-τυροσινάσης. Παρουσιάζονται τα ιόντα χαλκού, το μόριο υπεροξειδίου και τα αμινοξέα ιστιδίνης

Το αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό που παρατηρείται σε τυροσινάσες από διαφορετικές πηγές (διαφορετικούς οργανισμούς) είναι ότι η κεντρική περιοχή με το ζεύγος ατόμων χαλκού διατηρείται. Ένα μόριο τυροσινάσης μπορεί να περιέχει δύο άτομα χαλκού και έκαστο άτομο του διπυρηνικού συμπλέγματος χαλκού συνδέεται με τρεις ιστιδίνες. Κατά το σχηματισμό των χρωστικών μελανίνης, εμπλέκονται τρία είδη της τυροσινάσης (oxy-, met- και deoxy-τυροσινάση), με διαφορετικές δομές του ενεργού κέντρου των δύο ατόμων χαλκού. Η οξυγονωμένη μορφή (οξυ-τυροσινάση, E-oxy) αποτελείται από δύο τετραγωνικά άτομα χαλκού (II), έκαστο συντονισμένο από δύο ισχυρά ισημερινά και ένα ασθενέστερο αξονικό αμινοξύ ιστιδίνης. Το εξωγενές μόριο οξυγόνου δεσμεύεται ως υπεροξειδίου και γεφυρώνει τους δύο χαλκούς. Η met-τυροσινάσης (E-met), είναι παρόμοια με τη μορφή oxy-, και περιέχει δύο τετραγωνικά ιόντα χαλκού (II) συνδεδεμένα μέσω ενδογενούς γέφυρας, και εξωγενείς προσδέτες εκτός του υπεροξειδίου του συνδέονται με το χώρο του χαλκού. Η deoxy-τυροσινάση (E-deoxy) περιέχει δύο ιόντα χαλκού (I) με μια διάταξη συντονισμού παρόμοια με εκείνη της met μορφής, αλλά χωρίς τη γέφυρα υδροξειδίου. Η μορφή της τυροσινάσης όταν το ένζυμο λαμβάνεται μετά από καθαρισμό, έχει βρεθεί πως είναι μίγμα 85% met και 15% oxy μορφών [34].

Η μελανογένεση στα θηλαστικά ξεκινά με το πρώτο βήμα της οξειδωσης της τυροσίνης προς ντοπακινόνη η οποία καταλύεται από την τυροσινάση (Σχήμα 7). Η ντοπακινόνη έπειτα μετατρέπεται σε L-3,4-διϋδροξυφαινυλαλανίνη (ή L-DOPA) και ντοπαχρώμα (dopachrome) μέσω αυτοοξειδωσης. Η L-DOPA είναι επίσης υπόστρωμα της τυροσινάσης και οξειδώνεται προς ντοπακινόνη από το ένζυμο. Τέλος, σχηματίζονται ευμελανίνες (eumelanin) μέσω μιας σειράς αντιδράσεων οξειδωσης από διϋδροξυϊνδόλη (DHI) και διϋδροξυϊνδόλη-2-καρβοξυλικό οξύ (DHICA), τα οποία είναι τα προϊόντα αντίδρασης από ντοπαχρώμα. Υπό την παρουσία κυστεΐνης ή γλουταθειόνης, ντοπακινόνη μετατρέπεται σε κυστεΐνυλ-L-DOPA ή γλουταθειόνυλ-L-DOPA. Στη συνέχεια, σχηματίζονται φαιομελανίνες (pheomelanin). Εκτός από τις ευμελανίνες και φαιομελανίνες, οι άλλες "μελανίνες", που βασίζονται σε φαινολικά μονομερή διαφορετικά της τυροσίνης ονομάζονται αλλομελανίνες (allomelanin). Το φαινόμενο αμαύρωσης στα φρούτα και τους μύκητες συνήθως σχετίζεται με τον οξειδωτικό πολυμερισμό, που εννοιολογικά παρόμοιος με τη μελανογένεση. Η κύρια διαφορά έγκειται στο γεγονός ότι η



αλλομελανίνη ουσιαστικώς δεν περιέχει μονομερή προερχόμενα από την ντοπακινόνη ως τα κύρια μονομερή στη δομή του και, αντιθέτως, βασίζεται σε άλλους δομικούς λίθους [34].



Σχήμα 8: Όπου: TYR: τυροσινάση, TRP: πρωτεΐνη σχετιζόμενη με την τυροσινάση, dopa: 3,4-διϋδροξυφαινυλαλανίνη, DCICA: 5,6-διϋδροξυινδόλ-2-καρβοξυλικό οξύ, DHI: 5,6-διϋδροξυινδόλη, ICAQ: ινδόλ-2-καρβοξυλικό οξύ-5,6-κινόνη, IQ: ινδόλ-5,6-κινόνη, HBTA: 5-ϋδροξυ-1,4-βενζοθειαζινυλαλανίνη [34]

Η μελανίνη παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία του ανθρώπινου δέρματος από τις βλαβερές συνέπειες της υπεριώδους ακτινοβολίας από τον ήλιο. Η μελανίνη καθορίζει επίσης φαινοτυπική εμφάνισή μας. Παρά το γεγονός ότι η μελανίνη έχει κυρίως φωτοπροστατευτική λειτουργία στο ανθρώπινο δέρμα, η συσσώρευση μη φυσιολογικής ποσότητας μελανίνης σε συγκεκριμένα τμήματα του δέρματος με αποτέλεσμα αυξημένη χρώση σε εκείνα τα σημεία μπορεί να δημιουργήσει αισθητικό πρόβλημα [34]. Η ανώμαλη χρώση είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη σε μεσήλικες και ηλικιωμένα άτομα για τους οποίους αποτελεί ένα σοβαρό αισθητικό πρόβλημα. Είναι σημαντικό αισθητικά και μπορεί να υποβαθμίσει σημαντικά τόσο από την εμφάνιση και την ποιότητα ζωής, ιδίως σε κουλτούρες όπου η ομαλή επιδερμίδα αποτιμάται ως ένα σημάδι της υγείας. Εξωγενή αίτια όπως η έκθεση στο υπεριώδες φως, είναι ένας κοινός παράγοντας σε χρωστικές ανωμαλίες όπως το μέλασμα και οι φακίδες από τον ήλιο και οι κηλίδες που εμφανίζονται στα άκρα ηλικιωμένων ατόμων. Η έκθεση σε ορισμένα φάρμακα και τα χημικά προϊόντα, καθώς και η ύπαρξη ορισμένων ασθενειών μπορεί επίσης να οδηγήσει σε υπερμελάγχρωση [37]. Ούτε η υπέρχρωση στο ανθρώπινο δέρμα, αλλά ούτε η ενζυμική αμαύρωση στα φρούτα είναι επιθυμητές [34]. Τροποποίηση στη βιοσύνθεση μελανίνης συμβαίνει σε αρκετές ασθένειες. Οι χρωστικές της μελανίνης βρίσκονται επίσης στον εγκέφαλο των θηλαστικών. Η τυροσινάση μπορεί να παίζει ένα ρόλο στο σχηματισμό νευρομελανινών στον ανθρώπινο εγκέφαλο και θα μπορούσε να είναι κεντρικής σημασίας για

νευροτοξικότητα της ντοπαμίνης, καθώς να συμβάλλει στην νευροεκφυλισμό που σχετίζεται με νόσο του Parkinson. Η αντικαρκινική δραστηριότητα για μελανώματα είναι επίσης γνωστό ότι συνδέεται με τη δραστηριότητα της τυροσινάσης [36]. Τα φαινόμενα αυτά έχουν ενθαρρύνει τους ερευνητές να αναζητήσουν νέους ισχυρούς αναστολείς της τυροσινάσης για χρήση σε τρόφιμα, καλλυντικά, λ.χ. για την λεύκανση του δέρματος, αλλά και για φάρμακα [34].

Έτσι, πειραματική παρατήρηση της αναστολής της δραστηριότητας της τυροσινάσης μπορεί να επιτευχθεί με έναν από τους ακόλουθους τρόπους: (1) Αναγωγικοί παράγοντες που προκαλούν χημική αναγωγή ντοπακινόνης, όπως το ασκορβικό οξύ, το οποίο χρησιμοποιείται ως αναστολέας μελανογένεση λόγω της ικανότητάς της να ανάγει την ο-ντοπακινόνη πίσω σε L-DOPA, αποφεύγοντας έτσι σχηματισμό ντοπαχρώματος και μετέπειτα μελανίνης. (2) Συλλέκτες ο-ντοπακινόνης, όπως οι περισσότεροι ενώσεις που περιέχουν θείο, οι οποίες είναι γνωστοί αναστολείς μελανογένεση και αντιδρούν με την ντοπακινόνη προς σχηματισμό άχρωμων προϊόντα. Η διαδικασία μελανογένεσης επομένως επιβραδύνεται μέχρις ότου όλος συλλέκτης να καταναλωθεί, και στη συνέχεια πηγαίνει στο αρχικό ρυθμό της. (3) Εναλλακτικά υποστρώματα ενζύμων όπως ορισμένες φαινολικές ενώσεις, των οποίων τα προϊόντα αντίδρασης απορροφούν σε ένα φασματικό εύρος διαφορετική από εκείνο του ντοπαχρώματος. Όταν αυτά τα φαινολικά δείχνουν μια καλή συγγένεια για το ένζυμο, εμποδίζεται σχηματισμός ντοπαχρώματος, και θα μπορούσαν λανθασμένα να χαρακτηριστούν ως αναστολείς. (4) Μη ειδικό απενεργοποιητές ενζύμων όπως οξέα ή βάσεις, τα οποία μη ειδικά μετουσιώνουν το ένζυμο, έτσι αναστέλλοντας τη δράση του. (5) Ειδικό απενεργοποιητές της τυροσινάση, όπως αναστολείς με βάση το μηχανισμό, τα οποία καλούνται επίσης υποστρώματα αυτοκτονίας. Αυτοί οι αναστολείς μπορεί να καταλύονται από την τυροσινάση και σχηματίζουν ομοιοπολικό δεσμό με το ένζυμο, έτσι αδρανοποιώντας ανεπανόρθωτα το ένζυμο κατά τη διάρκεια της καταλυτικής αντιδράσεως. Αναστέλλουν τη δράση της τυροσινάσης επάγοντας στο ένζυμο "αντίδραση αυτοκτονίας." (6) Ειδικό αναστολείς τυροσινάσης οι οποίες δεσμεύονται αναστρέψιμα σε τυροσινάση και να μειώσουν καταλυτική ικανότητα. Μεταξύ των έξι τύπων των ενώσεων που περιγράφονται ανωτέρω, μόνο οι ειδικό απενεργοποιητές της τυροσινάσης (5) και οι αναστολείς (6) θεωρούνται ως "αληθινό αναστολείς", οι οποία στην πραγματικότητα συνδέονται με το ένζυμο και αναστέλλουν την δράση του [35].

Ως αναστολείς της τυροσινάσης έχουν προταθεί ενώσεις όπως οι φλαβονόλες [35], υβριδικές ενώσεις με βάση τις κουμαρίνες [38], χαλκόνες [11,34,39] και ωρόνες [11,39], ενώ για τις δύο τελευταίες κατηγορίες ενώσεων έχει προταθεί πως οφείλουν την ανασταλτική τους δράση στην παρουσία ομάδων υδροξυλίων στην δομή τους, με την δραστηριότητά τους να μεταβάλλεται ανάλογα με τον αριθμό και την θέση αυτών των ομάδων πάνω στο άτομο [36,39].

#### 1.3.4. Αντικαρκινική δράση φαρμακευτικών μορίων-παρεμπόδιση HDAC-αναστολή ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων

Η ακετυλίωση πρωτεϊνών από τις ακετυλοτρανσφεράσες ιστόνης (histone acetyltransferases, HATs) και αποακετυλίωσή τους από τις αποακετυλάσες ιστόνης (histone deacetylases, HDACs) ρυθμίζει μια ευρεία ποικιλία κυτταρικών λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένης της αναγνώρισης του DNA από πρωτεΐνες, αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, και την σταθερότητα πρωτεϊνών [40]. Οι HATs και HDACs παίζουν μεγάλο ρόλο στον σχηματισμό της δομής του DNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Στον πυρήνα των κυττάρων η δομή της χρωματίνης είναι σύνθετη και αποτελείται από DNA, ιστόνες, και μη-ιστονικές πρωτεΐνες. Η βασική

επαναλαμβανόμενη μονάδα της χρωματίνης είναι το νουκλεόσωμα, περίπου 146 ζεύγη βάσεων DNA τυλιγμένο γύρω από το οκταμερές ιστονών που αποτελείται από δύο αντίγραφα εκάστης από τις τέσσερις ιστόνες: H2A, H2B, H3, και H4. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών, συμπεριλαμβανομένης της ακετυλίωσης, φωσφορυλίωσης, μεθυλίωσης, και άλλων διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Οι δύο ομάδες των ενζύμων, HATs και HDACs, καθορίζουν το πρότυπο της ακετυλίωσης των ιστονών. Έχει προταθεί ότι οι τροποποιήσεις των ιστονών, ενεργώντας μόνες τους, διαδοχικά, ή σε συνδυασμό, αντιπροσωπεύουν έναν "κωδικό" που μπορεί να αναγνωριστεί από μη-ιστονικές πρωτεΐνες, οι οποίες σχηματίζουν σύμπλοκα που είναι σημαντικά για τη ρύθμιση της γονιδιακής μεταγραφής. Τα HDACs και HATs δεν προσδένονται στο DNA άμεσα, αλλά αλληλεπιδρούν με το DNA μέσω πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων που περιλαμβάνουν συγκαταστολείς και συνενεργοποιητές [41].

Η υπερέκφραση ή δυσλειτουργία HDACs μπορεί να είναι μια αιτία της καρκινογένεσης. Συνεπώς, η απορρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων μπορεί να προκαλέσει καρκίνο. Οι αναστολείς της αποακετυλάσης ιστόνης (HDACi) είναι μια ομάδα από δομικά διαφορετικές ενώσεις που αποτελούν στοχευμένους αντικαρκινικούς παράγοντες. Οι αναστολείς HDAC (HDACi) πιστεύεται ότι είναι σε θέση να αλληλεπιδράσουν με την καταλυτική περιοχή των HDAC και να εμποδίσουν την ικανότητα αναγνώρισης του υποστρώματος των ενζύμων αυτών, με αποτέλεσμα την αποκατάσταση της σχετικής έκφρασης γονιδίων. Οι κύριες βιολογικές επιδράσεις των HDACi είναι η παύση του κυτταρικού κύκλου, η επαγωγή της διαφοροποίησης και η προώθηση της απόπτωσης. Επιπλέον, οι HDACi μπορούν να ενισχύσουν την ευαισθησία σε χημειοθεραπεία για καρκίνους και να αναστείλουν την αγγειογένεση. Οι πηγές, φύσεις και τις δομές των γνωστών HDACi μέχρι σήμερα διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό, και αυτό θέτει το ερώτημα αν διαφορετικά είδη HDACi επηρεάζουν την εμφάνιση και την ανάπτυξη όγκου μέσω διαφορετικών μηχανισμών [41,42]. Επιπλέον, οι HDACi έχουν αναδειχθεί ως ενδιαφέροντα υποψήφια φάρμακα, ιδιαίτερα ως αντι-νεοπλασματικοί παράγοντες, ενώ μια σειρά από παράγοντες διερευνώνται σε κλινικές συνθήκες τόσο σε στερεούς και αιματολογικούς όγκους, όπου φαίνεται πως αντιστρέφουν παρεκκλίνουσες επιγενετικές καταστάσεις που σχετίζονται με καρκίνο. Επίσης οι HDACi είναι επίσης αντικείμενο έρευνας για μια σειρά από άλλους θεραπευτικούς τομείς όπως οι νευροεκφυλιστικές και ψυχιατρικές διαταραχές, η ίνωση, η καρδιακή υπερτροφία, η σκλήρυνση κατά πλάκας, η φλεγμονή και η χρήση τους ως αντιμολυσματικοί παράγοντες [43].

Ως ένδειξη καλής αντικαρκινικής ιδιότητας κάποιας φαρμακευτικής ένωσης μπορεί επίσης να νοηθεί και η ικανότητά της να αναστείλει την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων. Μια ιδιαίτερα ανθεκτική σειρά καρκινικών κυττάρων είναι η σειρά HeLa, τα οποία προέρχονται από επιθηλιακό καρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας από μια Αφρο-Αμερικανη γυναίκα (Henrietta Lacks), αν και επακόλουθη ανάλυση της παθολογίας των όγκων και του κλινικού φαινοτύπου προσδιόρισε τον κύριο όγκο ως σπάνιο αδenoκαρκίνωμα. Ενδεικτικό της αθανασίας και της ανθεκτικότητας αυτών των κυττάρων είναι πως αναπτύσσονται με ταχείς ρυθμούς (χρόνος διπλασιασμού είναι ~24 ώρες), και παρουσιάζουν έλλειψη αναστολής μέσω επαφής (contact inhibition). Αυτά τα χαρακτηριστικά και η παρουσία τους στα εργαστήρια κυτταρικής καλλιέργειας έχουν οδηγήσει σε συχνά φαινόμενα επιμόλυνσης. Έχει υπολογιστεί ότι το 18% των κυτταρικών σειρών που υποβάλλονται σε αποθετήρια έχουν μολυνθεί με άλλες κυτταρικές σειρές, με τα HeLa να υπεύθυνα για το 25% των εν λόγω φαινομένων επιμόλυνσης [44].

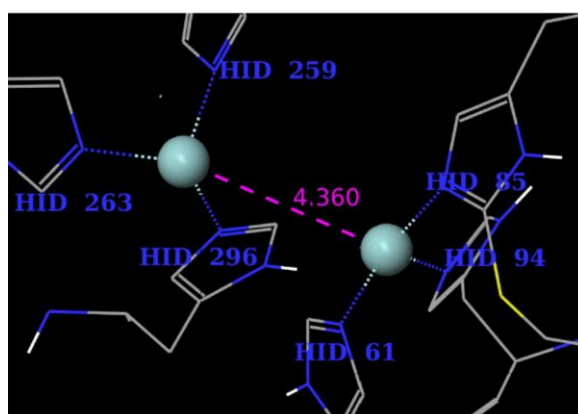
## 2. *In silico* μελέτη της ικανότητας πρόσδεσης (docking) βιοδραστικών μορίων στο ενεργό κέντρο του ενζύμου τυροσινάση

### 2.1. Εισαγωγή

Στο πλαίσιο των τεχνικών της ορθολογικής ανακάλυψης φαρμάκων πραγματοποιήθηκαν αρχικές *in silico* μελέτες της ικανότητας πρόσδεσης (docking) των μορίων που περιέχονται στην βιβλιοθήκη ενώσεων του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας για την ανακάλυψη ενώσεων που παρουσιάζουν ισχυρή πρόσδεση στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης.

#### 2.1.1. Παράμετροι διεξαγωγής μελετών

Οι μελέτες μοριακής πρόσδεσης έγιναν χρησιμοποιώντας την τυροσινάση του μανιταριού *Agaricus Bisporus* ως υποδοχέα (κρυσταλλική δομή μέσω XRD, ανάλυση 2,78Å, PDB ID: 2Y9X). Αυτή η τυροσινάση κρυσταλλώνεται ως διμερές με ένα μονομερές να έχει τέσσερις υπομονάδες, δύο υπομονάδες H, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την ενζυμική δράση και δύο υπομονάδες L των οποίων δραστηριότητα είναι προς το παρόν αδιευκρίνιστη. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη, όπως παρέχεται, έχει συγκρυσταλλωθεί μαζί με ιόντα Ho (ολμίου-αντικαθιστά ιόντα Zn στην φυσική δομή της πρωτεΐνης) και με τον αναστολέα tropolone προσκολλημένο πάνω της. Η πρωτεΐνη προετοιμάστηκε τροποποιώντας την αρχική δομή, όπως αυτή παρέχεται από την PDB, αφαιρώντας τον αναστολέα, το ένα μονομερές καθώς και τις δύο L υπομονάδες, αλλά και μια H από το εναπομείναν μονομερές. Στην υπομονάδα H που προέκυψε έγινε προσθήκη υδρογόνων, διόρθωση της δομής και ελαχιστοποίηση της ενέργειάς της. Όπως και όλες οι τυροσινάσες και το εξεταζόμενο ένζυμο περιέχει δύο ιόντα Cu (II) ως τους κύριους συμπαραγόντες στο ενεργό κέντρο, τα οποία συντονίζονται με 6 αμινοξέα ιστιδίνης [34,39,45].



Εικόνα 7: Αλληλεπίδραση των ιόντων χαλκού στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X

Οι μελέτες έγιναν μέσω χρήσης των προγραμμάτων LigPrep 2.6 και Glide 5.8 της οικογένειας προγραμμάτων Maestro 9.3 - Schrödinger Suite 2012. Οι ενώσεις που εξετάστηκαν αρχικά προετοιμάστηκαν για πρόσδεση κοντά στο pH βέλτιστης δράσης της τυροσινάσης (pH=6.5) στο πεδίο δυνάμεων OLPS 2005. Κατά την διαδικασία προετοιμασίας τους παρήχθησαν και ισομερείς δομές. Κατόπιν εφαρμόστηκαν οι τεχνικές πρόσδεσης: i)απλής ακρίβειας (standard precision-SP), ii)αυξημένης

ακρίβειας (extra precision-XP), iii) κβαντικά-πολωμένης πρόσδεσης (quantum-polarized ligand docking-QLPD). Όλες οι τεχνικές πρόσδεσης που χρησιμοποιήθηκαν δεν εισάγουν διαμορφωτική ευκαμψία στο μόριο του υποδοχέα. Οι τεχνικές XP και QPLD, λόγω του μεγαλύτερου υπολογιστικού τους κόστους, συνήθως χρησιμοποιούνταν σε ενώσεις που έδιναν καλά αποτελέσματα πρόσδεσης με χρήση τεχνικών SP [46,47,48,49].

Στα πλαίσια αυτών των μελετών, ως καλό αποτέλεσμα πρόσδεσης νοείται αυτό στο οποίο κάποια ομάδας του εξεταζόμενου μορίου-προσδέτη, ικανή να συντονίσει μεταλλοκατίον, προσεγγίζει τουλάχιστον ένα από τα ιόντα Cu του ενεργού κέντρου της τυροσινάσης σε απόσταση μικρότερη των 3Å, ούτως ώστε ο προσδέτης να μπορεί να δημιουργήσει σύμπλοκο με τα ιόντα, παρεμποδίζοντας αφενός τη δράση του μετάλλου και αφετέρου την πρόσδεση του βιολογικού υποστρώματος του ενζύμου. Εκτός από την απόσταση από τα ιόντα του χαλκού, σημαντική είναι η ενέργεια της πρόσδεσης (ελεύθερη ενέργεια Gibbs) που οφείλεται κυρίως στις υδρόφοβες και ιοντικές αλληλεπιδράσεις συμπεριλαμβανομένων των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των αμινοξέων της πρωτεΐνης και των υποψήφιων προσδετών. Τέτοιοι δεσμοί ενισχύουν την σταθερότητα του συμπλόκου προσδέτη-υποδοχέα, οδηγώντας πιθανώς σε καλύτερη αναστολή του ενζύμου.

### 2.1.2. Οι ενώσεις που υποβλήθηκαν σε μελέτες πρόσδεσης

Οι κατηγορίες ενώσεων που εξετάστηκαν ήταν: χαλκόνες και ανάλογά τους, κινολινυλοχαλκόνες και ανάλογά τους, ωρόνες και καρβοξαμίδια κινολινονών.

Αναλυτικότερα, οι ενώσεις που μελετήθηκαν παρουσιάζονται στους πίνακες που ακολουθούν:

**Πίνακας 1:** Χαλκόνες και ανάλογά τους

Κωδ.	Δομή	Κωδ.	Δομή	Κωδ.	Δομή
X1		X9		X17	
X2		X10		X18	
X3		X11		X19	
X4		X12		X20	
X5		X13		X21	
X6		X14		X22	
X7		X15		X23	
X8		X16		X24	

**Πίνακας 1-συνέχεια: Χαλκόνες και ανάλογά τους**

Κωδ.	Δομή	Κωδ.	Δομή	Κωδ.	Δομή
X25		X30		X35	
X26		X31		X36	
X27		X32		X37	
X28		X33		X39	
X29		X34		X39	

**Πίνακας 2: Κινολινολοχαλκόνες και ανάλογά τους**

Κωδ.	Δομή	Κωδ.	Δομή
KX1		KX7	
KX2		KX8	
KX3		KX9	
KX4		KX10	
KX5		KX11	
KX6		KX12	

Πίνακας 2-συνέχεια: Κινολινολογαλκόνες και ανάλογά τους

Κωδ.	Δομή	Κωδ.	Δομή
KX13		KX20	
KX14		KX21	
KX15		KX22	
KX16		KX23	
KX17		KX24	
KX18		KX25	
KX19		KX26	

Πίνακας 3: Ωρόνες

Κωδ.	Δομή	Κωδ.	Δομή	Κωδ.	Δομή
Ω1		Ω6		Ω11	
Ω2		Ω7		Ω12	
Ω3		Ω8		Ω13	
Ω4		Ω9		Ω14	
Ω5		Ω10		Ω15	

Πίνακας 4: Καρβοξαμίδια κινολινονών

Κωδ.	Δομή	Κωδ.	Δομή	Κωδ.	Δομή
ΚΚ1		ΚΚ5		ΚΚ9	
ΚΚ2		ΚΚ6		ΚΚ10	
ΚΚ3		ΚΚ7		ΚΚ11	
ΚΚ4		ΚΚ8		ΚΚ12	



Πίνακας 4-συνέχεια: Καρβοξαμίδια κινολινονών

Κωδ.	Δομή	Κωδ.	Δομή
KK13		KK21	
KK14		KK22	
KK15		KK23	
KK16		KK24	
KK17		KK25	
KK18		KK26	
KK19		KK27	
KK20			

## 2.2. Αποτελέσματα μελετών μοριακής πρόσδεσης

### 2.2.1. Τρόπος ανάγνωσης των τρισδιάστατων μοντέλων και των διαγραμμάτων αλληλεπιδράσεων

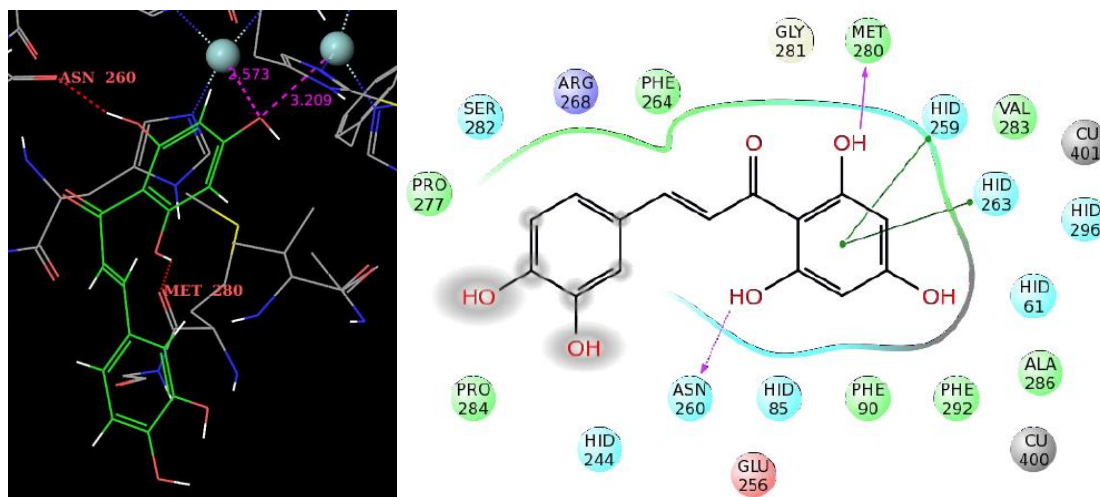
Στα τρισδιάστατα μοντέλα παρουσιάζεται το μόριο-προσδέτης στην διαμόρφωση που προβλέπεται υπολογιστικά πως θα λάβει κατά την πρόσδεσή του στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης. Με ροζ διακεκομμένες γραμμές παρουσιάζονται οι αποστάσεις μεταξύ δύο ατόμων, ενός ατόμου Cu του υποδοχέα και ενός ατόμου στον προσδέτη, και η απόσταση παρουσιάζεται με γράμματα του ίδιου χρώματος. Με κόκκινες διακεκομμένες γραμμές παρουσιάζονται οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ ομάδων του προσδέτη και αμινοξέων του υποδοχέα, των οποίων και το όνομα παρουσιάζεται.

Στα διαγράμματα αλληλεπιδράσεων παρουσιάζεται ο προσδέτης καθώς και τα αμινοξέα της πρωτεΐνης που βρίσκονται σε απόσταση ως και 5Å. Με σφαίρες παρουσιάζονται τα αμινοξέα και τα ιόντα χαλκού. Με συνεχή παχιά γραμμή περί τον προσδέτη παρουσιάζεται η διεπιφάνεια προσδέτη-υποδοχέα. Τα άτομα του προσδέτη που περιβάλλονται από γκρι κύκλους θεωρείται πως εκτίθενται στον διαλύτη κατά την πρόσδεση. Με ροζ βέλη υποδηλώνονται οι δεσμοί υδρογόνου, ενώ με πράσινες γραμμές υποδηλώνονται αλληλεπιδράσεις π-π. Σε κάποιες περιπτώσεις όπου η απόσταση μιας ομάδας υποδοχέα από ένα ιόν Cu είναι μικρότερη των 2,6Å ο σχηματισμός συμπλόκου υποδηλώνεται μέσω γκρι γραμμής μεταξύ της ομάδας και του ιόντος.

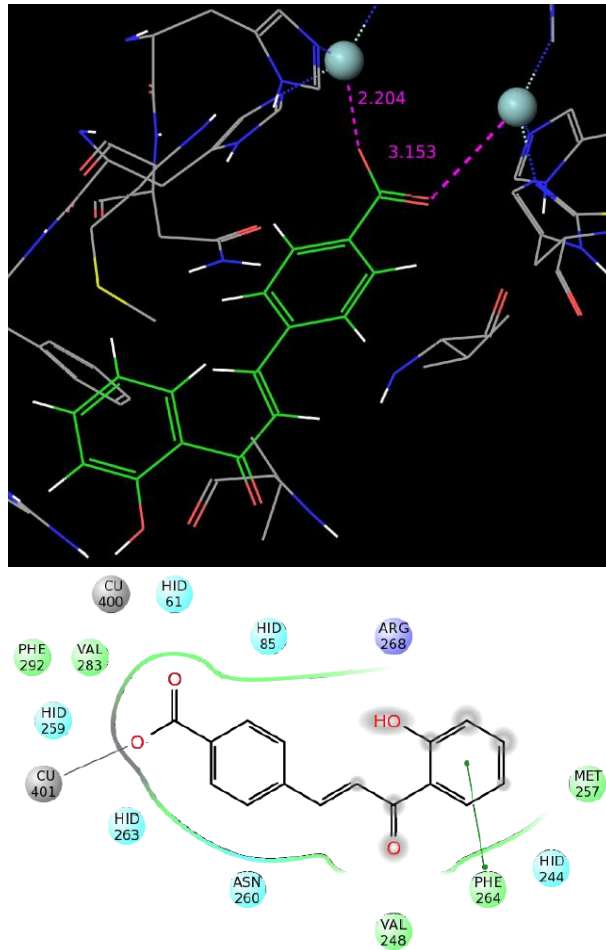
### 2.2.2. Μελέτες ικανότητας πρόσδεσης χαλκονών και αναλόγων τους

Σε αυτήν την κατηγορία ενώσεων έγινε αρχικά μελέτη πρόσδεσης στην τυροσινάση με τεχνική SP. Σε κάποιες από τις πόζες που παρήχθησαν υπήρχαν προσδέτες οι οποίοι προσέγγιζαν τα ιόντα Cu σε απόσταση μικρότερη από 3Å, πιθανώς αναστέλλοντας την δράση της τυροσινάσης. Καλύτερη ικανότητα πρόσδεσης παρουσίασαν οι ενώσεις **X1**, **X10**, **X12**, **X13**, **X16**, **X18**, **X21**, **X23**, **X25**, **X26**, **X27**, **X28**, **X29**, **X36**, **X38** και **X39** οι οποίες και υποβλήθηκαν σε μελέτες πρόσδεσης με τις τεχνικές XP και QPLD.

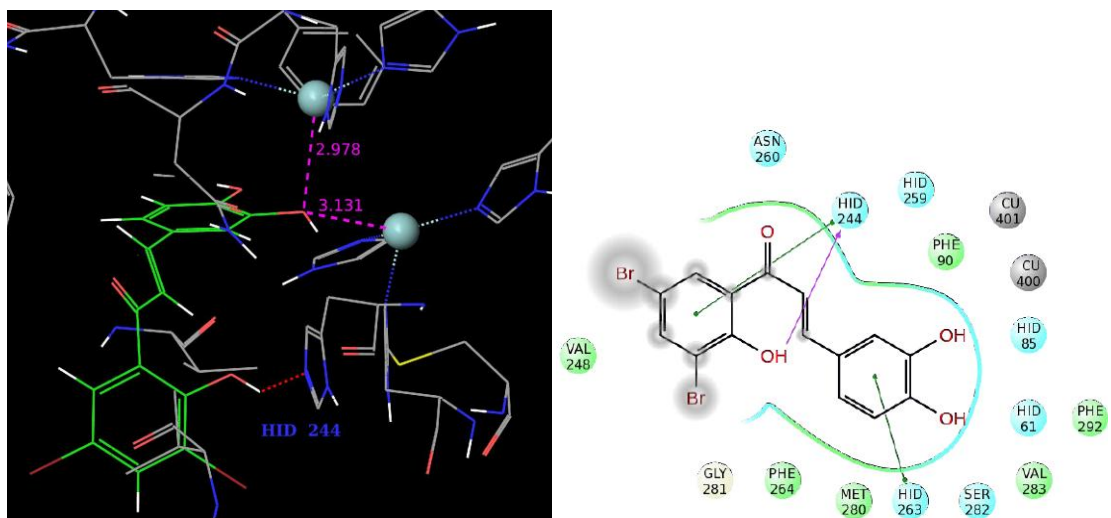
Παρουσιάζονται κάποιες από τις καλύτερες αποτελέσματα πρόσδεσης με την τεχνική QPLD όπως και τα αντίστοιχα διαγράμματα αλληλεπίδρασης:



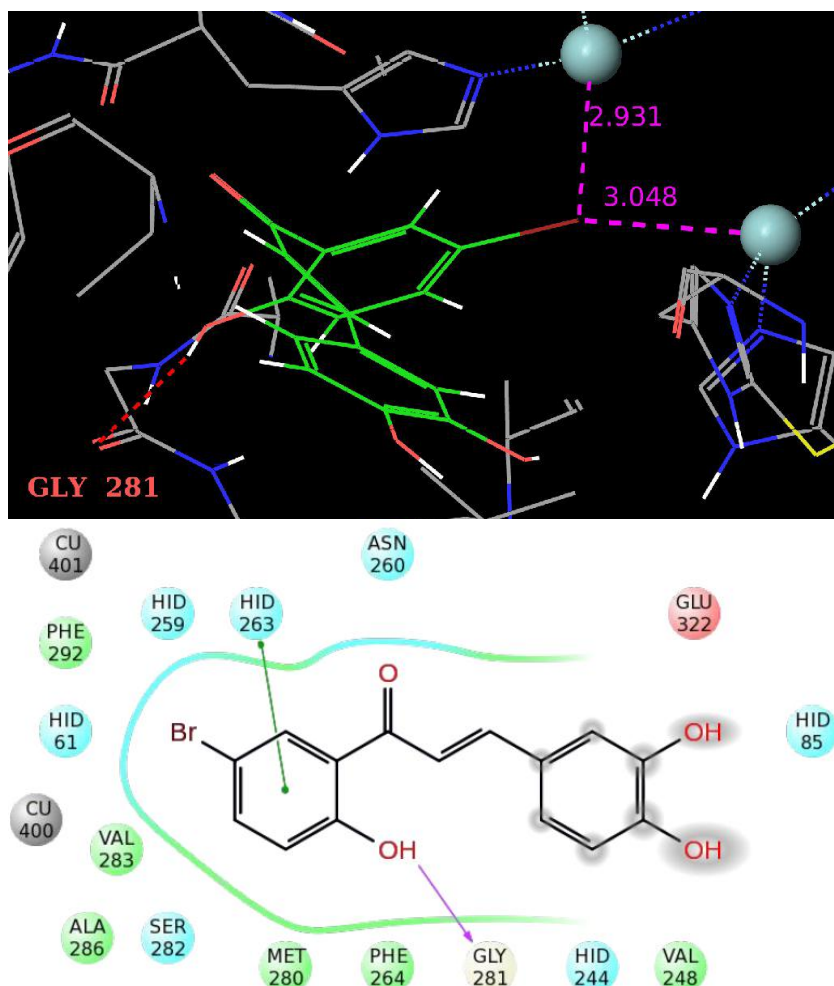
Εικόνα 8: Πρόσδεση της ένωσης **X12** στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Τρισδιάστατο μοντέλο και διάγραμμα αλληλεπιδράσεων.



Εικόνα 9: Πρόσδεση της ένωσης **X18** στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Τρισδιάστατο μοντέλο και διάγραμμα αλληλεπιδράσεων.



Εικόνα 10: Πρόσδεση της ένωσης **X39** στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Τρισδιάστατο μοντέλο και διάγραμμα αλληλεπιδράσεων.



Εικόνα 11: Πρόσδεση της ένωσης X27 στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Τρισδιάστατο μοντέλο και διάγραμμα αλληλεπιδράσεων.

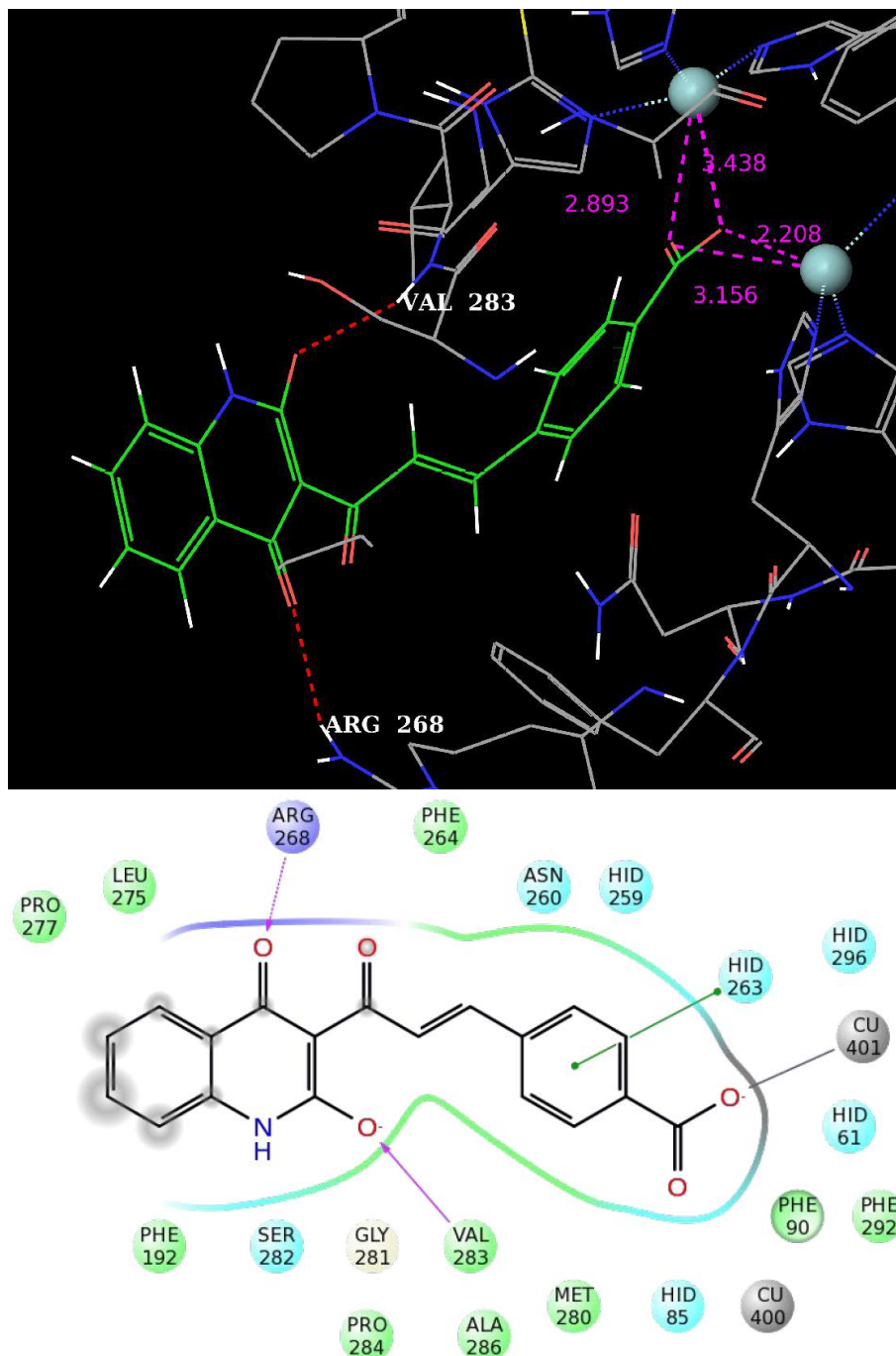
Από τα αποτελέσματα των μελετών με την τεχνική XP παρατηρήθηκε πως συνήθως οι ομάδες που περιέχονται στον δεύτερο δακτύλιο (λ.χ. η μεθόξυ ομάδα στη X1) παίζουν κυριότερο ρόλο στον τρόπο πρόσδεσης του ΦΜ στην τυροσινάση. Παρατηρήθηκε πως προσδέτες που στον δεύτερο δακτύλιο είχαν ομάδα καρβοξυλικού οξέος προσέγγιζαν τα ιόντα Cu σε απόσταση μικρότερη από 3Å, ούτως ώστε να μπορούν να τα συντονίσουν, και είχαν την καλύτερη βαθμολογία πρόσδεσης (περίπου -6,5 kcal/mol). Παρατηρήθηκε πως προσδέτες με φαινολικά ή κατεχολικά OH μπορούν επίσης να προσεγγίσουν τα ιόντα Cu σε αποστάσεις κοντά στα 3Å, με ικανοποιητικές βαθμολογίες πρόσδεσης. Τέλος, παρατηρήθηκε πως προσδέτες που είχαν Br στον Β δακτύλιο μπόρεσαν να προσεγγίσουν τα ιόντα Cu σε απόσταση μικρότερη των 3Å αλλά πρέπει να σημειωθεί πως τα αποτελέσματα πρόσδεσής τους είχαν χειρότερες βαθμολογίες πρόσδεσης από την πλειονότητα των αποτελεσμάτων που παρήχθησαν.

Τα αποτελέσματα που παρήχθησαν από την μελέτη με τεχνική QPLD ήταν παρόμοια με αυτά της μελέτης XP. Τα αυξημένης ακρίβειας αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την υπόθεσή μας για αυξημένη ικανότητα πρόσδεσης που δίνει στον προσδέτη η ύπαρξη ομάδας COOH. Επίσης, βελτιώθηκε η βαθμολογία/σκορ πρόσδεσης μέσω του Br ως υποκαταστάτη στον δεύτερο δακτύλιο (λ.χ. X27) σε σχέση με την μελέτη με την τεχνική XP.

### 2.2.3. Μελέτες ικανότητας πρόσδεσης κινολινυλογαλκονών και αναλόγων τους

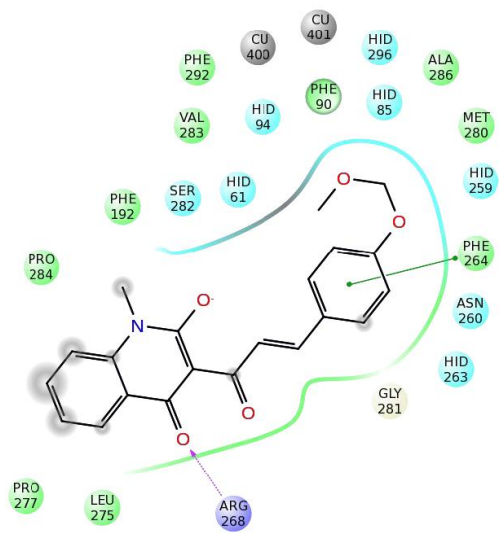
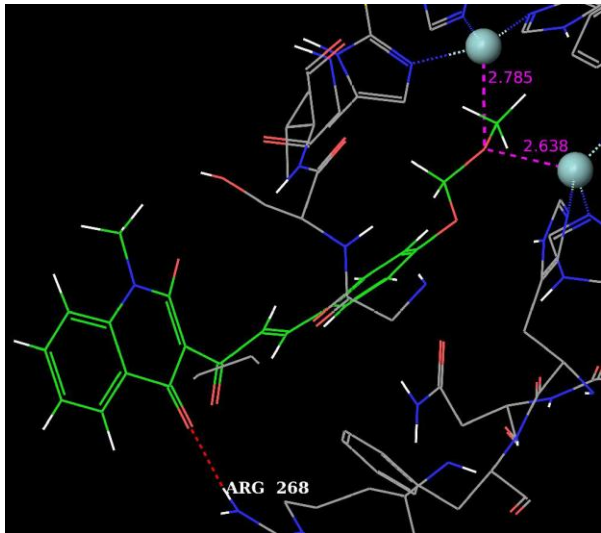
Σε αυτήν την κατηγορία ενώσεων έγινε αρχικά μελέτη πρόσδεσης στην τυροσινάση με τεχνική SP. Σε κάποιες από τις πόζες που παρήχθησαν υπήρχαν προσδέτες οι οποίοι προσέγγιζαν τα ιόντα Cu σε απόσταση μικρότερη από 3Å, πιθανώς παρεμποδίζοντας την τυροσινάση. Καλύτερη ικανότητα πρόσδεσης παρουσίασαν οι ενώσεις **KX2**, **KX3**, **KX4**, **KX7**, **KX10**, **KX11**, **KX12**, **KX13**, **KX14**, **KX25** και **KX26**. Σε αυτές έγιναν επιπλέον μελέτες πρόσδεσης σε αυξημένη ακρίβεια με τις τεχνικές XP και QPLD.

Παρουσιάζονται τα πιο ενδιαφέροντα αποτελέσματα πρόσδεσης και τα αντίστοιχα διαγράμματα αλληλεπίδρασης:

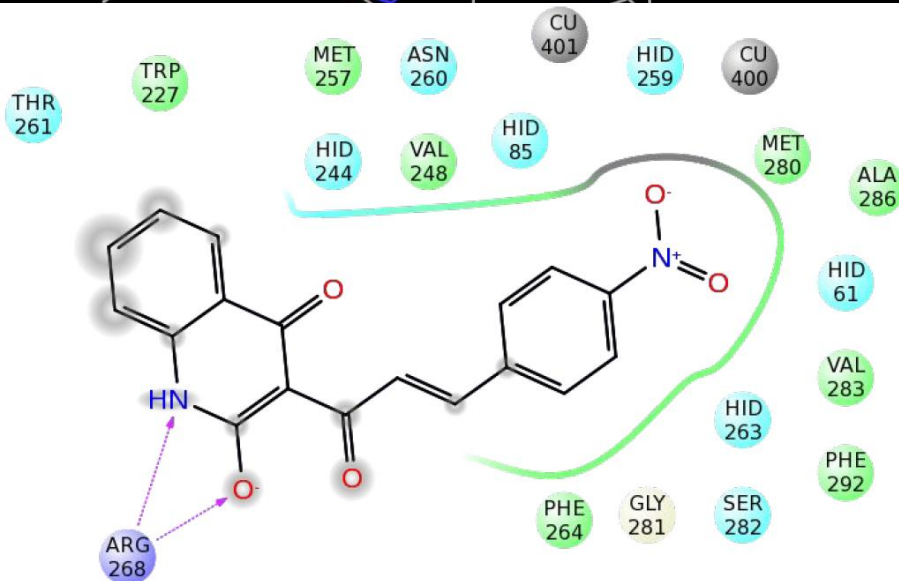
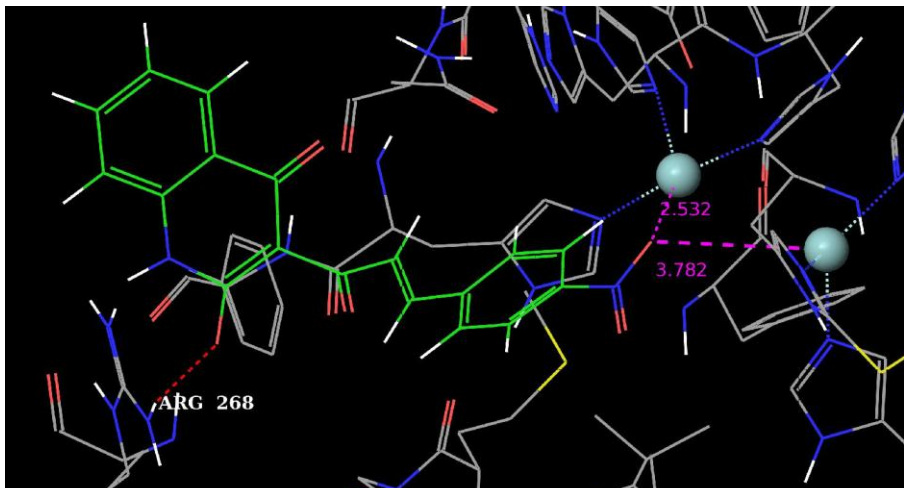


Εικόνα 12: Πρόσδεση της ένωσης **KX4** στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Τρισδιάστατο μοντέλο και διάγραμμα αλληλεπιδράσεων. Τεχνική: QPLD





Εικόνα 13: Πρόσδεση της ένωσης **KX25** στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Τρισδιάστατο μοντέλο και διάγραμμα αλληλεπιδράσεων. Τεχνική: QPLD



Εικόνα 14: Πρόσδεση της ένωσης **KX13** στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Τρισδιάστατο μοντέλο και διάγραμμα αλληλεπιδράσεων. Τεχνική: XP

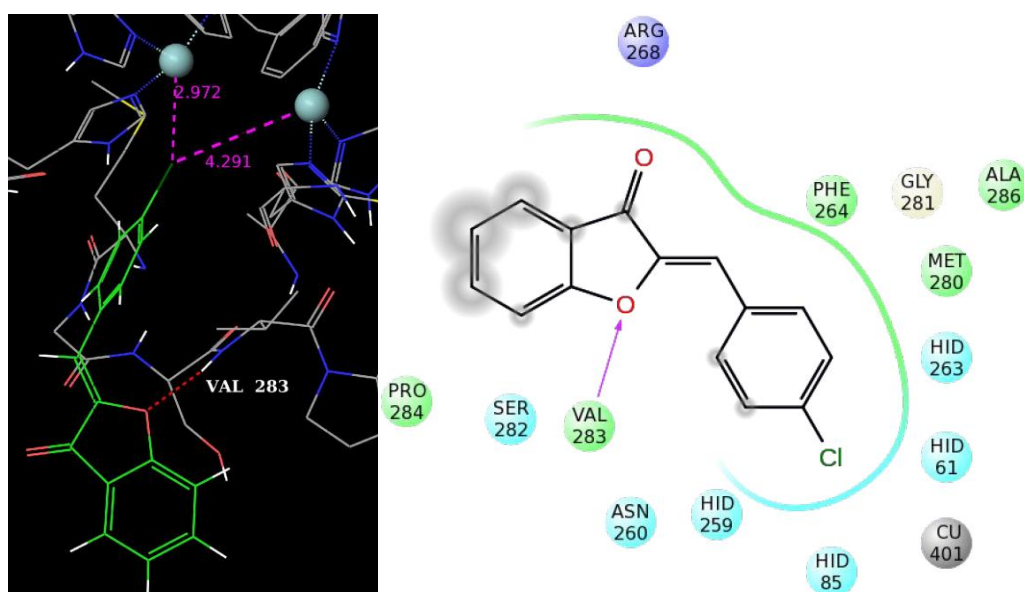
Από τα αποτελέσματα των μελετών με την τεχνική XP παρατηρήθηκε πως προσδέτες που στον δεύτερο δακτύλιο είχαν ομάδα καρβοξυλικού οξέος προσέγγιζαν τα ιόντα Cu σε απόσταση μικρότερη από 3Å, ούτως ώστε να μπορούν να τα συντονίσουν, πιθανότατα παρεμποδίζοντας την πρόσδεση του φυσικού υποστρώματος, και είχαν τη καλύτερη βαθμολογία πρόσδεσης από όλα τα αποτελέσματα πρόσδεσης που παρήχθησαν. Παρατηρήθηκε πως τα άτομα οξυγόνου σε κάποιες μεθόξυ ομάδες μικρού αριθμού προσδετών μπορούσαν επίσης να προσεγγίσουν τα ιόντα Cu και να τοποθετηθούν ώστε να απέχουν λιγότερο από 3Å από ένα από τα ιόντα Cu, ωστόσο δεν είναι πιθανή η δυνατότητα συντονισμού των ιόντων χαλκού στην περίπτωση αυτή. Επίσης άξιο προσοχής είναι πως προσδέτες με την ομάδα NO<sub>2</sub> μπορούν με αυτή να προσεγγίσουν τα ιόντα Cu σε απόσταση μικρότερη των 3Å.

Τα αποτελέσματα που παρήχθησαν από την μελέτη με τεχνική QPLD ήταν παρόμοια με αυτά της μελέτης XP. Τα αυξημένης ακρίβειας αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την υπόθεσή μας για αυξημένη ικανότητα πρόσδεσης που δίνει στον προσδέτη η ύπαρξη καρβοξυλομάδας. Σημειώνεται επίσης η δυνατότητα δύο πιθανών προσανατολισμών αυτής της ομάδας σε σχέση με τα δύο ιόντα, είτε κάθετα στο επίπεδο των ιόντων (εικόνα 12) είτε παράλληλα στο προαναφερθέν επίπεδο, με τον πρώτο προσανατολισμό να έχει καλύτερη βαθμολογία πρόσδεσης. Επίσης σημειώνεται η σημασία της ύπαρξης των οξυγόνων που είναι προσκολλημένα στον εξαμελή δακτύλιο που έχει ως ετεροάτομο N (λ.χ. **KX4**, **KX25**, εικόνες 12,13) καθώς σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με γειτονικές πλευρικές ομάδες, βελτιώνοντας τη βαθμολογία πρόσδεσης των προσδετών.

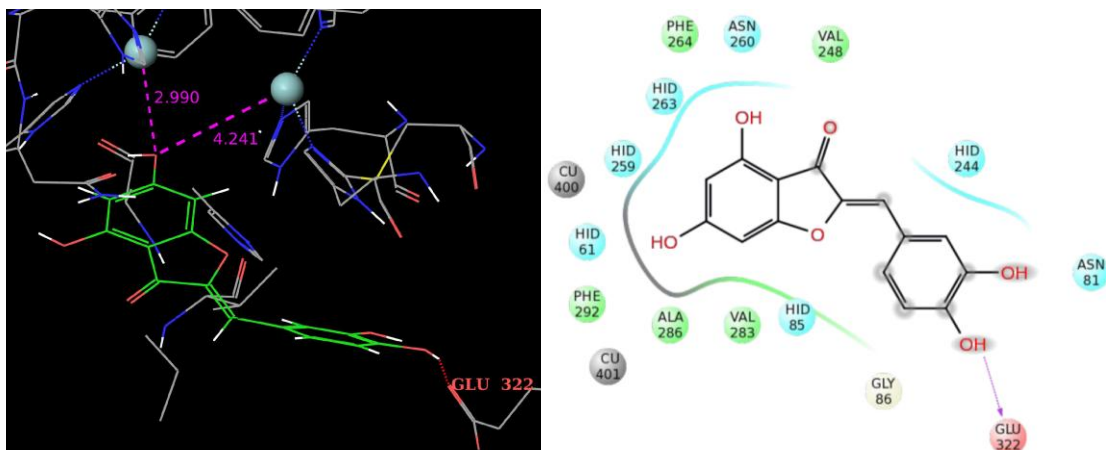
#### 2.2.4. Μελέτες ικανότητας πρόσδεσης ωρονών

Τα μόρια αυτής της κατηγορίας ενώσεων υποβλήθηκαν όλα σε μελέτες με την τεχνική XP και κατόπιν σε μελέτες με χρήση της τεχνικής QPLD.

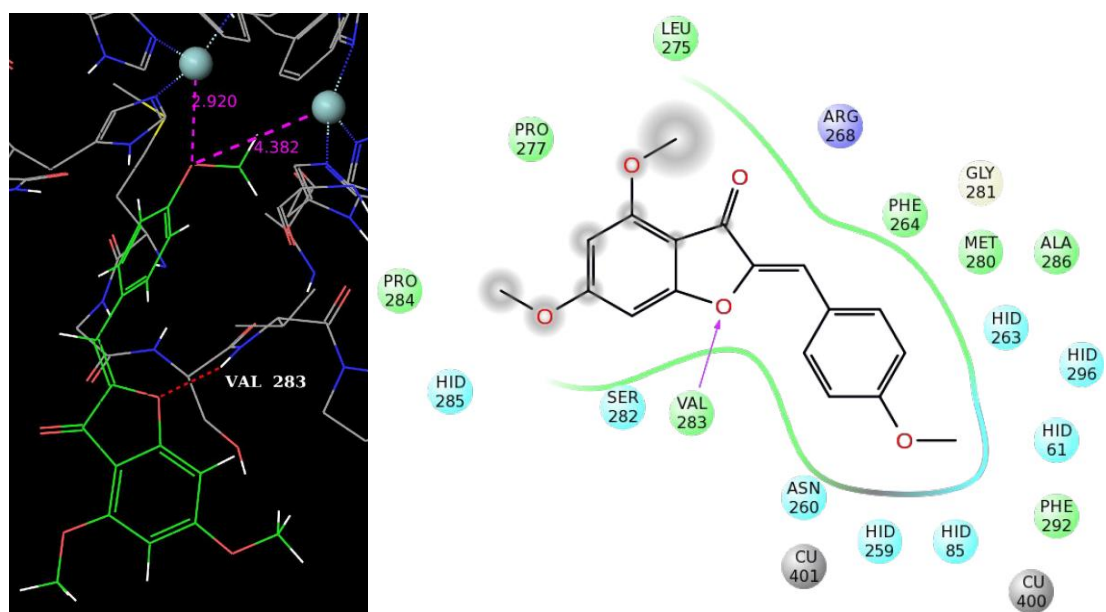
Παρουσιάζονται κάποια από τα καλύτερα αποτελέσματα πρόσδεσης με την τεχνική QPLD όπως και τα αντίστοιχα διαγράμματα αλληλεπίδρασης (να σημειωθεί πως τα αποτελέσματα για τα **Ω1**, **Ω5** και **Ω8** ήταν παρόμοια, συνεπώς παρατίθεται το καλύτερο εξ' αυτών):



Εικόνα 15: Πρόσδεση της ένωσης **Ω4** στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Τρισδιάστατο μοντέλο και διάγραμμα αλληλεπιδράσεων.



Εικόνα 16: Πρόσδεση της ένωσης  $\Omega 11$  στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Τρισδιάστατο μοντέλο και διάγραμμα αλληλεπιδράσεων.



Εικόνα 17: Πρόσδεση της ένωσης  $\Omega 5$  στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Τρισδιάστατο μοντέλο και διάγραμμα αλληλεπιδράσεων.

Από τα αποτελέσματα των μελετών με τις τεχνικές XP και QPLD παρατηρήθηκε πως λίγες από τις ωρόνες που εξετάστηκαν είχαν την ικανότητα να προσεγγίσουν το ενεργό κέντρο της τυροσινάσης σε απόσταση μικρότερη των 3Å, ούτως ώστε να μπορούν να τα συντονίσουν, πιθανώς αναστέλλοντας την δράση της τυροσινάσης. Μπορεί έτσι να γίνει μια αντιπαραβολή με τις χαλκόνες (βλ. 2.2.3.) οι οποίες παρουσίασαν μεγαλύτερη ικανότητα πρόσδεσης, πιθανώς λόγω της μεγαλύτερης ευελιξίας των μορίων τους. Οι ωρόνες που παρουσίασαν ικανότητα πρόσδεσης προσέγγισαν τα ιόντα Cu είτε μέσω ομάδας Cl είτε μέσω μεθόξυ-ομάδας. Πρέπει επίσης να σημειωθεί πως οι ωρόνες που παρουσίασαν στα αποτελέσματα πρόσδεσης μεγαλύτερη εγγύτητα στα ιόντα Cu δεν ήταν εκείνες με το καλύτερο σκορ πρόσδεσης.

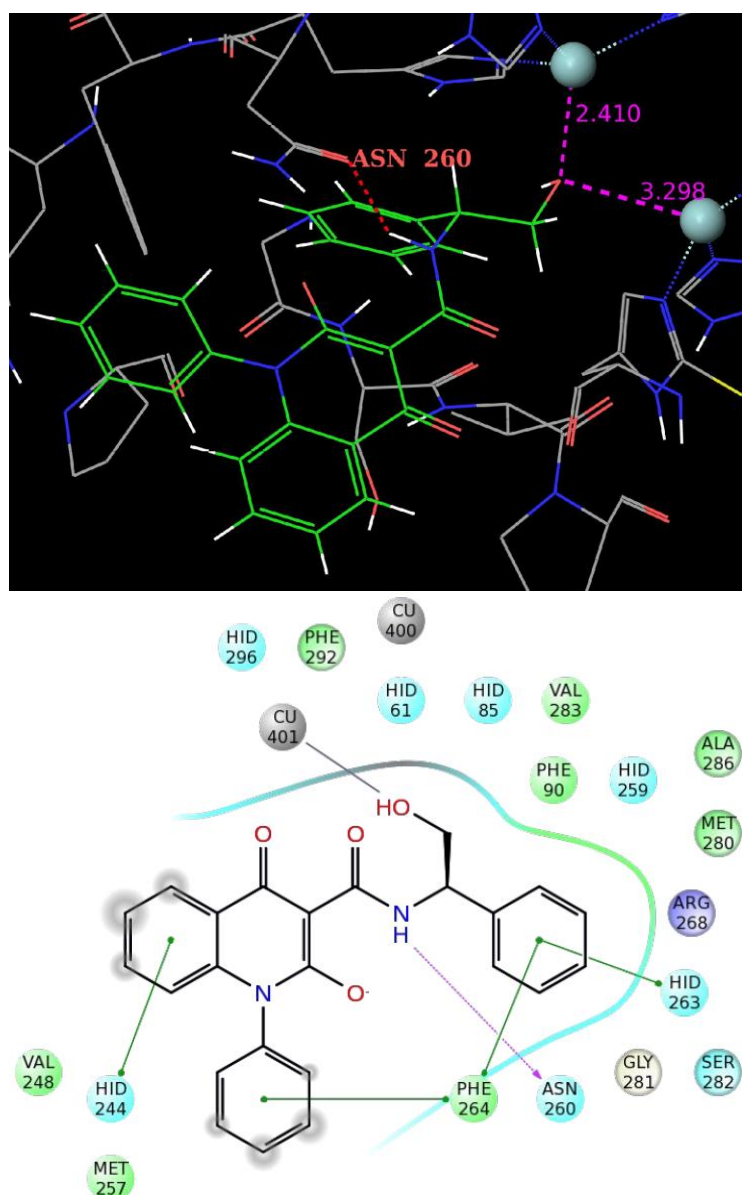


### 2.2.5. Μελέτες ικανότητας πρόσδεσης καρβοξαμιδίων κινολινονών

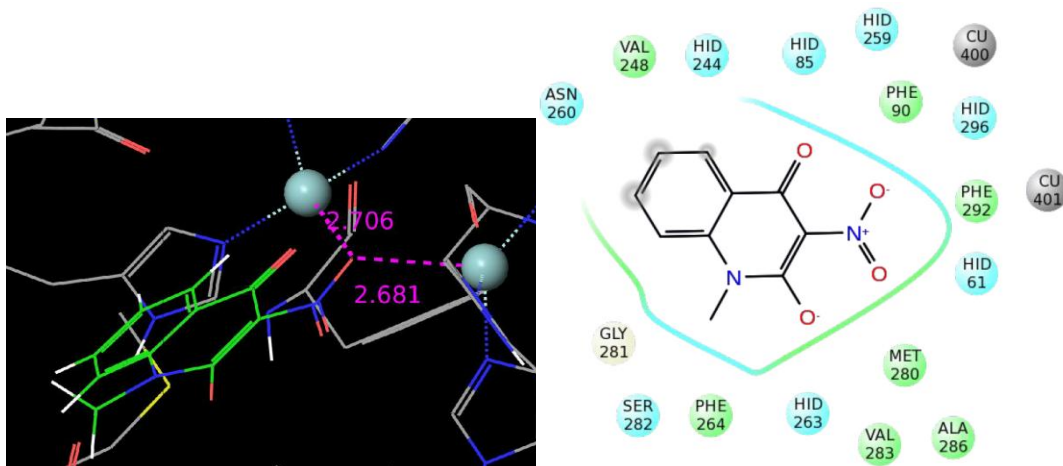
Τα μόρια αυτής της κατηγορίας ενώσεων υποβλήθηκαν σε μελέτες με την τεχνική ΧΡ και κατόπιν σε μελέτες με χρήση της τεχνικής QPLD.

Από τα αποτελέσματα των μελετών με τις τεχνικές ΧΡ και QPLD παρατηρήθηκε πως στην συγκεκριμένη κατηγορία προσδετών, επιτυγχάνεται προσέγγιση των ιόντων Cu μέσω ομάδων φαινολικών υδροξυλίων, αλογόνων (όπως το F) και σε μια περίπτωση μέσω ομάδας -NO<sub>2</sub>. Επίσης, λόγω των αρωματικών δακτυλίων στην δομή κάποιων από τους εξεταζόμενους προσδέτες παρατηρείται σε κάποιες πύξες (λ.χ. της **KK19**) πως αναπτύσσονται αλληλεπιδράσεις π-π οι οποίες πιθανώς να σταθεροποιούν το ΦΜ στην θέση πρόσδεσης, ενισχύοντας την ικανότητα αναστολής της τυροσινάσης.

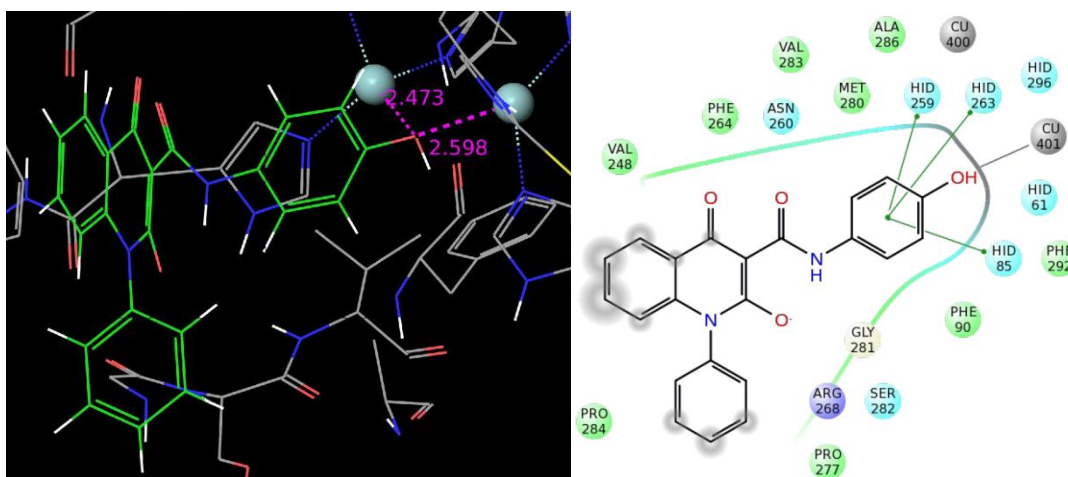
Παρατίθενται τα αποτελέσματα πρόσδεσης, μέσω της τεχνικής QPLD, και τα αντίστοιχα διαγράμματα αλληλεπιδράσεων (να σημειωθεί πως τα αποτελέσματα πρόσδεσης για τα **KK17** και **KK19** ήταν παρόμοια, παρατίθεται το καλύτερο εξ' αυτών):



Εικόνα 18: Πρόσδεση της ένωσης **KK19** στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Τρισδιάστατο μοντέλο και διάγραμμα αλληλεπιδράσεων.



Εικόνα 19: Πρόσδεση της ένωσης **KK27** στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Τρισδιάστατο μοντέλο και διάγραμμα αλληλεπιδράσεων.



Εικόνα 20: Πρόσδεση της ένωσης **KK16** στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Τρισδιάστατο μοντέλο και διάγραμμα αλληλεπιδράσεων.

### 2.3. Συμπεράσματα

Από τα αποτελέσματα των μελετών πρόσδεσης που έγιναν στις προαναφερθείσες κατηγορίες ενώσεων, προέκυψε το συμπέρασμα πως η σύνθεση αναλόγων χαλκονών και ωρονών θα μπορούσε να οδηγήσει σε νέους αναστολείς της τυροσινάσης. Συνεπώς, έχοντας υπ' όψιν τα σχόλια που έγιναν στην μελέτη πρόσδεσης των χαλκονών και ωρονών της βιβλιοθήκης ενώσεων του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας ΕΜΠ (βλ. 2.2.2. και 2.2.3.), ελήφθη η απόφαση να πραγματοποιηθεί η σύνθεση χαλκονών και ωρονών με υποκαταστάτες ομάδες  $-OH$ ,  $-COOH$  στον δακτύλιο Β, ούτως ώστε να γίνει μελέτη της βιολογικής τους δράσης, ειδικότερα δε της ικανότητάς τους να αναστείλουν την τυροσινάση και κατ' επέκταση την παραγωγή μελανίνης με ό,τι αυτή συνεπάγεται (λ.χ. ενζυμική αμαύρωση).

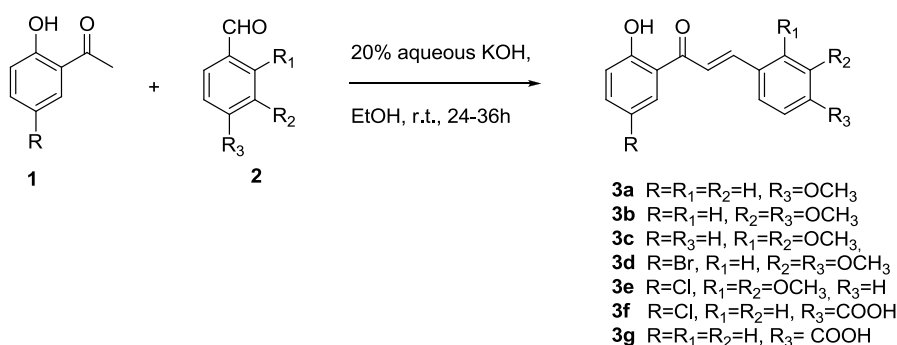
### 3. Γενικές μέθοδοι σύνθεσης νέων αναλόγων χαλκονών και ωρονών

#### 3.1. Εισαγωγή

Η σύνθεση των νέων αναλόγων χαλκονών και ωρονών απαιτεί από ένα ως και τέσσερα συνθετικά στάδια. Η σύνθεση νέων χαλκονών επιτυγχάνεται μέσω αντίδρασης συμπύκνωσης τύπου Claisen-Schmidt. Τα προϊόντα αυτών των αντιδράσεων συμπύκνωσης μπορούν να υποβληθούν σε αντίδραση οξειδωτικής κυκλοποίησης για να δώσουν τις αντίστοιχες ωρόνες. Σε ορισμένες από τις ωρόνες που προκύπτουν πραγματοποιείται απομάκρυνση της μεθυλο-ομάδας από τους μεθοξυ-υποκαταστάτες τους για την παραγωγή επιπλέον αναλόγων ωρονών. Τέλος, πραγματοποιείται σύνθεση νέων υβριδικών μορίων με την υποκατάσταση των υδροξυλομάδων των αποπροστατευμένων ωρονών με αιθέρες του λιποϊκού οξέος.

#### 3.2. Αντιδράσεις συμπύκνωσης Claisen-Schmidt

Η σύνθεση των χαλκονών πραγματοποιήθηκε μέσω αντίδρασης συμπύκνωσης τύπου Claisen – Schmidt (υποκατηγορία των αντιδράσεων καρβονυλικής συμπύκνωσης) μεταξύ κατάλληλα υποκατεστημένων 2-υδροξυ-ακετοφαινονών **1** και βενζαλδεϊδών **2** (Σχήμα 5).



Σχήμα 9: Σύνθεση των χαλκονών **3a-g**

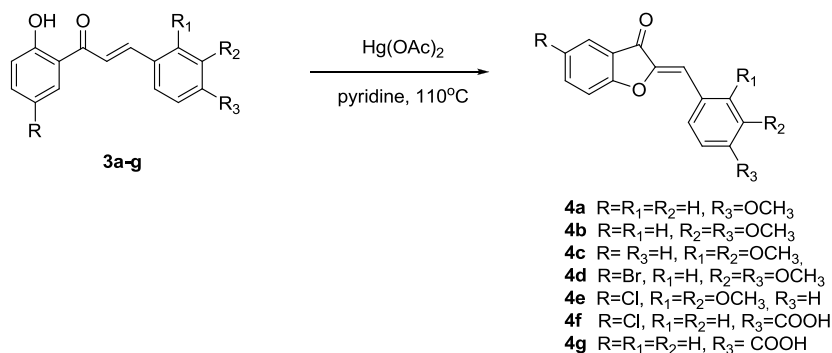
#### ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΧΑΛΚΟΝΩΝ **3a-3g**

Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε βασικό περιβάλλον (αιθανόλη - 20% υδατικό διάλυμα KOH). Τα δύο αντιδρώντα **1** και **2**, και το KOH (υπό την μορφή υδατικού διαλύματος 20%) προστίθενται σε γραμμομοριακή αναλογία 1:1:3, ενώ ανά 1 mol αντιδρώντος χρησιμοποιούνται 18 mL αιθανόλης ως διαλύτης. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται επί 24-36 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Εναλλακτικά, το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται σε θερμοκρασία 78 °C αναδεύεται για 2-4 h. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το μίγμα οξινίζεται με υδατικό διάλυμα HCl 10% ως pH=1 και παρατηρείται καταβύθιση του προϊόντος υπό την μορφή στερεού, το οποίο και παραλαμβάνεται μετά από διήθηση υπό κενό, με έκπλυση του ιζήματος με υδατικό διάλυμα HCl 10%. Απαιτείται ξήρανση του στερεού σε ξηραντήρα για να απομακρυνθεί όλη η υγρασία. Η χαλκόνη που παράγεται είναι σχετικά υψηλής

καθαρότητας. Η αντίδραση έχουν αποδόσεις 30-50%. Αν επιθυμείται μεγαλύτερος βαθμός καθαρότητας, γίνεται ανακρυστάλλωση του προϊόντος με μεθανόλη.

### 3.3. Αντιδράσεις οξειδωτικής κυκλοποίησης

Η σύνθεση των ωρονών **4a-4g** πραγματοποιήθηκε μέσω αντίδρασης οξειδωτικής κυκλοποίησης χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη τις χαλκόνες **3a-g**.



Σχήμα 10: Σύνθεση των ωρονών **4a-g**

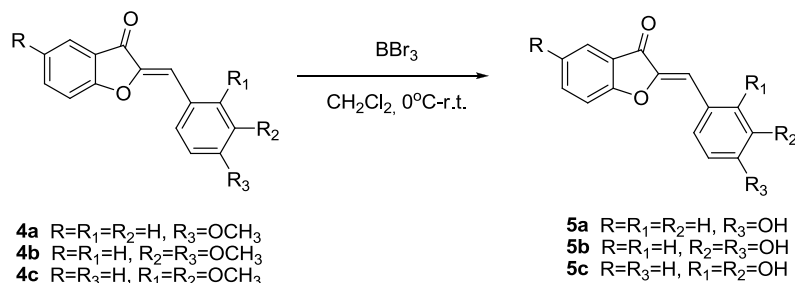
#### ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΩΡΟΝΩΝ **4a-4g**

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε διαλύτη πυριδίνη με χρήση οξικού υδραργύρου ως καταλύτη, σε αναλογία αντιδρώντος-καταλύτη 1:1,25 ή και μεγαλύτερη αναλογία καταλύτη, κατά περίπτωση. Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται στους 110 °C με ανάδευση για 1h, ή και για περισσότερο χρόνο (η εξέλιξη της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, TLC). Μετά το πέρας της αντίδρασης, το μίγμα ψύχεται με την απόχωση αυτού σε διάλυμα πάγου και νερού και κατόπιν οξινίζεται με υδατικό διάλυμα HCl 10% ως pH=1. Στο οξινισμένο μίγμα γίνεται εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο (DCM) και η οργανική φάση, αφού πρώτα υποβληθεί σε ξήρανση με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, εξατμίζεται υπό κενό και το προϊόν λαμβάνεται υπό την μορφή στερεού. Οι αντιδράσεις έχουν τις περισσότερες φορές ικανοποιητικές αποδόσεις της τάξεως των 70-90%. Αν επιθυμείται μεγαλύτερος βαθμός καθαρότητας, γίνεται ανακρυστάλλωση του προϊόντος με μεθανόλη.

Αποπειράθηκαν και εναλλακτικές μεθοδολογίες αντίδρασης οξειδωτικής κυκλοποίησης, οι οποίες χρησιμοποιούσαν ως καταλύτη οξικό μαγγάνιο αντί για οξικό υδράργυρο, σε αναλογία αντιδρώντος-καταλύτη 1:2, με χρήση οξικού οξέος ως διαλύτη. Το μίγμα της αντίδρασης θερμάνθηκε στους 100 °C με ανάδευση για 3 h. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα της αντίδρασης υποβλήθηκε σε διήθηση υπό κενό για την απομάκρυνση του στερεού καταλύτη από το μίγμα. Κατόπιν έγινε εκχύλιση του διηθήματος με DCM, ξήρανση και εξάτμιση της οργανικής φάσης υπό κενό και λήψη προϊόντος υπό την μορφή στερεού. Επειδή το παραχθέν προϊόν ήταν μικρής καθαρότητας, υποβλήθηκε σε έκπλυση με διαιθυλεθέρα, η οποία οδήγησε σε σχηματισμό μεγαλύτερων κρυστάλλων στερεού, οι οποίοι ελήφθησαν μετά από διήθηση υπό κενό. Λόγω μικρής και πάλι καθαρότητας χρειάστηκε να υποβληθούν σε ανακρυστάλλωση με μεθανόλη, μετά από την οποία προέκυψε προϊόν ικανοποιητικής καθαρότητας. Η απόδοση σε προϊόν όμως αυτής της μεθοδολογίας κρίθηκε μη ικανοποιητική (περίπου 10%) και συνεπώς δεν ακολουθήθηκε περαιτέρω.

### 3.4. Αντιδράσεις αποπροστασίας

Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση της παρουσίας φαινολικών υδροξυλίων στη βιολογική δράση των ωρονών, πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση της μεθυλομάδας από τους μεθοξυ-υποκαταστάτες των ωρονών **4a-c**.



Σχήμα 11: Σύνθεση των ωρονών **5a-c**

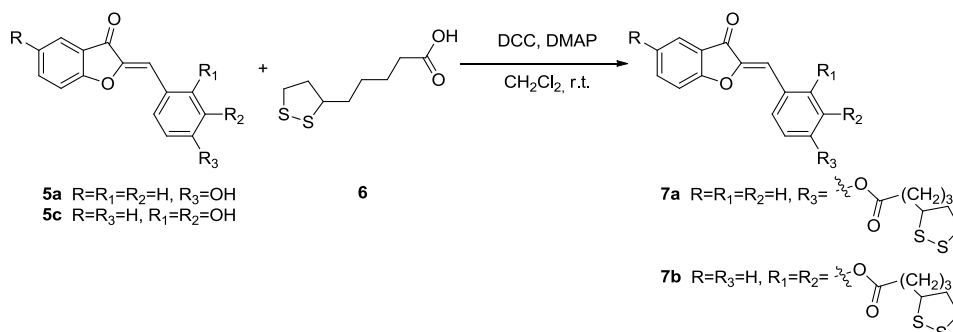
Η αντίδραση λαμβάνει χώρα υπό την επίδραση τριβρωμιούχου βορίου, σε αναλογία 5mol BBr<sub>3</sub> ανά mol μεθύξυ ομάδας σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο. Το μίγμα της αντίδρασης τοποθετείται σε παγόλουτρο (0°C) με ανάδευση για 4-24 h. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το μίγμα της αντίδρασης, το οποίο έχει ιώδες χρώμα, αναμειγνύεται με μίγμα νερού και πάγου ως που να αποκτήσει κίτρινο χρώμα, τυπικά για 15-30 min. Κατόπιν, το προκύπτον μίγμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc) και η οργανική φάση, αφού πρώτα υποβληθεί σε ξήρανση με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, εξατμίζεται υπό κενό και το προϊόν λαμβάνεται υπό την μορφή στερεού. Σε συγκεκριμένες περιπτώσεις που κατά την εκχύλιση δεν επετεύχθη η πλήρης απομάκρυνση του BBr<sub>3</sub> γίνεται ένας επιπλέον καθαρισμός του προϊόντος με ανακρυστάλλωση με μεθανόλη. Οι αποδόσεις σε προϊόν στις περισσότερες περιπτώσεις είναι λίαν ικανοποιητικές, άνω του 90%.

### 3.5. Αντιδράσεις σχηματισμού εστέρων του λιποϊκού οξέος

Προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανότητα συνδυασμού της βιολογικής δράσης νέων ωρονικών αναλόγων με την δράση του λιποϊκού οξέος, πραγματοποιήθηκε υποκατάσταση του υδρογόνου από τις υδρόξυ-ομάδες των ωρονών **5a-c** με μόρια λιποϊκού οξέος προς σχηματισμό νέων υβριδικών μορίων.

Αποπειράθηκε ένας αριθμός διαφορετικών προσεγγίσεων για την επίτευξη του ανωτέρω στόχου και η πιο επιτυχημένη (Σχήμα 8) γίνεται μέσω αντίδρασης εστεροποίησης Steglich, η οποία είναι μια ήπια αντίδραση που επιτρέπει την εστεροποίηση ασταθών όξινων υποστρωμάτων τα οποία παρουσιάζουν ειδικές στερεοχημικές απαιτήσεις. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα υπό την επίδραση N,N-δικυκλοεξυλκαρβοδιμιδίου (DCC) και 4-διμεθυλοαμινοπυριδίνης (DMAP) σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο (DCM) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Τα αντιδρώντα, η ωρόνη και το λιποϊκό οξύ προστίθενται στην μισή ποσότητα διαλύτη σε γραμμομοριακή αναλογία λιποϊκού οξέος ανά υδροξυλομάδα ωρόνης 1,2:1. Το DCC και το DMAP, τα οποία είναι σε αναλογία 1,2 mol DCC και 5 mg DMAP ανά 1 mol υδροξυλομάδας ωρόνης αντίστοιχα, διαλύονται στην υπόλοιπη ποσότητα διαλύτη και προστίθενται στάγδην στο μίγμα της αντίδρασης. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 24 h. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα διηθείται

υπό κενό για την αφαίρεση της μεγαλύτερης ποσότητας δικυκλοεξυλουρίας που παράγεται από την αντίδραση ως παραπροϊόν, το οποίο είναι αδιάλυτο στερεό. Το διήθημα μετά εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο και ακολουθεί ξήρανση και εξάτμιση υπό κενό της οργανικής φάσης, η οποία δίνει το προϊόν υπό την μορφή στερεού. Η παραλαβή προϊόντος αποδεκτής καθαρότητας μπορεί να επιτευχθεί μόνο με επιπρόσθετο καθαρισμό του στερεού μέσω χρωματογραφίας στήλης. Η μεθοδολογία αυτή δίνει αποδόσεις οριακά αποδεκτές, της τάξεως 20-30%.



Σχήμα 12: Σύνθεση των υβριδικών μορίων **7a-b**

Εναλλακτική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την επίτευξη του ίδιου αποτελέσματος ήταν η εφαρμογή της ανωτέρω μεθοδολογίας, με χρήση 1-αιθυλο-3-(3-διμεθύλοαμινοπρόπυλο) καρβοδιιμιδίου (EDC) αντί για DCC ως ενεργοποιητή του καρβοξυλικού οξέος, για την αποφυγή παραγωγής της αδιάλυτης δικυκλοεξυλουρίας και συνεπώς εξάλειψης της ανάγκης καθαρισμού. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για τουλάχιστον 24 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το μίγμα της αντίδρασης εκχυλίζεται με DCM, και η οργανική φάση ξηραίνεται και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό, δίνοντας ελαιώδες προϊόν. Όταν το ίζημα εκπλυθεί με μεθανόλη συμπυκνώνεται προϊόν υπό την μορφή στερεού, το οποίο παραλαμβάνεται μέσω διήθησης υπό κενό. Το προϊόν που παραλαμβάνεται, αν και είναι αποδεκτής καθαρότητας παράγεται σε εξαιρετικά μικρές ποσότητες, δηλαδή σε αποδόσεις κάτω του 15% ακόμα και αν αφηθεί η αντίδραση για πολλές μέρες, οπότε αυτή η μέθοδος δεν χρησιμοποιήθηκε ευρέως.

Άλλη εναλλακτική μέθοδος περιελάμβανε την παρασκευή χλωριδίου του λιποϊκού οξέος μετά από αντίδραση ποσότητας λιποϊκού οξέος με θειόνυλο-χλωρίδιο (SOCl<sub>2</sub>) σε γραμμομοριακή αναλογία 1,5:1 με το λιποϊκό οξύ. Η αντίδραση διεξάγεται σε συνθήκες θερμοκρασίας περιβάλλοντος και ατμόσφαιρας αζώτου, υπό ανάδευση, με το λιποϊκό οξύ διαλυμένο σε ξηρό CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> και το SOCl<sub>2</sub> να προστίθεται στάγδην στο μίγμα. Η αντίδραση διαρκεί 1 h. Μετά το πέρας της το χλωρίδιο παραλαμβάνεται σε στερεή μορφή μετά από έκπλυση με ακετόνη. Το παραγόμενο χλωρίδιο αντιδρά με την ωρόνη, σε αναλογία 2 mol χλωριδίου ανά mol υδροξυλομάδας ωρόνης, παρουσία DMAP (0,45eq), και μικρής ποσότητας τριαιθυλαμίνης (Et<sub>3</sub>N) σε διαλύτη τετραϋδροφουράνιο (THF). Σε διάλυμα DMAP, ωρόνης και Et<sub>3</sub>N σε THF προστίθεται στάγδην το SOCl<sub>2</sub> διαλυμένο σε THF. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται επί 24 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ατμόσφαιρα αζώτου. Μετά το πέρας της αντίδρασης ακολουθεί διήθηση του προϊόντος, εκχύλιση του διηθήματος με οξικό αιθυλεστέρα, ξήρανση και εξάτμιση της οργανικής φάσης. Το προϊόν που παράγεται προκύπτει σε μορφή αδιάλυτων υμενίων, συνεπώς είναι μη ανακτήσιμο και μη χρησιμοποιήσιμο, συνεπώς αυτή η μέθοδος απορρίφθηκε.

## 4. Σύνθεση νέων αναλόγων χαλκονών και ωρονών

### 4.1. Εισαγωγή

#### 4.1.1. Γενικά

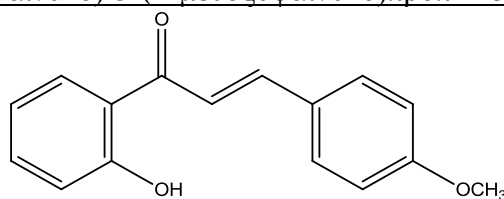
Στο παρόν κεφάλαιο περιγράφεται αναλυτικά η σύνθεση και ταυτοποίηση νέων αναλόγων χαλκονών, ωρονών και υβριδικών μορίων ωρονών, όπως αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ. Για έκαστο μόριο δίνεται η αναλυτική μεθοδολογία σύνθεσής του, η απόδοση αυτής της μεθοδολογίας καθώς και φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά και το σημείο τήξεως του προϊόντος που προέκυψε. Σημειώνεται πως η πρόοδος όλων των αντιδράσεων που ακολουθούν ελέγχθηκε κατά την σύνθεση στο εργαστήριο με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC).

#### 4.1.2. Όργανα και συσκευές

- Για την σύνθεση χρησιμοποιήθηκε ο εξοπλισμός και τα σκεύη του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ.
- Τα φάσματα NMR ( $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$ ) ελήφθησαν με την χρήση του οργάνου Varian Gemini 300MHz. Ειδικά για τις ωρόνες **5a-c**, ελήφθησαν τα φάσματα  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ), HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) και HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) σε όργανο Varian 600MHz. Οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων δίνονται σε ppm, οι σταθερές σύζευξης δίνονται σε Hz, ενώ η πολλαπλότητα των σημάτων αναφέρεται ως:
  - s (singlet, απλό)
  - d (doublet, διπλό)
  - t (triplet, τριπλό)
  - m (multiplet, πολλαπλό)
  - dd (doublet of doublets, διπλά διπλό)
  - br (broad, ευρύ)
- Τα σημεία τήξεως έχουν ληφθεί σε συσκευή Gallenkamp και δεν έχουν διορθωθεί.

### 4.2. Σύνθεση χαλκονών **3a-g**

#### 4.2.1. (E)-1-(2-υδροξυφαινυλο)-3-(4-μεθοξυφαινυλο)προπ-2-εν-όνη (**3a**) [9]



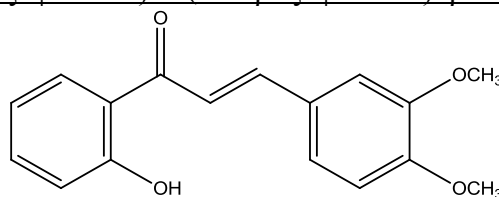
Σχήμα 13: Χημικός τύπος της **3a**

Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο σύνθεσης χαλκονών, με την προσθήκη 3,67 mmol (500 mg) της 2-υδροξυ-ακετοφαινόνης **1a** και 3,67 mmol (500 mg) της βενζαλδεΐδης **2a** σε 14,2 mL αιθανόλης και 3,1 mL υδατικού διαλύματος KOH. Το μίγμα αναδεύεται επί 24 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Κατόπιν, το μίγμα της αντίδρασης οξινίζεται με υδατικό διάλυμα HCl 10% ως pH=1 και παρατηρείται καταβύθιση του προϊόντος υπό την μορφή στερεού, το οποίο και παραλαμβάνεται μετά από διήθηση υπό κενό, με έκπλυση του ιζήματος με υδατικό

διάλυμα HCl 10%. Το ίζημα, το οποίο είναι φαιοκίτρινο στερεό, παραλαμβάνεται και καθαρίζεται μέσω ανακρυστάλλωσης με μεθανόλη.

- Απόδοση: 452 mg (46%)
- Σημείο τήξεως: 89-92 °C (βιβλ: 84-86 °C [9])
- <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ ppm 12.93 (s, 1H, -OH), 7.91 (dd, 1H, J<sub>6',5'</sub> = 8,06 Hz, J<sub>6',4'</sub> = 1,46 Hz H-6'), 7.906 (d, 1H, J<sub>B,A</sub> = 15,38 Hz, H<sub>B</sub>), 7.63 (d, 2H, J<sub>2,3</sub> = J<sub>6,5</sub> = 8,79 Hz, H-2, H-6), 7.54 (d, 1H, J<sub>A,B</sub> = 15,38 Hz, H<sub>A</sub>), 7.51-7.46 (m, 1H, H-5'), 7.02 (d, 1H, J<sub>3',4'</sub> = 8.79 Hz, H-3'), 6.95 (d, 2H, J<sub>3,2</sub> = J<sub>5,6</sub> = 8,79 Hz, H-3, H-5), 6.96-6.91 (m, 1H, H-4'), 3.87 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>)
- <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) δ ppm 193.66, 163.55, 162.03, 145.34, 136.12, 130.53, 129.51, 127.35, 120.12, 118.73, 118.57, 117.61, 114.51, 55.43

#### 4.2.2. (E)-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-1-(2-υδροξυφαινυλο)προπ-2-εν-1-όνη (**3b**) [9]



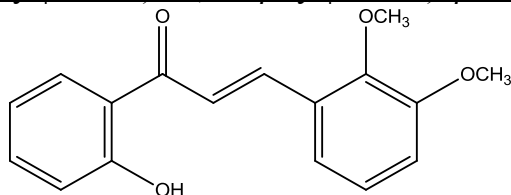
Σχήμα 14: Χημικός τύπος της **3b**

Παρασκευάζεται σύμφωνα με την γενική μέθοδο σύνθεσης χαλκονών, με την προσθήκη 7,35 mmol (1000 mg) της 2-υδροξυ-ακετοφαινόνης **1b** και 7,35 mmol (1000 mg) της βενζαλδεΐδης **2b** σε 18 mL αιθανόλης και 6,2 mL υδατικού διαλύματος KOH. Το μίγμα αναδεύεται επί 2 h σε θερμοκρασία 78 °C. Κατόπιν, το μίγμα της αντίδρασης οξινίζεται με υδατικό διάλυμα HCl 10% ως pH=1 και παρατηρείται καταβύθιση του προϊόντος υπό την μορφή στερεού, το οποίο και παραλαμβάνεται μετά από διήθηση υπό κενό, με έκπλυση του ιζήματος με υδατικό διάλυμα HCl 10%. Το ίζημα, το οποίο είναι κίτρινο στερεό, παραλαμβάνεται και καθαρίζεται μέσω ανακρυστάλλωσής του με μεθανόλη. Επίσης, το διήθημα εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο (3x10 mL). Τα οργανικά εκχυλίσματα ενώνονται, ξηραίνονται με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό που παραλαμβάνεται έχει ίδιο χρώμα και παρουσιάζει το ίδιο R<sub>f</sub> σε TLC με το στερεό ίζημα που ελήφθη από την διήθηση, συνεπώς τα δύο στερεά προϊόντα αναμειγνύονται.

- Απόδοση: 671 mg (46%)
- Σημείο τήξεως: 115-116 °C (βιβλ: 112-113 °C [9])
- <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 12.91 (s, 1H), 7.93 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.50 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.28 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.18 (s, 1H), 7.03 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 6.99 – 6.83 (m, 2H), 3.96 (d, J = 7.4 Hz, 6H).
- <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) δ ppm 193.54, 163.53, 151.80, 149.30, 145.62, 136.12, 129.50, 127.57, 123.56, 120.07, 118.69, 118.56, 117.76, 111.15, 110.29, 55.99;



#### 4.2.3. (E)-3-(2,3-διμεθοξυφαινυλο)-1-(2-υδροξυφαινυλο)προπ-2-εν-1-όνη (3c)

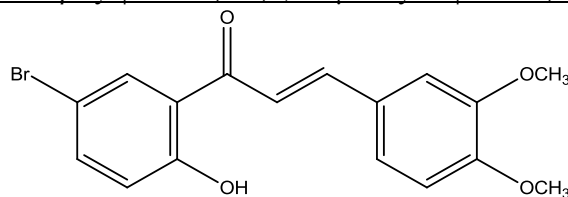


Σχήμα 15: Χημικός τύπος της **3c**

Παρασκευάζεται σύμφωνα με την γενική μέθοδο σύνθεσης χαλκονών, με την προσθήκη 7,35 mmol (1000 mg) της 2-υδροξυ-ακετοφαινόνης **1c** και 7,35 mmol (1220 mg) της βενζαλδεΐδης **2c** σε 18 mL αιθανόλης και 6,2 mL υδατικού διαλύματος KOH. Το μίγμα αναδεύεται επί 4 h σε θερμοκρασία 78 °C. Κατόπιν, το μίγμα της αντίδρασης οξινίζεται με υδατικό διάλυμα HCl 10% ως pH=1 και παρατηρείται καταβύθιση του προϊόντος υπό την μορφή στερεού, το οποίο και παραλαμβάνεται μετά από διήθηση υπό κενό, με έκπλυση του ιζήματος με υδατικό διάλυμα HCl 10%. Το ίζημα, το οποίο είναι πορτοκαλοκίτρινο στερεό, παραλαμβάνεται και καθαρίζεται μέσω ανακρυστάλλωσης με μεθανόλη.

- Απόδοση: 871 mg (42%)
- Σημείο τήξεως: 102,3-102,6 °C (βιβλ: 100-102 °C [50])
- <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 12.85 (s, 1H), 8.21 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 7.92 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.76 (d, J = 15.5 Hz, 1H), 7.50 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.33 – 7.22 (m, 1H), 7.12 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 6.98 (dt, J = 15.4, 8.6 Hz, 2H), 3.91 (d, J = 3.9 Hz, 6H).
- <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 194.25, 163.75, 153.42, 140.57, 136.45, 129.84, 128.95, 124.39, 121.83, 120.28, 120.06, 118.96, 118.76, 114.74, 99.39, 61.52, 56.09, 31.06.

#### 4.2.4. (E)-1-(5-βρωμο-2-υδροξυφαινυλο)-3-(3,4-διμεθοξυλοφαινυλο)προπ-2-εν-1-όνη (3d)



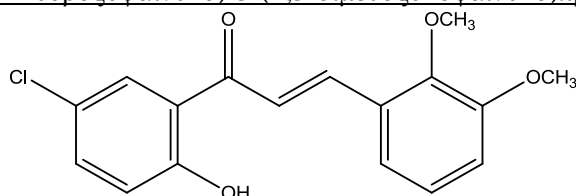
Σχήμα 16: Χημικός τύπος της **3d**

Παρασκευάζεται σύμφωνα με την γενική μέθοδο σύνθεσης χαλκονών, με την προσθήκη 2,00 mmol (500 mg) της 2-υδροξυ-ακετοφαινόνης **1d** και 2,00 mmol (330 mg) της βενζαλδεΐδης **2d** σε 5 mL αιθανόλης και 320mg KOH ως υδατικό διάλυμα 20% w/v. Το μίγμα αναδεύεται επί 24 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Κατόπιν, το μίγμα της αντίδρασης, το οποίο έχει χρώμα πορτοκαλί, οξινίζεται με υδατικό διάλυμα HCl 10% ως pH=1 και παρατηρείται καταβύθιση του προϊόντος (κίτρινο ίζημα) υπό την μορφή στερεού, το οποίο και παραλαμβάνεται μετά από διήθηση υπό κενό, με έκπλυση του ιζήματος με υδατικό διάλυμα HCl 10%. Το ίζημα, το οποίο είναι πορτοκαλοκίτρινο στερεό, παραλαμβάνεται και καθαρίζεται με ανακρυστάλλωση από σύστημα διαλυτών μεθανόλη-διχλωρομεθάνιο.

- Απόδοση: 300 mg (50%)
- Σημείο τήξεως: 178-179 °C

- $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO):  $\delta$  12.53 (s, 1H, -OH), 8.30 (d, 1H, H-6'), 7.82 (d, 1H, H<sub>B</sub>), 7.79 (d, 1H H<sub>A</sub>), 7.65 (d, 1H, H-4'), 7.52 (s, 1H, H-2), 7.45 (d, 1H, H-6), 7.02 (d, 1H, H-5), 6,95 (d, 1H, H-3'), 3.83 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.80 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>);
- $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO):  $\delta$  192.90, 160.50, 152.10, 149.60, 146.30, 138.40, 132.30, 127.10, 124.50, 123.00, 119.30, 112.02, 111.58, 111.30, 110.20, 55.80, 55.50

#### 4.2.5. (E)-1-(5-βρωμο-2-υδροξυφαινυλο)-3-(2,3-διμεθοξυλοφαινυλο)προπ-2-εν-1-όνη (3e)

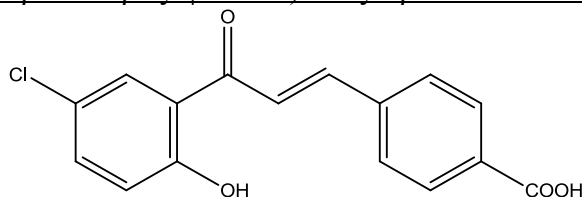


Σχήμα 17: Χημικός τύπος της **3e**

Παρασκευάζεται σύμφωνα με την γενική μέθοδο σύνθεσης χαλκονών, με την προσθήκη 2,00 mmol (341 mg) της 2-υδροξυ-ακετοφαινόνης **1e** και 2,00 mmol (330 mg) της βενζαλδεΐδης **2e** σε 5 mL αιθανόλης και 320mg KOH ως υδατικό διάλυμα 20% w/v. Το μίγμα αναδεύεται επί 24 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με TLC (διαλύτης ανάπτυξης: P.E./EtOH 5:5). Κατόπιν, το μίγμα της αντίδρασης, οξινίζεται με υδατικό διάλυμα HCl 10% ως pH=1 και παρατηρείται καταβύθιση του προϊόντος (κίτρινο ίζημα) υπό την μορφή στερεού, το οποίο και παραλαμβάνεται μετά από διήθηση υπό κενό, με έκπλυση του ιζήματος με υδατικό διάλυμα HCl 10%. Το ίζημα, το οποίο είναι πορτοκαλοκίτρινο στερεό, παραλαμβάνεται και καθαρίζεται με ανακρυστάλλωση από σύστημα διαλυτών μεθανόλη-διχλωρομεθάνιο.

- Απόδοση: 390 mg (50%)
- Σημείο τήξεως: 133-134 °C
- $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO):  $\delta$  8.15 (s, 1H, H-6'), 8.01 (d, 1H, H<sub>B</sub>), 7.92 (d, 1H, H<sub>A</sub>), 7.63 (d, 1H H-6), 7.53 (d, 1H, H-4'), 7.15 (t, 2H, H-4, H-5), 7.01 (d, 1H, H-3'), 3.81 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.77 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>);
- $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO):  $\delta$  192.30, 162.50, 155.80, 148.30, 135.10, 129.70, 127.80, 125.50, 124.10, 123.60, 122.90, 115.20, 112.40, 112.16, 60.80, 55.58

#### 4.2.6. (E)-4-(3-(5-χλωρο-2-υδροξυφαινυλο)-3-οξοπροπ-1-εν-1-υλ) βενζοϊκό οξύ (3f)



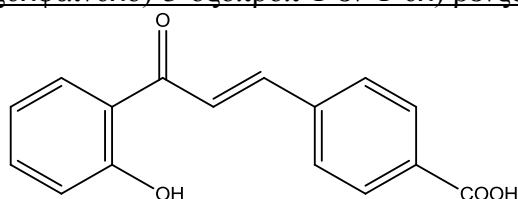
Σχήμα 18: Χημικός τύπος της **3f**

Παρασκευάζεται σύμφωνα με την γενική μέθοδο σύνθεσης χαλκονών, με την προσθήκη 2,93 mmol (500 mg) της 2-υδροξυ-ακετοφαινόνης **1f** και 2,93 mmol (440 mg) της βενζαλδεΐδης **2f** σε 7,2 mL αιθανόλης και 2,5 mL υδατικού διαλύματος KOH. Το μίγμα αναδεύεται επί 24 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Κατόπιν, το

μίγμα της αντίδρασης οξινίζεται με υδατικό διάλυμα HCl 10% ως pH=1 και παρατηρείται καταβύθιση του προϊόντος (κίτρινο ίζημα) υπό την μορφή στερεού, το οποίο και παραλαμβάνεται μετά από διήθηση υπό κενό, με έκπλυση του ιζήματος με υδατικό διάλυμα HCl 10%. Το ίζημα, το οποίο είναι κίτρινο στερεό, παραλαμβάνεται και καθαρίζεται με ανακρυστάλλωση από σύστημα διαλυτών μεθανόλη-διχλωρομεθάνιο.

- Απόδοση: 710 mg (85%)
- Σημείο τήξεως: 284-286 °C (βιβλ: >300 °C [51])
- <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO): δ 13.11 (s, 1H, -COOH), 12.12 (s, 1H, -OH), 8.20 (d, 1H, H-6'), 8.05 (d, 1H, H<sub>B</sub>), 7.99 (d, 2H, H-2, H-6), 7.98 (d, 2H, H-3, H-5), 7.80 (d, 1H, H<sub>A</sub>), 7.56 (t, 1H, H-4'), 7.01 (d, 1H, H-3')
- <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO): δ 192.64, 167.22, 160.16, 143.91, 138.88, 136.05, 132.83, 130.18, 130.07, 129.67, 124.91, 123.43, 123.11, 120.22

#### 4.2.7. (E)-4-(3-2-υδροξυλφαινυλο)-3-οξοπροπ-1-εν-1-υλ) βενζοϊκό οξύ (3g)



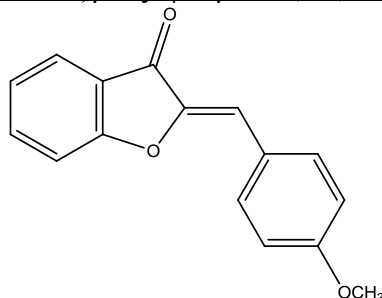
Σχήμα 19: Χημικός τύπος της **3g**

Παρασκευάζεται σύμφωνα με την γενική μέθοδο σύνθεσης χαλκονών, με την προσθήκη 7,34 mmol (1000 mg) της 2-υδροξυ-ακετοφαινόνης **1g** και 7,34 mmol (1102 mg) της βενζαλδεΐδης **2g** σε 18,0 mL αιθανόλης και 6,0 mL υδατικού διαλύματος KOH. Το μίγμα αναδεύεται επί 24 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Κατόπιν, το μίγμα της αντίδρασης ψύχεται σε παγόλουτρο και οξινίζεται με υδατικό διάλυμα HCl 10% ως pH=1 και παρατηρείται καταβύθιση του προϊόντος (κίτρινο ίζημα) υπό την μορφή στερεού, το οποίο και παραλαμβάνεται μετά από διήθηση υπό κενό, με έκπλυση του ιζήματος με υδατικό διάλυμα HCl 10%. Το ίζημα, το οποίο είναι κίτρινο στερεό, παραλαμβάνεται και καθαρίζεται με ανακρυστάλλωση από σύστημα διαλυτών μεθανόλη-διχλωρομεθάνιο.

- Απόδοση: 813 mg (43%)
- Σημείο τήξεως: 253-255 °C
- <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO): δ 13.13 (s, 1H, -COOH), 12.31 (s, 1H, -OH), 8.22 (d, 1H, H-6'), 8.10 (d, 1H, H<sub>B</sub>), 7.99 (d, 2H, H-2, H-6), 7.97 (d, 2H, H-3, H-5), 7.84 (d, 1H, H<sub>A</sub>), 7.55 (t, 1H, H-5'), 7.00 (d, 1H, H-3'), 6.98 (t, 1H, H-4')
- <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO): δ 192.51, 166.33, 161.3, 142.98, 138.51, 136.47, 132.41, 131.08, 129.86, 129.26, 124.44, 121.19, 119.54, 118.05

### 4.3. Σύνθεση ωρονών **4a-g**

#### 4.3.1. (Z)-2-(4-μεθοξυβενζυλιδENO)βενζοφουραν-3(2H)-όνη (4a) [9]

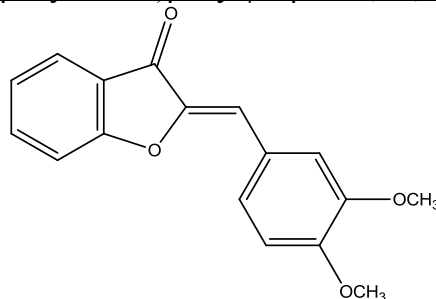


Σχήμα 20: Χημικός τύπος της **4a**

Παρασκευάζεται σύμφωνα με την γενική μέθοδο σύνθεσης ωρονών, με την προσθήκη 2,07 mmol (550 mg) χαλκόνης **3a** και 2,07 mmol (550 mg) Hg(OAc)<sub>2</sub> σε 19,4 mL πυριδίνης. Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται στους 110 °C με ανάδευση για 2h. Κατόπιν, το μίγμα ψύχεται με την προσθήκη πάγου και εν συνεχεία οξινίζεται με υδατικό διάλυμα HCl 10% ως pH=1. Στο οξινισμένο μίγμα γίνεται εκχύλιση με διγλωρομεθάνιο (3x15 mL). Τα οργανικά εκχυλίσματα ενώνονται, ξηραίνονται με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση. Παραλαμβάνεται στερεό έντονου κίτρινου χρώματος.

- Απόδοση: 370 mg (73%)
- Σημείο τήξεως: 124-134 °C (βιβλ: 137-138,5 °C [9])
- <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ ppm 7.90 (d, 2H, J<sub>2',3'</sub> = J<sub>5',6'</sub> = 8.8 Hz, H-2' , H-6'), 7.80 (dd, 1H, J<sub>4,5</sub> = 7.69 Hz, J<sub>4,6</sub> = 1.47, H-4), 7.64 (ddd, 1H, J<sub>6,7</sub> = 7.69 Hz, J<sub>6,5</sub> = 7.33 Hz, J<sub>4,6</sub> = 1.47, H-6), 7.33 (d, 1H, J<sub>6,7</sub> = 7.69 Hz, H-7), 7.21 (ddd, 1H, J<sub>5,4</sub> = 7.69 Hz, J<sub>5,6</sub> = 7.33 Hz, J<sub>5,7</sub> = 0.74 Hz, H-5), 6.99 (d, 2H, J<sub>3',2'</sub> = J<sub>5',6'</sub> = 8.79 Hz, H-3' , H-5'), 6.89 (s, 1H, H-10), 3.88 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>);
- <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ ppm 184.70, 165.85, 161.08, 145.90, 136.51, 133.44, 125.07, 124.56, 123.26, 121.96, 114.51, 113.39, 112.86, 55.39

#### 4.3.2. (Z)-2-(3,4-διμεθοξυβενζυλιδENO)βενζοφουραν-3(2H)-όνη (4b) [9]



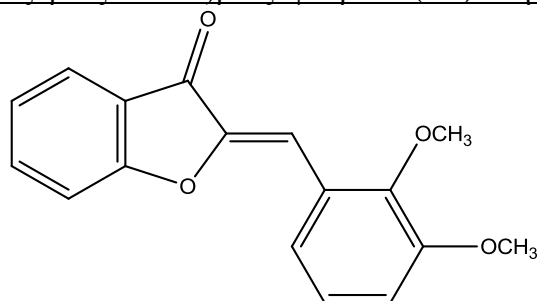
Σχήμα 21: Χημικός τύπος της **4b**

Παρασκευάζεται σύμφωνα με την γενική μέθοδο σύνθεσης ωρονών, με την προσθήκη 1,98 mmol (564 mg) χαλκόνης **3b** και 2,48 mmol (789 mg) Hg(OAc)<sub>2</sub> σε 19,8 mL πυριδίνης. Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται στους 110 °C με ανάδευση για 1,5 h. Κατόπιν, το μίγμα ψύχεται με την προσθήκη πάγου και εν συνεχεία

οξινίζεται με υδατικό διάλυμα HCl 10% ως pH=1. Στο οξινισμένο μίγμα γίνεται εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο (3x15 mL). Τα οργανικά εκχυλίσματα ενώνονται, ξηραίνονται με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση. Παραλαμβάνεται στερεό έντονου πορτοκαλί χρώματος, το οποίο καθαρίζεται μέσω ανακρυστάλλωσης με μεθανόλη.

- Απόδοση: 520 mg (94%)
- Σημείο τήξεως: 154-157 °C (βιβλ: 160-162 °C [9])
- <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ ppm 7.82 (dd, 1H, J<sub>4,5</sub> = 7.69 Hz, J<sub>4,6</sub> = 1.46 Hz, H-4), 7.65 (ddd, 1H, J<sub>6,7</sub> = 8.05 Hz, J<sub>6,5</sub> = 7.69 Hz, J<sub>6,4</sub> = 1.46 Hz, H-6), 7.55 (d, 1H, J<sub>2',6'</sub> = 1.83 Hz, H-2'), 7.51 (dd, 1H, J<sub>6',5'</sub> = 8.43 Hz, J<sub>6',2'</sub> = 1.84 Hz, H-6'), 7.32 (d, 1H, J<sub>7,6</sub> = 8.42 Hz, H-7), 7.21 (dd, 1H, J<sub>5,4</sub> = 8.05 Hz, J<sub>5,6</sub> = 0.73 Hz, H-5), 6.95 (d, 1H, J<sub>5',6'</sub> = 8.42 Hz, H-5'), 6.88 (s, 1H, H-10), 3.98 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.95 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>);
- <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ ppm 184.40, 165.73, 150.88, 149.06, 145.91, 136.48, 125.98, 125.26, 124.55, 123.31, 121.88, 113.78, 113.59, 112.80, 112.21, 55.93, 55.90;

#### 4.3.3. (Z)-2-(2,3-διμεθοξυβενζυλιδενο)βενζοφουραν-3(2H)-όνη (4c)

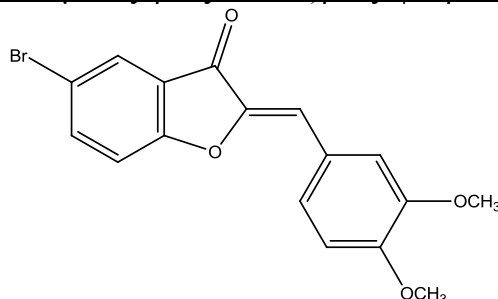


Σχήμα 22: Χημικός τύπος της **4c**

Παρασκευάζεται σύμφωνα με την γενική μέθοδο σύνθεσης ωρονών, με την προσθήκη 3,45 mmol (980 mg) χαλκόνης **3c** και 4,31 mmol (1373 mg) Hg(OAc)<sub>2</sub> σε 27,0 mL πυριδίνης. Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται στους 110 °C με ανάδευση για 1,5 h. Κατόπιν, το μίγμα ψύχεται με την προσθήκη πάγου και εν συνεχεία οξινίζεται με υδατικό διάλυμα HCl 10% ως pH=1. Στο οξινισμένο μίγμα γίνεται εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο (3x15 mL). Τα οργανικά εκχυλίσματα ενώνονται, ξηραίνονται με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση. Παραλαμβάνεται στερεό πορτοκαλί χρώματος, το οποίο καθαρίζεται μέσω ανακρυστάλλωσης με μεθανόλη.

- Απόδοση: 720 mg (74%)
- Σημείο τήξεως: 127-128 °C (βιβλ: 128-130 °C [50])
- <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.93 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.82 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.65 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.32 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.28 – 7.10 (m, 2H), 6.98 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 3.91 (d, J = 6.6 Hz, 6H).
- <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 184.92, 166.21, 152.96, 149.52, 147.64, 136.94, 126.74, 124.85, 124.35, 123.79, 123.60, 125.54, 123.12, 122.87, 121.92, 116.62, 114.90, 114.27, 113.06, 112.72, 107.23, 61.86, 56.04, 31.05

#### 4.3.4. (Z)-5-βρωμο-2-(3,4-διμεθοξυβενζυλιδενο)βενζοφουραν-3(2H)-όνη (4d)

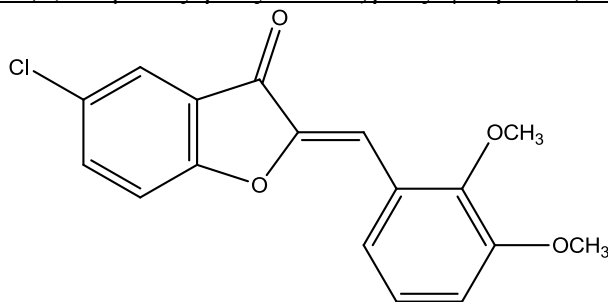


Σχήμα 23: Χημικός τύπος της **4d**

Παρασκευάζεται σύμφωνα με την γενική μέθοδο σύνθεσης ωρονών, με την προσθήκη 0,28 mmol (100 mg) χαλκόνης **3d** και 0,35 mmol (110 mg) Hg(OAc)<sub>2</sub> σε 2,8 mL πυριδίνης. Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται στους 110 °C με ανάδευση για 1 h. Κατόπιν, το μίγμα ψύχεται με την προσθήκη πάγου και εν συνεχεία οξινίζεται με υδατικό διάλυμα HCl 10% ως pH=1. Στο οξινισμένο μίγμα γίνεται εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο (3x15 mL). Τα οργανικά εκχυλίσματα ενώνονται, ξηραίνονται με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση. Παραλαμβάνεται στερεό φαιοκίτρινου χρώματος, το οποίο καθαρίζεται μέσω ανακρυστάλλωσης με μεθανόλη.

- Απόδοση: 52,2 mg (53%)
- Σημείο τήξεως: 200-203 °C
- <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.94 (s, 1H), 7.74 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.52 (s, 2H), 7.23 (s, 1H), 7.08 – 6.83 (m, 2H), 3.97 (d, J = 5.2 Hz, 6H).
- <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 182.98, 164.44, 151.40, 149.30, 146.00, 139.10, 127.41, 126.50, 125.09, 123.81, 116.36, 114.91, 114.72, 114.03, 111.42, 56.132

#### 4.3.5. (Z)-5-χλωρο-2-(2,3-διμεθοξυβενζυλιδενο)βενζοφουραν-3(2H)-όνη (4e)



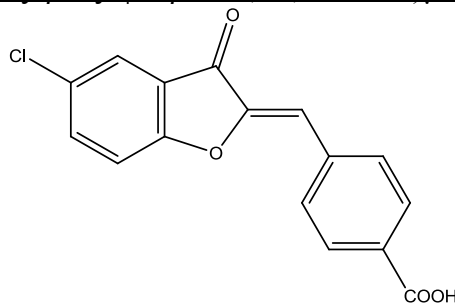
Σχήμα 24: Χημικός τύπος της **4e**

Παρασκευάζεται σύμφωνα με την γενική μέθοδο σύνθεσης ωρονών, με την προσθήκη 0,33 mmol (104 mg) χαλκόνης **3e** και 0,40 mmol (129 mg) Hg(OAc)<sub>2</sub> σε 3,3 mL πυριδίνης. Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται στους 110 °C με ανάδευση για 1 h. Κατόπιν, το μίγμα ψύχεται με την προσθήκη πάγου και εν συνεχεία οξινίζεται με υδατικό διάλυμα HCl 10% ως pH=1. Στο οξινισμένο μίγμα γίνεται εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο (3x15 mL). Τα οργανικά εκχυλίσματα ενώνονται, ξηραίνονται με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση. Παραλαμβάνεται στερεό ανοιχτού κίτρινου χρώματος, το οποίο καθαρίζεται μέσω ανακρυστάλλωσης με μεθανόλη.

- Απόδοση: 86,1 mg (83%)

- Σημείο τήξεως: 155-156 °C
- <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.89 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.60 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.17 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 7.00 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 3.92 (d, J = 6.3 Hz, 6H).
- <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 164.12, 152.74, 149.46, 147.50, 136.45, 129.05, 126.14, 124.17, 123.35, 122.88, 114.38, 114.14, 108.13, 99.15, 61.65, 55.80

#### 4.3.6. (Z)-4-((5-χλωρο-3-οξοβενζοφουραν-2(3H)-υλιδενο)μεθυλο βενζοϊκό οξύ (4f)

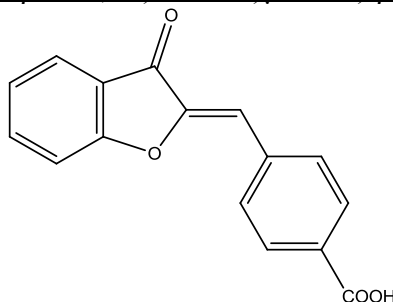


Σχήμα 25: Χημικός τύπος της **4f**

Παρασκευάζεται σύμφωνα με την γενική μέθοδο σύνθεσης ωρονών, με την προσθήκη 0,17 mmol (58 mg) χαλκόνης **3f** και 0,42 mmol (131 mg) Hg(OAc)<sub>2</sub> σε 3,6 mL πυριδίνης. Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται στους 110 °C με ανάδευση για 6 h. Κατόπιν, το μίγμα ψύχεται με την προσθήκη πάγου και εν συνεχεία οξινίζεται με υδατικό διάλυμα HCl 10% ως pH=1. Στο οξινισμένο μίγμα γίνεται εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο (3x15 mL). Τα οργανικά εκχυλίσματα ενώνονται, ξηραίνονται με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση. Παραλαμβάνεται στερεό φαιού χρώματος, το οποίο καθαρίζεται μέσω ανακρυστάλλωσης με μεθανόλη.

- Απόδοση: 9,8 mg (20%)
- Σημείο τήξεως: >300 °C (με αποσύνθεση)
- <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO): δ 8.81 (s, 3H), 8.07 (dd, J = 20.1, 8.2 Hz, 4H), 7.87 (d, J = 9.8 Hz, 3H), 7.65 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.06 (s, 1H).
- <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO): δ 182.74, 166.82, 164.10, 147.40, 137.39, 135.84, 131.72, 131.47, 129.81, 128.51, 123.85, 122.24, 115.32, 111.65

#### 4.3.7. (Z)-4-((3-οξοβενζοφουραν-2(3H)υλιδενο)μεθυλο βενζοϊκό οξύ (4g)



Σχήμα 26: Χημικός τύπος της **4g**

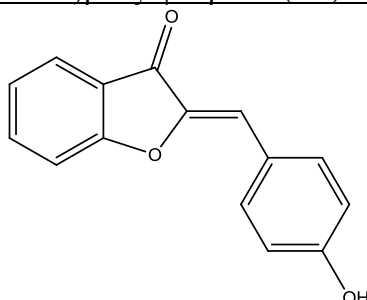
Παρασκευάζεται σύμφωνα με την γενική μέθοδο σύνθεσης ωρονών, με την προσθήκη 0,19 mmol (50 mg) χαλκόνης **3g** και 0,47 mmol (149 mg) Hg(OAc)<sub>2</sub> σε 3,7 mL πυριδίνης. Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται στους 110 °C με ανάδευση για 6 h. Κατόπιν, το μίγμα ψύχεται με την προσθήκη πάγου και εν συνεχεία οξινίζεται με

υδατικό διάλυμα HCl 10% ως pH=1. Στο οξιτισμένο μίγμα γίνεται εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο (3x15 mL). Τα οργανικά εκχυλίσματα ενώνονται, ξηραίνονται με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση. Παραλαμβάνεται στερεό φαιού χρώματος, το οποίο καθαρίζεται μέσω ανακρυστάλλωσης με μεθανόλη.

- Απόδοση: 19,6 mg (40%)
- Σημείο τήξεως: 272-274 °C (με αποσύνθεση)
- <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.89 (s, 2H), 8.50 (s, 1H), 8.08 (d, J = 12.1 Hz, 2H), 7.99 (s, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.01 (s, 1H).
- <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 183.80, 166.79, 165.66, 147.19, 145.36, 145.31, 142.68, 138.02, 136.09, 134.49, 131.40, 131.28, 129.77, 126.96, 126.89, 124.49, 124.26, 120.69, 113.32, 110.66

#### 4.4. Σύνθεση ωρονών **5a-c**

##### 4.4.1. (Z)-2-(4-υδροξυβενζυλιδενο)βενζοφουραν-3(2H)-όνη (5a)



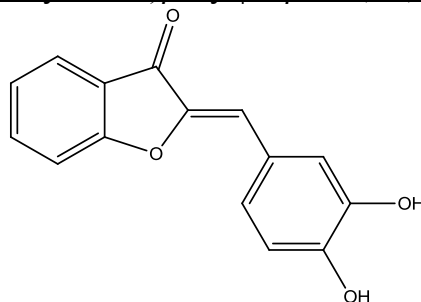
Σχήμα 27: Χημικός τύπος της **5a**

Παρασκευάζεται σύμφωνα με την γενική μέθοδο αποπροστασίας ωρονών, με την προσθήκη 1,69 mmol (370 mg) ωρόνης **4a** και 12,3 mL διαλύματος BBr<sub>3</sub> μοριακότητας 1 M σε 10,5 mL DCM. Το μίγμα της αντίδρασης διατηρείται στους 0 °C με ανάδευση για 2 h. Κατόπιν, το μίγμα της αντίδρασης, το οποίο έχει κίτρινο χρώμα, αναμειγνύεται με μίγμα νερού και πάγου, για περίπου 20 min και αποκτά κίτρινο χρώμα. Εν συνεχεία, το προκύπτον μίγμα υποβάλλεται σε εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc) (3x15 mL). Τα οργανικά εκχυλίσματα ενώνονται, ξηραίνονται με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση. Παραλαμβάνεται στερεό έντονου πορτοκαλί χρώματος, το οποίο καθαρίζεται μέσω ανακρυστάλλωσης με μεθανόλη. Μετά από τον καθαρισμό προκύπτει στερεό κίτρινου χρώματος.

- Απόδοση: 328 mg (94%)
- Σημείο τήξεως: 230-235 °C (με αποσύνθεση) (βιβλ: 238-239 °C [52])
- <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO): δ 10.22 (b, 1H), 7.86 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.77 – 7.70 (m, 2H), 7.53 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.28 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 6.90 – 6.85 (m, 3H).
- <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO): δ 182.97, 164.66, 159.49, 144.47, 136.82, 133.36, 123.76, 123.39, 122.48, 120.98, 115.88, 113.10, 112.80



#### 4.4.2. (Z)-2-(3,4-διδροξυβενζυλιδενο)βενζοφουραν-3(2H)-όνη (5b)

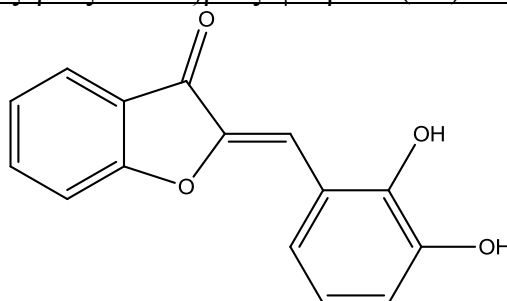


Σχήμα 28: Χημικός τύπος της **5b**

Παρασκευάζεται σύμφωνα με την γενική μέθοδο αποπροστασίας ωρονών, με την προσθήκη 1,85 mmol (520 mg) ωρόνης **4b** και 18,4 mL διαλύματος  $\text{BBr}_3$  μοριακότητας 1 M σε 7,0 mL DCM. Το μίγμα της αντίδρασης διατηρείται στους 0 °C με ανάδευση για 2 h. Κατόπιν, το μίγμα της αντίδρασης, το οποίο έχει ιώδες χρώμα, αναμειγνύεται με μίγμα νερού και πάγου, για περίπου 20 min και αποκτά κίτρινο χρώμα. Εν συνεχεία, το προκύπτον μίγμα υποβάλλεται σε εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc) (3x15 mL). Τα οργανικά εκχυλίσματα ενώνονται, ξηραίνονται με  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση. Παραλαμβάνεται στερεό έντονου πορτοκαλί χρώματος, το οποίο καθαρίζεται μέσω ανακρυστάλλωσης με μεθανόλη. Μετά από τον καθαρισμό προκύπτει στερεό κίτρινου χρώματος.

- Απόδοση: 446 mg (94%)
- Σημείο τήξεως: 228-231 °C (βιβλ: 225-228 °C [53])
- $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO):  $\delta$  9.76 (s, 1H), 9.33 – 9.26 (m, 1H), 7.76 (dd,  $J = 11.4, 4.3$  Hz, 2H), 7.51 – 7.46 (m, 2H), 7.29 (ddd,  $J = 14.2, 8.0, 4.6$  Hz, 2H), 6.84 (t,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 6.79 (s, 1H).
- $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO):  $\delta$  186.12, 168.02, 151.68, 148.71, 147.74, 140.22, 128.24, 127.19, 126.77, 126.31, 124.42, 121.35, 119.17, 117.07, 116.12.

#### 4.4.3. (Z)-2-(3,4-διδροξυβενζυλιδενο)βενζοφουραν-3(2H)-όνη (5c)



Σχήμα 29: Χημικός τύπος της **5c**

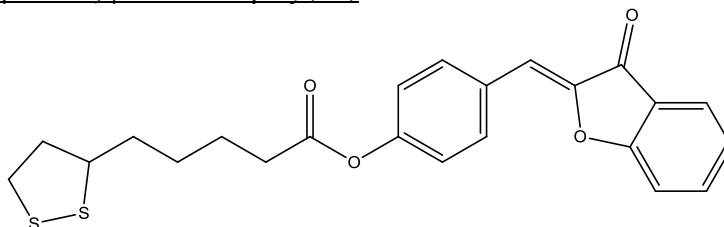
Παρασκευάζεται σύμφωνα με την γενική μέθοδο αποπροστασίας ωρονών, με την προσθήκη 2,53 mmol (720 mg) ωρόνης **4c** και 25,5 mL διαλύματος  $\text{BBr}_3$  μοριακότητας 1 M σε 3,0 mL DCM. Το μίγμα της αντίδρασης διατηρείται στους 0 °C με ανάδευση για 3 h. Κατόπιν, το μίγμα της αντίδρασης, το οποίο έχει ιώδες χρώμα, αναμειγνύεται με μίγμα νερού και πάγου, για περίπου 20 min και αποκτά κίτρινο χρώμα. Εν συνεχεία, το προκύπτον μίγμα υποβάλλεται σε εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc) (3x15 mL). Τα οργανικά εκχυλίσματα ενώνονται, ξηραίνονται

με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση. Παραλαμβάνεται στερεό έντονου πορτοκαλί χρώματος, το οποίο καθαρίζεται μέσω ανακρυστάλλωσης με μεθανόλη. Μετά από τον καθαρισμό προκύπτει στερεό κίτρινου χρώματος.

- Απόδοση: 597 mg (93%)
- Σημείο τήξεως: 226-230 °C (με αποσύνθεση)
- <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO) δ 9.49 (s, 2H), 7.80 – 7.73 (m, 2H), 7.62 (dd, J = 7.9, 1.1 Hz, 1H), 7.53 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.29 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.86 (dd, J = 7.8, 1.1 Hz, 1H), 6.76 (t, J = 7.9 Hz, 1H).
- <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO): δ 186.6, 168.3, 149.5, 148.8, 148.5, 140.5, 127.3, 126.8, 124.5, 124.2, 122.6, 122.4, 120.4, 116.5, 110.2

## 4.5. Σύνθεση υβριδικών μορίων **7a-b**

### 4.5.1. 5-(1,2-διθειολαν-3-υλ)πεντανοϊκός (Z)-4-((3-οξοβενζοφουραν-2(3H)-υλιδενο)μεθυλο)φαινυλεστέρας (7a)

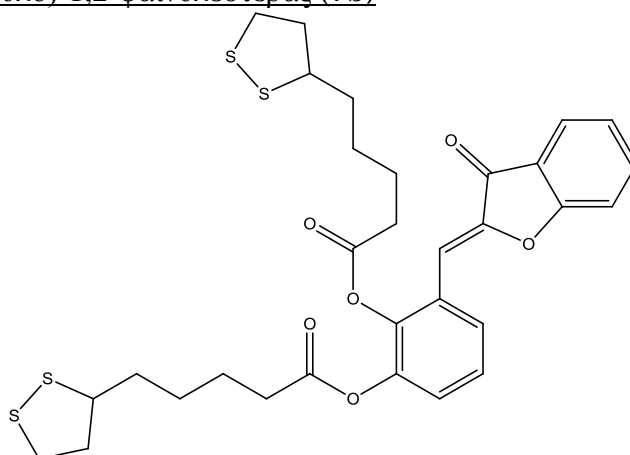


Σχήμα 30: Χημικός τύπος της **7a**

Παρασκευάζεται σύμφωνα με την μέθοδο εστεροποίησης Sterglich, με την προσθήκη 0,42 mmol (100 mg) ωρόνης **5a**, 0,46 mmol (95 mg) λιποϊκού οξέος σε 3,0 mL DCM. Στο ανωτέρω μίγμα, το οποίο αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ατμόσφαιρα αζώτου, προστίθενται στάγδην 0,50 mmol (103 mg) DCC και 5 mg DMAP διαλυμένα σε 3,0 mL DCM. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 48 h. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα Κατόπιν, το μίγμα της αντίδρασης, υποβάλλεται σε εκχύλιση με νερό (3x10 mL) και μετά σε εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο (3x15 mL). Τα οργανικά εκχυλίσματα ενώνονται, ξηραίνονται με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση. Παραλαμβάνεται στερεό κίτρινου χρώματος, το οποίο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (οξικός αιθυλεστέρας:πετρελαϊκός αιθέρας 7:3).

- Απόδοση: 25 mg (14%)
- Σημείο τήξεως: 166-170 °C
- <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.95 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.82 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.67 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.34 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.21 (t, J = 8.3 Hz, 3H), 6.88 (s, 1H), 3.63 (dd, J = 1, 8.3 Hz, 19H), 3.47 (s, 1H), 3.27 – 3.07 (m, 2H), 2.62 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.49 (dt, J = 12.1, 6.6 Hz, 1H), 1.94 (dd, J = 12.9, 6.8 Hz, 2H), 1.86 – 1.71 (m, 5H), 1.68 (s, 1H), 1.64 – 1.44 (m, 5H), 1.35 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 1.26 (s, 1H), 1.19 – 1.06 (m, 2H), 0.87 (d, J = 7.0 Hz, 1H).

4.5.2. δισ(5-(1,2-διθειολαν-3-υλ)πεντανοϊκός) (Z)-3-((3-οξοβενζοφουραν-2(3H)-υλιδενο)μεθυλο)-1,2-φαινυλεστέρας (7b)



Σχήμα 31: Χημικός τύπος της **7b**

Παρασκευάζεται σύμφωνα με την μέθοδο εστεροποίησης Sterglich, με την προσθήκη 0,39 mmol (100 mg) ωρόνης **5c**, 0,86 mmol (177 mg) λιποϊκού οξέος σε 3,0 mL DCM. Στο ανωτέρω μίγμα, το οποίο αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ατμόσφαιρα αζώτου, προστίθενται στάγδην 1,00 mmol (206 mg) DCC και 10 mg DMAP διαλυμένα σε 3,0 mL DCM. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 48 h. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα Κατόπιν, το μίγμα της αντίδρασης, υποβάλλεται σε εκχύλιση με νερό (3x10 mL) και μετά σε εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο (3x15 mL). Τα οργανικά εκχυλίσματα ενώνονται, ξηραίνονται με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση. Παραλαμβάνεται στερεό κίτρινου χρώματος, το οποίο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (οξικός αιθυλεστέρας:πετρελαϊκός αιθέρας 7:3).

- Απόδοση: 64 mg (25%)
- Σημείο τήξεως: 209-212 °C (με αποσύνθεση)
- <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.27 – 8.20 (m, 1H), 7.79 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.67 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.31 (ddd, J = 28.9, 16.3, 7.9 Hz, 5H), 6.87 (s, 1H), 4.11 (q, J = 7.2 Hz, 1H), 3.61 (dq, J = 13.2, 6.6 Hz, 3H), 3.29 – 3.00 (m, 5H), 2.70 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.57 (t, J = 7.4 Hz, 3H), 2.53 – 2.40 (m, 2H), 2.04 (s, 1H), 2.00 – 1.87 (m, 3H), 1.85 – 1.68 (m, 9H), 1.59 (ddd, J = 21.0, 14.1, 6.8 Hz, 6H), 1.34 – 1.16 (m, 6H), 0.86 (d, J = 7.3 Hz, 2H).
- <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 184.38, 170.54, 170.45, 166.16, 147.77, 142.77, 141.67, 137.19, 128.81, 127.04, 126.49, 124.75, 124.69, 123.73, 121.29, 112.93, 104.36, 56.23, 40.22, 38.50, 34.58, 33.85, 33.68, 29.64, 28.77, 28.69, 24.71, 24.54.

## 5. Φασματοσκοπική μελέτη των νέων αναλόγων χαλκονών και ωρονών μέσω NMR

### 5.1. Εισαγωγή

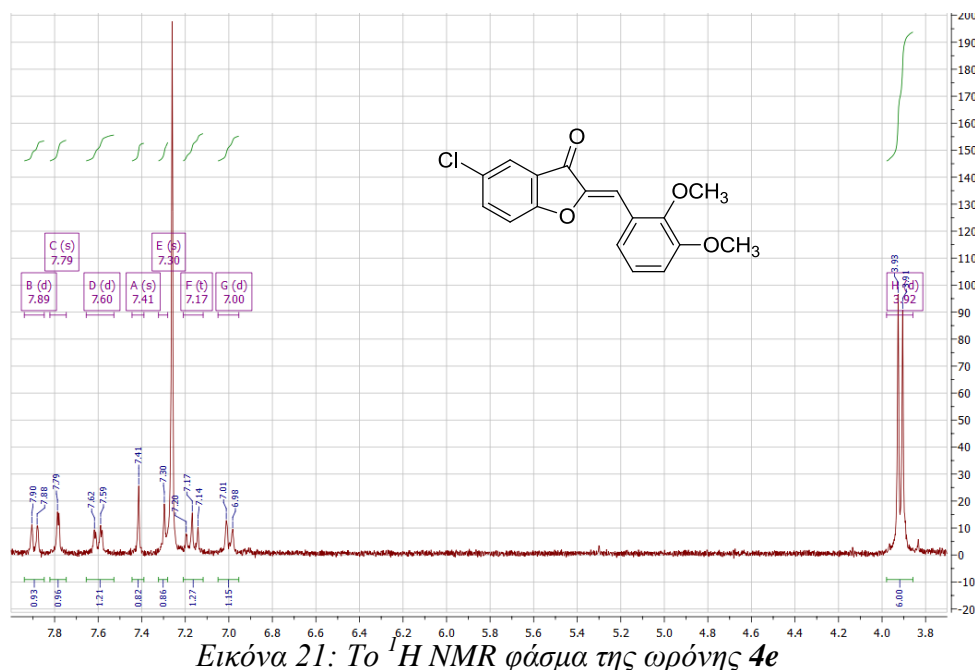
Στο παρόν κεφάλαιο περιγράφεται η φασματοσκοπική μελέτη νέων αναλόγων χαλκονών, ωρονών και υβριδικών μορίων ωρονών μέσω φασματοσκοπίας πυρηνικού συντονισμού (NMR). Η φασματοσκοπική μελέτη όλων των μορίων πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ. Ειδικά για τις ωρόνες 5a-c πραγματοποιήθηκε επιπρόσθετη φασματοσκοπική μελέτη μέσω φασματοσκοπίας πυρηνικού συντονισμού δύο διαστάσεων (2D-NMR) στο Εργαστήριο Μοριακής Ανάλυσης του Τμήματος Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας & Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

Θα παρουσιαστούν και θα σχολιαστούν ενδεικτικά φάσματα  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$  για τις ενώσεις που προέκυψαν από αντιδράσεις, οξειδωτικής κυκλοποίησης (**4a-g**) και σχηματισμών εστέρων του λιποϊκού οξέος (**7a-c**). Επίσης, χρησιμοποιώντας τα φάσματα  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ), HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) και HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) θα παρουσιαστεί η πλήρης ταυτοποίηση των φασμάτων των ωρονών **5a-c**.

### 5.2. Ενδεικτική παράθεση και σχολιασμός 1D-NMR φασμάτων

#### 5.2.1. Φασματοσκοπική μελέτη της ωρόνης **4e**

Ως παράδειγμα σχολιασμού του φάσματος 1D-NMR μιας ωρόνης παρατίθεται και σχολιάζεται το φάσμα της ωρόνης **4e**.

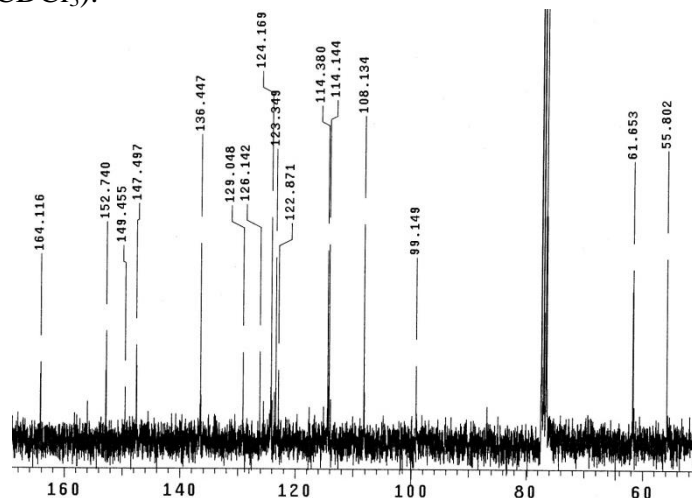


Εικόνα 21: Το  $^1\text{H}$  NMR φάσμα της ωρόνης **4e**

Στο φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ωρόνης **4e** (εικόνα 21), οι κορυφές μεταξύ 8-6.8 ppm αντιστοιχούν σε αρωματικά πρωτόνια πλην της κορυφής στα 7.41 ppm η οποία

αντιστοιχεί στο βινυλικό πρωτόνιο της ένωσης και της κορυφής στα 7.26 ppm η οποία αντιστοιχεί στον διαλύτη (CDCl<sub>3</sub>). Οι κορυφές στα 3.93 και 3.91 ppm ανήκουν σε πρωτόνια μεθόξυ ομάδων.

Στο φάσμα <sup>13</sup>C NMR της ωρόνης **4e** (εικόνα 22) παρατίθενται οι κορυφές των ατόμων άνθρακα της **4e**. Αγνοούνται οι κορυφές περί τα 77 ppm καθώς αντιστοιχούν στον διαλύτη (CDCl<sub>3</sub>).

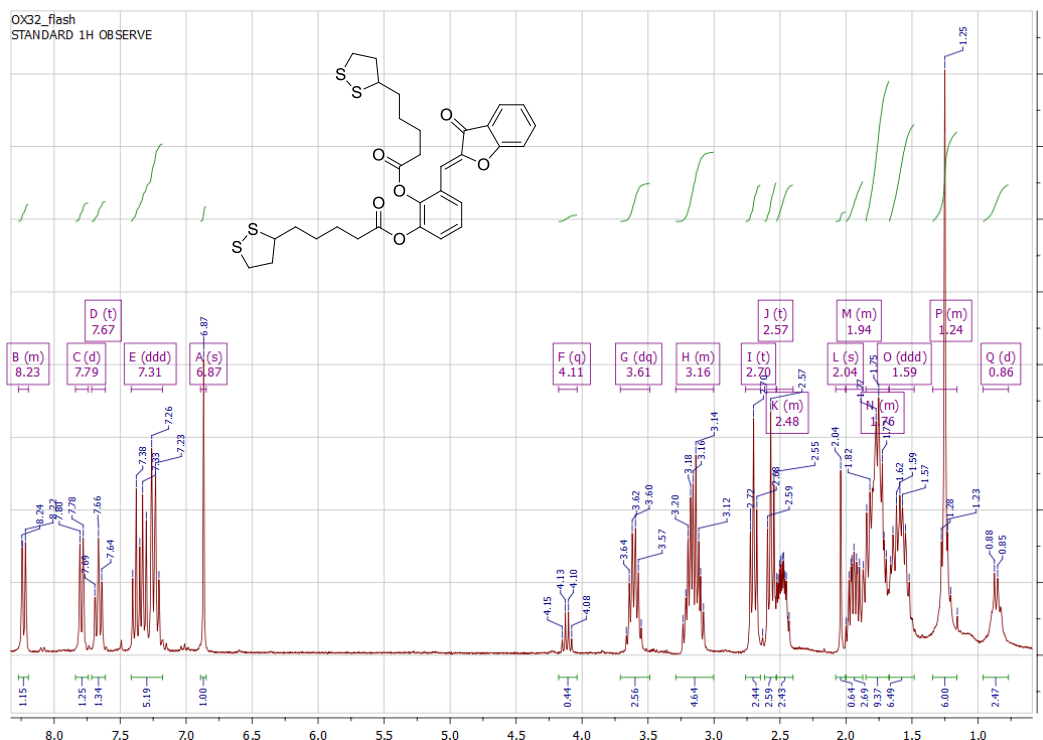


Εικόνα 22: Το <sup>13</sup>C NMR φάσμα της ωρόνης **4e**

Τα φάσματα <sup>1</sup>H και <sup>13</sup>C για τις υπόλοιπες ενώσεις της κατηγορίας **4** μπορούν να σχολιαστούν ακολουθώντας παρόμοια μεθοδολογία.

### 5.2.2. Φασματοσκοπική μελέτη του υβριδικού μορίου **7b**

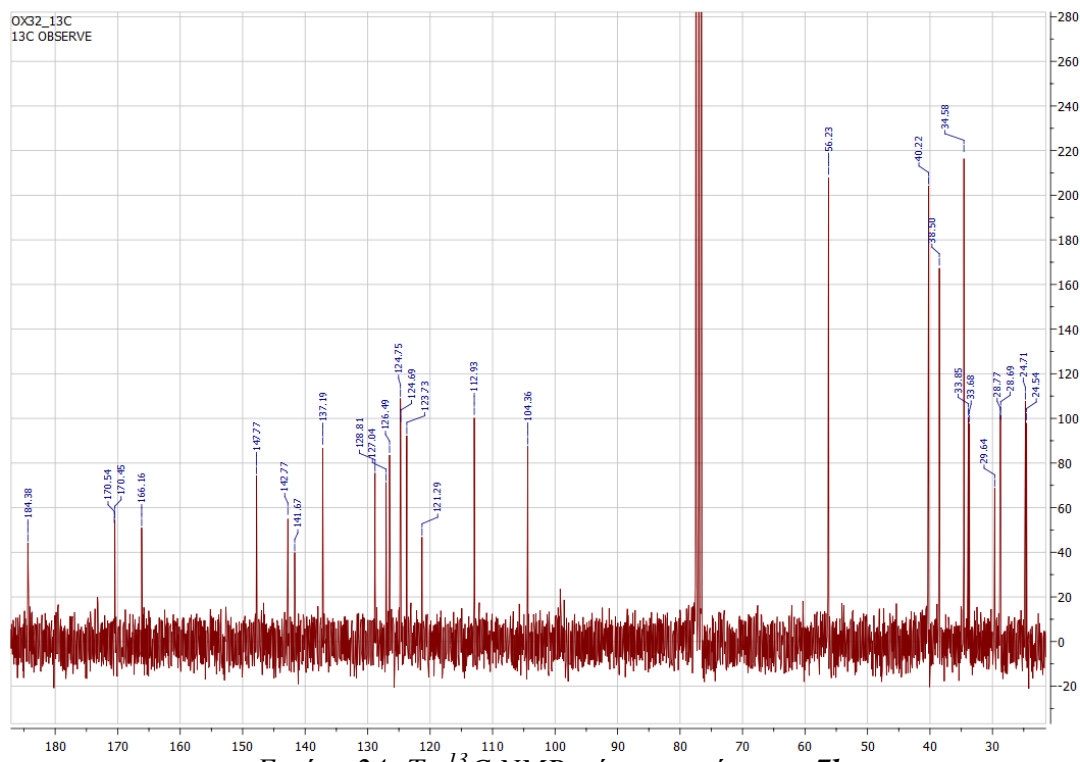
Ως παράδειγμα σχολιασμού του φάσματος 1D-NMR ενός υβριδικού μορίου ωρόνης με λιποϊκό οξύ παρατίθεται και σχολιάζεται το φάσμα της ένωσης **7b**.



Εικόνα 23: Το <sup>1</sup>H NMR φάσμα της ένωσης **7b**

Στο φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης **7b** (εικόνα 23), οι κορυφές μεταξύ 8-6.8 ppm αντιστοιχούν σε αρωματικά πρωτόνια πλην της κορυφής στα 6.87 ppm η οποία αντιστοιχεί στο βινυλικό πρωτόνιο της ένωσης. Οι κορυφές μεταξύ 4.5-0 ppm ανήκουν στα πρωτόνια των ομάδων του λιποϊκού οξέος.

Στο φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της ωρόνης **7b** (εικόνα 22) παρατίθενται οι κορυφές των ατόμων άνθρακα της **7b**. Αγνοούνται οι κορυφές περί τα 77 ppm καθώς αντιστοιχούν στον διαλύτη ( $\text{CDCl}_3$ ).



Εικόνα 24: Το  $^{13}\text{C}$  NMR φάσμα της ένωσης **7b**

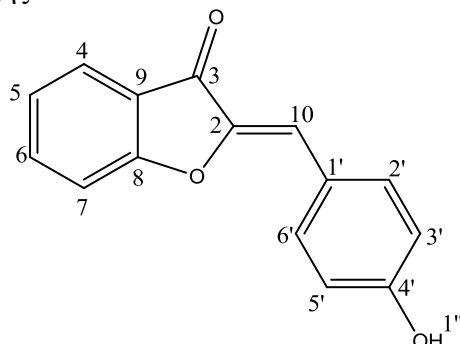
Τα φάσματα  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$  για τις υπόλοιπες ενώσεις της κατηγορίας **7** μπορούν να σχολιαστούν ακολουθώντας παρόμοια μεθοδολογία.

### 5.3. Πλήρης ταυτοποίηση των ωρόνων **5a-c** μέσω 2D-NMR

Όλα τα κατωτέρω φάσματα ελήφθησαν σε όργανο Varian 600MHz, σε διαλύτη DMSO-d<sub>6</sub>.

#### 5.3.1. Φασματοσκοπική μελέτη της ωρόνης **5a**

Η ωρόνη **5a** έχει τον εξής συντακτικό τύπο:



Σχήμα 32: Χημικός τύπος της **5a** με αρίθμηση των θέσεων στο μόριο

Σε πειράματα 1-D NMR που διεξήχθησαν παρατηρήθηκαν τα εξής σήματα:

**Πίνακας 5:** Σήματα <sup>1</sup>H της **5a**

Σήμα <sup>1</sup> H	Χημική Μετατόπιση (ppm)	Ολοκλήρωση, Πολλαπλότητα
X	10,250	1H, b
A	7,858	2H, d
B	7,761	2H, m
Γ	7,526	1H, d
Δ	7,283	1H, t
E	6,886	3H, m

(Παραλείπονται σήματα που οφείλονται σε τυχόν ακαθαρσίες ή θόρυβο, στον διαλύτη, ή σε υπολείμματα νερού. Επίσης παραλείπονται σήματα που πιθανόν να οφείλονται σε παρουσία μικρής ποσότητας στερεοϊσομερούς.)

**Πίνακας 6:** Σήματα <sup>13</sup>C της **5a**

Σήμα <sup>13</sup> C	Χημική Μετατόπιση (ppm)	Σήμα <sup>13</sup> C	Χημική Μετατόπιση (ppm)
α	182,97	η	123,39
β	164,66	θ	122,48
γ	159,49	ι	120,98
δ	144,47	ια	115,88
ε	136,82	ιβ	113,10
στ	133,36	ιγ	112,80
ζ	123,76		

(Παραλείπονται σήματα που οφείλονται σε τυχόν ακαθαρσίες ή θόρυβο, στον διαλύτη, ή σε υπολείμματα νερού.)

Σε πειράματα 2-D NMR που διεξήχθησαν παρατηρήθηκαν οι εξής συσχετίσεις:

**Πίνακας 7:** Συσχετίσεις σημάτων όπως προέκυψαν από το πείραμα COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) για την **5a**

Το σήμα	Συσχετίζεται με σήμα/σήματα	Το σήμα	Συσχετίζεται με σήμα/σήματα
X	Κανένα	Γ	B
A	E	Δ	B
B	Γ, Δ	E	A

**Πίνακας 8:** Συσχετίσεις σημάτων όπως προέκυψαν από το πείραμα HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) για την **5a**

Το σήμα	Συσχετίζεται με σήμα/σήματα	Το σήμα	Συσχετίζεται με σήμα/σήματα
X	Κανένα	Γ	ιγ
A	στ	Δ	η
B	ε, ζ	E	ια, ιβ

**Πίνακας 9:** Συσχετίσεις σημάτων όπως προέκυψαν από το πείραμα HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) για την **5a**

Το σήμα	Συσχετίζεται με σήμα/σήματα	Το σήμα	Συσχετίζεται με σήμα/σήματα
α	B, E	η	Γ
β	B, (Γ), (Δ)	θ	E
γ	A, (E)	ι	Γ, Δ
δ	E	ια	(A), E
ε	B, Δ	ιβ	A
στ	A, E	ιγ	Δ
ζ	B		

(Εντός παρενθέσεων υποδηλώνονται ασθενείς συσχετίσεις)

Βάσει των ανωτέρω δεδομένων προκύπτει η εξής ανάλυση-ταυτοποίηση:

Από το πείραμα COSY προκύπτουν πως υπάρχουν δύο ομάδες συγγενών σημάτων-πρωτονίων, η πρώτη ομάδα αφορά τα σήματα A και E, που αντιστοιχούν σε 5 συνολικά πρωτόνια, ενώ η δεύτερη ομάδα αφορά τα σήματα B, Γ και Δ που αντιστοιχούν σε 4 συνολικά πρωτόνια. Μια πρώτη εκτίμηση που μπορεί να γίνει από το πείραμα COSY είναι η εξής:

Λόγω της μεγάλης του χημικής μετατόπισης, θεωρείται πως το σήμα A ανήκει στα πρωτόνια των θέσεων 3' και 5', τα οποία είναι μαγνητικά ισοδύναμα και αναμένεται να δώσουν αμφοτέρα διπλή κορυφή. Επιπλέον θεωρείται πως το σήμα E αντιστοιχεί στα δύο πρωτόνια των θέσεων 2' και 6', τα οποία είναι μαγνητικά ισοδύναμα και αναμένεται να δώσουν αμφοτέρα διπλή κορυφή και στο πρωτόνιο της θέσης 10, το οποίο αναμένεται να δώσει απλή κορυφή. Αυτός θεωρείται ο λόγος που η κορυφή E ολοκληρώνεται για 3 πρωτόνια και είναι πολλαπλή. Από τα δεδομένα του πειράματος HSQC εξάγεται το συμπέρασμα πως στις θέσεις 3' και 5' αντιστοιχεί το σήμα στ. Στις θέσεις 2', 6' και 10 μπορούν να αντιστοιχούν τα σήματα ια και ιβ. Εφ' όσον το σήμα ιβ στο HMBC συσχετίζεται μόνο με το σήμα A (που αντιστοιχήθηκε στις θέσεις 3' και 5'), και το σήμα ια στο HMBC συσχετίζεται κυρίως με το σήμα E, θεωρείται πως το σήμα ιβ αντιστοιχεί στις θέσεις 2' και 6', ενώ το σήμα ια αντιστοιχεί στην θέση 10. Σχετικά με την θέση 4', θεωρείται πως ο άνθρακός της παράγει το σήμα γ, δεδομένου πως στο πείραμα HMBC παρατηρούνται συσχετισμοί αυτού με το σήμα A (και δευτερευόντως με το E). Όσον αφορά τα σήματα δ και θ, παρατηρείται πως στο HMBC αμφοτέρα συσχετίζονται αποκλειστικά με το σήμα E. Αυτό μας οδηγεί στο



συμπέρασμα πως πρόκειται για σήματα που αντιστοιχούν στις θέσεις 2 και 1', καθώς είναι οι μόνες θέσεις (από αυτές που δεν έχουν ήδη αντιστοιχηθεί) των οποίων οι άνθρακες μπορούν να δώσουν στο HMBC συσχέτιση αποκλειστικά μόνο με το σήμα E. Γίνεται η υπόθεση πως το σήμα δ αντιστοιχεί στην θέση 2 και το σήμα θ αντιστοιχεί στην θέση 1'. Η υπόθεση στηρίζεται στην μεγαλύτερη χημική μετατόπιση του σήματος δ, η οποία μπορεί να εξηγηθεί από την εγγύτητα της θέσης 2 στην καρβονυλομάδα που συνδέεται στην θέση 3, καθώς και στην μεγαλύτερη ένταση συσχετισμού του σήματος θ με το σήμα E (συγκρινόμενο με τον αντίστοιχο συσχετισμό των σημάτων δ-E) η οποία μπορεί να εξηγηθεί από την εγγύτητα της θέσης 1' και στα 3 πρωτόνια που παράγουν το σήμα E.

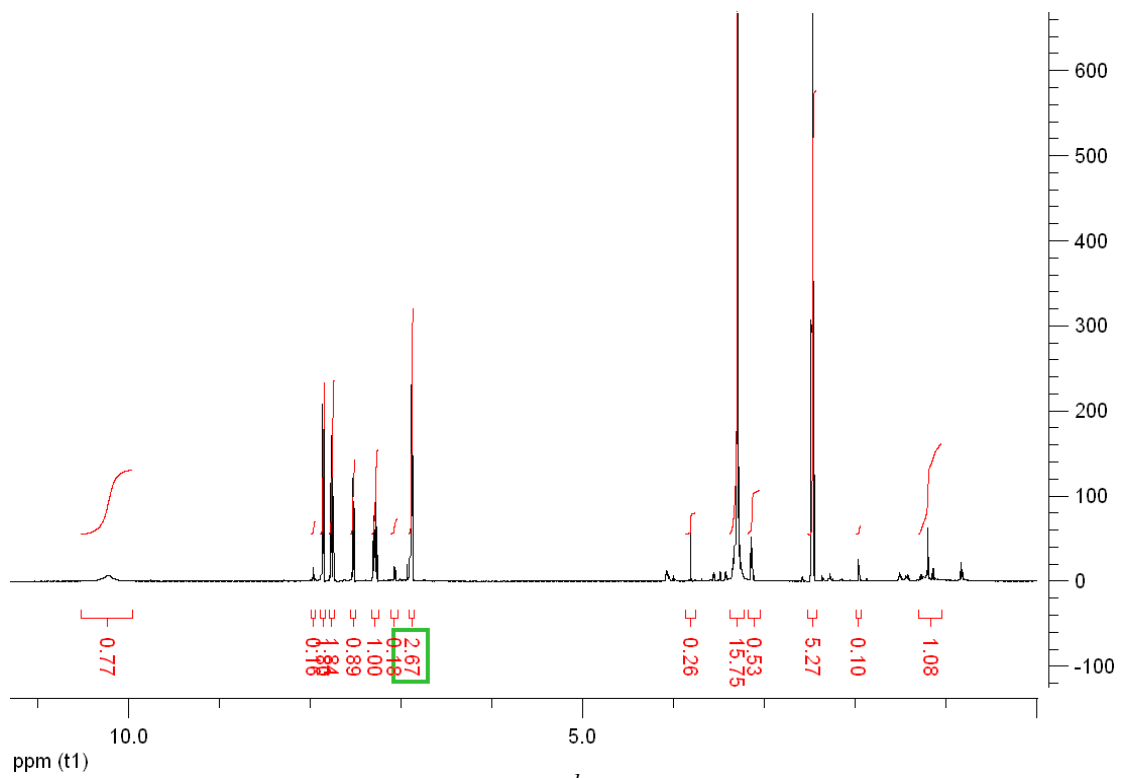
Επιπλέον, εφ' όσον τα σήματα Γ και Δ έχουν πολλαπλότητα d και t αντιστοίχως και εφ' όσον αμφότερα αλληλεπιδρούν στο COSY με το B, προκύπτει το συμπέρασμα πως τα δύο πρωτόνια που παράγουν το σήμα B δεν βρίσκονται σε γειτονικούς άνθρακες. Γίνεται η υπόθεση πως ένα από τα πρωτόνια του B βρίσκεται στην θέση 4 ούτως ώστε να εξηγηθεί η μεγαλύτερη (συγκρινόμενη με τα Γ και Δ) χημική μετατόπιση του σήματος B λόγω της εγγύτητας της θέσης 4 στο π-σύστημα του διπλού δεσμού με το O. Εφ' όσον στην θέση 5 είναι αδύνατο να βρίσκεται το 2<sup>ο</sup> πρωτόνιο από τα 2 που παράγουν το σήμα B, αναγκαστικά το σήμα Δ αντιστοιχεί σε αυτήν την θέση, επειδή είναι τριπλή κορυφή. Επίσης, στην θέση 7 αντιστοιχεί το σήμα Γ, ως διπλή κορυφή. Συνεπώς το 2<sup>ο</sup> πρωτόνιο του σήματος B τοποθετείται στην θέση 6. Από το πείραμα HSQC αντιστοιχούνται στα σήματα Γ και Δ, και αντίστοιχα στις θέσεις 7 και 5 τα σήματα ιγ και η. Όσον αφορά τα σήματα ε και ζ, που αντιστοιχούν μέσω του HSQC στους άνθρακες που είναι ενωμένοι με τα δυο πρωτόνια που παράγουν το σήμα B, γίνεται η υπόθεση, λαμβάνοντας υπ' όψιν και τα αποτελέσματα του πειράματος HMBC, πως το σήμα ε αντιστοιχεί στην θέση 4, ούτως ώστε να μπορεί να εξηγηθεί η μεγαλύτερη χημική μετατόπιση από την εγγύτητα στην καρβονυλομάδα της θέσης 3, ενώ το σήμα ζ αντιστοιχεί στην θέση 6.

Παρατηρείται πως το σήμα α παρουσιάζει την μεγαλύτερη χημική μετατόπιση και στο HMBC συσχετίζεται με τα σήματα E και B. Θεωρείται πως αυτή η συμπεριφορά δικαιολογείται μόνο αν το σήμα α αντιστοιχεί στην θέση 3. Σχετικά με τα σήματα β και ι, γίνεται η υπόθεση, λαμβάνοντας υπ' όψιν και τα αποτελέσματα του πειράματος HMBC, πως το σήμα β αντιστοιχεί στην θέση 9, ούτως ώστε να μπορεί να εξηγηθεί η μεγαλύτερη χημική μετατόπιση από την εγγύτητα στην καρβονυλομάδα της θέσης 3, ενώ το σήμα ι αντιστοιχεί στην θέση 8.

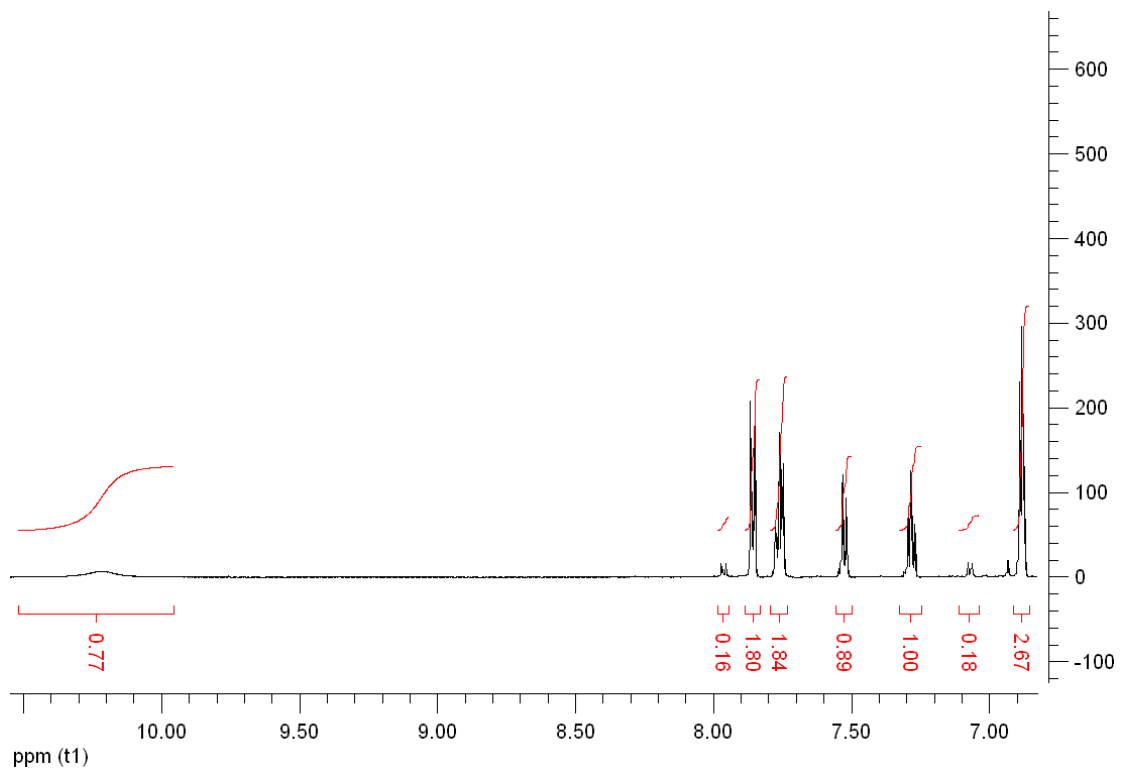
Εφ' όσον κανένα αποτέλεσμα από τα διεξαχθέντα πειράματα δεν διαψεύδει τα συμπεράσματα της ανάλυσης, ακολουθεί ταυτοποίηση του μορίου ως εξής:

**Πίνακας 10:** Αντιστοιχήσεις σημάτων NMR σε θέσεις στο μόριο της **5a**

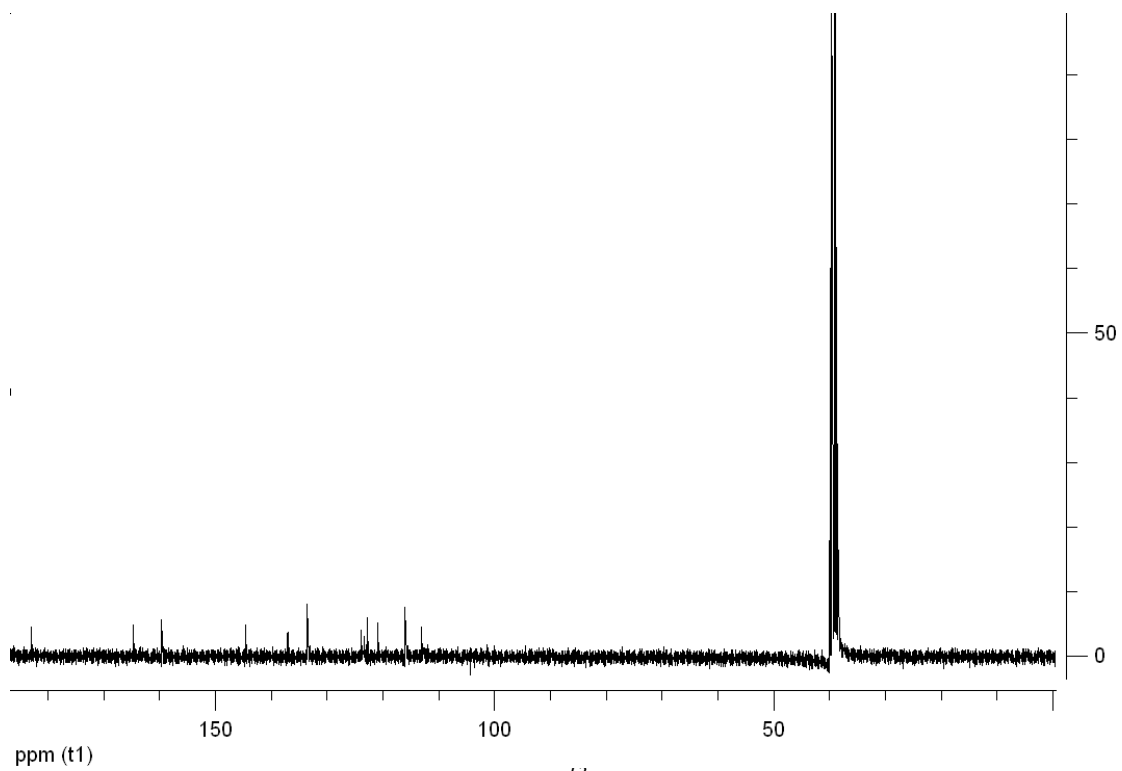
Θέση	Σήμα/σήματα (ppm)	Θέση	Σήμα/σήματα (ppm)
2	δ (114,47)	10	E (6,886) & ια (115,88)
3	α (182,97)	1'	θ (122,48)
4	B (7,761) & ε (136,82)	2'	E (6,886) & ιβ (113,10)
5	Δ (7,283) & η (123,39)	3'	A (7,858) & στ (133,36)
6	B (7,761) & ζ (123,76)	4'	γ (159,49)
7	Γ (7,526) & ιγ (112,80)	5'	A (7,858) & στ (133,36)
8	ι (120,98)	6'	E (6,886) & ιβ (113,10)
9	β (164,66)	1''	X (10,250)



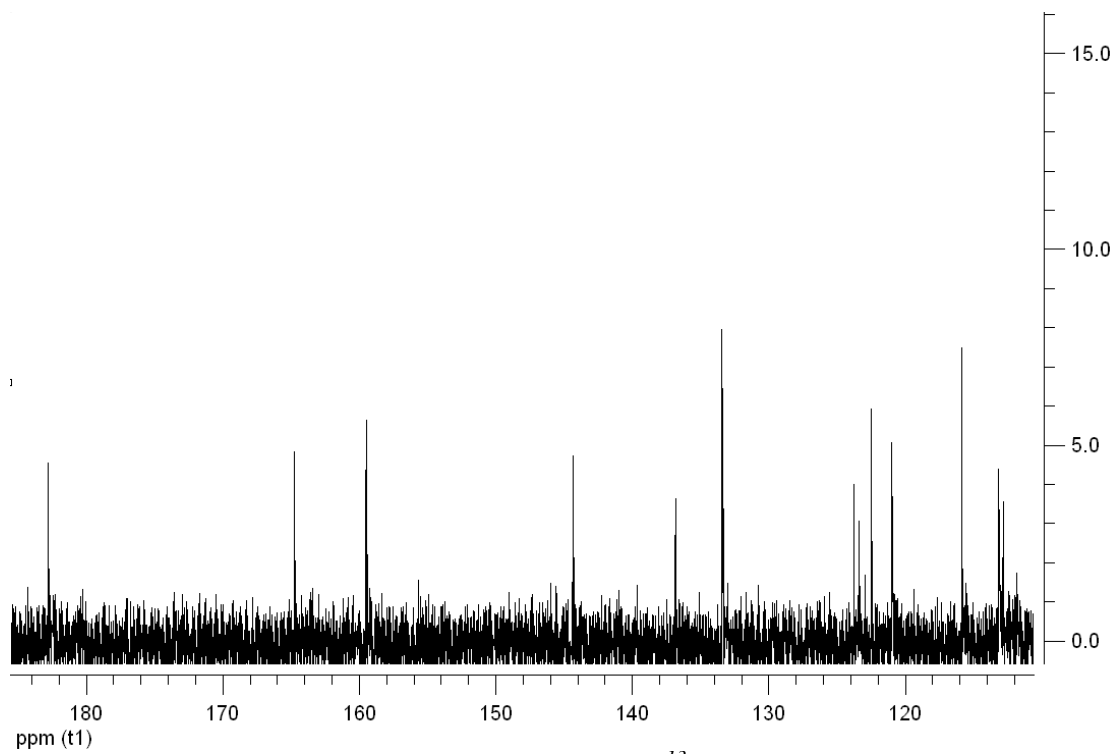
Εικόνα 25: Φάσμα  $^1\text{H}$  της ωρόνης 5a



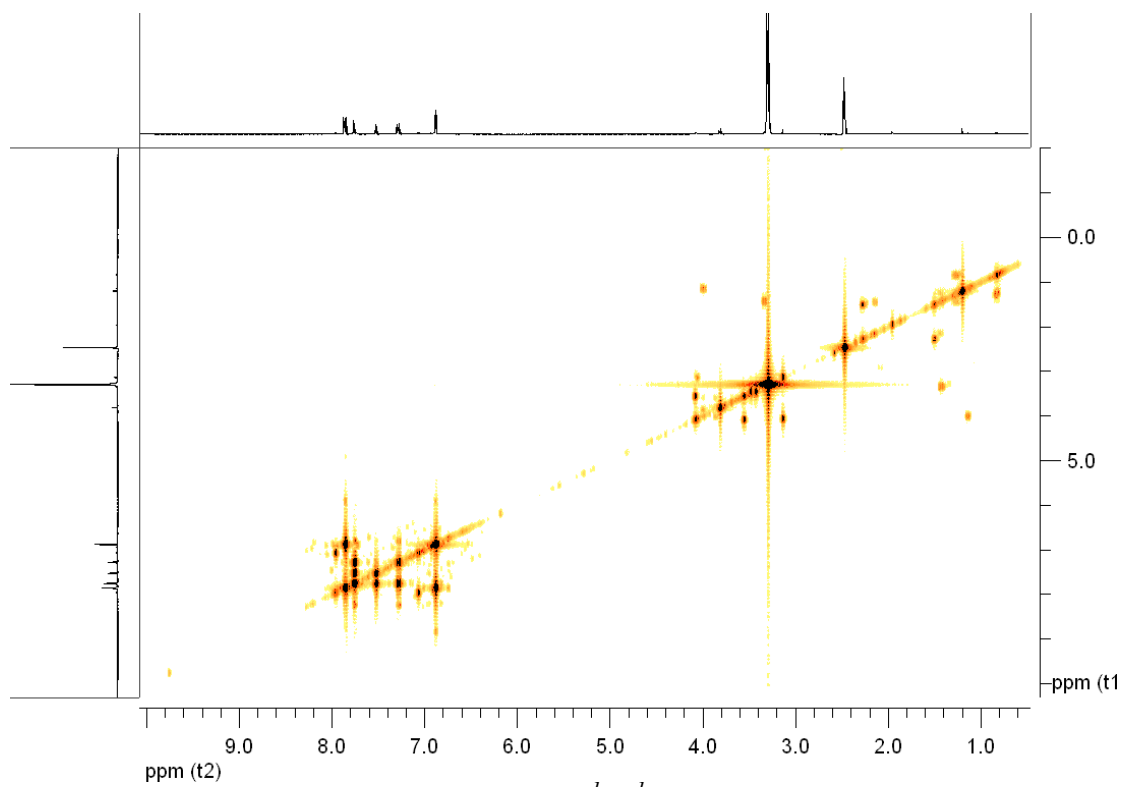
Εικόνα 26: Λεπτομέρεια φάσματος  $^1\text{H}$  της ωρόνης 5a



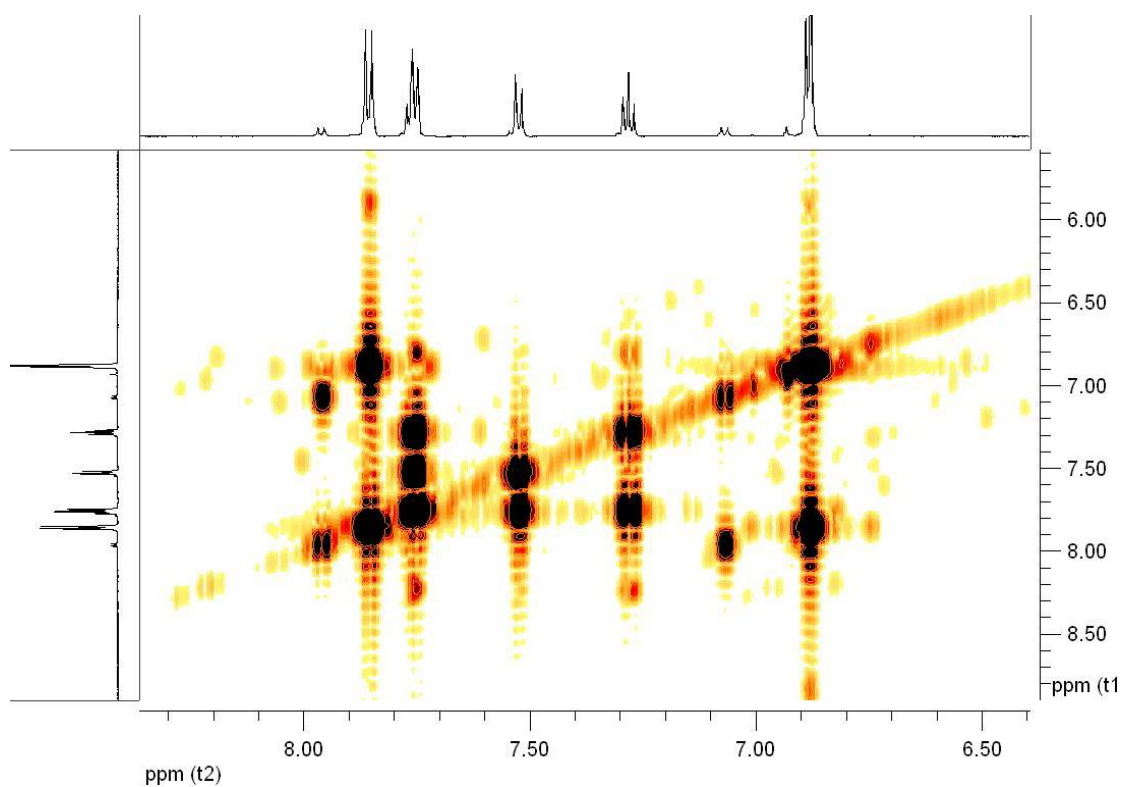
Εικόνα 27: Φάσμα  $^{13}\text{C}$  της ωρόνης 5a



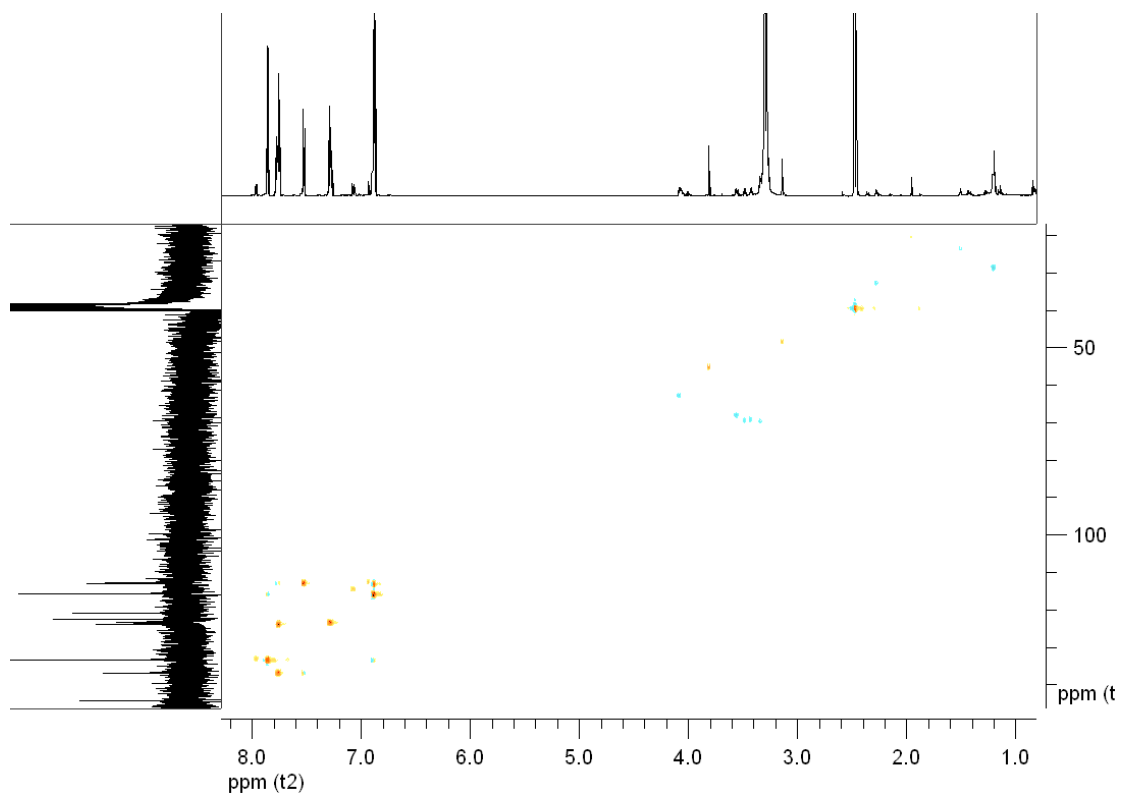
Εικόνα 28: Λεπτομέρεια φάσματος  $^{13}\text{C}$  της ωρόνης 5a



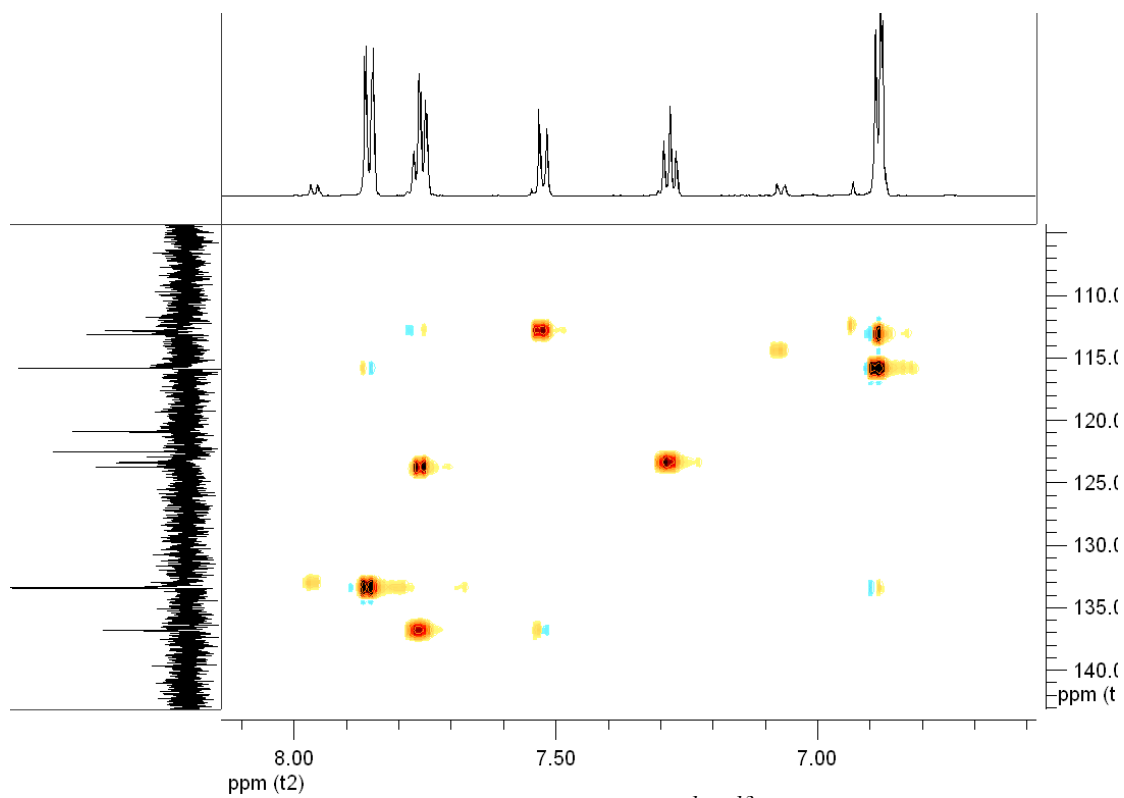
Εικόνα 29: Φάσμα COSY ( $^1\text{H}-^1\text{H}$ ) της ωρόνης **5a**



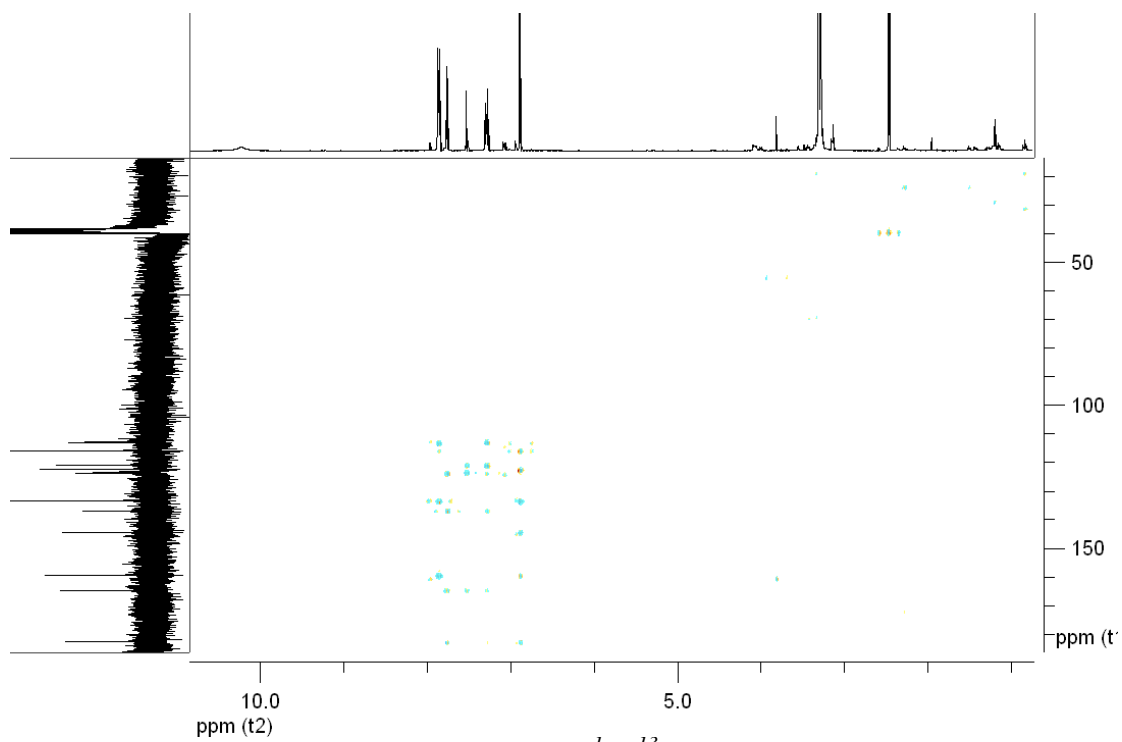
Εικόνα 30: Λεπτομέρεια φάσματος COSY ( $^1\text{H}-^1\text{H}$ ) της ωρόνης **5a**



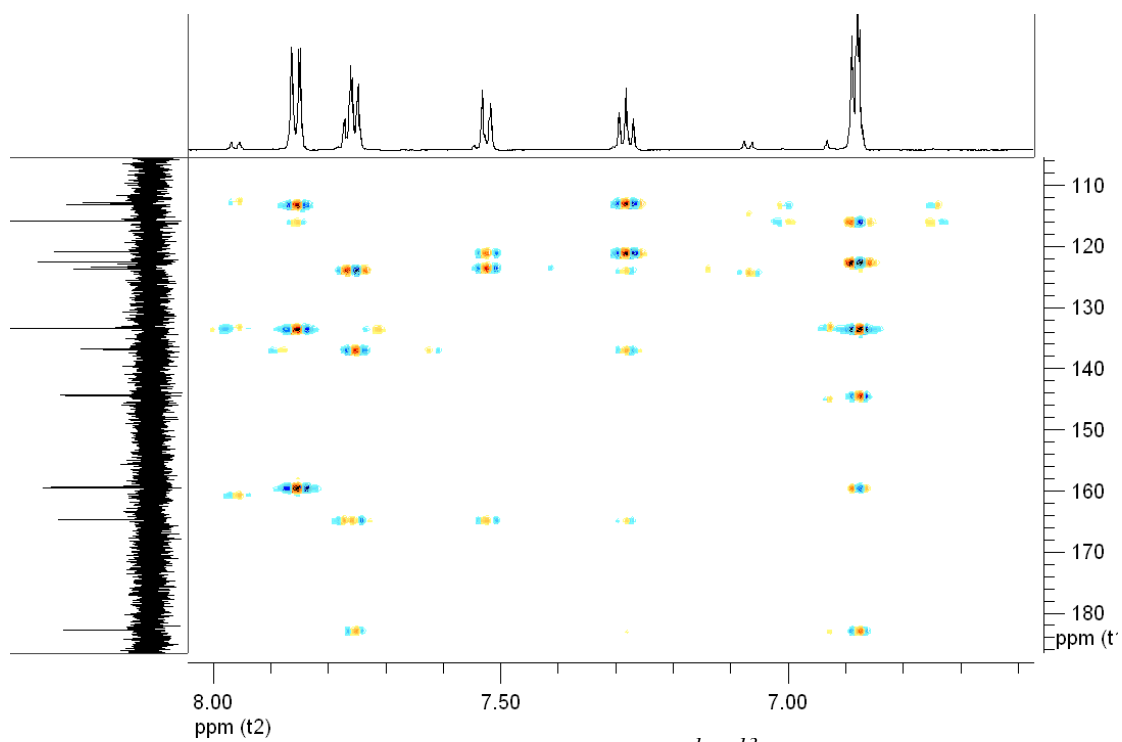
Εικόνα 31: Φάσμα HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) της ωρόνης 5a



Εικόνα 32: Λεπτομέρεια φάσματος HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) της ωρόνης 5a



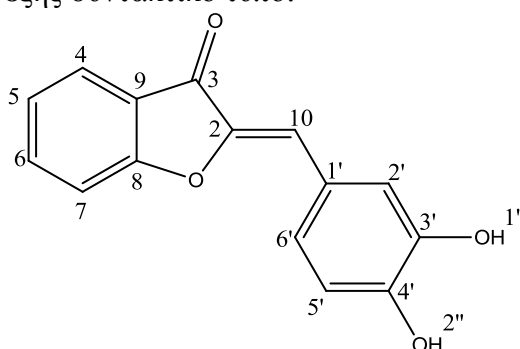
Εικόνα 33: Φάσμα HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) της ωρόνης 5a



Εικόνα 34: Λεπτομέρεια φάσματος HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) της ωρόνης 5a

### 5.3.2. Φασματοσκοπική μελέτη της ωρόνης **5b**

Η ωρόνη **5b** έχει τον εξής συντακτικό τύπο:



Σχήμα 33: Χημικός τύπος της **5b** με αρίθμηση των θέσεων στο μόριο

Σε πειράματα 1-D NMR που διεξήχθησαν παρατηρήθηκαν τα εξής σήματα:

**Πίνακας 11:** Σήματα  $^1\text{H}$  της **5b**

Σήμα $^1\text{H}$	Χημική Μετατόπιση (ppm)	Ολοκλήρωση, Πολλαπλότητα
A	9,760	1H, s
B	9,288	1H, s
Γ	7,757	2H, dd
Δ	7,484	2H, m
E	7,298	2H, m
ΣΤ	6,849	1H, d
Z	6,789	1H, s

(Παραλείπονται σήματα που οφείλονται σε τυχόν ακαθαρσίες ή θόρυβο, στον διαλύτη, ή σε υπολείμματα νερού.)

**Πίνακας 12:** Σήματα  $^{13}\text{C}$  της **5b**

Σήμα $^{13}\text{C}$	Χημική Μετατόπιση (ppm)	Σήμα $^{13}\text{C}$	Χημική Μετατόπιση (ppm)
α	186,12	θ	126,77
β	168,02	ι	126,31
γ	151,68	ια	124,42
δ	148,71	ιβ	121,35
ε	147,74	ιγ	119,17
στ	140,22	ιδ	117,07
ζ	128,24	ιε	116,12
η	127,19		

(Παραλείπονται σήματα που οφείλονται σε τυχόν ακαθαρσίες ή θόρυβο, στον διαλύτη, ή σε υπολείμματα νερού.)

Σε πειράματα 2-D NMR που διεξήχθησαν παρατηρήθηκαν οι εξής συσχετίσεις:

**Πίνακας 13:** Συσχετίσεις σημάτων όπως προέκυψαν από το πείραμα COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) για την **5b**

Το σήμα	Συσχετίζεται με σήμα/σήματα	Το σήμα	Συσχετίζεται με σήμα/σήματα
A	Κανένα	E	Γ, ΣΤ
B	Κανένα	ΣΤ	E
Γ	Δ, E	Z	Κανένα
Δ	Γ		

**Πίνακας 14:** Συσχετίσεις σημάτων όπως προέκυψαν από το πείραμα HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) για την **5b**

Το σήμα	Συσχετίζεται με σήμα/σήματα
A	Κανένα
B	Κανένα
Γ	στ, η
Δ	ιβ, ε
E	ζ, θ
ΣΤ	ιγ
Z	ιδ

**Πίνακας 15:** Συσχετίσεις σημάτων όπως προέκυψαν από το πείραμα HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) για την **5b**

Το σήμα	Συσχετίζεται με σήμα/σήματα	Το σήμα	Συσχετίζεται με σήμα/σήματα
α	Γ, Z	θ	Δ
β	Γ, Δ, E	ι	ΣΤ
γ	A, B, Δ, E, ΣΤ	ια	Δ, E
δ	A, B, Δ, (E), ΣΤ	ιβ	B, E, Z
ε	Z	ιγ	A
στ	Γ, E	ιδ	Δ, E
ζ	Δ, Z	ιε	E
η	Γ, (E)		

(Εντός παρενθέσεων υποδηλώνονται ασθενείς συσχετίσεις)

Βάσει των ανωτέρω δεδομένων προκύπτει η εξής ανάλυση-ταυτοποίηση:

Δεδομένης της χημικής μετατόπισης των σημάτων A και B, αλλά και λόγω του γεγονότος πως στο πείραμα HSQC δεν παρουσιάζουν καμία συσχέτιση με σήματα ανθράκων, προκύπτει πως αυτά ανήκουν στα πρωτόνια των δυο υδροξυλίων (1" και 2"). Στο πείραμα HMBC τα σήματα A και B συσχετίζονται με τις κορυφές γ, δ, ιγ και γ, δ, ιβ αντίστοιχα. Συνεπώς προκύπτει πως οι κορυφές γ και δ αντιστοιχούν στους άνθρακες των θέσεων 3' και 4' και τα ιβ, ιγ σε άνθρακες των θέσεων 2' και 5'. Δεδομένου ότι τα σήματα ιβ και ιγ συσχετίζονται στο HSQC με τα σήματα Δ και ΣΤ, αλλά πως μόνο στην θέση 2' αναμένεται διπλή κορυφή στο φάσμα  $^1\text{H}$  (όπως η ΣΤ) οδηγεί στο συμπέρασμα πως στις θέσεις 1", 2", 5' και 2' αντιστοιχούν τα σήματα B, A, ΣΤ & ιγ και Δ & ιβ αντιστοίχως. Επειδή το A συσχετίζεται ισχυρότερα με το δ παρά με το γ και επειδή το B συσχετίζεται ισχυρότερα με το γ παρά με το δ θεωρείται πως οι κορυφές γ και δ αντιστοιχούν στις θέσεις 3' και 4' αντιστοίχως.

Το σήμα ΣΤ συσχετίζεται στο HMBC με τα σήματα γ, δ και ι. Εφόσον τα γ και δ έχουν ήδη ταυτοποιηθεί, το σήμα ι αναγκαστικά παράγεται από τον C της θέσης 1'. Εφόσον τα σήματα γ και δ συσχετίζονται στο HMBC με τα σήματα A, B, Δ, E και ΣΤ και όλα εκ των προηγηθέντων πλην του E έχουν αντιστοιχηθεί σε θέσεις στον δεύτερο δακτύλιο, προκύπτει πως ένα εκ' των δύο πρωτονίων που παράγουν το σήμα E βρίσκεται στην θέση 6'. Από το HSQC υπάρχουν δύο πιθανά σήματα  $^{13}\text{C}$  που μπορεί να αντιστοιχούν στην ίδια θέση, τα ζ και θ, οι HMBC συσχετίσεις των οποίων (ζ με Δ και Z, θ με Δ) δεν παράγουν κάποιο άμεσο συμπέρασμα. Γίνεται διερεύνηση των HMBC συσχετισμών του σήματος Z, το οποίο συσχετίζεται με τα σήματα ιβ (που είναι γνωστό πως ανήκει στην θέση 2'), ζ, ε και α. Γίνεται η υπόθεση πως το σήμα α ανήκει στην θέση 3 ούτως ώστε να εξηγηθεί η μεγάλη χημική μετατόπιση στο σήμα α μέσω της εγγύτητας στην καρβονυλομάδα που βρίσκεται στην θέση 3. Αν λοιπόν το σήμα α αντιστοιχεί στην θέση 3, τότε το σήμα Z αντιστοιχεί στην θέση 10 (το οποίο



θεωρείται και λογικό, δεδομένου του ότι μέσω του πειράματος COSY προκύπτει απουσία  $^1\text{H}$  συνδεδεμένων στους γειτονικούς C), ομοίως και το σήμα ιδ, ενώ το σήμα ζ (και όχι το θ) αντιστοιχεί στην θέση 6'. Το δε σήμα ε αντιστοιχεί στην θέση 2.

Σχετικά με τον δεύτερο δακτύλιο: Το σήμα α συσχετίζεται μέσω HMBC με τα σήματα Z (το οποίο έχει ταυτοποιηθεί) και Γ. Εφόσον το Γ προκύπτει από το πείραμα HSQC πως συσχετίζεται με τα σήματα  $^1\text{H}$  στ και η, αναγκαστικά ανήκει στην θέση 4 (και όχι λ.χ. στην θέση 9). Θεωρείται πιθανότερο στην θέση 4 να βρίσκεται το σήμα στ παρά το η, ούτως ώστε να εξηγηθεί η μεγαλύτερη χημική μετατόπιση του σήματος στ λόγω της εγγύτητας της θέσης 4 στο π-σύστημα του διπλού δεσμού με το O. Συνεπώς συνεχίζει η ανάλυση με αυτήν την υπόθεση.

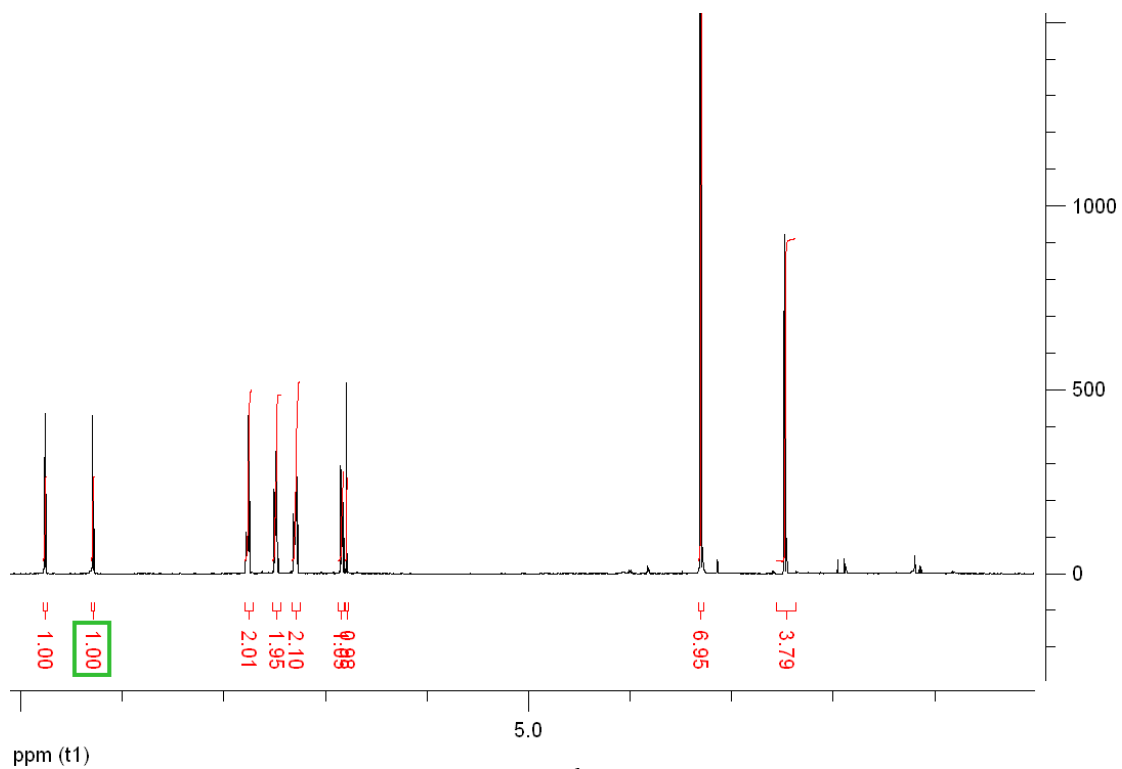
Απομένουν δύο σήματα  $^{13}\text{C}$  που στο πείραμα HSQC δεν σχετίζονται με κορυφές πρωτονίων, τα σήματα β και ια. Θεωρείται πιθανότερο στην θέση 9 να βρίσκεται το σήμα β παρά το ια, ούτως ώστε να εξηγηθεί η μεγαλύτερη χημική μετατόπιση του σήματος β λόγω της εγγύτητας της θέσης 9 στο π-σύστημα του διπλού δεσμού με το O. Συνεπώς συνεχίζει η ανάλυση με αυτήν την υπόθεση. Άρα στην θέση 8 θεωρείται πως αντιστοιχεί το σήμα ια.

Εφόσον από το πείραμα COSY το σήμα Γ συσχετίζεται με δύο σήματα, το Δ και Ε, αναγκαστικά το δεύτερο πρωτόνιο που παράγει το σήμα Γ δεν μπορεί να ευρίσκεται στην θέση 5, αλλά πρέπει να βρίσκεται είτε στην θέση 6 ή στην θέση 7, με τα εναπομείναντα 2 πρωτόνια να ευθύνονται για τα σήματα Δ και Ε. Εφόσον το σήμα ια συσχετίζεται στο πείραμα HMBC με το σήμα Ε ισχυρότερα απ' ότι με το Δ, ενώ το σήμα Ε δεν συσχετίζεται στο COSY με το Δ (οπότε δεν βρίσκονται τα πρωτόνια τους σε γειτονικές θέσεις) οδηγούμαστε στο συμπέρασμα, αν ληφθούν υπ' όψιν και οι συσχετίσεις όπως προκύπτουν από το πείραμα HMBC, πως στις θέσεις 7, 6 και 5 αντιστοιχούν τα σήματα Ε & θ, Γ & η και Δ & ιε αντιστοίχως.

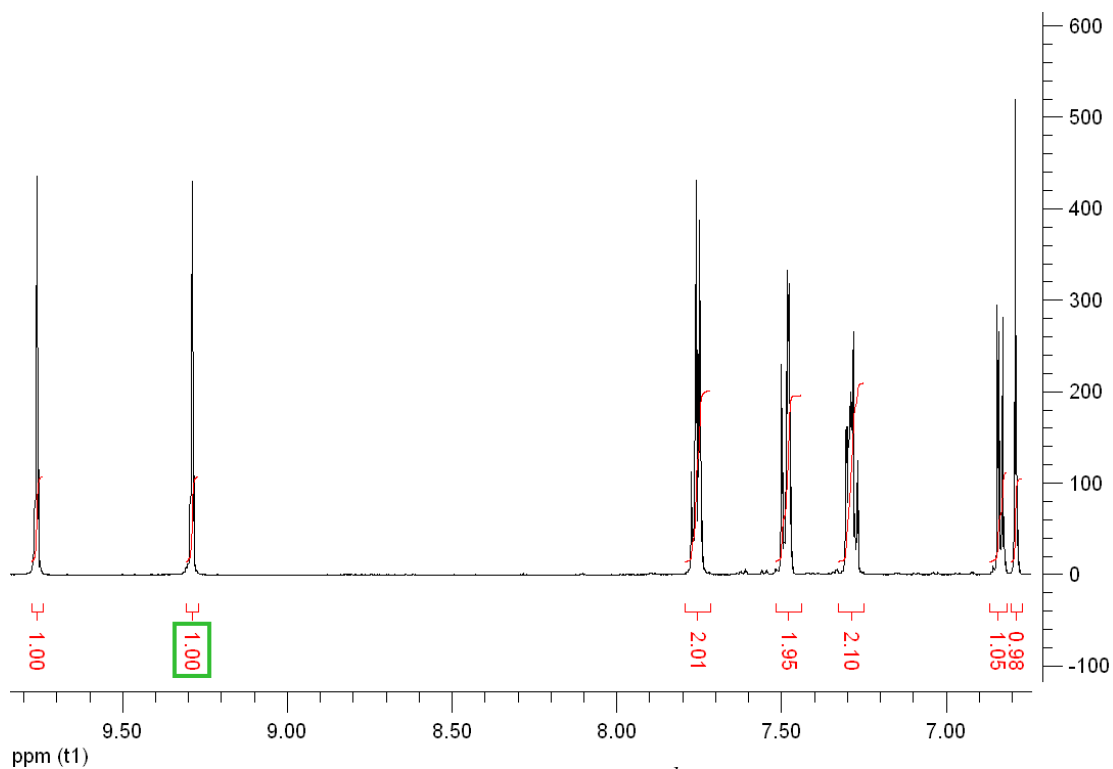
Εφόσον κανένα αποτέλεσμα από τα διεξαχθέντα πειράματα δεν διαψεύδει τα συμπεράσματα της ανάλυσης, ακολουθεί ταυτοποίηση του μορίου ως εξής:

**Πίνακας 17:** Αντιστοιχήσεις σημάτων NMR σε θέσεις στο μόριο της **5b**

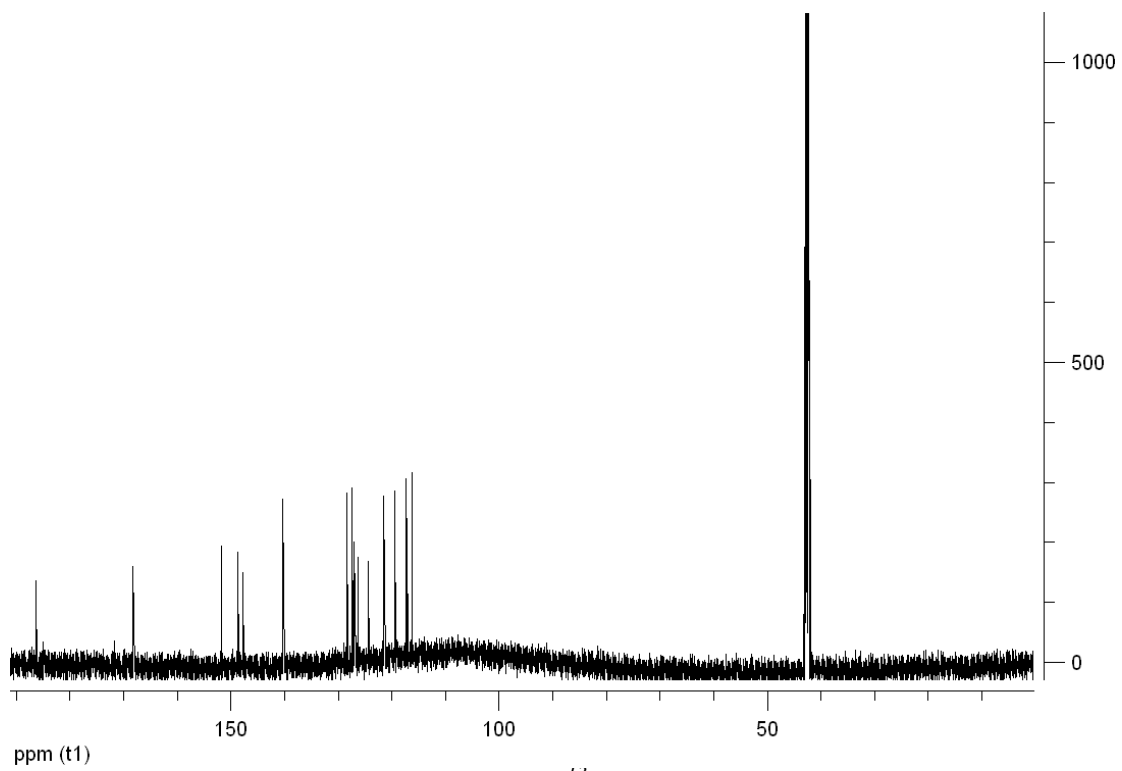
Θέση	Σήμα/σήματα (ppm)
2	ε (147,74)
3	α (186,12)
4	Γ (7,757) & στ (140,22)
5	Δ (7,484) & ιε (116,12)
6	Γ (7,757) & η (127,19)
7	Ε (7,298) & θ (126,77)
8	ια (124,42)
9	β (168,02)
10	Z (6,789) & ιδ (117,07)
1'	ι (126,3)
2'	Δ (7,484) & ιβ (121,3)
3'	γ (151,68)
4'	δ (148,24)
5'	ΣΤ (6,849) & ιγ (119,17)
6'	Ε (7,298) & ζ (128,24)
1''	Β (9,228)
2''	Α (9,760)



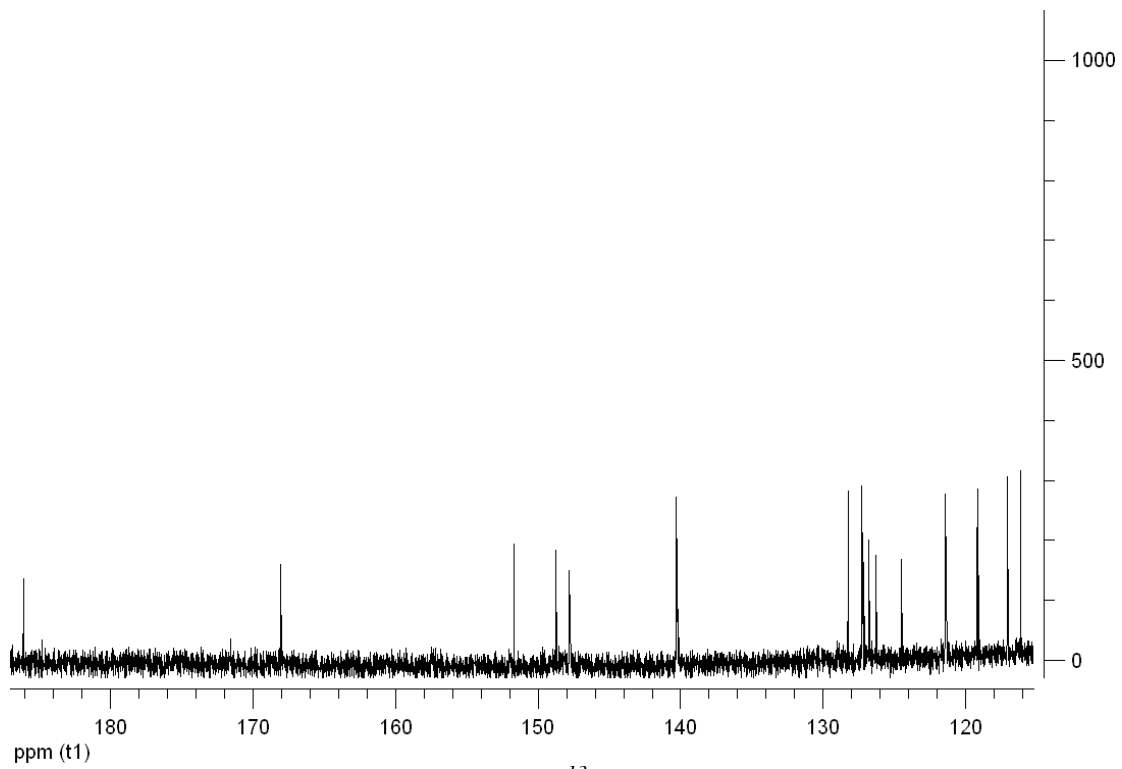
Εικόνα 35: Φάσμα  $^1\text{H}$  της ωρόνης **5b**



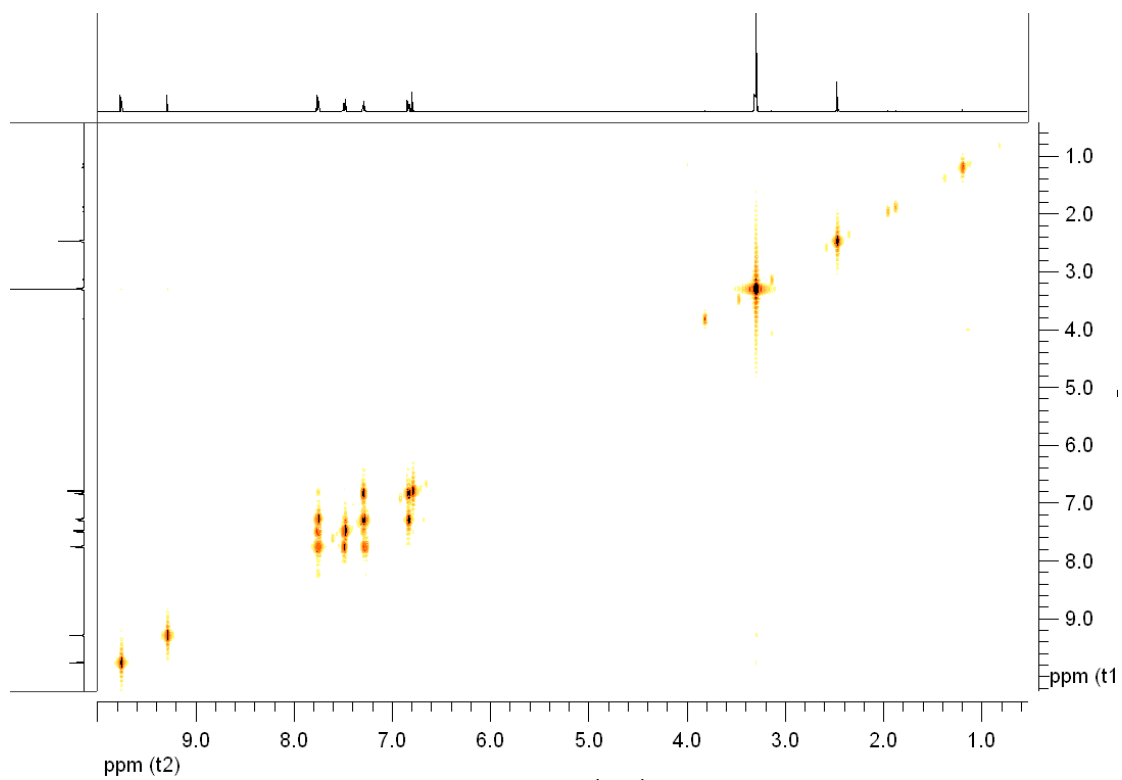
Εικόνα 36: Λεπτομέρεια φάσματος  $^1\text{H}$  της ωρόνης **5b**



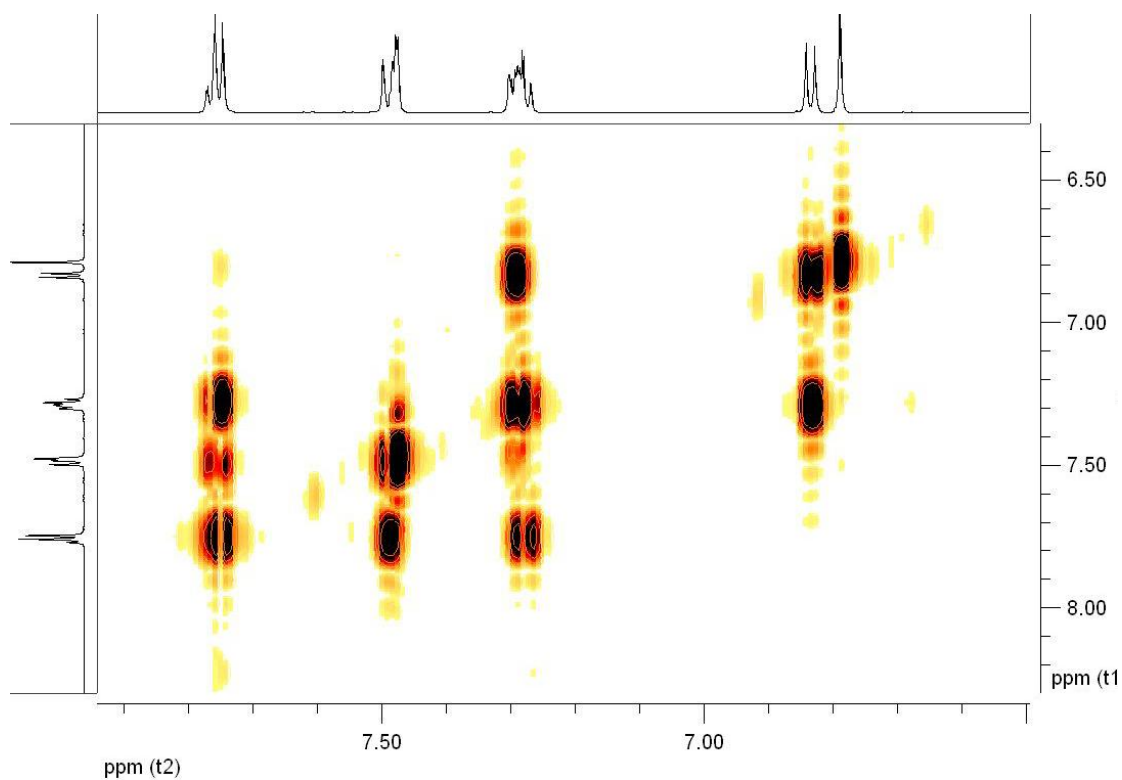
Εικόνα 37: Φάσμα  $^{13}\text{C}$  της ωρόνης **5b**



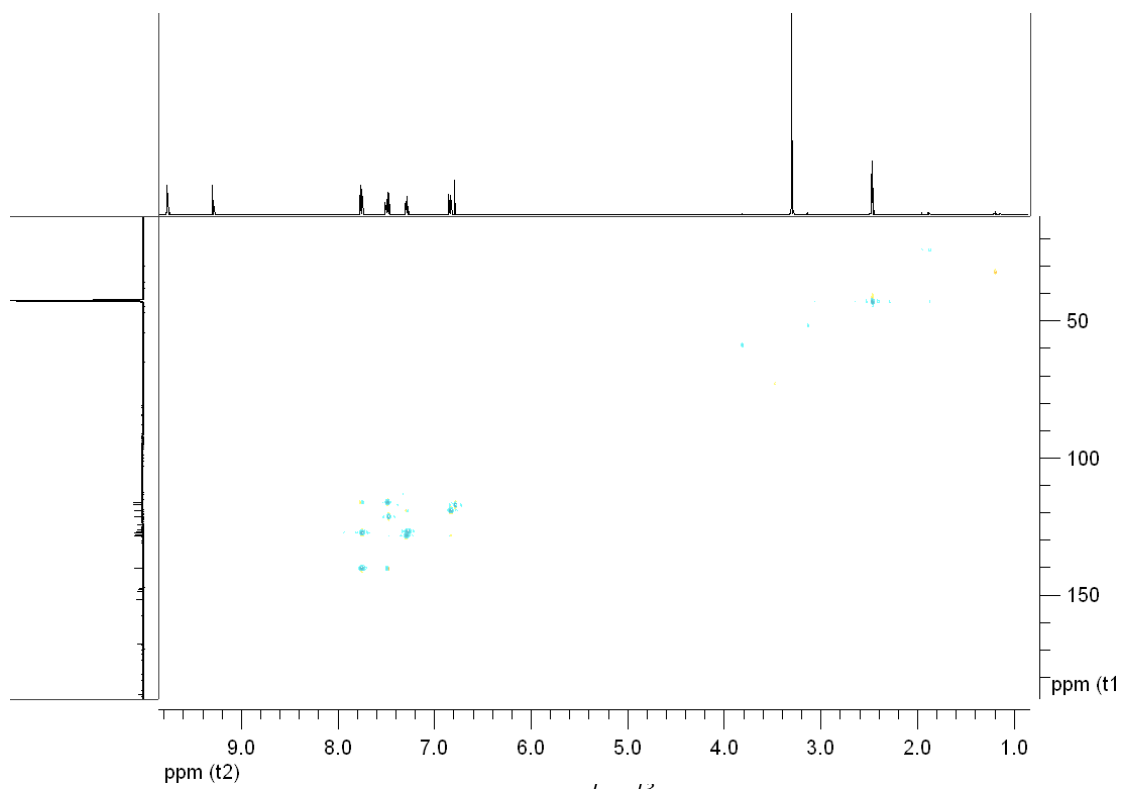
Εικόνα 38: Φάσμα  $^{13}\text{C}$  της ωρόνης **5b**



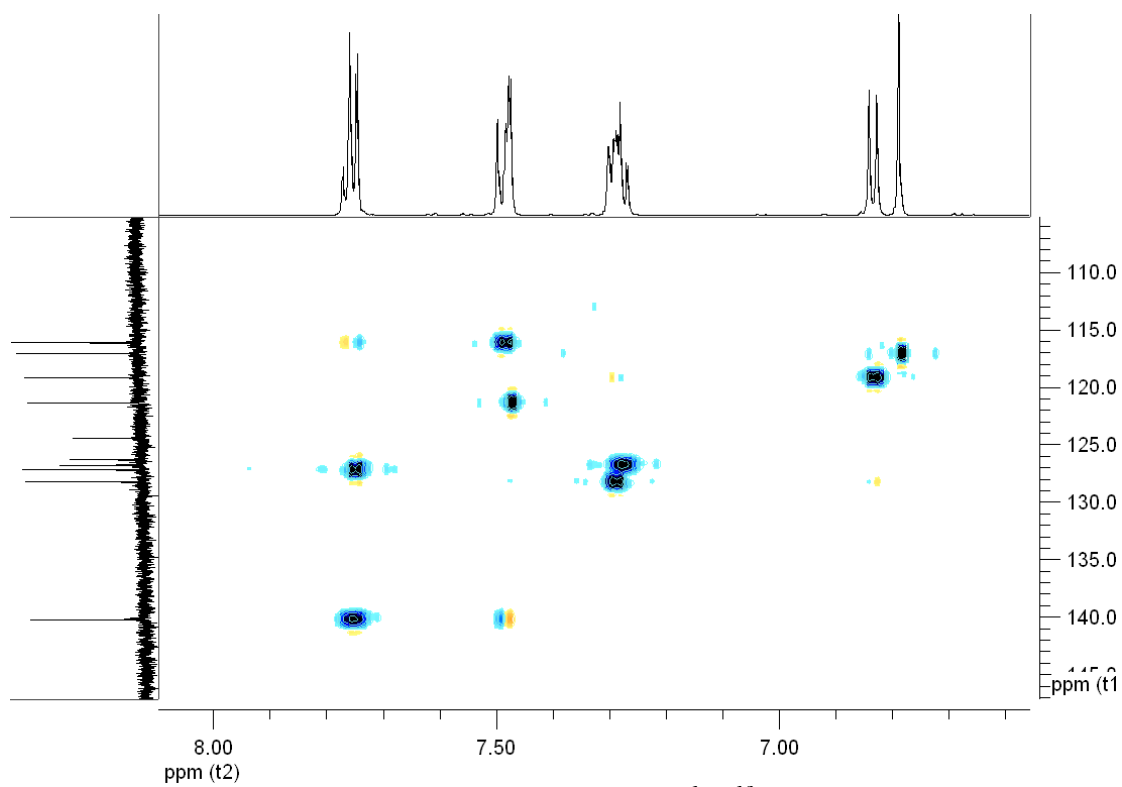
Εικόνα 39: Φάσμα COSY ( $^1\text{H}-^1\text{H}$ ) της ωρόνης **5b**



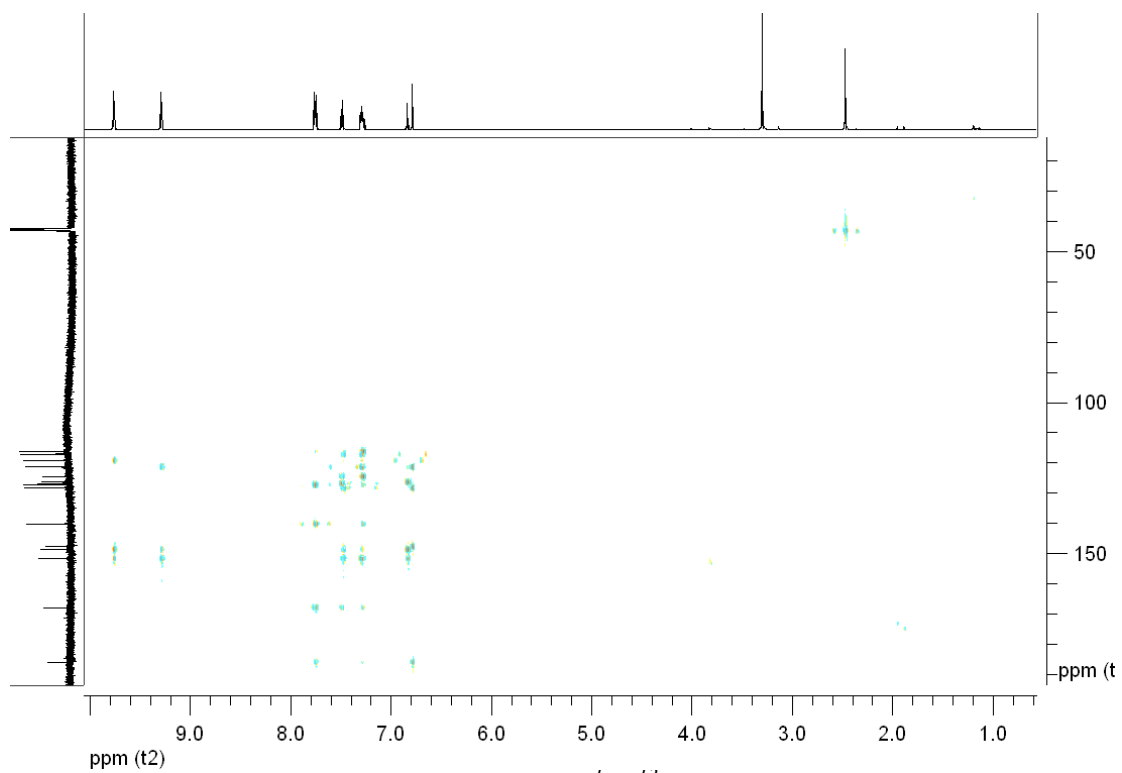
Εικόνα 40: Λεπτομέρεια φάσματος COSY ( $^1\text{H}-^1\text{H}$ ) της ωρόνης **5b**



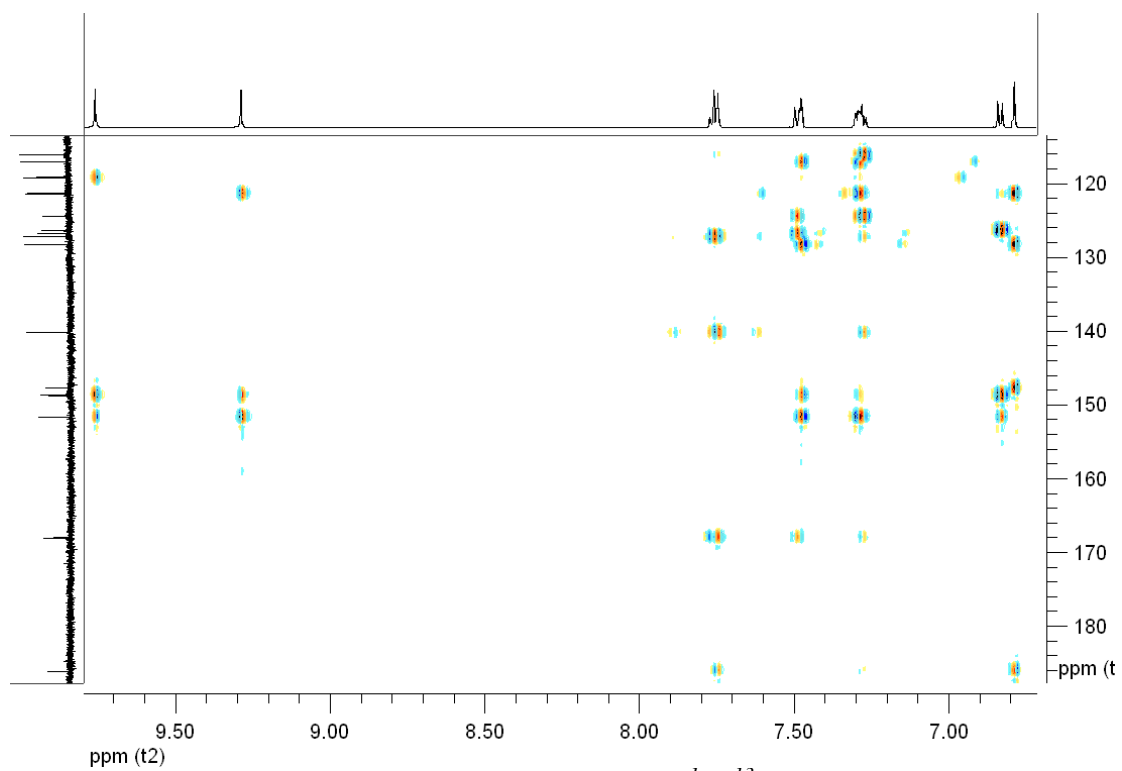
Εικόνα 41: Φάσμα HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) της ωρόνης **5b**



Εικόνα 42: Λεπτομέρεια φάσματος HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) της ωρόνης **5b**



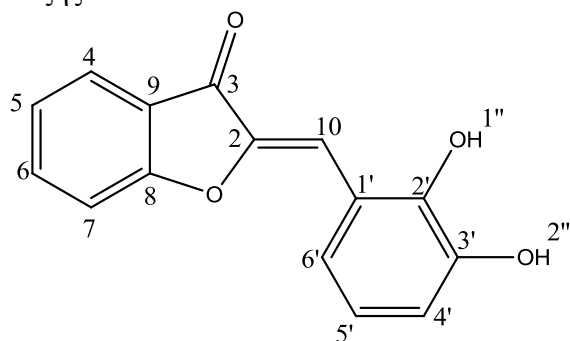
Εικόνα 43: Φάσμα HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) της ωρόνης **5b**



Εικόνα 44: Λεπτομέρεια φάσματος HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) της ωρόνης **5b**

### 5.3.3. Φασματοσκοπική μελέτη της ωρόνης **5c**

Η ωρόνη **5c** έχει τον εξής συντακτικό τύπο:



Σχήμα 34: Χημικός τύπος της **5c** με αρίθμηση των θέσεων στο μόριο

Σε πειράματα 1-D NMR που διεξήχθησαν παρατηρήθηκαν τα εξής σήματα:

**Πίνακας 17:** Σήματα  $^1\text{H}$  της **5c**

Σήμα $^1\text{H}$	Χημική Μετατόπιση (ppm)	Ολοκλήρωση, Πολλαπλότητα
X	9,45	2H, b
A	7,76	2H, m
B	7,62	1H, dd
Γ	7,53	1H, d
Δ	7,29	1H, t
E	7,25	1H, s
ΣΤ	6,86	1H, dd
Z	6,76	1H, t

(Παραλείπονται σήματα που οφείλονται σε τυχόν ακαθαρσίες ή θόρυβο, στον διαλύτη, ή σε υπολείμματα νερού.)

**Πίνακας 18:** Σήματα  $^{13}\text{C}$  της **5c**

Σήμα $^{13}\text{C}$	Χημική Μετατόπιση (ppm)	Σήμα $^{13}\text{C}$	Χημική Μετατόπιση (ppm)
α	186,6	θ	124,5
β	168,3	ι	124,2
γ	149,5	ια	122,6
δ	148,7	ιβ	122,4
ε	148,5	ιγ	120,4
στ	140,5	ιδ	116,5
ζ	127,3	ιε	110,2
η	126,8		

(Παραλείπονται σήματα που οφείλονται σε τυχόν ακαθαρσίες ή θόρυβο, στον διαλύτη, ή σε υπολείμματα νερού.)

Σε πειράματα 2-D NMR που διεξήχθησαν παρατηρήθηκαν οι εξής συσχετίσεις:

**Πίνακας 19:** Συσχετίσεις σημάτων όπως προέκυψαν από το πείραμα COSY ( $^1\text{H}-^1\text{H}$ ) για την **5c**

Το σήμα	Συσχετίζεται με σήμα/σήματα	Το σήμα	Συσχετίζεται με σήμα/σήματα
X	Κανένα	Δ	A
A	Γ, Δ	E	Κανένα
B	Z	ΣΤ	Z
Γ	A	Z	B, ΣΤ

**Πίνακας 20:** Συσχετίσεις σημάτων όπως προέκυψαν από το πείραμα HSQC ( $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ ) για την **5c**

Το σήμα	Συσχετίζεται με σήμα/σήματα	Το σήμα	Συσχετίζεται με σήμα/σήματα
X	Κανένα	Δ	η
A	στ, ζ	E	ιε
B	ι	ΣΤ	ιγ
Γ	ιδ	Z	ιβ

**Πίνακας 21:** Συσχετίσεις σημάτων όπως προέκυψαν από το πείραμα HMBC ( $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ ) για την **5c**

Το σήμα	Συσχετίζεται με σήμα/σήματα	Το σήμα	Συσχετίζεται με σήμα/σήματα
α	A	θ	E, ΣΤ
β	A, Γ, (Δ)	ι**	Γ, Δ
γ*	B, ΣΤ	ια**	Κανένα
δ*	E	ιβ	Z, E
ε*	Z	ιγ	B
στ	A, Δ	ιδ	Δ
ζ	A, (Δ)	ιε	B
η	Γ		

(Εντός παρενθέσεων υποδηλώνονται ασθενείς συσχετίσεις)

\*:Καθώς τα σήματα είναι πολύ κοντινά το σχετικό σφάλμα της μέτρησής των συσχετισμών τους στο φάσμα του HMBC είναι μεγάλο και συνεπώς όσον αφορά αυτά τα 3 σήματα οι συσχετισμοί του πίνακα 17 παρατίθενται με επιφύλαξη.

\*\*::Καθώς τα σήματα είναι πολύ κοντινά το σχετικό σφάλμα της μέτρησής των συσχετισμών τους στο φάσμα του HMBC είναι μεγάλο και συνεπώς όσον αφορά αυτά τα 2 σήματα οι συσχετισμοί του πίνακα 17 παρατίθενται με επιφύλαξη.

Βάσει των ανωτέρω δεδομένων προκύπτει η εξής ανάλυση-ταυτοποίηση:

Εφόσον το σήμα E είναι το μοναδικό σήμα τύπου s, είναι λογικό να αντιστοιχεί στην θέση 10, την μοναδική τέτοια θέση που αναμένεται απλή κορυφή στο φάσμα  $^1\text{H}$ . Από το πείραμα COSY προκύπτει πως τα 3 σήματα B, ΣΤ και Z ανήκουν στην ίδια ομάδα, (υπό την έννοια πως τα πρωτόνια που τα προκαλούν είναι μεταξύ τους γειτονικά), καθώς υπάρχουν συσχετισμοί μεταξύ τους, με το Z να συσχετίζεται και με τα δύο. Άρα ανήκουν στις θέσεις 6', 5' και 4'. Από το πείραμα HMBC είναι γνωστό πως το σήμα B συσχετίζεται με τα σήματα γ, ιγ και ιε. Από το πείραμα HMBC είναι επίσης γνωστό πως το σήμα ΣΤ συσχετίζεται με τα σήματα γ, θ και ιβ. Εφ' όσον όμως το σήμα ιε παράγεται από τον άνθρακα της θέσης 10, είναι πιο πιθανό το σήμα που στο HMBC συσχετίζεται με αυτό να ανήκει σε πρωτόνιο που βρίσκεται εγγύτερα στην θέση 10. Συνεπώς θεωρείται πως στην θέση 6' αντιστοιχούν τα σήματα B & θ, στην θέση 4' αντιστοιχούν τα σήματα ΣΤ & ιγ και στην θέση 5' αντιστοιχούν τα σήματα Z & ιβ. Το σήμα E συσχετίζεται στο HMBC με τα σήματα ι, δ και α. Γίνεται η υπόθεση πως το σήμα α ανήκει στην θέση 3 ούτως ώστε να εξηγηθεί η μεγάλη



χημική μετατόπιση στο σήμα α μέσω της εγγύτητας στην καρβονυλομάδα που βρίσκεται στην θέση 3. Όσον αφορά τις θέσεις 1', 2' και 3' θεωρείται πως παράγουν τα σήματα γ, δ και ε. Παρά τις επιφυλάξεις για τους συσχετισμούς των σημάτων γ, δ και ε στο HMBC, προτείνεται η αντιστοίχιση των σημάτων γ, δ και ε στις θέσεις 1', 2' και 3' αντίστοιχα. Σχετικά με τα δύο πρωτόνια των θέσεων 1" και 2", η ταχεία ανταλλαγή τους με πρωτόνια νερού του διαλύτη δεν επιτρέπει την ταυτοποίηση εκάστου.

Από το πείραμα COSY προκύπτει πως τα 3 σήματα Α, Γ και Δ ανήκουν στην ίδια ομάδα, καθώς υπάρχουν συσχετισμοί μεταξύ τους, με το Α να συσχετίζεται και με τα δύο. Άρα ανήκουν στις θέσεις 4, 5, 6 και 7. Δεδομένης της μεγάλης χημικής μετατόπισης του σήματος Α είναι πιο πιθανό ένα εκ' των πρωτονίων που το προκαλούν αυτό να αντιστοιχεί στην θέση 4, ούτως ώστε να εξηγείται η μεγάλη χημική μετατόπιση από την εγγύτητα στην καρβονυλομάδα του πενταμελούς δακτυλίου. Συνεπώς, το πρωτόνιο της θέσης 7 παράγει το σήμα Γ, το οποίο είναι δ, όπως αναμενόταν, ενώ από τον συσχετισμό Γ και Α από το COSY πείραμα προκύπτει πως το δεύτερο από τα δύο πρωτόνια που παράγουν το σήμα Α ανήκει στην θέση 6. Τέλος, η κορυφή Δ αντιστοιχεί στην θέση 5, καθώς είναι τριπλή, όπως αναμενόταν για την θέση εκείνη, αλλά και συσχετίζεται στο COSY μόνο με το Α, το οποίο επαληθεύεται βάσει της προηγούμενης ανάλυσης που τοποθέτησε στις θέσεις 4 και 6 τα πρωτόνια που παράγουν το σήμα Α. Τα δεδομένα που παράγει το πείραμα HMBC δεν διαψεύδουν την ανωτέρω ανάλυση. Συνεπώς, στις θέσεις 4, 5, 6 και 7 αντιστοιχίζονται τα σήματα στ, η, ζ και ιδ αντίστοιχα (θεωρείται πιθανότερο στην θέση 4 να βρίσκεται το σήμα στ παρά το ζ, ούτως ώστε να εξηγηθεί η μεγαλύτερη χημική μετατόπιση του σήματος στ λόγω της εγγύτητας της θέσης 4 στο π-σύστημα του διπλού δεσμού με το Ο). Σχετικά με τον πενταμελή δακτύλιο, λαμβάνοντας υπ' όψιν πως οι χημικές μετατοπίσεις των σημάτων <sup>13</sup>C που ακόμα δεν έχουν ανατεθεί σε κορυφές καθώς και το σκεπτικό της προηγούμενης ανάλυσης (βλ. ανάλυση για ωρόνη **5b**) θεωρείται πως οι άνθρακες των θέσεων 9, 8 και 2 παράγουν τα σήματα β, ι και ια αντίστοιχως.

Εάν εξαιρεθεί το παράδοξο φαινόμενο συσχετισμού του σήματος Ζ με το σήμα ιβ σε αμφοτέρωτα τα πειράματα HSQC και HMBC, εφ' όσον κανένα από τα υπόλοιπα αποτελέσματα από τα διεξαχθέντα πειράματα δεν διαψεύδει τα συμπεράσματα της ανάλυσης, ακολουθεί ταυτοποίηση του μορίου ως εξής:

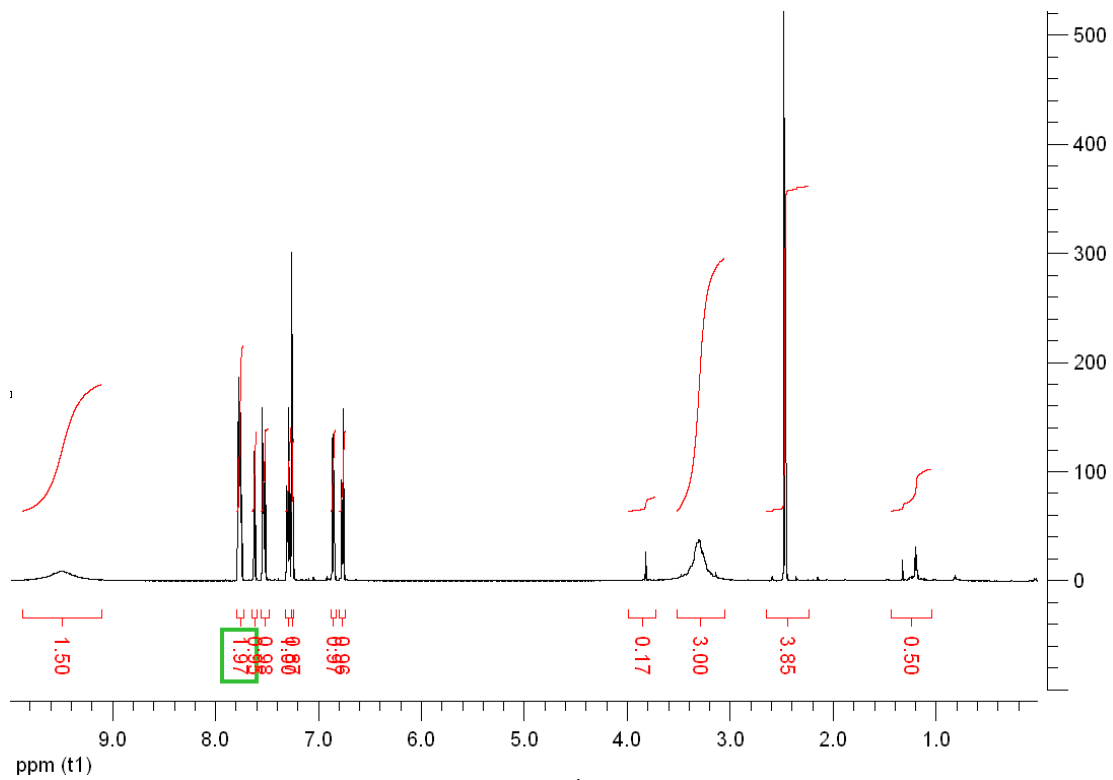
**Πίνακας 22:** Αντιστοιχίσεις σημάτων NMR σε θέσεις στο μόριο της **5c**

Θέση	Σήμα/σήματα (ppm)	Θέση	Σήμα/σήματα (ppm)
2	ια (122,6) <sup>(1)</sup>	1'	γ (149,5) <sup>(2)</sup>
3	α (186,6)	2'	δ (148,7) <sup>(2)</sup>
4	Α (7,76) & στ (140,5)	3'	ε (148,5) <sup>(2)</sup>
5	Δ (7,29) & η (126,8)	4'	ΣΤ (6,86) & ιγ (120,4)
6	Α (7,76) & ζ (127,3)	5'	Ζ (6,76) & ιβ (122,4)
7	Γ (7,53) & ιδ (116,5)	6'	Β (7,62) & θ (124,5)
8	ι (124,2) <sup>(1)</sup>	1"	Χ (9,45) <sup>(3)</sup>
9	β (168,3)	2"	Χ (9,45) <sup>(3)</sup>
10	Ε (7,25) & ιε (110,2)		

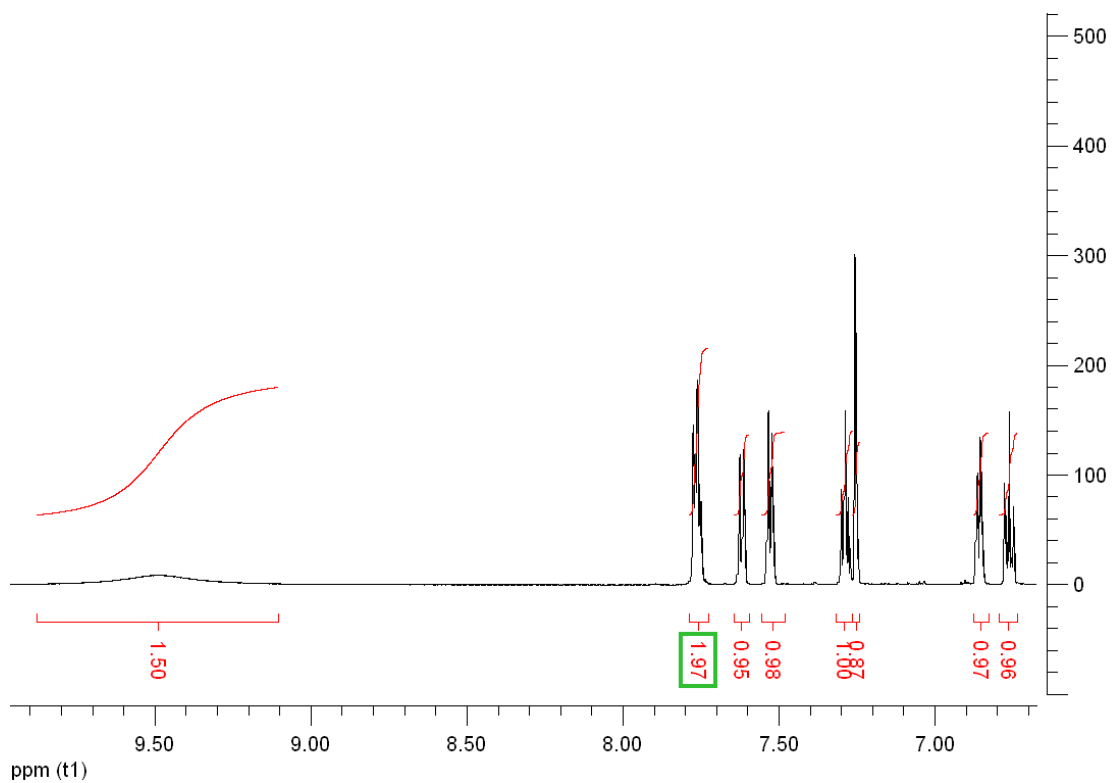
<sup>(1)</sup>:Με επιφύλαξη, επειδή οι κορυφές ι, ια είναι πολύ κοντινές μεταξύ τους η ανάλυση μπορεί να σφάλει.

<sup>(2)</sup>:Με επιφύλαξη, επειδή οι κορυφές γ, δ, ε είναι πολύ κοντινές μεταξύ τους η ανάλυση μπορεί να σφάλει.

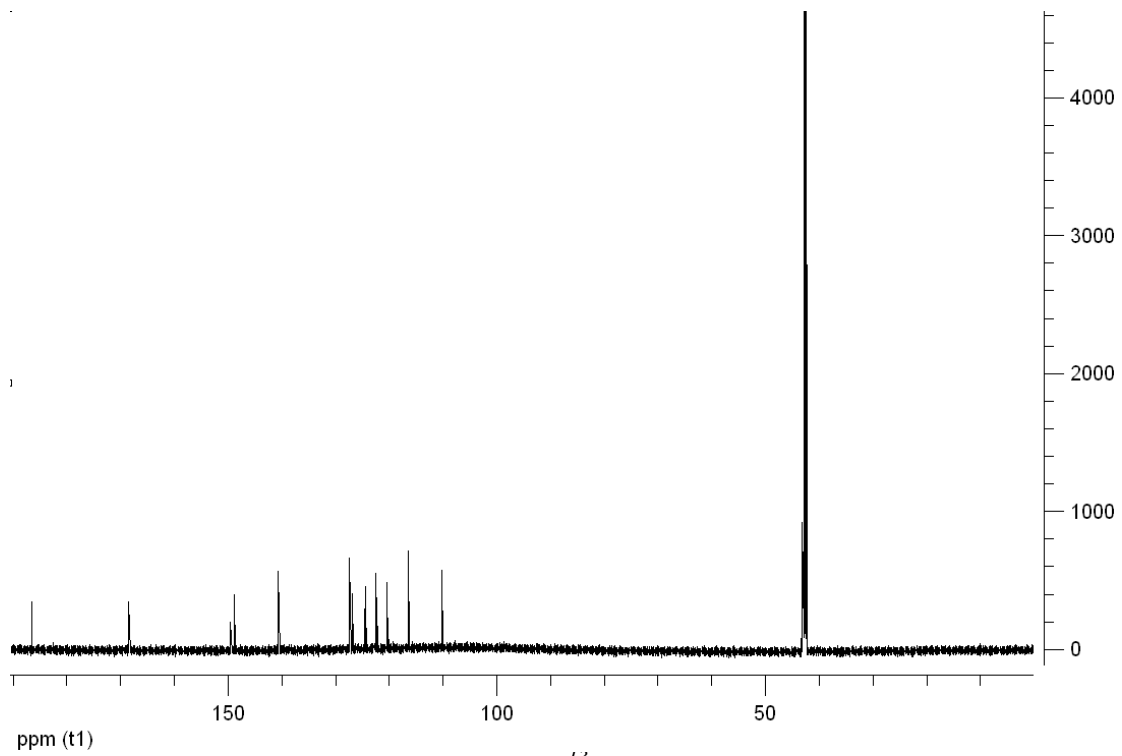
<sup>(3)</sup>:Δεδομένων των πειραματικών συνθηκών/σφαλμάτων δεν είναι δυνατός περεταίρω διαχωρισμός κορυφών.



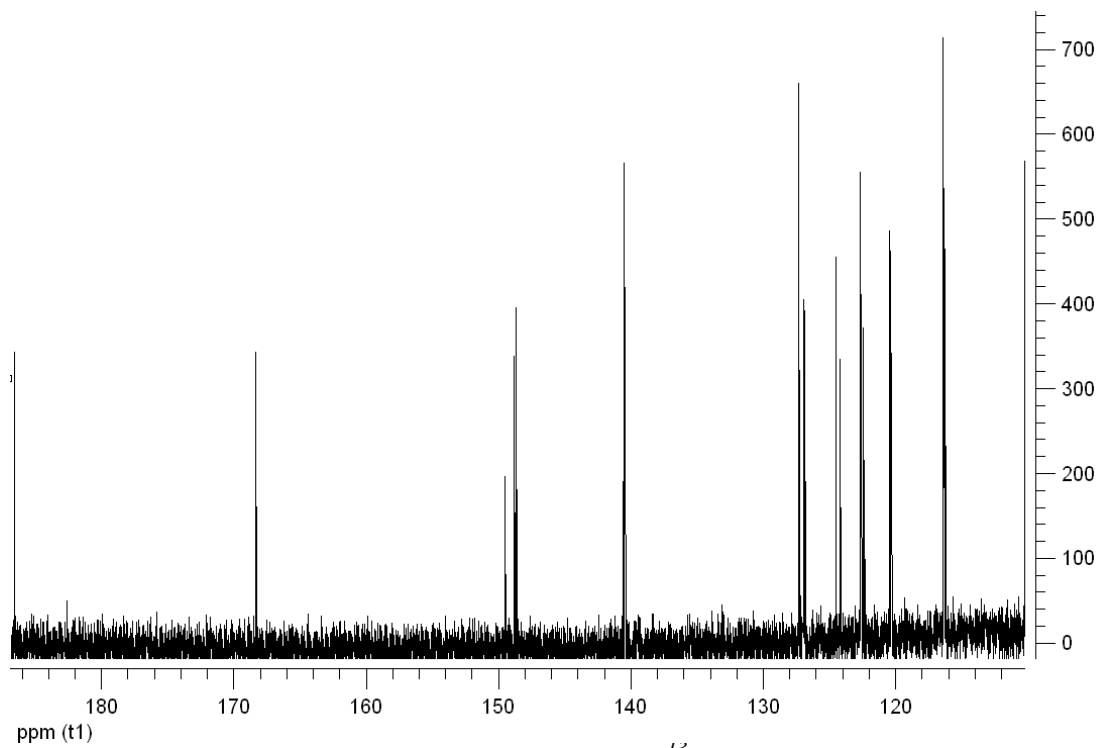
Εικόνα 45: Φάσμα  $^1\text{H}$  της ωρόνης 5c



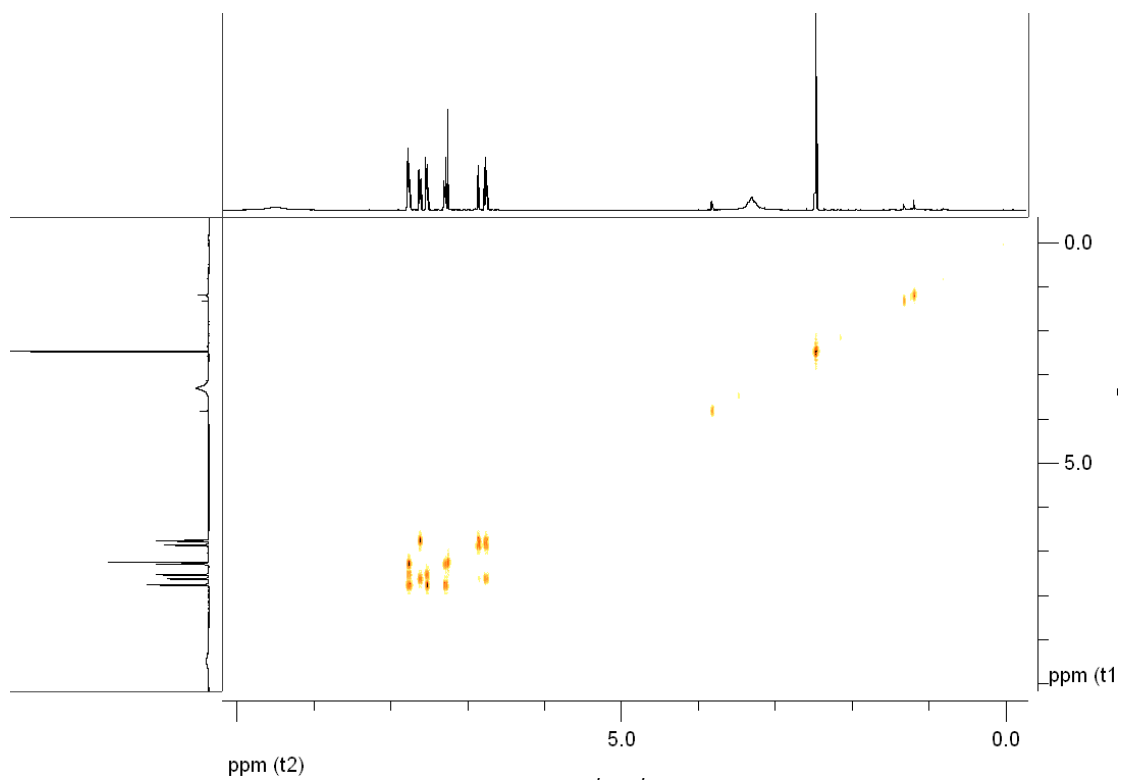
Εικόνα 46: Λεπτομέρεια φάσματος  $^1\text{H}$  της ωρόνης 5c



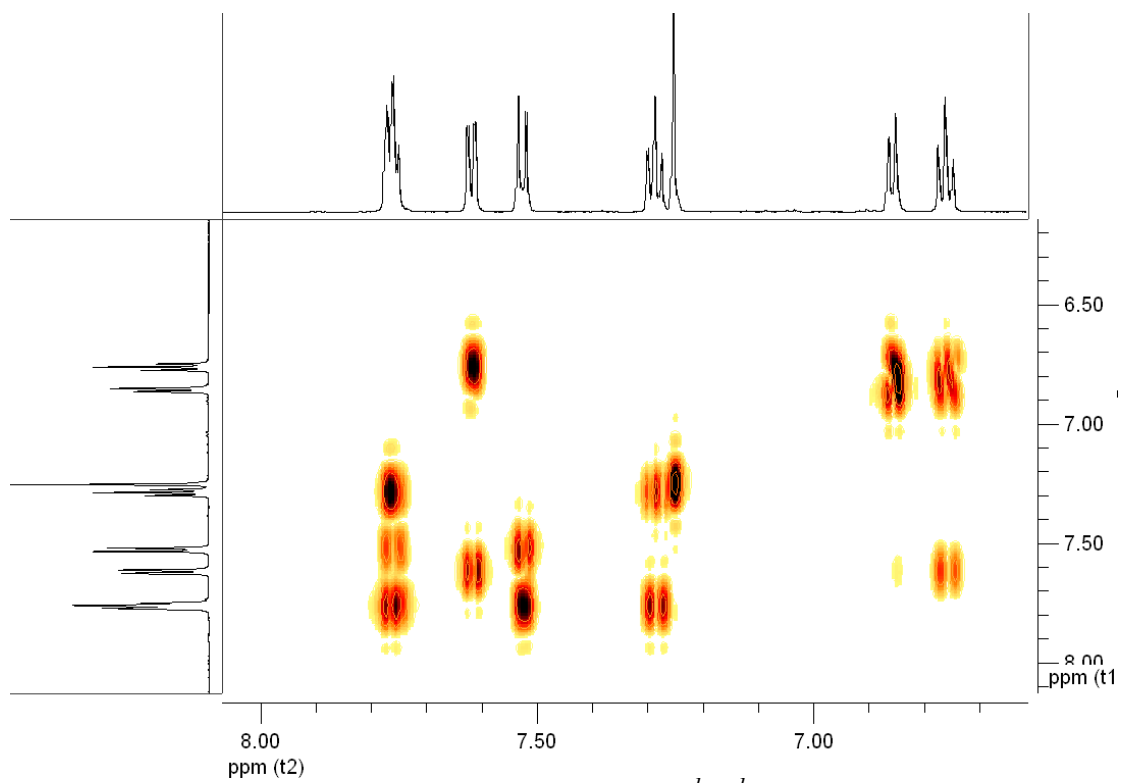
Εικόνα 47: Φάσμα  $^{13}\text{C}$  της ωρόνης 5c



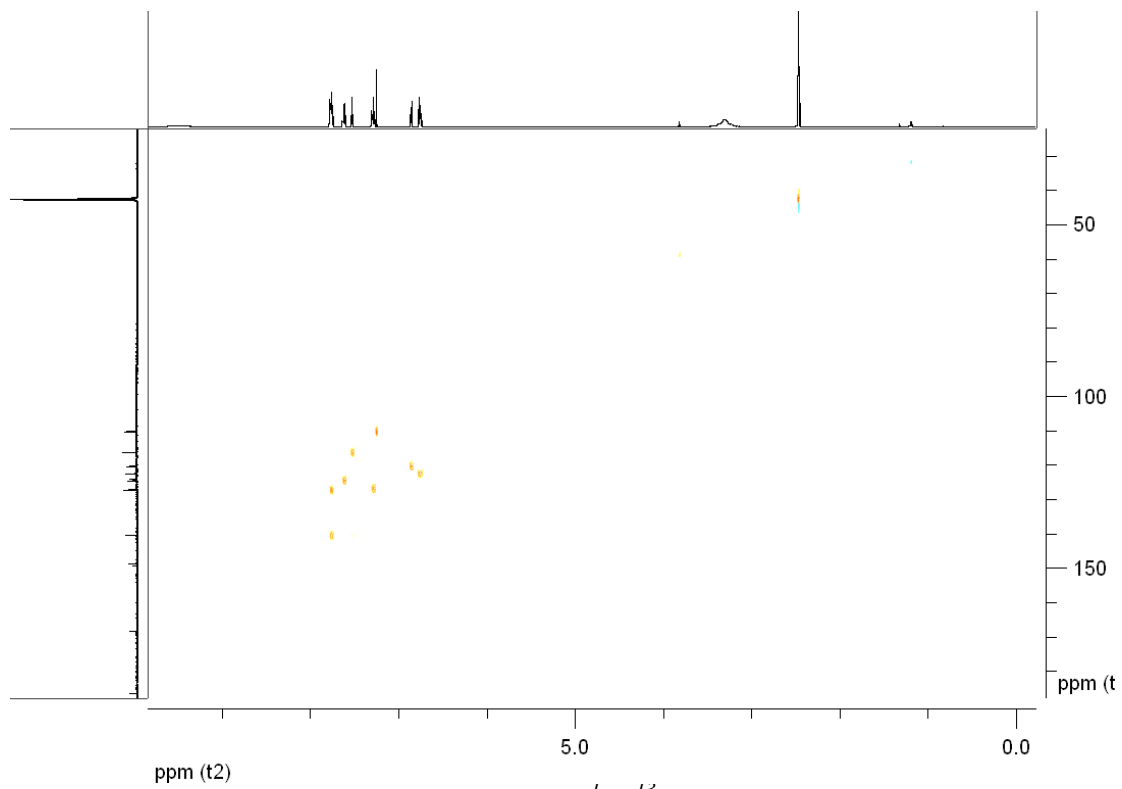
Εικόνα 48: Λεπτομέρεια φάσματος  $^{13}\text{C}$  της ωρόνης 5c



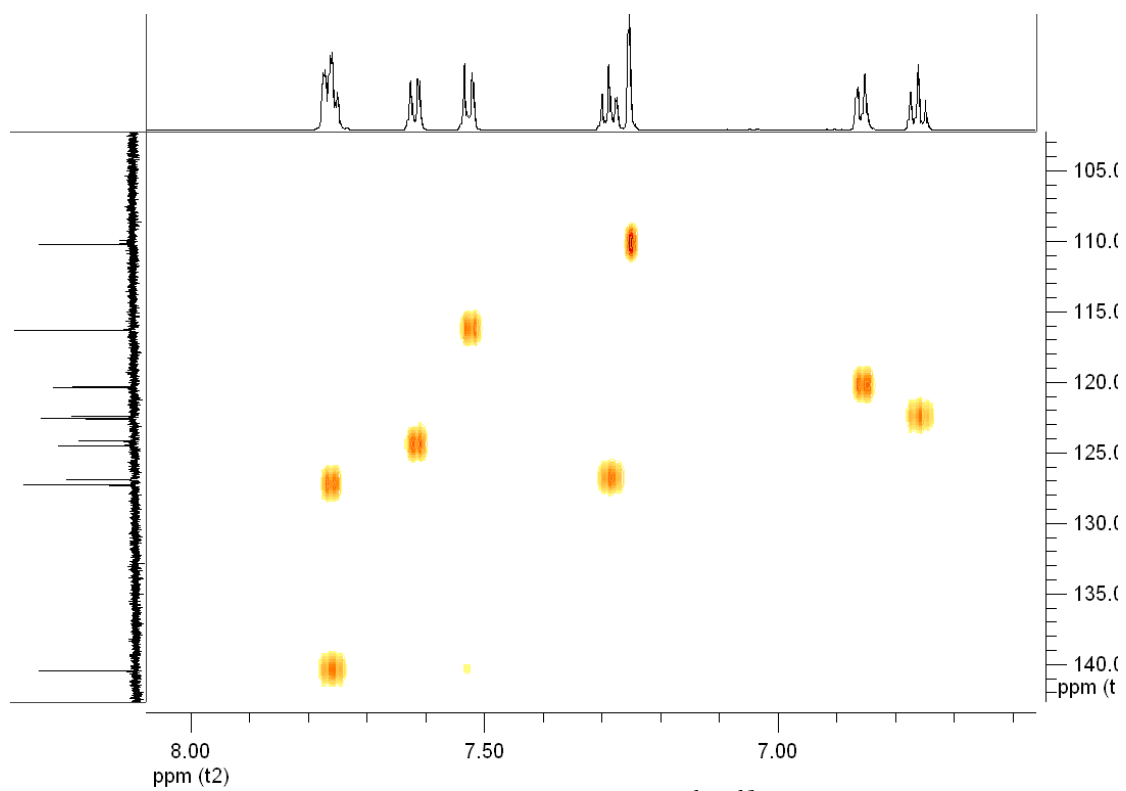
Εικόνα 49: Φάσμα COSY ( $^1\text{H}-^1\text{H}$ ) της ωρόνης 5c



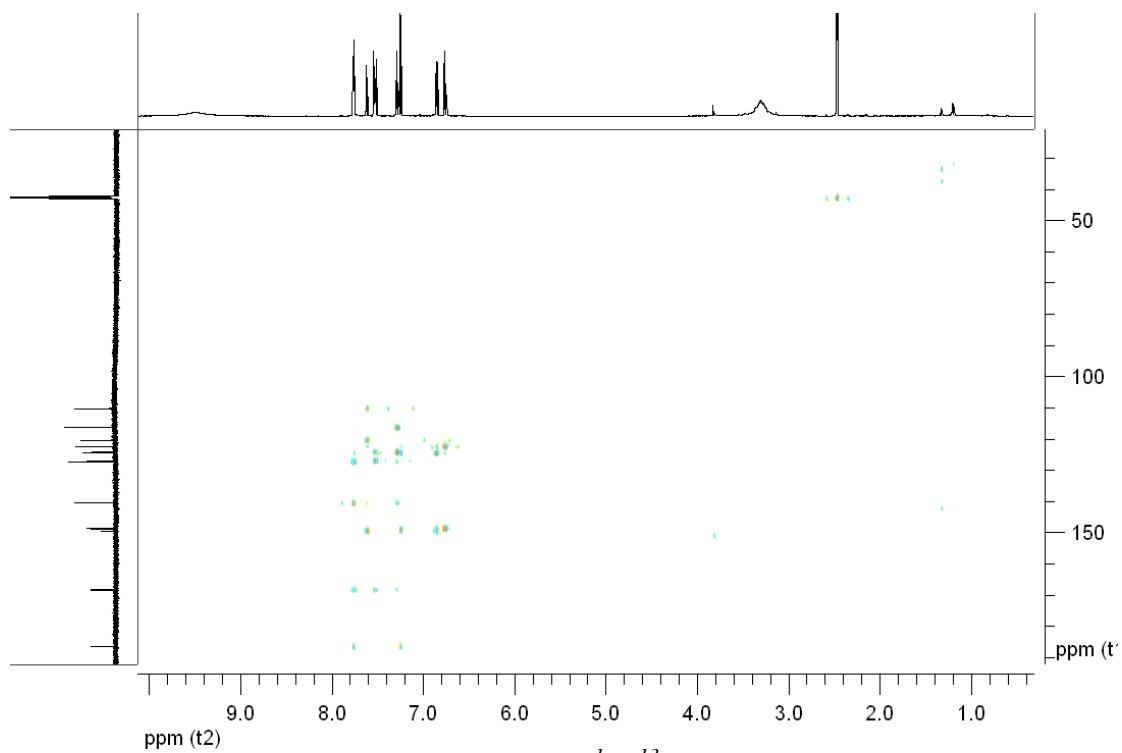
Εικόνα 50: Λεπτομέρεια φάσματος COSY ( $^1\text{H}-^1\text{H}$ ) της ωρόνης 5c



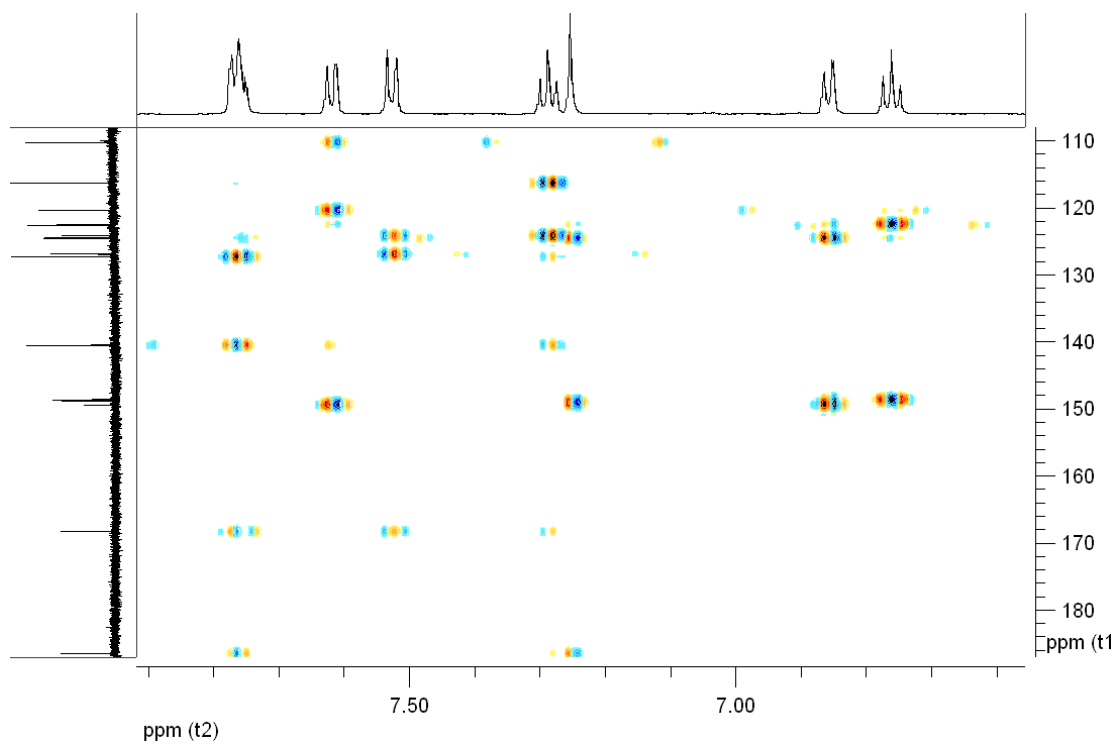
Εικόνα 51: Φάσμα HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) της ωρόνης 5c



Εικόνα 52: Λεπτομέρεια φάσματος HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) της ωρόνης 5c



Εικόνα 53: Φάσμα HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) της ωρόνης 5c



Εικόνα 54: Λεπτομέρεια φάσματος HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) της ωρόνης 5c

## **6. *In silico* μελέτη ικανότητας πρόσδεσης νέων χαλκονών και ωρονών και νέες προτάσεις για βελτίωση**

### **6.1. Εισαγωγή**

#### **6.1.1. Γενικά**

Μετά την σύνθεση της πλειονότητας νέων μορίων και την ταυτοποίηση της δομής τους, οι νεοσυντιθείσες ενώσεις (που στο εξής θα αναφέρονται και ως Φαρμακευτικά Μόρια, ΦΜ) υποβλήθηκαν σε μια νέα σειρά *in silico* μελετών πρόσδεσης στην τυροσινάση. Εξετάστηκε και πάλι η ικανότητα πρόσδεσης σειρών φαρμακευτικών μορίων στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης. Για να διερευνηθεί η ικανότητα πρόσδεσης έγιναν προσομοιώσεις πρόσδεσης των ΦΜ σε τρεις κρυσταλλωμένες δομές του ενζύμου της τυροσινάσης. Ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να βρεθούν ποιά από τα ΦΜ προσδέονται καλύτερα στα ενεργό κέντρο της τυροσινάσης, με το σκεπτικό πως τα ΦΜ που παρουσιάζουν μεγάλη ικανότητα πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης θα δράσουν και ως παρεμποδιστές της δράσης της. Οι απώτεροι σκοποί αυτών των μελετών ήταν κατ' αρχάς η διαλογή από την λίστα των ενώσεων που παρουσίαζαν καλή ικανότητα πρόσδεσης ούτως ώστε να προσδιοριστούν οι καλύτερες υποψήφιες ενώσεις για υποβολή σε περαιτέρω *in vitro* μελέτες, αλλά και κατά δεύτερον, ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη νέων προτεινόμενων προς σύνθεση μορίων, βασιζόμενοι στην βελτίωση ή παραλλαγή της δομής των ενώσεων που θα παρουσίαζαν τα καλύτερα αποτελέσματα πρόσδεσης.

#### **6.1.2. Παράμετροι διεξαγωγής μελετών**

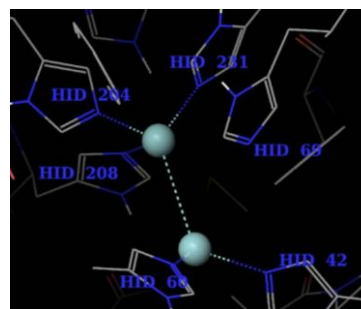
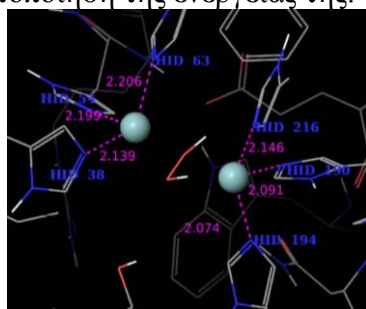
Οι μελέτες πρόσδεσης έγιναν με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε αναλυτικά στο κεφάλαιο 2, μέσω χρήσης των προγραμμάτων LigPrep 2.6 και Glide 5.8 της οικογένειας προγραμμάτων Maestro 9.3 - Schrödinger Suite 2012. Οι ενώσεις που εξετάστηκαν αρχικά προετοιμάστηκαν για πρόσδεση κοντά στο pH βέλτιστης δράσης της τυροσινάσης (pH=6.5) στο πεδίο δυνάμεων OLPS 2005. Κατά την διαδικασία προετοιμασίας τους παρήχθησαν και ισομερείς δομές. Κατόπιν εφαρμόστηκαν οι τεχνικές πρόσδεσης: i) απλής ακρίβειας (standard precision-SP), ii) διπλής ακρίβειας (extra precision-XP), iii) κβαντικά-πολωμένης πρόσδεσης (quantum-polarized ligand docking-QLPD), iv) επαγόμενης πρόσδεσης (induced-fit docking-IFD). Οι τρεις πρώτες τεχνικές πρόσδεσης που χρησιμοποιήθηκαν θεωρούν του υποδοχέα άκαμπτο, ενώ η τέταρτη ακολουθεί το μοντέλο της επαγόμενης πρόσδεσης, κατά την οποία οι ομάδες-αμινοξέα που ευρίσκονται περί το ενεργό κέντρο επιδεικνύουν μερική ευκαμψία κατά την πρόσδεση του φαρμακευτικού μορίου. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι τεχνικές ανώτερης ακρίβειας, λόγω του μεγαλύτερου υπολογιστικού τους κόστους, συνήθως χρησιμοποιούνταν σε ενώσεις που έδιναν καλές πόζες πρόσδεσης με χρήση τεχνικών κατώτερης ακρίβειας (λ.χ. συνήθως γίνονταν IFD προσομοιώσεις μόνο σε ενώσεις που έδιναν καλά αποτελέσματα σε XP ή QPLD προσομοιώσεις) [46,47,48,49,54].

#### **6.1.3. Οι πρωτεΐνες-υποδοχείς**

Ως πιθανοί υποδοχείς για την πρόσδεση χρησιμοποιούνται τρεις πρωτεΐνες τυροσινάσης, οι οποίες προετοιμάστηκαν κατάλληλα για την χρήση τους στις *in silico* μελέτες. Το σκεπτικό πίσω από την χρήση τριών διαφορετικών πρωτεϊνών

τυροσινάσης είναι πως αν κάποια φαρμακευτικά μόρια προσδένονται σε όλες, ή τουλάχιστον σε δύο από αυτές, αυξάνονται οι πιθανότητες να μπορούν να προσδεθούν και στην ανθρώπινη τυροσινάση, η οποία θα έχει παρόμοια δομή με τις εξεταζόμενες, αλλά δεν είναι διαθέσιμη για υποβολή σε *in silico* μελέτες πρόσδεσης, καθώς δεν έχει κρυσταλλωθεί στο εργαστήριο. Η προετοιμασία όλων των ανωτέρω πρωτεϊνών έγινε μέσω του Protein Preparation Wizard του Maestro 9.3 [55]. Η ταυτότητα των πρωτεϊνών καθώς και η επεξεργασία που υπέστησαν για την χρήση τους ως υποδοχείς στις προσομοιώσεις πρόσδεσης των φαρμακευτικών μορίων παρατίθενται ακολούθως:

1. Τυροσινάση (oxy-form) από τον *Streptomyces castaneoglobisporus* σε σύμπλοκο με μια συνοδευτική πρωτεΐνη (caddie protein-ρυθμίζει την είσοδο ΦΜ στο ενεργό κέντρο), κρυσταλλωμένη μέσω XRD με ανάλυση 1,8Å (PDB ID: 1WX2) [56]. Για την προετοιμασία της πρωτεΐνης για χρήση στις *in silico* μελέτες, ξεκινώντας από την αρχική μορφή της πρωτεΐνης (όπως αυτή παρέχεται από την RCSB Protein Data Bank), γίνεται προσθήκη υδρογόνων, διόρθωση της δομής και ελαχιστοποίηση της ενέργειάς της, αφαιρείται η caddie protein, καθώς και όλα τα μόρια νερού.
2. Τυροσινάση από τον *Bacillus megaterium*, κρυσταλλωμένη μέσω XRD με ανάλυση 2Å (PDB ID: 3NM8). Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη πρόκειται για διμερές τυροσινάσης και έχει συγκρυσταλλωθεί με ιόντα Zn και Cl [57]. Για την προετοιμασία της πρωτεΐνης για χρήση στις *in silico* μελέτες, ξεκινώντας από την αρχική μορφή της πρωτεΐνης (όπως αυτή παρέχεται από την RCSB Protein Data Bank), γίνεται αφαίρεση του ενός εκ των δύο μονομερών, διόρθωση της δομής και ελαχιστοποίηση της ενέργειάς της, αφαίρεση όλων των μορίων νερού που απέχουν πάνω από 5Å και επιλεκτική αφαίρεση ορισμένων εκ των μορίων νερού που ευρίσκονται κοντά στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης, στην περιοχή των δύο ιόντων χαλκού. Επίσης αφαιρείται ένα νερό κοντά στο ενεργό κέντρο καθώς ένα ιόν Zn κοντά στο ενεργό κέντρο (το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την κρυστάλλωση της πρωτεΐνης), καθώς είναι πιθανόν τα εξεταζόμενα μόρια να προσεγγίσουν το συγκρυσταλλωμένο ιόν Zn αντί για τα ιόντα Cu στο ενεργό κέντρο.
3. Τυροσινάση, από το μανιτάρι *Agaricus bisporus*, κρυσταλλωμένη μέσω XRD με ανάλυση 2,78Å (PDB ID: 2Y9X). Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη, όπως παρέχεται, πρόκειται για διμερές και έχει συγκρυσταλλωθεί μαζί με ιόντα Ηο και με τον αναστολέα τροπολόνη (tropolone) προσκολλημένο πάνω της. Κάθε μονομερές αποτελείται από 4 υπομονάδες, δύο Η (οι οποίες έχουν την δράση της τυροσινάσης) και δύο L (αγνωστου χρησιμότητας) [45]. Η πρωτεΐνη προετοιμάστηκε τροποποιώντας την αρχική δομή, όπως αυτή παρέχεται από την PDB, αφαιρώντας τον αναστολέα, το ένα μονομερές καθώς και τις δύο L υπομονάδες, αλλά και μια υπομονάδα Η από το εναπομείναν μονομερές. Στην υπομονάδα Η που προέκυψε έγινε προσθήκη υδρογόνων, διόρθωση της δομής και ελαχιστοποίηση της ενέργειάς της.



Εικόνες 55-56: Το ενεργό κέντρο της τυροσινάσης, αρ:1WX2, δεξ:3NM8

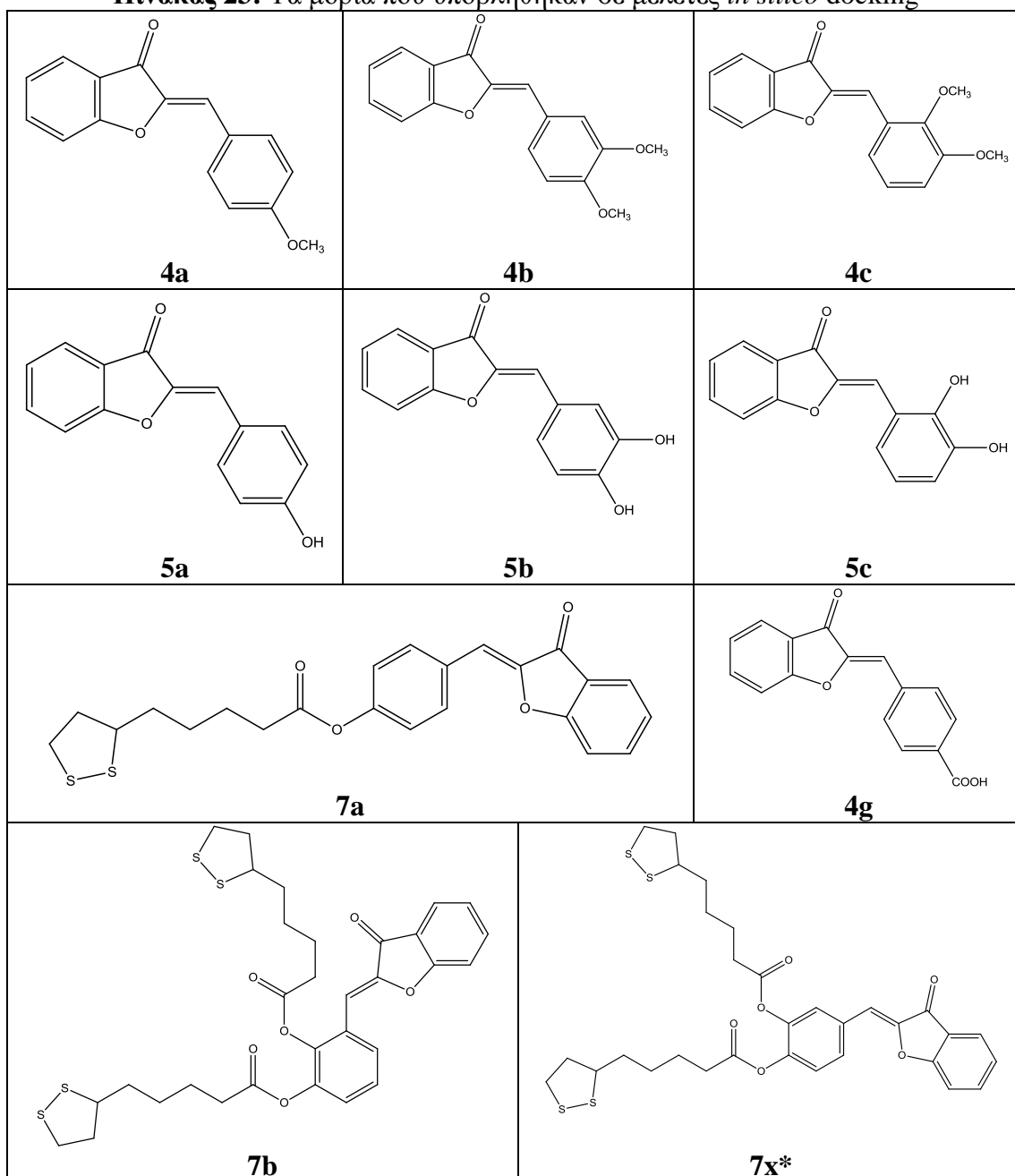


## 6.2. *In silico* μελέτες πρόσδεσης σε μόρια που έχουν συντεθεί στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας ΕΜΠ

### 6.2.1. Επιλογή υπό μελέτη ενώσεων

Οι ενώσεις που υποβλήθηκαν αρχικά στις μελέτες πρόσδεσης ήταν οι περισσότερες από αυτές που είχαν συντεθεί σε προηγούμενα βήματα. Ιδιαίτερη βαρύτητα δόθηκε στις ενώσεις των κατηγοριών υποκαταστατών a-c.

**Πίνακας 23:** Τα μόρια που υποβλήθηκαν σε μελέτες *in silico* docking

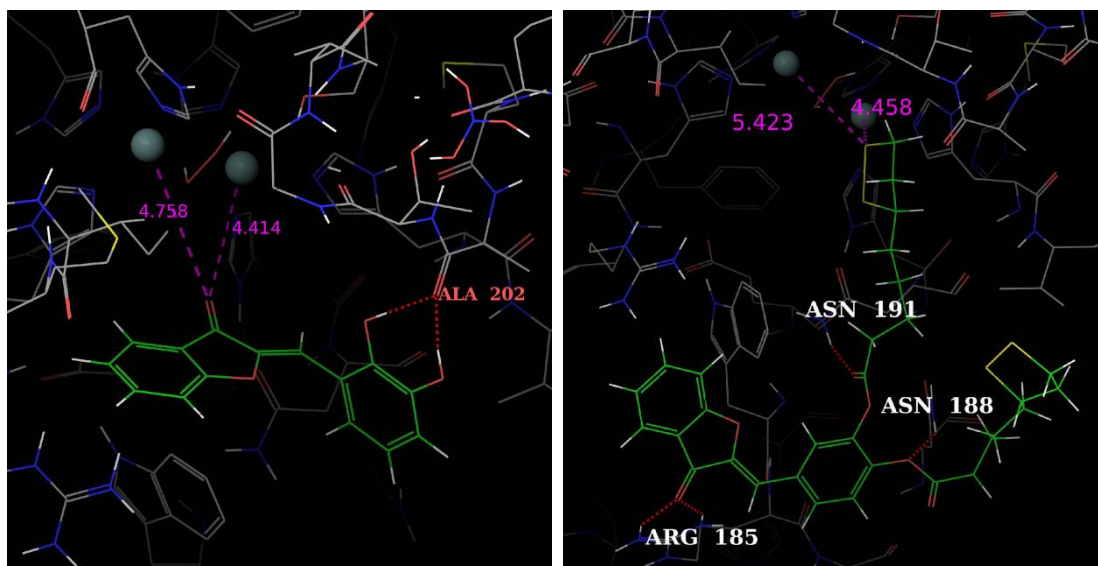


\*Η σύνθεση του 7x δεν έχει επιτευχθεί ακόμα.

### 6.2.2. Πρόσδεση σε τυροσινάση από τον *Streptomyces castaneoglobisporus* (1WX2)

Αρχικά έγιναν μελέτες πρόσδεσης στην τυροσινάση 1WX2 με την τεχνική SP και κατόπιν μέσω της τεχνικής XP. Καλύτερη ικανότητα πρόσδεσης παρουσίασαν τα μόρια **5a-c**, με τα μόρια **7a**, **7b** και **7x** να ακολουθούν.

Στις περισσότερες περιπτώσεις (όπως φαίνεται και από τις εικόνες που ακολουθούν) παρατηρείται πως τα μόρια-προσδέτες καταφέρνουν να σταθεροποιηθούν με δεσμούς υδρογόνου πάνω στο ένζυμο. Επίσης, συνήθως προσδέονται με τέτοιο τρόπο ώστε να φράσσουν την πρόσβαση άλλων πιθανών προσδετών στα ιόντα Cu. Στην περίπτωση των μορίων της ομάδας B παρατηρείται πως, σε αντίθεση με την βιβλιογραφία σχετική με την δράση της τυροσινάσης, στα ιόντα Cu προσεγγίζει συνήθως το οξυγόνο που είναι προσδεμένο με διπλό δεσμό στον πενταμελή δακτύλιο αντί για τα φαινολικά OH, τα οποία είναι απασχολημένα με δεσμούς υδρογόνου με αμινοξέα του σκελετού της πρωτεΐνης. Επίσης παρατηρήθηκε πως σε κάποιες περιπτώσεις πρόσδεσης των μορίων **7a**, **7b** και **7x** η ομάδα του λιποϊκού οξέος προσανατολιζόταν έτσι ώστε να προσεγγίζουν τα άτομα S του πενταμελούς δακτυλίου τα ιόντα Cu. Η απόσταση μεταξύ του οξυγόνου (ή του θείου σε κάποιες περιπτώσεις των ενώσεων ομάδας **7**) και των ιόντων Cu είναι, το λιγότερο 4-4,5Å, συνεπώς πιθανότατα δεν μπορεί να επιτευχθεί συντονισμός και αναστολή της τυροσινάσης.



Εικόνες 57-58: Πόζες πρόσδεσης μορίων στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 1WX2, αριστερά: **5c**, δεξιά: **7x**, Τεχνική: XP

### 6.2.3. Πρόσδεση σε τυροσινάση από τον *Bacillus megaterium* (3NM8)

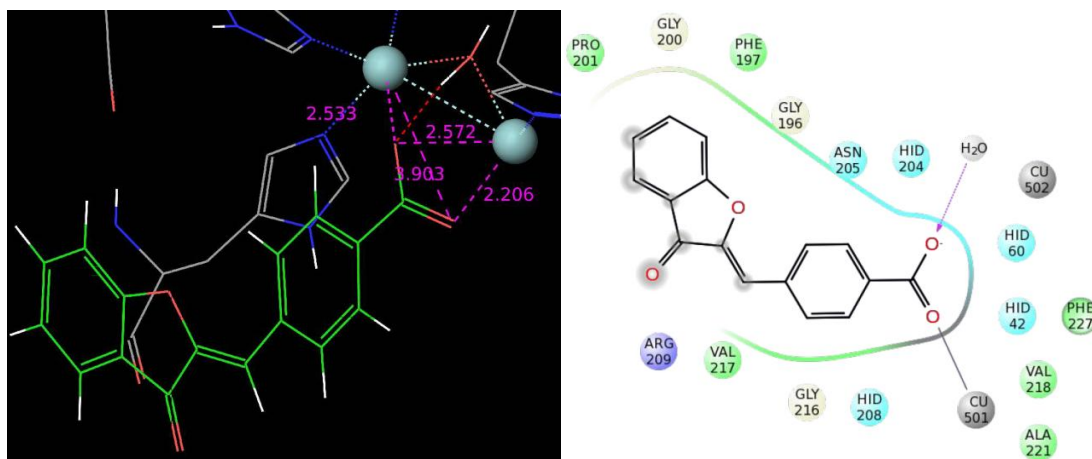
Αρχικά έγιναν μελέτες πρόσδεσης στην τυροσινάση 3NM8 με την τεχνική SP και κατόπιν μέσω της τεχνικής XP. Επίσης, επειδή τα αποτελέσματα των μελετών SP και XP ήταν ενθαρρυντικά, έγιναν και μελέτες μέσω των τεχνικών QPLD (η οποία υπολογίζει καλύτερα την συνεισφορά των μερικών φορτίων στην πρόσδεση) και IFD (η οποία λαμβάνει υπ' όψιν την μερική ευκαμψία του υποδοχέα).

Καλύτερη ικανότητα πρόσδεσης παρουσιάζουν τα μόρια **5a-c**, **7a**, **7b** και **7x**, αλλά κυρίως η ένωση **4g**. Σε πολλές περιπτώσεις πρόσδεσης, οι προσδέτες σταθεροποιούνται στην θέση τους κάνοντας δεσμούς υδρογόνου με αμινοξέα του σκελετού της πρωτεΐνης (συνήθως με την ARG 209), αλλά και με το νερό ανάμεσα στους χαλκούς και μπορούν να προσεγγίσουν τα ιόντα Cu ώστε να σχηματίζουν σύμπλοκο με αυτά.

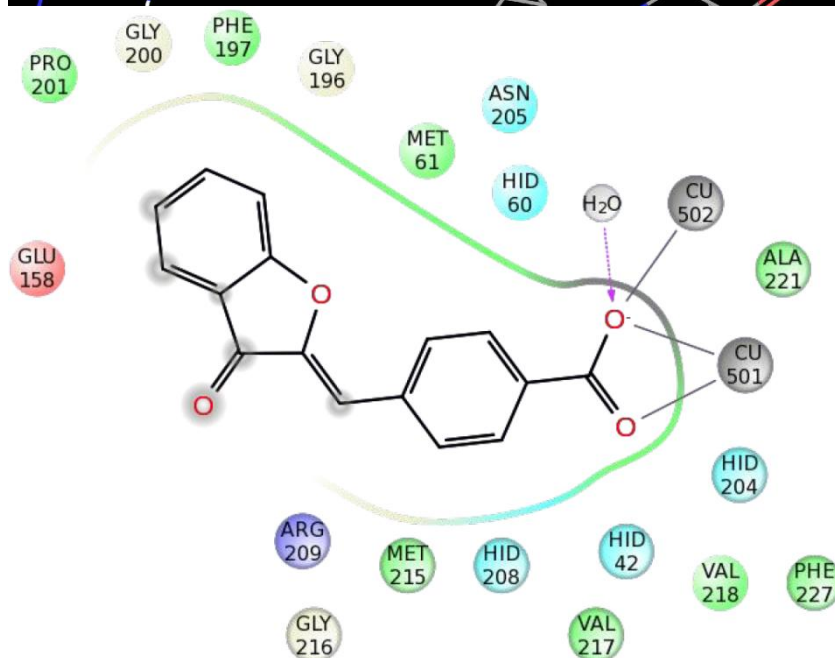
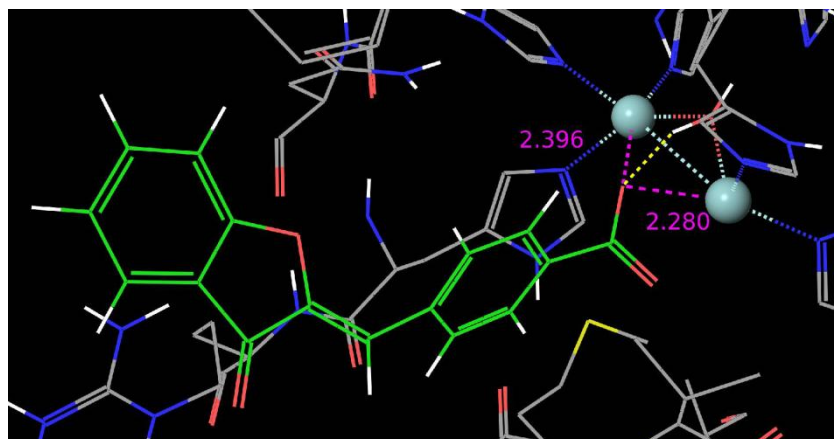
Παρατηρείται πως τα μόρια **5a-c** παρουσιάζουν την ικανότητα να προσεγγίσουν με τα υδροξύλια τους τα ιόντα Cu σε απόσταση κοντά στα 3Å, συνεπώς μπορούν τα συντονίσουν, πιθανώς παρεμποδίζοντάς την πρόσβαση του φυσικού υποστρώματος στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης. Βεβαίως πρέπει να σημειωθεί πως είναι γνωστό βιβλιογραφικά πως οι μονοφαινολικές αλλά και οι ο-διφαινολικές ενώσεις είναι ιδανικό υπόστρωμα για την δράση της τυροσινάσης. Παρατηρήθηκε πως εκ των **5a-c** την καλύτερη ικανότητα πρόσδεσης είχε η **5b**, η οποία με το κατεχολικό της σύστημα μπορεί να προσεγγίσει τα ιόντα Cu σε απόσταση κοντά στα 3Å. Το φαινολικό OH της **5a** επίσης προσεγγίζει τα ιόντα Cu σε απόσταση περίπου 3,5Å, οπότε μπορεί να λειτουργήσει και αυτή ως πιθανός παρεμποδιστής.

Όσον αφορά την ένωση **4g**, παρατηρείται πως η ομάδα του αποπρωτονιωμένου (λόγω pH) καρβοξυλικού οξέος παρουσιάζει μεγαλύτερη τάση, από το κατεχολικό σύστημα όσον αφορά την προσέγγιση του ενεργού κέντρου των ιόντων Cu. Επίσης, άξιο προσοχής είναι πως η τοποθέτηση αυτής της ομάδας στον χώρο μπορεί να οδηγήσει στο συμπέρασμα πως και το καρβονύλιο αλλά και το αποπρωτονιωμένο υδροξύλιο μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τα ιόντα χαλκού, είτε αμφότερα ταυτόχρονα και με τα δύο ιόντα (εικόνα 60), ή έκαστο με διαφορετικό ιόν (εικόνα 61).

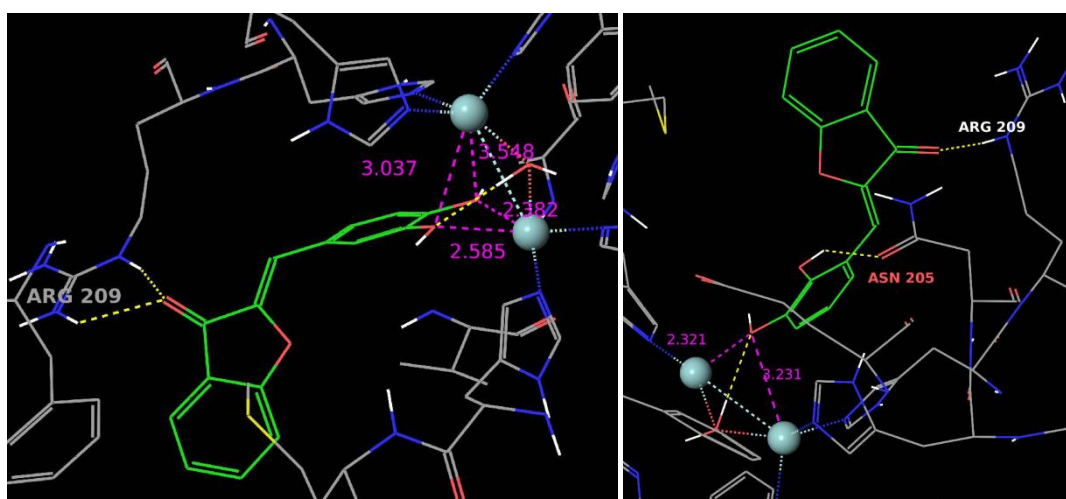
Σχετικά με τα **7a**, **7b** και **7x** παρατηρήθηκε πως σε κάποιες περιπτώσεις πρόσδεσης η ομάδα του λιποϊκού οξέος προσανατολιζόταν έτσι ώστε τα άτομα S του δακτυλίου του λιποϊκού οξέος να προσεγγίζουν τα ιόντα Cu. Παρατηρήθηκε επίσης πως τα δύο άτομα S της ομάδας του λιποϊκού οξέος της **7a** παρουσίασαν την ικανότητα να προσεγγίσουν τα ιόντα Cu σε απόσταση περίπου 3,5Å κατά μέσο όρο (όμως αυτή συγκεκριμένη πρόσδεση δεν έχει πολύ καλή βαθμολογία πρόσδεσης).



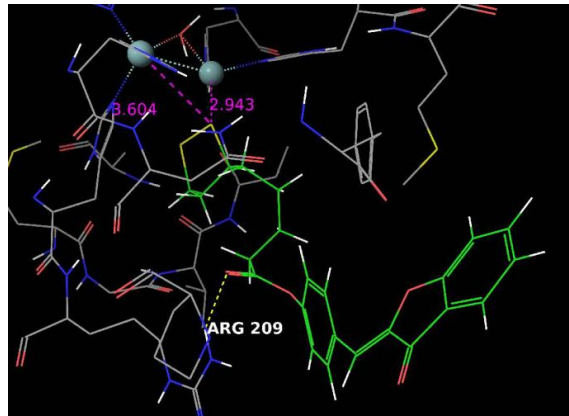
Εικόνα 59: Πρόσδεση της ένωσης **4g** στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 3NM8. Τρισδιάστατο μοντέλο και διάγραμμα αλληλεπιδράσεων. Τεχνική: XP



Εικόνα 60: Πρόσδεση της ένωσης **4g** στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 3NM8. Τρισδιάστατο μοντέλο και διάγραμμα αλληλεπιδράσεων. Τεχνική: QPLD



Εικόνες 61-62: Πόζες πρόσδεσης μορίων στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 3NM8, αριστερά: **5b**, δεξιά: **5c**, Τεχνική: IFD



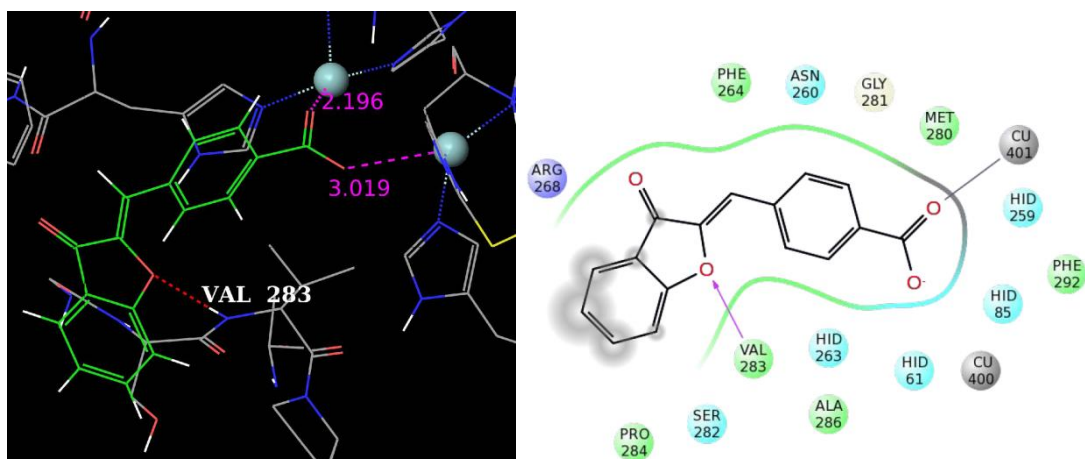
Εικόνα 63: Πόζα πρόσδεσης της **7a** στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 3NM8, Τεχνική: IFD

#### 6.2.4. Πρόσδεση σε τυροσινάση από τον *Agaricus bisporus* (2Y9X)

Αρχικά έγιναν μελέτες πρόσδεσης στην τυροσινάση 2Y9X με την τεχνική SP και κατόπιν μέσω της τεχνικής XP. Επίσης, επειδή τα αποτελέσματα των μελετών SP και XP ήταν ενθαρρυντικά, έγιναν και μελέτες μέσω των τεχνικών QPLD και IFD.

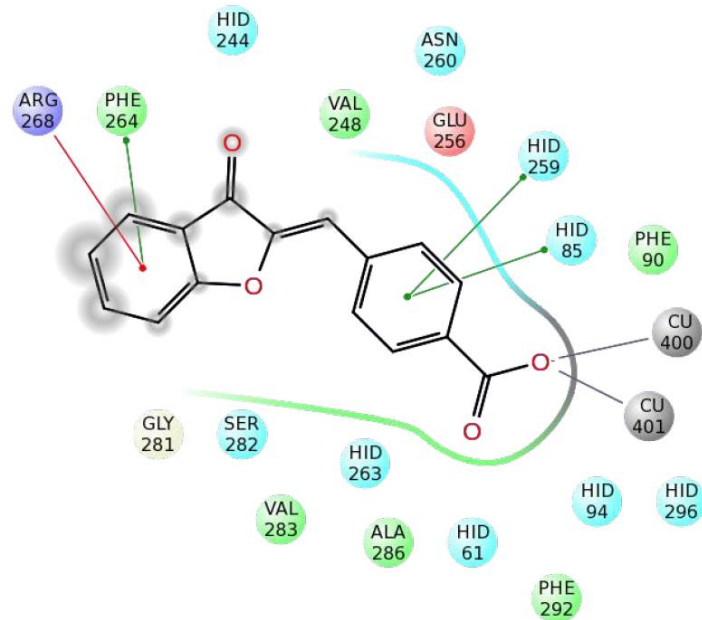
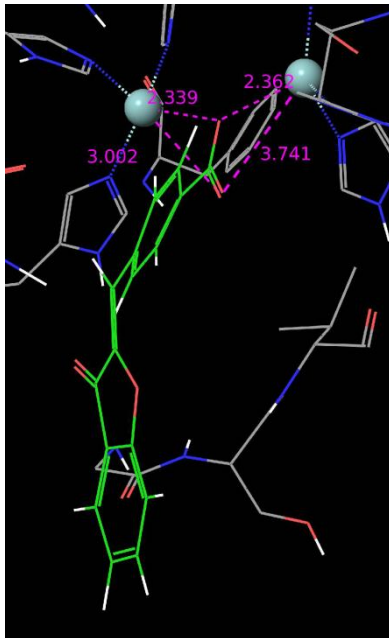
Σε γενικές γραμμές, στην περίπτωση πρόσδεσης μορίων στην 2Y9X μπορούν να γίνουν παρόμοια σχόλια με αυτά της πρόσδεσης στην 3NM8. Μεγαλύτερη ικανότητα πρόσδεσης παρουσίασαν τα μόρια της **5a-c**, αλλά ιδίως η **4g**. Παρατηρείται πως, όσον αφορά την πρόσδεση φαρμακευτικών μορίων στο ένζυμο, η ομάδα καρβοξυλικού οξέος παρουσιάζει μεγαλύτερη τάση προσέγγισης του ενεργού κέντρου του ενζύμου από το κατεχολικό σύστημα, καθώς οι προσδέσεις στο ενεργό κέντρο μέσω του καρβοξυλικού οξέος ήταν πιο συχνές από αυτές με το κατεχολικό σύστημα και είχαν καλύτερη βαθμολογία πρόσδεσης. Όπως φαίνεται και από τις εικόνες που ακολουθούν, είναι δυνατή η πρόσδεση κάποιων από τα εξεταζόμενα ΦΜ σε απόσταση μικρότερη των 3Å, και συνεπώς μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκο με το ενεργό κέντρο της τυροσινάσης, πιθανότατα παρεμποδίζοντας τη δράση της.

Πρέπει να σημειωθεί πως στα αποτελέσματα της προσομοίωσης μέσω τεχνικής IFD, λόγω της επαγόμενης πρόσδεσης στην πρωτεΐνη, η απόσταση ανάμεσα στα ιόντα Cu παρουσίασε μια μικρή διακύμανση (όχι περισσότερο από  $\pm 0.3\text{\AA}$ ). Αυτή θεωρήθηκε αποδεκτή, στην βάση πως είναι βιβλιογραφικά γνωστό πως το ενεργό κέντρο της τυροσινάσης, όπως και κάθε ενζύμου, παρουσιάζει μια μικρή πλαστικότητα κατά την πρόσδεση.

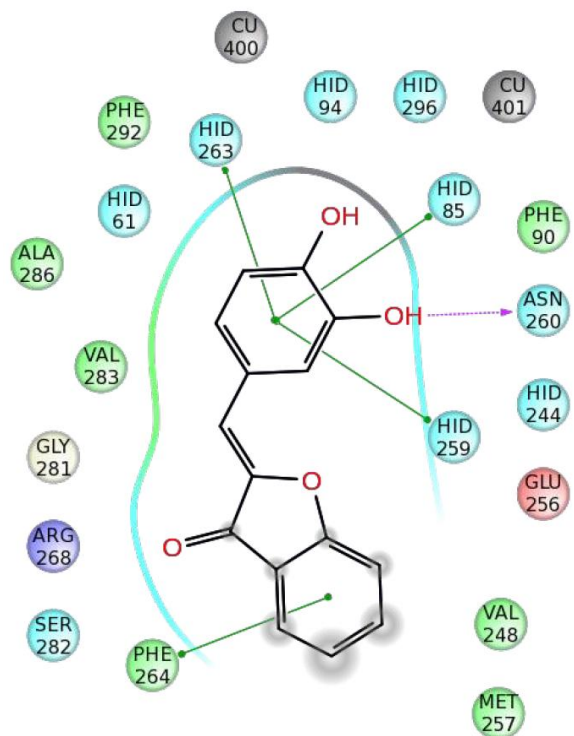
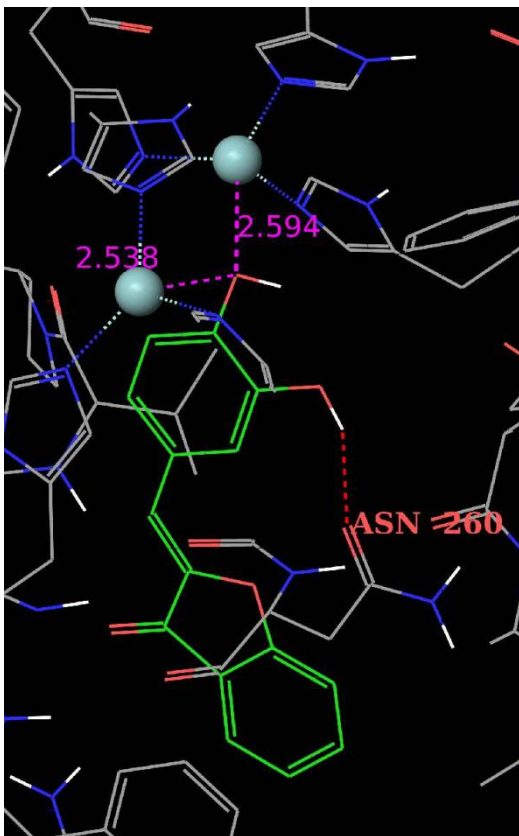


Εικόνα 64: Πρόσδεση της ένωσης **4g** στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Τρισδιάστατο μοντέλο και διάγραμμα αλληλεπιδράσεων. Τεχνική: XP

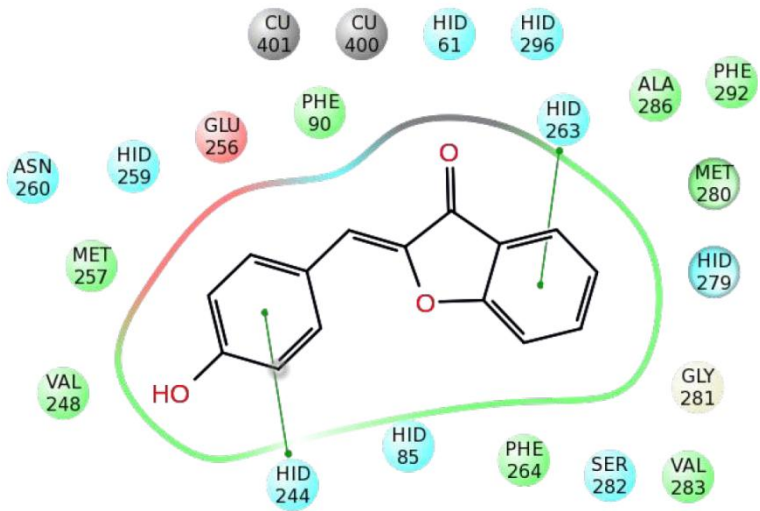
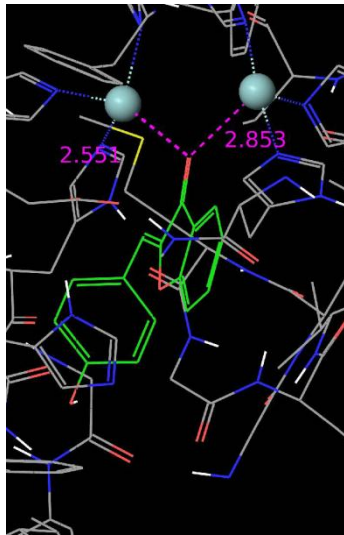




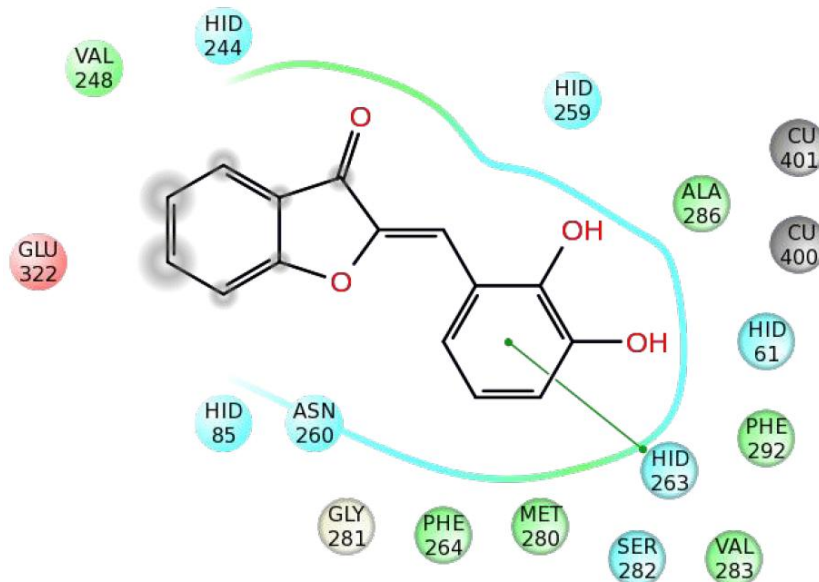
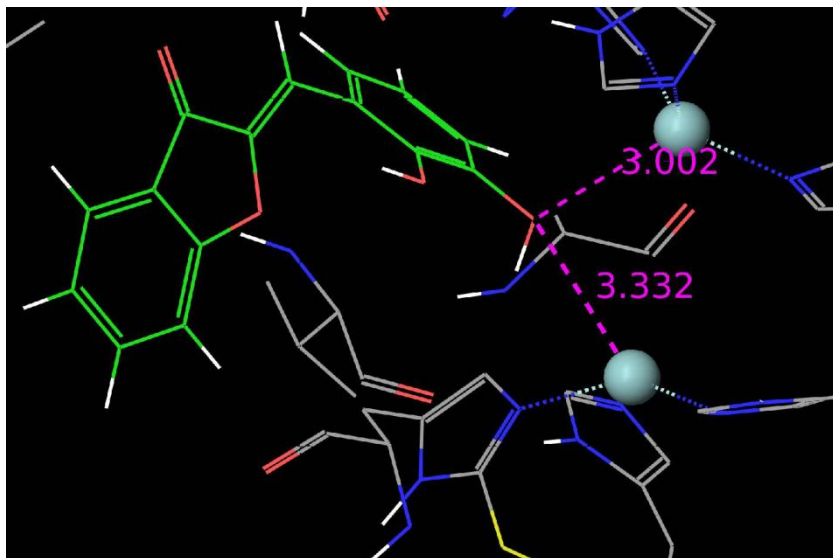
Εικόνα 65: Πρόσδεση της ένωσης **4g** στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Τρισδιάστατο μοντέλο και διάγραμμα αλληλεπιδράσεων. Τεχνική: QPLD



Εικόνα 66: Πρόσδεση της ένωσης **5b** στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Τρισδιάστατο μοντέλο και διάγραμμα αλληλεπιδράσεων. Τεχνική: IFD



Εικόνα 67: Πρόσδεση της ένωσης **5a** στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Τρισδιάστατο μοντέλο και διάγραμμα αλληλεπιδράσεων. Τεχνική: IFD



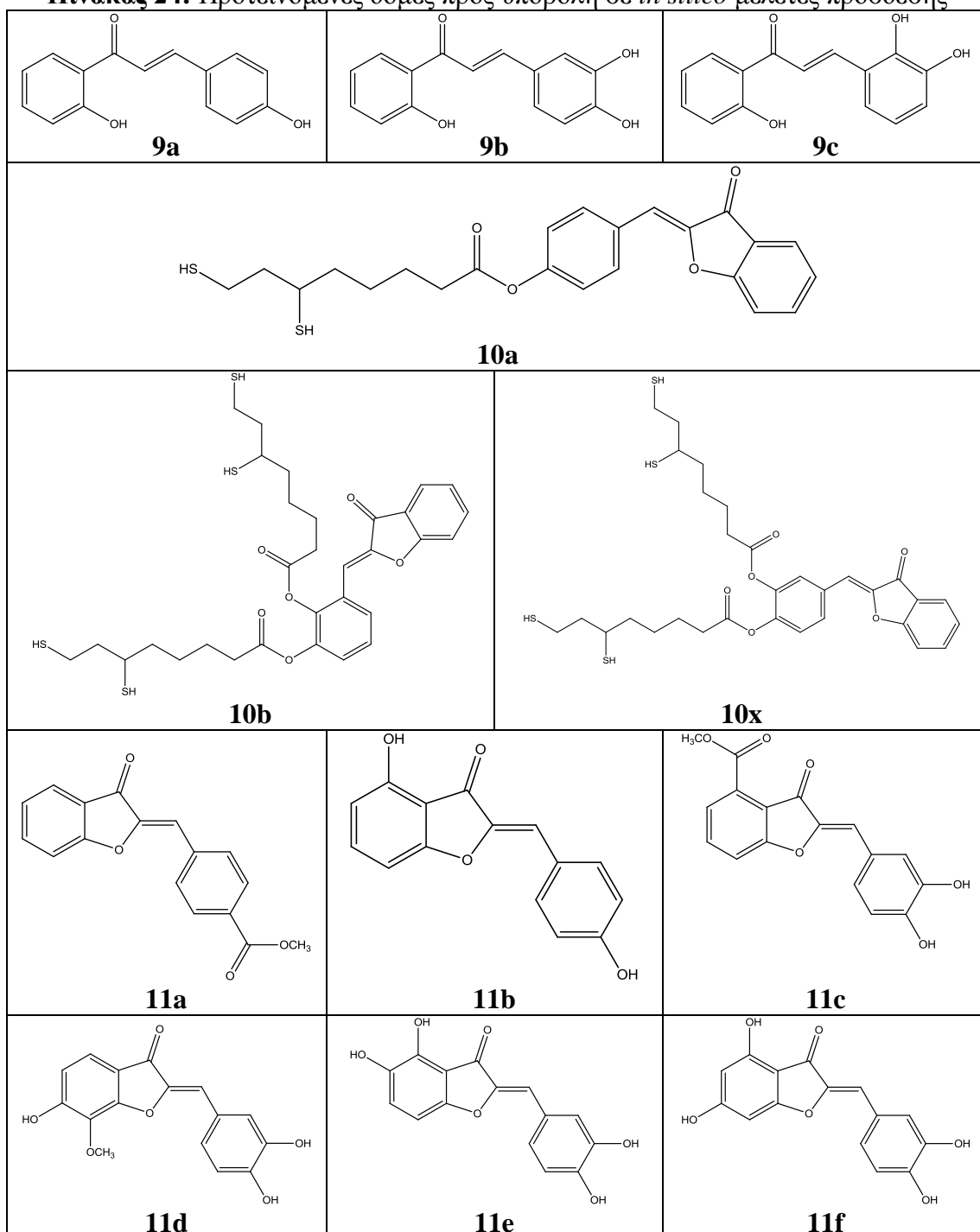
Εικόνα 68: Πρόσδεση της ένωσης **5c** στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Τρισδιάστατο μοντέλο και διάγραμμα αλληλεπιδράσεων. Τεχνική: QPLD

## 6.3. Προτάσεις για νέες δομές με βελτιωμένη ικανότητα πρόσδεσης

### 6.3.1. Νέες προτεινόμενες δομές

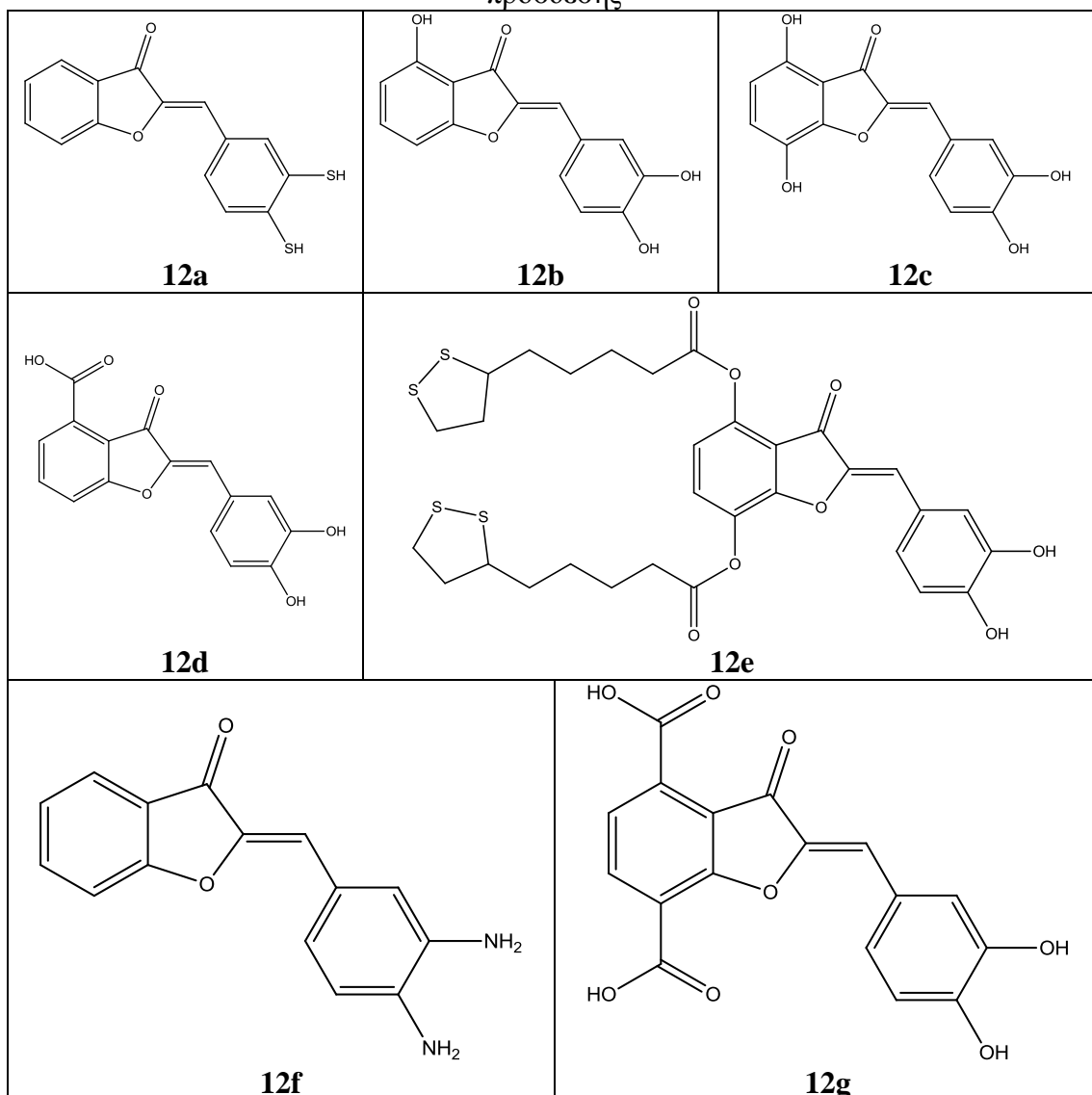
Στα πλαίσια της διερεύνησης του τρόπου πρόσδεσης στην τυροσινάση και της βελτίωσης της ικανότητας πρόσδεσης έγιναν οι εξής προτάσεις τροποποίησης δομής ή παραλλαγών πάνω στα συντεθειμένα μόρια.

**Πίνακας 24:** Προτεινόμενες δομές προς υποβολή σε *in silico* μελέτες πρόσδεσης





**Πίνακας 20-συνέχεια:** Προτεινόμενες δομές προς υποβολή σε *in silico* μελέτες πρόσδεσης



Το σκεπτικό πίσω από την πρόταση αυτών των νέων εναλλακτικών δομών προς υποβολή σε νέες *in silico* μελέτες πρόσδεσης είναι το εξής:

Οι ενώσεις **9a-c**, είναι χαλκόνες που μπορούν να προκύψουν από αποπροστασία των **3a-c**. Αυτή η παραλλαγή πάνω στις **3a-c** προέκυψε επειδή παρατηρήθηκε πως, στις προηγούμενες μελέτες πρόσδεσης καμία από τις δομές **4a-c** δεν προσέγγισε το ενεργό κέντρο της τυροσινάσης μέσω της μεθόξυ ομάδας, ενώ οι αντίστοιχες αποπροστατευμένες **5a-c** παρουσίασαν αρκετά ικανοποιητικά αποτελέσματα πρόσδεσης μέσω της υδροξυλομάδας. Συνεπώς παρήχθησαν οι **9a-c** για να διερευνηθεί η ικανότητα πρόσδεσης χαλκόνων μέσω φαινολικών υδροξυλίων ή και κατεχολικού συστήματος, αλλά και για να συγκριθεί η ικανότητα πρόσδεσής τους με τις αντίστοιχες ωρόνες **5a-c**. Επίσης, υπήρχε ενδιαφέρον για το κατά πόσον η πιο ευέλικτη δομή των χαλκόνων θα επηρέαζε την ικανότητα πρόσδεσης.

Κατά την διεξαγωγή *in silico* μελετών πρόσδεσης στα υβριδικά μόρια (**7a**, **7b** και **7x**) παρατηρήθηκε πως σε κάποιες περιπτώσεις πρόσδεσης αυτών των μορίων τύχαινε η ομάδα του λιποϊκού οξέος να διευθετείται έτσι ώστε τα ιόντα Cu να προσεγγίζονται από τα άτομα S του διθειολανικού δακτυλίου. Από αυτή την

παρατήρηση προέκυψε η ιδέα να “ενεργοποιηθεί” ο διθειολανικός δακτύλιος, μέσω αναγωγής του δισουλφιδικού δεσμού (οδηγώντας έτσι σε δοκιμή ελέγχου ικανότητας πρόσδεσης των μορίων-προσδετών **10a**, **10b** και **10x**).

Οι δομές **11a-f** προτάθηκαν ως εναλλακτικές δομές ωρονών στα πλαίσια σχεδιασμού νέων ωρονών με καλύτερα χαρακτηριστικά πρόσδεσης, ενθαρρυσμένοι από τα καλά αποτελέσματα πρόσδεσης των **5a-c** και **4g**. Παρομοίως, οι δομές **12a-g**, οι οποίες βασίζονται σε παραλλαγές πάνω στην **5b**, η οποία έδωσε πολύ καλά αποτελέσματα πρόσδεσης, ούτως ώστε να βελτιωθεί η ικανότητα πρόσδεσης. Δευτερεύοντες στόχοι για την παραγωγή των δομών **11a-f** και **12a-g** ήταν η διερεύνηση ικανότητας πρόσδεσης στην τυροσινάση μέσω φαρμακοφόρων ομάδων στον Α δακτύλιο μιας ωρόνης, αλλά και η διερεύνηση του τρόπου που η ύπαρξη μιας καρβοξυλομάδας στην δομή ενός μορίου επηρεάζει την πρόσδεση στην τυροσινάση.

### 6.3.2. Κρυσταλλικές δομές ενζύμων και παράμετροι διεξαγωγής μελετών

Οι υποδοχείς που χρησιμοποιήθηκαν (1WX2, 3NM8, 2Y9X), οι τρόποι προετοιμασίας των υποδοχέων και των πρωτεϊνών, αλλά και οι τεχνικές πρόσδεσης ήταν όμοιες με τις προηγούμενες μελέτες (βλ. 6.1.2 και 6.1.3) και δεν θα αναπτυχθούν περαιτέρω.

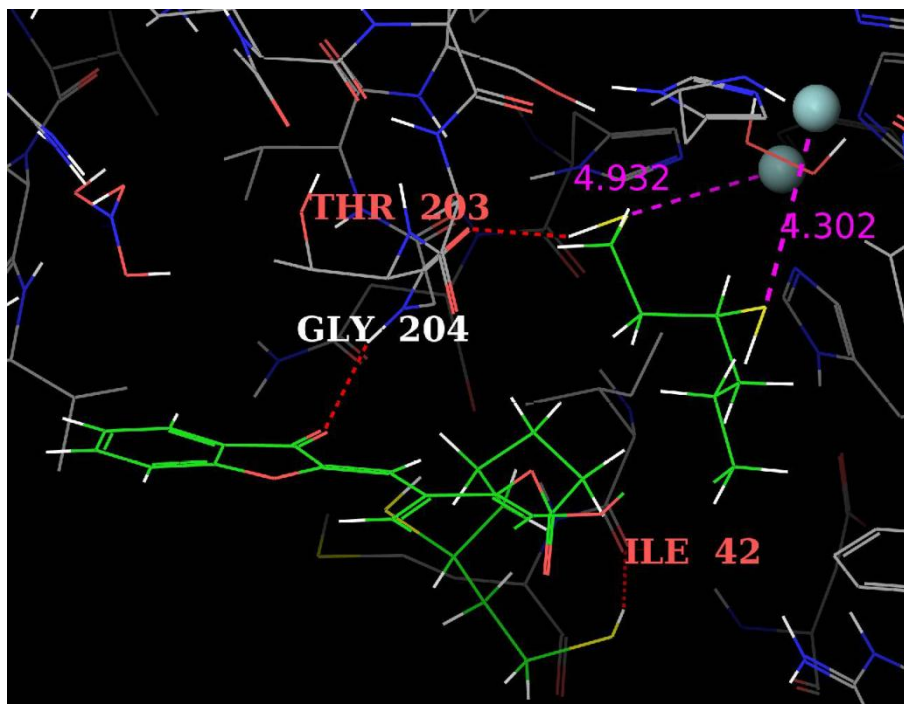
### 6.3.3. Πρόσδεση σε τυροσινάση από τον *Streptomyces castaneoglobisporus* (1WX2)

Στα πλαίσια των *in silico* μελετών της ικανότητας πρόσδεσης των προτεινόμενων μορίων στην τυροσινάση 1WX2 διεξήχθησαν μελέτες με τεχνικές SP, XP και QPLD.

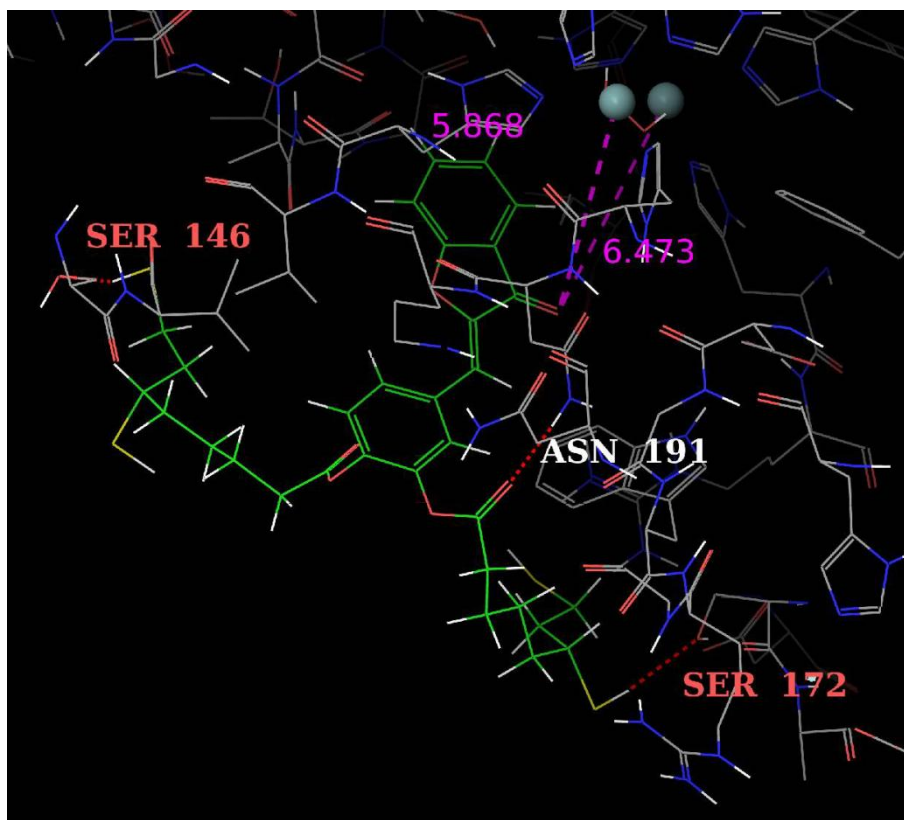
Σχετικά με την ικανότητα πρόσδεσης των **10a**, **10b** και **10x** σημειώνεται πως σε κάποιες προσδέσεις που παρουσιάζουν καλή βαθμολογία πρόσδεσης παρατηρείται πως όντως μπορούν οι ομάδες S-H να προσεγγίσουν τα ιόντα Cu, αλλά όχι σε απόσταση μικρότερη των 3Å (εικόνα 69). Στις συνήθεις περιπτώσεις πρόσδεσης όμως οι ομάδες S-H “χρησιμοποιούνται” για να σταθεροποιούνται οι προσδέτες στο ένζυμο με δεσμούς H με τις πλευρικές ομάδες αμινοξέων του ενζύμου, παρά για να επιτυγχάνουν δημιουργία συμπλόκου με τα ιόντα Cu. Οι περιπτώσεις πρόσδεσης που παρουσιάζουν το μεγαλύτερο σκορ πρόσδεσης θα μπορούσε να θεωρηθεί πως πιθανώς να μπλοκάρουν το ενεργό κέντρο επειδή κάποια τμήματά τους προσεγγίζουν τα ιόντα Cu και αποτρέπουν με την παρουσία τους σε άλλα μόρια να προσεγγίσουν το ενεργό κέντρο. Όμως, στην πλειονότητα των πιθανών προσδέσεων (κάποιες εκ’ των οποίων έχουν βαθμολογία πρόσδεσης που δεν διαφέρει σημαντικά από αυτή των καλύτερων), τα μόρια δεν προσδέονται κοντά στο ενεργό κέντρο, επειδή οι ομάδες S-H, οι οποίες έχουν μεγάλη ευκινησία παρατηρείται πως να κάνουν δεσμούς H με αμινοξέα που δεν είναι απαραίτητα κοντά στα ιόντα Cu (λ.χ. εικόνα 70: δεσμός με SER146) και συνεπώς το μόριο δεν τοποθετείται απαραίτητως με τέτοιο τρόπο ώστε να φράσσει την πρόσβαση άλλων μορίων στο ενεργό κέντρο.

Όσον αφορά τις υπόλοιπες δομές του πίνακα 20, μεταξύ των καλύτερων περιπτώσεων πρόσδεσης (συμπεριλαμβανομένων και των δομών **5a-c**, για σύγκριση) η φθίνουσα κατάταξη ικανότητας πρόσδεσης, όπως δίδεται από τη βαθμολογία πρόσδεσης, είναι **9c**, **12b**, **12c**, **5c**, **5b**, **12d**. Δεν παρατηρήθηκε σε καμία περίπτωση προσέγγιση των ιόντων Cu σε απόσταση κοντά στα 3Å, αλλά η μικρότερη απόσταση τα 3,5Å (κατά μέσο όρο). Πιθανώς όμως τα μόρια που εξετάστηκαν να μπορούν να χρησιμεύσουν ως παρεμποδιστές επειδή, δεσμευόμενα έστω και ασθενώς, πάνω στην τυροσινάση ίσως να φράσσουν την δίοδο άλλων μορίων προς το ενεργό κέντρο. Σε γενικές γραμμές όμως παρατηρήθηκε πως οι χαλκόνες **9a-c** έδιναν καλύτερες πόζες πρόσδεσης από τις αντίστοιχες τους ωρόνες **5a-c**, γεγονός που αποδόθηκε στην μεγαλύτερη ευελιξία των μορίων τους και την ύπαρξη ελεύθερης υδροξυλομάδας

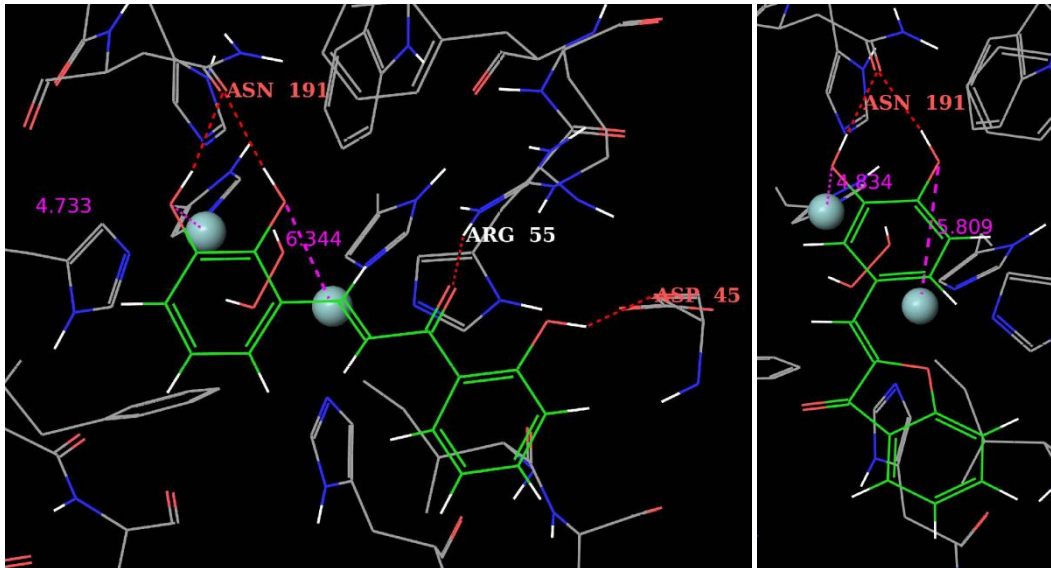
στην θέση 2' του Α δακτυλίου, που επιτρέπει τον σχηματισμό περισσότερων δεσμών υδρογόνου με τα αμινοξέα της τυροσινάσης.



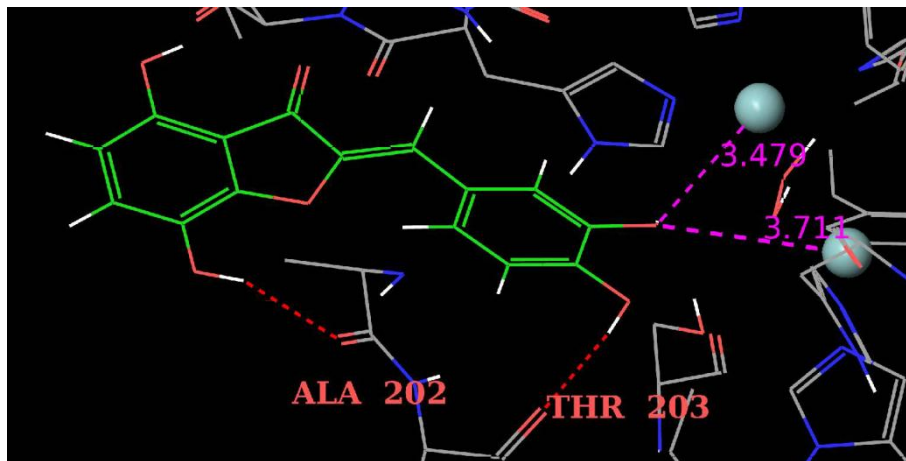
Εικόνα 69: Πόζα πρόσδεσης της ένωσης **10b** στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 1WX2, Τεχνική: SP



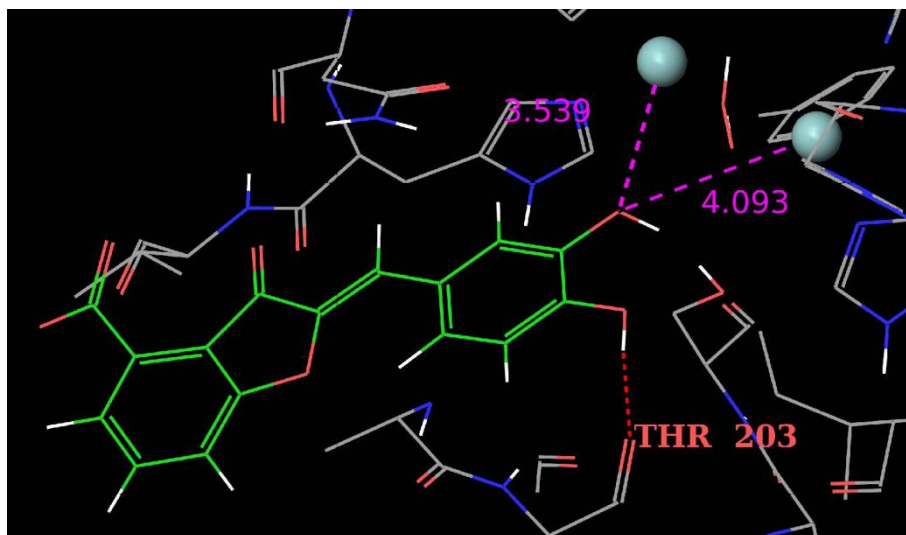
Εικόνα 70: Πόζα πρόσδεσης της ένωσης **10x** στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 1WX2, Τεχνική: SP



Εικόνες 71-72: Πόζες πρόσδεσης μορίων στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 1WX2, αριστερά: **9c**, δεξιά: **5b**, Τεχνική: XP



Εικόνα 73: Πόζα πρόσδεσης της ένωσης **12c** στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 1WX2, Τεχνική: QPLD



Εικόνα 74: Πόζα πρόσδεσης της ένωσης **12d** στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 1WX2, Τεχνική: QPLD

#### 6.3.4. Πρόσδεση σε τυροσινάση από τον *Bacillus megaterium* (3NM8)

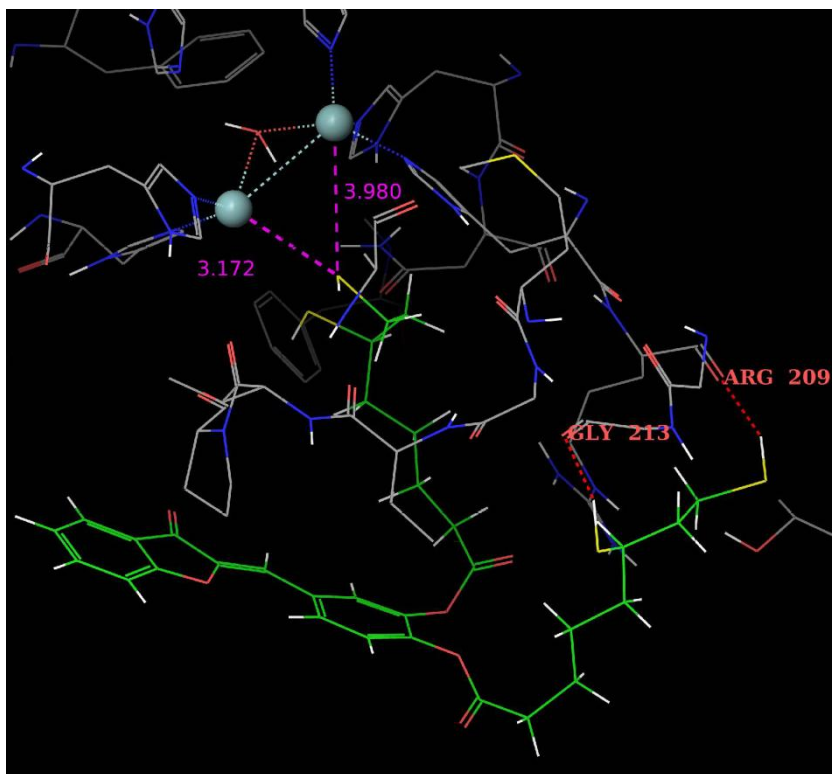
Στα πλαίσια των *in silico* μελετών της ικανότητας πρόσδεσης των προτεινόμενων μορίων στην τυροσινάση 3NM8 διεξήχθησαν μελέτες με τεχνικές SP, XP, QPLD και IFD.

Σχετικά με την ικανότητα πρόσδεσης των **10a**, **10b** και **10x** παρατηρείται πως, όπως συνέβη και στην περίπτωση των μελετών σε υποδοχέα 1WX2, οι ομάδες S-H δεν προσεγγίζουν το ενεργό κέντρο των δύο ιόντων Cu, αλλά “απασχολούνται” με το να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τις πλευρικές ομάδες των αμινοξέων της πρωτεΐνης. Σε αυτήν την περίπτωση, τα ιόντα Cu προσεγγίζει συνήθως το O που είναι συνδεδεμένο με διπλό δεσμό πάνω στον πενταμελή δακτύλιο, αλλά ποτέ σε απόσταση μικρότερη των 3Å. Μολαταύτα, σε επαναληπτικές μελέτες με αυξημένη ακρίβεια (XP) παρατηρήθηκε μια περίπτωση, η πρόσδεση του **10x** στην οποία S προσέγγισε τα ιόντα Cu, σε απόσταση λίγο μεγαλύτερη των 3Å (εικόνα 75). Εν συνεχεία, σε μελέτες που λαμβάνουν υπ’ όψιν την ευκαμψία του υποδοχέα (IFD), παρατηρήθηκε πως η ένωση **10b** έχει την ικανότητα να προσεγγίσει μέσω της ομάδας S-H το ενεργό κέντρο των ιόντων Cu (εικόνα 76), και μάλιστα αυτή η πρόσδεση έχει καλό σκορ πρόσδεσης (αλλά όχι το καλύτερο όλων των πιθανών προσδέσεων της **10b**).

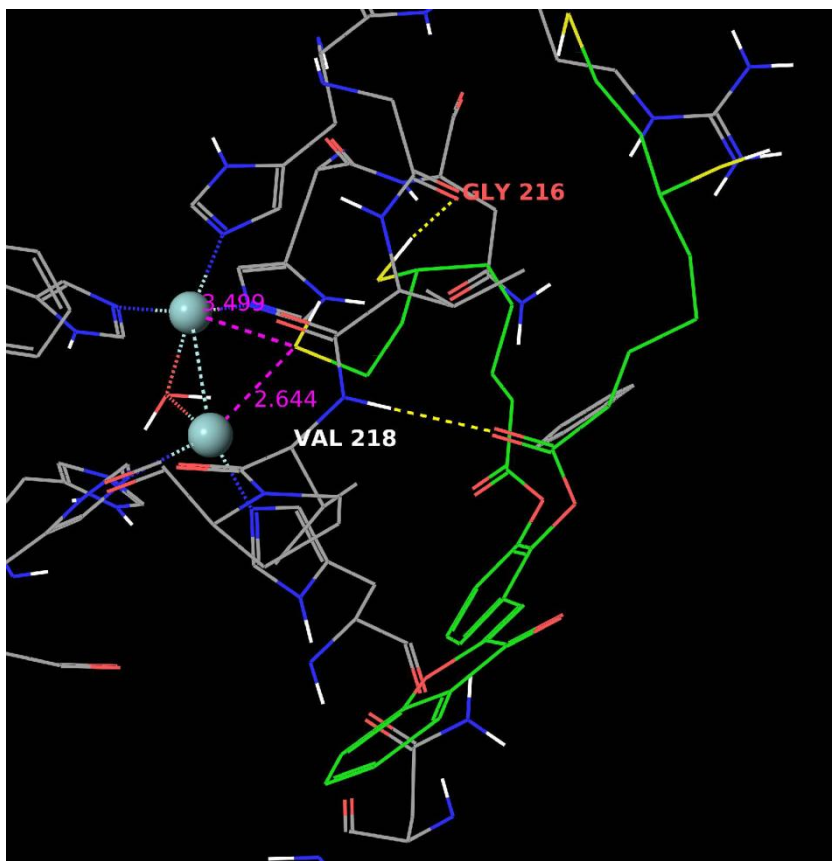
Σε μελέτες πρόσδεσης που έγιναν μεταξύ των **5a-c**, **9a-c** και **12a-g** σε όλες περιπτώσεις πρόσδεσης παρατηρήθηκε πως το μόριο προσεγγίζει το ενεργό κέντρο των δύο ιόντων Cu, σε απόσταση κοντά στα 3Å και συνεπώς μπορούν να δημιουργήσουν συντονιστούν με αυτά, πιθανώς αναστέλλοντας την δράση της τυροσινάσης. Η φθίνουσα κατάταξη ικανότητας πρόσδεσης (όπως δίδεται από το σκορ πρόσδεσης) είναι: **12d**, **9b**, **12b**, **12c**, **5b** για τεχνική XP, ενώ εφαρμογή τεχνικής QPLD μεταξύ των καλύτερων περιπτώσεων πρόσδεσης (συμπεριλαμβανομένου και του μορίου **5b**) έδωσε φθίνουσα κατάταξη ικανότητας πρόσδεσης **12d**, **12g**, **12b**, **12c**, **5b**, ενώ μόνο σε ελάχιστες περιπτώσεις προσέγγισης των ανωτέρω παρατηρήθηκε προσέγγιση των ιόντων Cu σε απόσταση μεγαλύτερη των 3Å. Συνεπώς προκύπτει το συμπέρασμα πως τα εξεταζόμενα μόρια είναι πιθανοί παρεμποδιστές της τυροσινάσης καθώς, εφόσον προσεγγίζουν τα ιόντα Cu σε απόσταση κοντά στα 3Å, μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκο με αυτά, πιθανότατα παρεμποδίζοντάς την πρόσδεση του φυσικού υποστρώματος. Από τις μελέτες που διεξήχθησαν παρατηρήθηκε πως αλλαγές πάνω στην δομή του **5b** μπορούν να βελτιώσουν αρκετά την ικανότητα πρόσδεσης του μορίου στην τυροσινάση, με τις παραλλαγμένες δομές **12d**, **12c**, **12g** και **12b** να παρουσιάζουν την μεγαλύτερη βελτίωση στην ικανότητα πρόσδεσης στην τυροσινάση.

Λαμβάνοντας υπ’ όψιν τα ανωτέρω αποτελέσματα, αλλά και τα αποτελέσματα πρόσδεσης των **11a-g**, παρατηρείται πως η ομάδα του αποπροτωνιωμένου καρβοξυλικού οξέος έχει μεγαλύτερη τάση, από το κατεχολικό σύστημα στο να προσεγγίσει το ενεργό κέντρο των ιόντων Cu, παρ’ όλο που και το κατεχολικό σύστημα επίσης παρουσιάζει τάση προσέγγισης των ιόντων, αλλά μικρότερη από αυτήν της καρβοξυλομάδας (εικόνες 76-77).

Στην περίπτωση πρόσδεσης στην 3NM8, οι προσδέτες συνήθως σταθεροποιούνται στην θέση τους σχηματίζοντας δεσμούς H με αμινοξέα της κύριας αλυσίδας της πρωτεΐνης (συνήθως με την ARG 209), αλλά και με ένα μόριο νερού που βρίσκεται ανάμεσα στα ιόντα χαλκού. Επιπρόσθετα, μπορούν να προσεγγίσουν τα ιόντα Cu ώστε να σχηματίζουν σύμπλοκο με αυτά. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί πως ύπαρξη καρβοξυλικού οξέος ή εστέρα στην όρθο θέση στον αρωματικό δακτύλιο B ενισχύει την ικανότητα πρόσδεσης, μέσω δεσμού H, του προσδέτη σε αμινοξύ της πρωτεΐνης (εδώ: ARG 209).

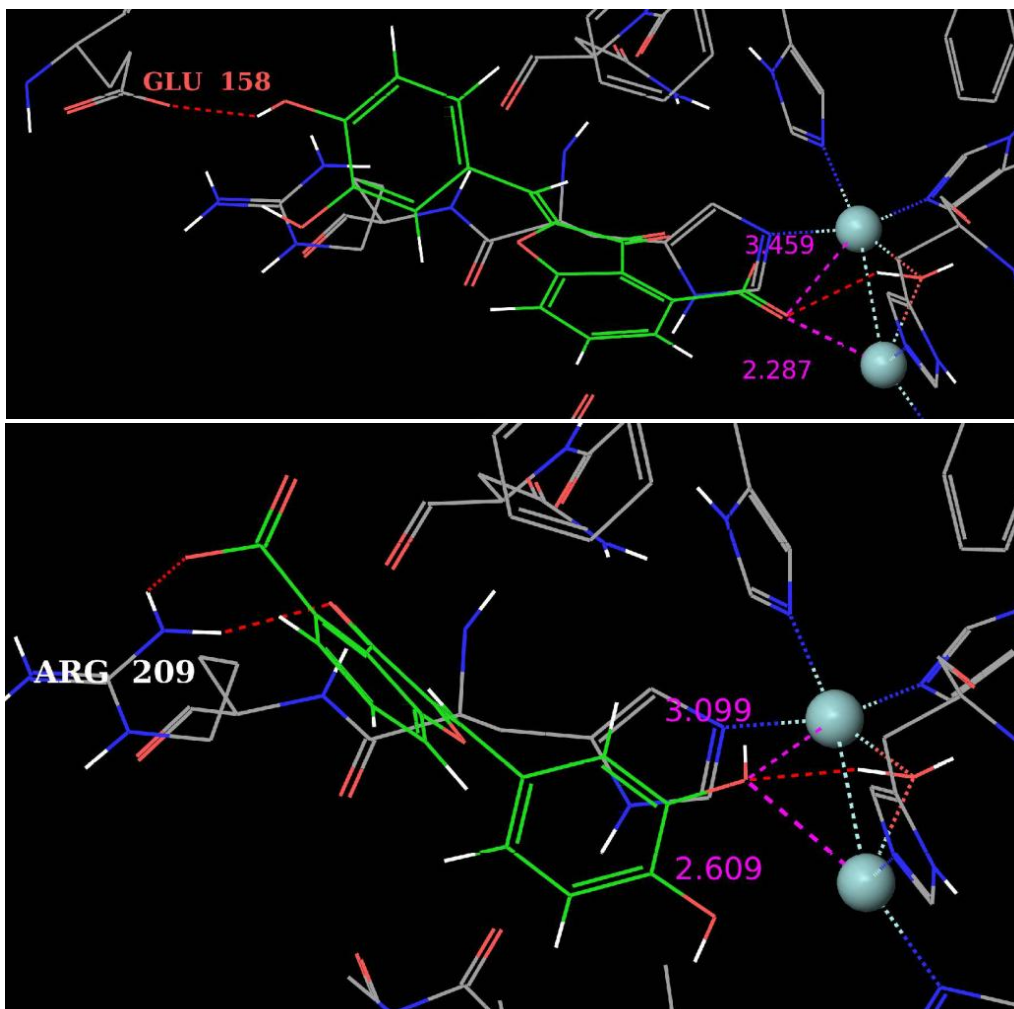


Εικόνα 75: Πόζα πρόσδεσης της ένωσης **10x** στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 3NM8, Τεχνική: XP

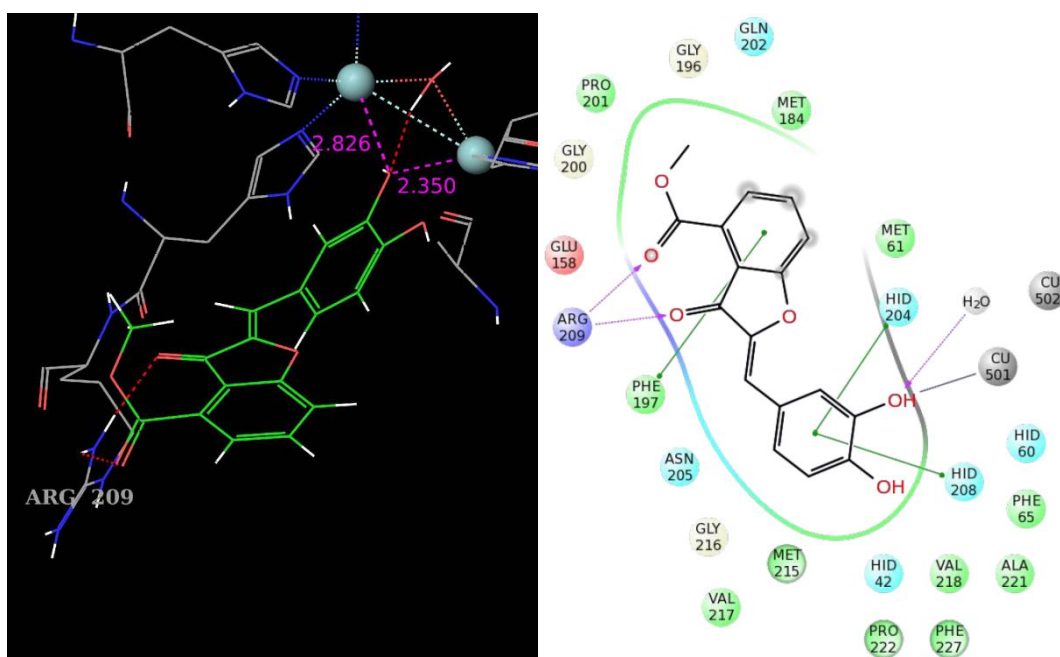


Εικόνα 76: Πόζα πρόσδεσης της ένωσης **10b** στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 3NM8, Τεχνική: IFD

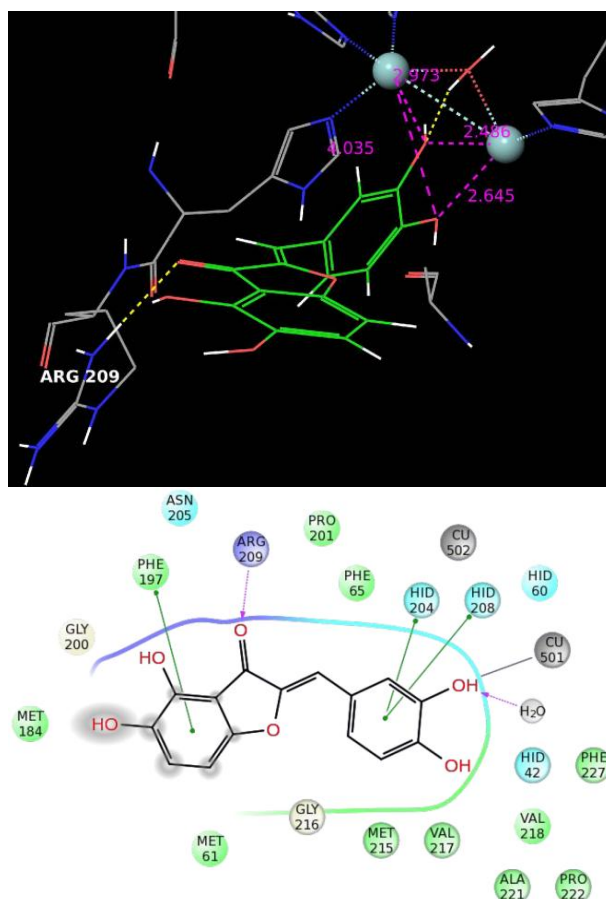




Εικόνες 77-78: Πόζες πρόσδεσης της ένωσης **12d** στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 3NM8, η άνω έχει καλύτερο σκορ πρόσδεσης από την κάτω, Τεχνική: QPLD



Εικόνα 79: Πρόσδεση της ένωσης **11c** στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 3NM8. Τρισδιάστατο μοντέλο και διάγραμμα αλληλεπιδράσεων. Τεχνική: XP



Εικόνα 80: Πρόσδεση της ένωσης **11e** στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 3NM8. Τρισδιάστατο μοντέλο και διάγραμμα αλληλεπιδράσεων. Τεχνική: QPLD

#### 6.3.5. Πρόσδεση σε τυροσινάση από τον *Agaricus bisporus* (2Y9X)

Στα πλαίσια των *in silico* μελετών της ικανότητας πρόσδεσης των προτεινόμενων μορίων στην τυροσινάση 2Y9X διεξήχθησαν μελέτες με τεχνικές SP, XP, QPLD και IFD.

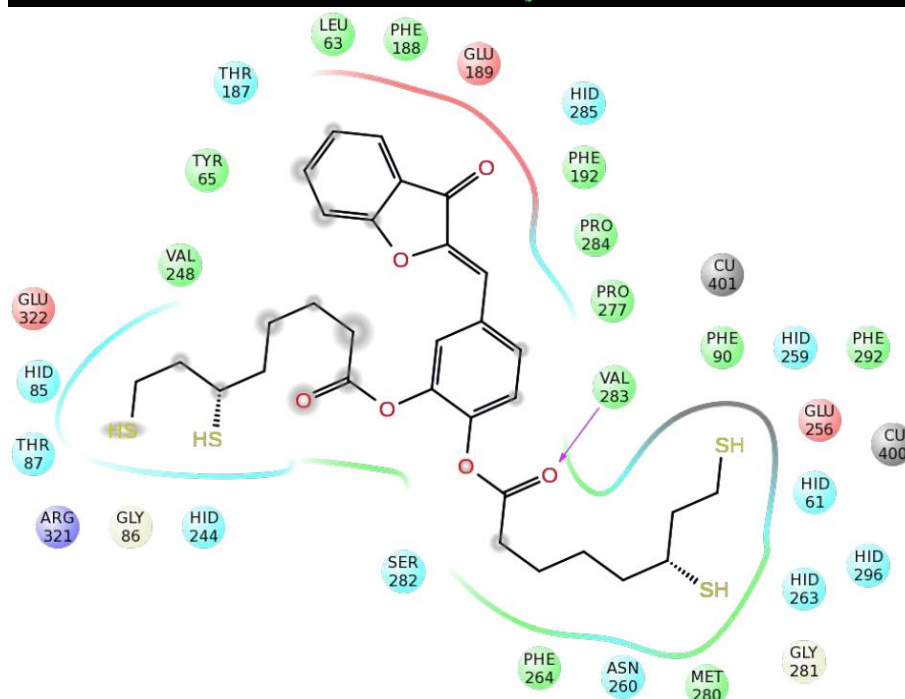
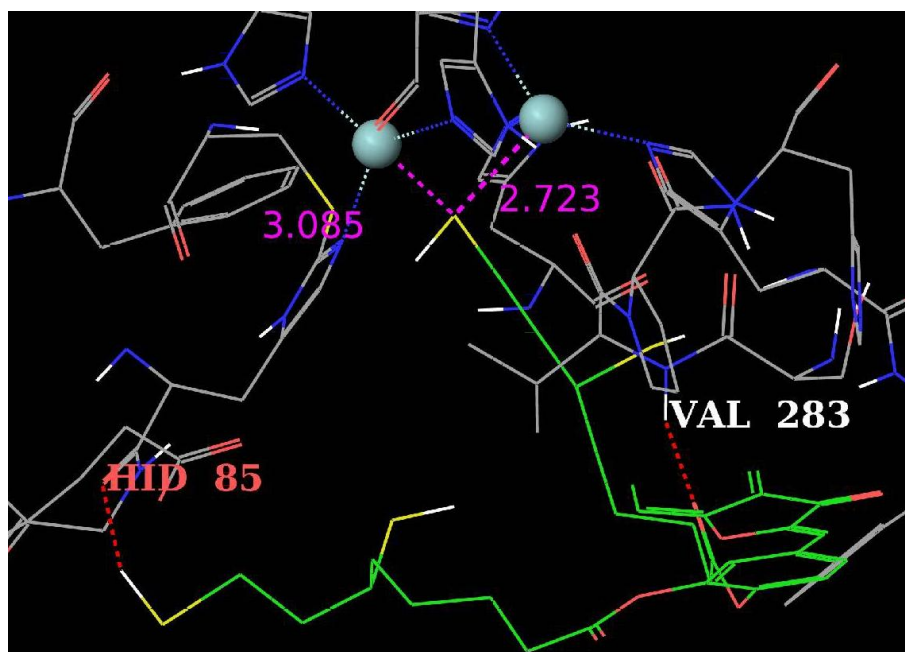
Σε *in silico* μελέτες μεταξύ των **5a-c**, **9a-c**, **10a**, **10b** και **10x**, μεγαλύτερη ικανότητα πρόσδεσης παρουσίασαν οι ενώσεις της κατηγορίας **10**, οι οποίες προσεγγίζουν τα ιόντα Cu μέσω των ομάδων S-H του λιποϊκού οξέος. Την δεύτερη καλύτερη ικανότητα πρόσδεσης παρουσίασαν οι ενώσεις της κατηγορίας **9** (αποπροστατευμένες χαλκόνες), οι οποίες προσεγγίζουν το ενεργό κέντρο με το κατεχολικό τους σύστημα. Επίσης, ικανότητα προσέγγισης του ενεργού κέντρου παρουσίασε και το κατεχολικό σύστημα των ΦΜ της κατηγορίας **5** (αποπροστατευμένες ωρόνες), οι οποίες επίσης προσεγγίζουν το ενεργό κέντρο με το κατεχολικό τους σύστημα, αλλά σε κάπως μικρότερη ισχύ πρόσδεσης από αυτή των ενώσεων της κατηγορίας **9**, πιθανότατα λόγω της μικρότερης ευελιξίας των μορίων τους.

Σε *in silico* μελέτες αυξημένης ακρίβειας (QPLD και IFD) των παραλλαγών πάνω στον βασικό σκελετό των ωρονών (**11a-f** και **12a-g**), στις οποίες συμπεριελήφθησαν και οι δομές **4g** και **5a-c** για λόγους σύγκρισης, παρατηρείται πως, όσον αφορά την πρόσδεση μορίων στο ένζυμο, η ομάδα καρβοξυλικού οξέος παρουσιάζει μεγαλύτερη τάση προσέγγισης του ενεργού κέντρου του ενζύμου από το κατεχολικό σύστημα, καθώς οι προσδέσεις στο ενεργό κέντρο μέσω του καρβοξυλικού οξέος ήταν πιο συχνές από αυτές με το κατεχολικό σύστημα και είχαν καλύτερη βαθμολογία πρόσδεσης. Όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα, είναι δυνατή η πρόσδεση

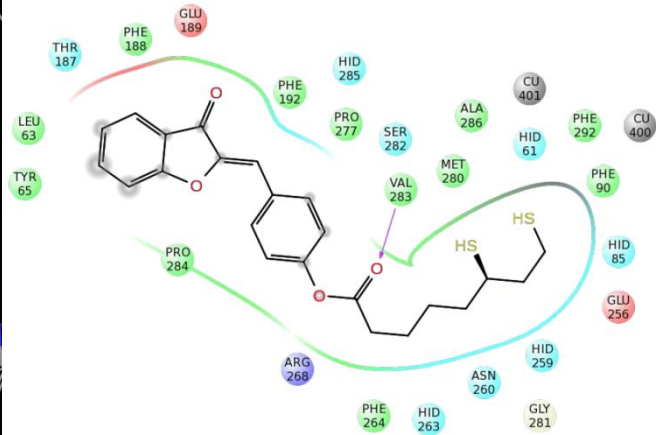
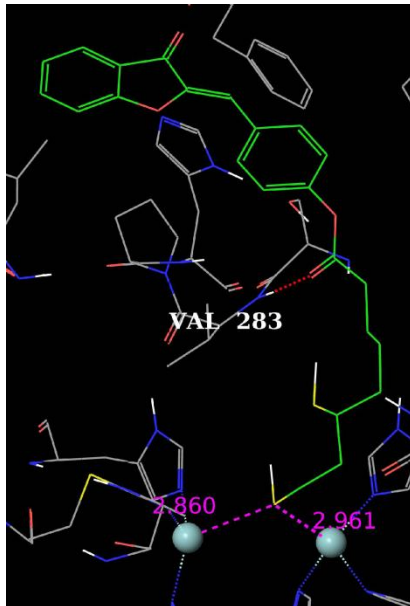


κάποιων από τα εξεταζόμενα ΦΜ σε απόσταση μικρότερη των 3Å, και συνεπώς μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκο με την τυροσινάση, πιθανότατα παρεμποδίζοντάς την. Οι δομές που παρουσίασαν την μεγαλύτερη ικανότητα πρόσδεσης ήταν τα **12d**, **4g**, **12g**, **11c** και **12b**.

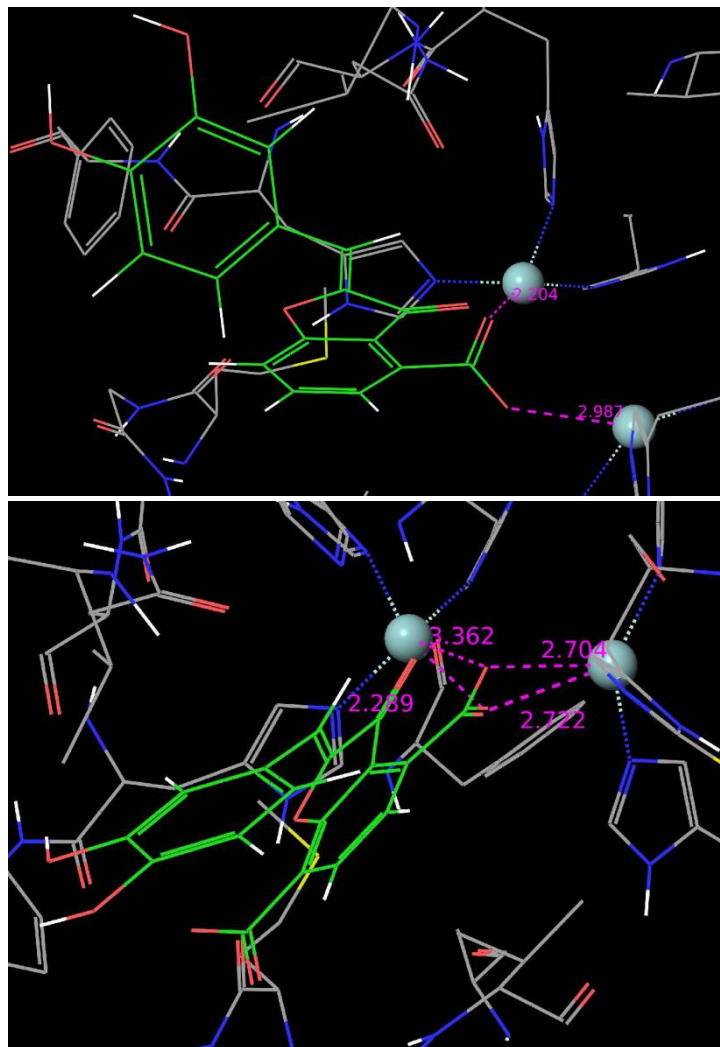
Πρέπει να σημειωθεί πως στα αποτελέσματα της μελέτης με τεχνική IFD, λόγω της επαγόμενης πρόσδεσης στην πρωτεΐνη, η απόσταση ανάμεσα στα ιόντα Cu παρουσίασε μια μικρή διακύμανση (όχι περισσότερο από  $\pm 0.3\text{\AA}$ ). Αυτή θεωρήθηκε αποδεκτή, στην βάση πως είναι βιβλιογραφικά γνωστό πως το ενεργό κέντρο της τυροσινάσης, όπως και κάθε ενζύμου, παρουσιάζει μια μικρή πλαστικότητα κατά την πρόσδεση.



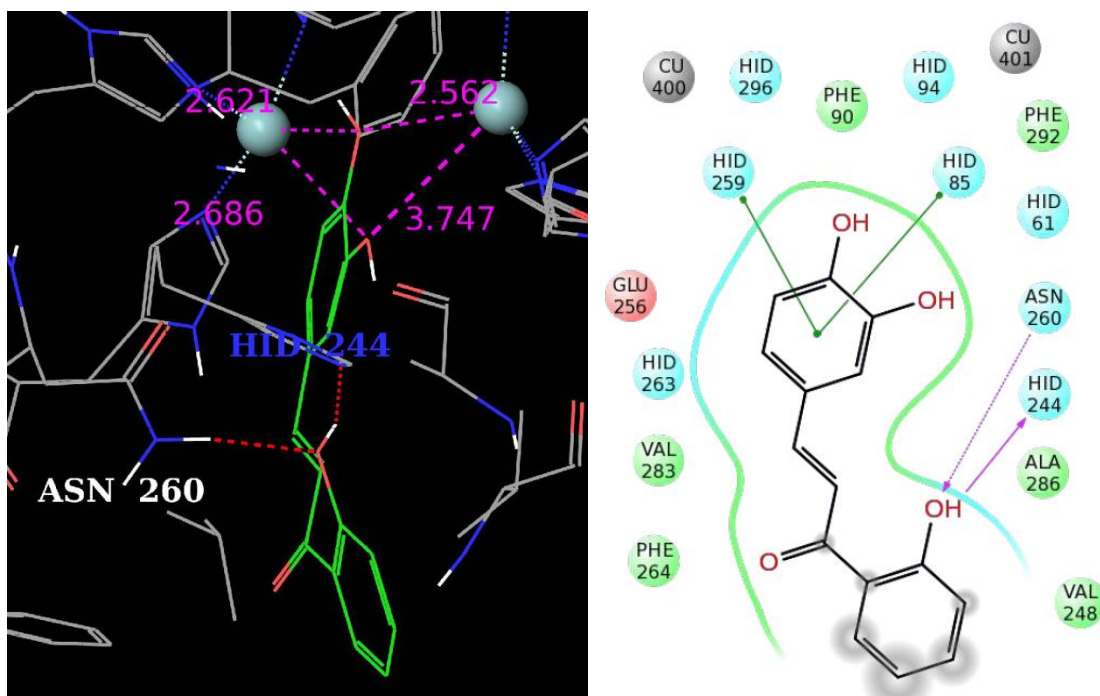
Εικόνα 81: Πρόσδεση της ένωσης **10x** στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Τρισδιάστατο μοντέλο και διάγραμμα αλληλεπιδράσεων. Τεχνική: IFD



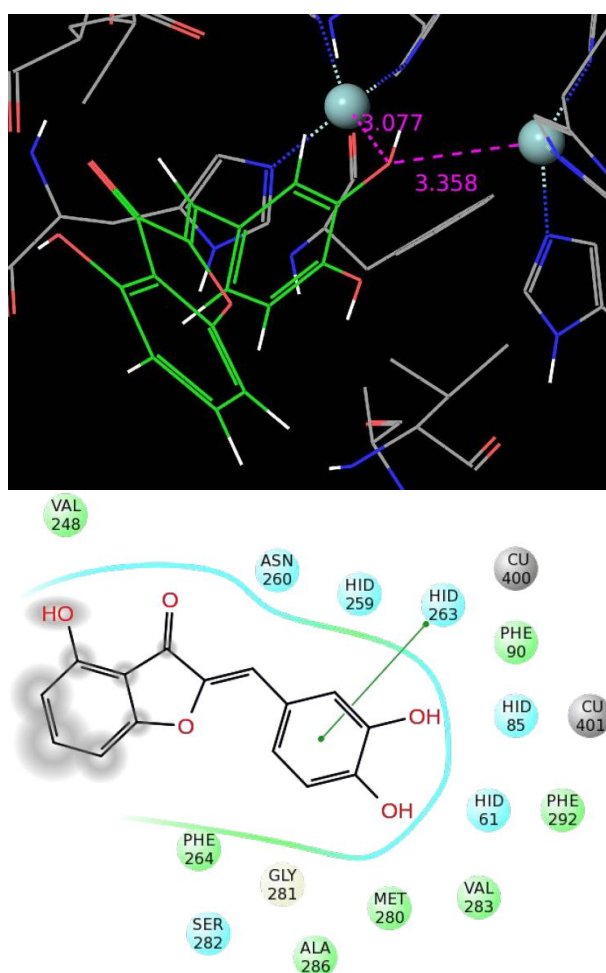
Εικόνα 82: Πρόσδεση της ένωσης **10a** στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Τρισδιάστατο μοντέλο και διάγραμμα αλληλεπιδράσεων. Τεχνική: IFD



Εικόνες 83-84: Πόζες πρόσδεσης της ένωσης **12d** στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X, η άνω έχει καλύτερο σκορ πρόσδεσης από την κάτω, Τεχνική: QPLD



Εικόνα 85: Πρόσδεση της ένωσης **9b** στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Τρισδιάστατο μοντέλο και διάγραμμα αλληλεπιδράσεων. Τεχνική: IFD



Εικόνα 86: Πρόσδεση της ένωσης **12b** στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Τρισδιάστατο μοντέλο και διάγραμμα αλληλεπιδράσεων. Τεχνική: QPLD

## 6.4. Αναλυτικοί πίνακες αποτελεσμάτων *in silico* μελετών

### 6.4.1. Εισαγωγή – επεξηγηματικό υπόμνημα

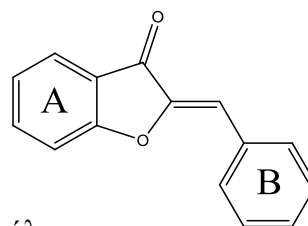
Κατωτέρω, χάριν πληρότητας, παρατίθενται πίνακες που περιέχουν αναλυτικά αποτελέσματα πρόσδεσης στα τρία διαφορετικά είδη πρωτεϊνών τυροσινάσης.

Σημειώνεται πως στις περισσότερες περιπτώσεις κάθε μόριο που εξετάστηκε παρήγαγε πολλές πόζες πρόσδεσης. Από αυτές θα παρατεθούν μια ή δύο καλύτερες/πιο ενδιαφέρουσες ανά μέθοδο. Επίσης, στις περισσότερες περιπτώσεις θα παραλειφθούν τα αποτελέσματα από μελέτες SP, εκτός και αν δεν υπάρχουν αποτελέσματα μεγαλύτερης ακρίβειας.

Όσον αφορά την ανάγνωση των πινάκων, ισχύουν οι εξής συμβολισμοί:

- **OXI:** Αν σε κάποια γραμμή αναγράφεται η λέξη OXI, τότε ισχύει ένα εκ' των ακόλουθων:
  - α) η ένωση δεν υποβλήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη ή
  - β) η ένωση υποβλήθηκε σε μελέτη αλλά δεν παρήχθησαν πόζες
- **Mol.:** Το εξεταζόμενο μόριο
- **Meth.:** Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για να ληφθούν τα αποτελέσματα: XP: docking-extra precision, QPLD: Quantum-mechanics Polarized Ligand Docking, IFD: Induced-Fit Docking
- **GSc (Glide Score), GEm (Glide Emodel):** Μέθοδοι βαθμολόγησης πρόσδεσης / προσεγγίσεις ενέργειας πρόσδεσης του εξεταζόμενου μορίου στην πρωτεΐνη (σε kcal/mol).
- **Cu B.:** Στο Cu B. σημειώνεται ποιιά ομάδα (με κωδικό αριθμό) του εξεταζόμενου μορίου προσεγγίζει περισσότερο τα ιόντα Cu,
- **Dist.:** Στο Dist. αναγράφεται η μέση απόσταση της προαναφερθείσας ομάδας από τα δύο ιόντα Cu, σε Å, στρογγυλοποιημένη στο ένα δεκαδικό, ή σπανιότερα σε δύο. Αν πρόκειται περί 2 αριθμών, λ.χ. A/B, τότε έκαστος αριθμός συμβολίζει την απόσταση της ομάδας από ένα εκ των δύο ιόντων.
  - Ειδικότερα, αν στο Cu B. υπάρχει ένδειξη 1 (κατεχολικό σύστημα), τότε ισχύουν τα εξής: Αν πρόκειται περί 2 αριθμών, λ.χ. A/B ή A/B (OH1/OH2), τότε έκαστος αριθμός συμβολίζει την μέση απόσταση εκάστου υδροξυλίου από τα δύο ιόντα Cu. Αν υπάρχουν δύο αριθμοί, μαζί με την ένδειξη (OH1), τότε έκαστος αριθμός συμβολίζει την απόσταση του ενός από τα κατεχολικά υδροξυλία από ένα εκ των δύο ιόντων. Αν υπάρχουν δύο αριθμοί, μαζί με την ένδειξη (CU1/CU2), τότε έκαστος αριθμός συμβολίζει την μέση απόσταση και των δύο κατεχολικών υδροξυλίων από έκαστο εκ των δύο ιόντων.
  - Αν η απόσταση είναι τέτοια που θεωρείται πως μπορεί να οδηγήσει σε ισχυρή πρόσδεση (μικρότερη των ή κοντά στα 3 Å), τότε η απόσταση αναγράφεται με bold.
- **H-bond:** Αναγράφονται οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζει το εξεταζόμενο μόριο. Αναγράφεται το αμινοξύ (ή, ειδικά για την 3NM8, το νερό, ως "H<sub>2</sub>O", ανάμεσα στα ιόντα Cu) και η ομάδα του μορίου (με κωδικό αριθμό) που σχηματίζουν δεσμό H. Δεν αναγράφεται ποιός είναι δότης και ποιός είναι δέκτης.
- **Other:** Αναγράφονται τυχόν άλλες αλληλεπιδράσεις που γίνονται μεταξύ πρωτεΐνης και προσδέτη. Αναγράφεται ο τύπος τους καθώς και τα αμινοξέα και τα τμήματα του ΦΜ που συμμετέχουν.
  - Τύποι αλληλεπιδράσεων: Pi-Pi: αλληλεπιδράσεις π-π (*pi-pi stacking interactions*), Pi-cat: αλληλεπιδράσεις π ηλεκτρονίων με κατιόν (*pi-cation interactions*).

- Δεν αναγράφονται δεσμοί μεταξύ μετάλλων και προσδέτη (τυπικά εμφανίζονται σε Dist.<2.6).
- Κωδικοί ομάδων/τμημάτων των ΦΜ:
  - Δακτύλιοι: 1<sup>st</sup>: A δακτύλιος, 2<sup>nd</sup>: B δακτύλιος (π.χ. στο **5b**, ο δακτύλιος 2<sup>nd</sup> είναι αυτός που έχει το κατεχολικό σύστημα).



- Ομάδες:
  - (0) Αμινομάδα στο δακτύλιο B (π.χ. **12f**)
  - (1) Κατεχολικό σύστημα στο δακτύλιο B (π.χ. **5b**)
  - (2) Καρβοξυλικό οξύ στο δακτύλιο A (π.χ. **12d**)
  - (3) Καρβονυλικό Οξυγόνο στον ετεροκυκλικό δακτύλιο
  - (4) Άτομα S συνδεδεμένα μεταξύ τους με δισουλφιδικό δεσμό (π.χ. **7a**)
  - (5) Ομάδα S-H (π.χ. **10a**)
  - (6) Οξυγόνο ετεροκυκλικού δακτυλίου
  - (7) Φαινολικό στο δακτύλιο B (π.χ. **5a**)
  - (8) Οξυγόνο συνδεδεμένο με διπλό δεσμό (ομάδα λιποϊκού οξέος) (π.χ. **7a**)
  - (9) Καρβονυλικό Οξυγόνο (ομάδα λιποϊκού οξέος) (π.χ. **7a**)
  - (10) Μεθόξυ ομάδα (συνήθως “κατεχολικού” συστήματος) (π.χ. **4b**)
  - (11) Φαινολικό OH στο δακτύλιο A (π.χ. **12b**)
  - (12) Καρβοξυλικό οξύ στο δακτύλιο B (π.χ. **4g**)
  - (13) Εστέρας (συνήθως το οξυγόνο με διπλό δεσμό του εστέρα) στο δακτύλιο A (π.χ. **11c**)
  - (14) Εστέρας (συνήθως το οξυγόνο με διπλό δεσμό του εστέρα) στο δακτύλιο B (π.χ. **11a**)
  - (15) Κατεχολικό σύστημα στο δακτύλιο A (π.χ. **11e**)

#### 6.4.2. Αναλυτικά αποτελέσματα *in silico* μελετών πρόσδεσης

**Πίνακας 25:** Αποτελέσματα *in silico* μελετών πρόσδεσης μορίων στην 1WX2

Mol.	Meth.	GSc	GEm	Cu B.	Dist.	H-bond	Other
<b>4a</b>	XP	-3,167	-33,898	6	4,40	ARG55 & 2 <sup>nd</sup>	
<b>4b</b>	XP	-4,227	-37,095	6	7,40	GLY 204 & 10	Pi-Pi: HID194 & 1 <sup>st</sup>
<b>4c</b>	XP	-3,827	-35,581	3	6,90	ASN 191 & 10	Pi-Pi: HID194 & 1 <sup>st</sup>
<b>5a</b>	XP	-4,198	-39,091	7	4,65	SER206 & 7 THR203 & 7	Pi-Pi: HID194 & 2 <sup>nd</sup>
<b>5b</b>	XP	-5,259	-36,983	1	5,00	ASN 191 & 1 ASN 191 & 1	Pi-Pi: TRP184 & 2 <sup>nd</sup>
<b>5c</b>	XP	-5,423	-34,840	1	4,60	ALA202 & 1 ALA202 & 1	Pi-Pi: TRP184 & 1 <sup>st</sup> Pi-Pi: HID54 & 1 <sup>st</sup>
<b>7a</b>	XP	-4,851	-42,853	4	7,30	ARG55 & 8 ARG55 & 9 GLY 204 & 3	
<b>7x</b>	XP	-5,180	-66,244	4	4,90	ARG181 & 3 ASN188 & 9 ASN191 & 8	Pi-Pi: TRP184 & 1 <sup>st</sup>
<b>7x</b>	XP	-4,094	-54,593	3	4,10	ARG55 & 2 <sup>nd</sup>	Pi-Pi: HID194 & 1 <sup>st</sup> Pi-Pi: TRP184 & 1 <sup>st</sup>
<b>7b</b>	XP	-4,631	-66,895	3	5,10		Pi-Pi: HID54 & 1 <sup>st</sup>
<b>7b</b>	XP	-2,807	-71,003	4	4,20		

**Πίνακας 26:** Αποτελέσματα *in silico* μελετών πρόσδεσης μορίων στην 3NM8

Mol.	Meth.	GSc	GEm	Cu B.	Dist.	H-bond	Other
4a	XP	-2,263	-38,995	3	5,30	ASN 205 & 3	Pi-Pi: HID208 & 1 <sup>st</sup>
4a	QLPD	-2,074	-31,676	3	5,40	ASN 205 & 3	Pi-Pi: HID208 & 2 <sup>nd</sup>
4a	IFD	OXI- $\alpha$					
4b	XP	-2,458	-39,852	3	5,30	ASN205 & 3	Pi-Pi: HID208 & 1 <sup>st</sup>
4b	QLPD	-2,419	-40,315	3	5,30	ASN 205 & 3	
4b	IFD	OXI- $\alpha$					
4c	XP	-2,612	-42,731	3	5,70	ASN205 & 3	Pi-Pi: HID208 & 1 <sup>st</sup>
4c	QLPD	-2,874	-41,817	10	5,20	VAL218 & 6 ASN205 & 10	
4c	IFD	OXI- $\alpha$					
4g	XP	-8,906	-52,854	12	<b>2,3/3,2</b>	H <sub>2</sub> O & 12	
4g	QLPD	-9,193	-50,181	12	<b>2,2/3,1</b>	H <sub>2</sub> O & 12	
5a	XP	-3,594	-31,083	7	<b>3,00</b>	ARG209 & 3	Pi-Pi: HID208 & 1 <sup>st</sup> Pi-Pi: HID204 & 1 <sup>st</sup>
5a	XP	-3,140	-43,865	7	<b>2,70</b>	H <sub>2</sub> O & 1	
5a	QLPD	-3,117	-43,499	7	<b>2,80</b>	H <sub>2</sub> O & 1	Pi-Pi: HID204 & 2 <sup>nd</sup>
5a	IFD	-3,487	-32,119	7	<b>2,78</b>	HID208 & 7	Pi-Pi: HID208 & 2 <sup>nd</sup>
5b	XP	-5,406	-51,587	1	<b>2,70</b>	ARG209 & 3 H <sub>2</sub> O & 1	
5b	QLPD	-4,736	-34,083	1	<b>2,60</b>	H <sub>2</sub> O & 1 ARG209 & 3	Pi-Pi: HID208 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: PHE197 & 1 <sup>st</sup>
5b	IFD	-5,664	-36,680	1	<b>2,4/3,5</b>	ARG209 & 3 H <sub>2</sub> O & 1	Pi-Pi: HID208 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: PHE197 & 1 <sup>st</sup>
5c	XP	-4,612	-43,411	1	5,70		Pi-Pi: HID208 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: HID204 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: PHE197 & 1 <sup>st</sup>
5c	QLPD	-3,627	-21,883	7	3,50	VAL218 & 6 GLY216 & 1	
5c	IFD	-6,276	-55,144	1	<b>2,80</b>	ARG209 & 3 H <sub>2</sub> O & 1 ASN208 & 1	Pi-Pi: HID208 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: PHE197 & 1 <sup>st</sup>
7a	XP	-3,902	-56,791	4	<b>3,00</b>	ARG209 & 9	
7a	QLPD	-3,002	-46,417	4	<b>3,30</b>	ARG209 & 9	
7a	IFD	OXI- $\alpha$					
7x	XP	-4,193	-79,866	3	5,10	ASN205 & 3 ARG209 & 9	Pi-Pi: HID208 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: HID204 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: PHE197 & 1 <sup>st</sup>
7x	QLPD	-5,865	-70,811	3	9,70	ARG209 & 8 THR158 & 9	Pi-cat: ARG 209 & 2 <sup>nd</sup>
7x	QLPD	-3,376	-68,612	3	5,40	ASN205 & 3	Pi-Pi: HID208 & 1 <sup>st</sup>
7x	IFD	OXI- $\alpha$					
7b	XP	-4,104	-81,978	3	5,30	ASN205 & 3	Pi-Pi: HID208 & 1 <sup>st</sup>
7b	QLPD	-4,071	-64,396	3	5,30	ASN205 & 3	Pi-Pi: HID208 & 1 <sup>st</sup>
7b	IFD	OXI- $\alpha$					

**Πίνακας 27:** Αποτελέσματα *in silico* μελετών πρόσδεσης μορίων στην 2Y9X

Mol.	Meth.	GSc	GEm	Cu B.	Dist.	H-bond	Other
4a	QLPD	-3,362	-38,574	10	4,00		
4a	IFD	-4,408	-37,652	10	<b>2,8/4,6</b>	VAL283 & 6	Pi-cat: ARG268 & 1 <sup>st</sup>
4b	QLPD	-3,883	-39,662	10	3,80		
4b	IFD	-5,118	-41,318	10	4,10	VAL283 & 3	Pi-Pi: HID263 & 1 <sup>st</sup> Pi-Pi: HID259 & 1 <sup>st</sup> Pi-Pi: HID85 & 1 <sup>st</sup>
4c	QLPD	-3,453	-39,968	10	<b>2,9/4,5</b>		Pi-Pi: HID263 & 2 <sup>nd</sup>
4c	IFD	-4,006	-43,125	6	5,60	VAL283 & 10	Pi-Pi: HID85 & 1 <sup>st</sup> Pi-Pi: HID259 & 1 <sup>st</sup> Pi-Pi: PHE264 & 2 <sup>nd</sup>
4g	XP	-6,772	-27,112	12	<b>2,60</b>	VAL283 & 3	
4g	QLPD	-5,998	-38,102	12	<b>2,1/3,9</b>		
5a	QLPD	-3,596	-24,733	11	3,75		
5a	IFD	-5,333	-49,368	3	<b>2,70</b>		Pi-Pi: HID263 & 1 <sup>st</sup> Pi-Pi: HID244 & 2 <sup>nd</sup>
5b	QLPD	-4,358	-42,382	1	3,3/4,2		Pi-Pi: HID244 & 1 <sup>st</sup> Pi-Pi: HID263 & 2 <sup>nd</sup>
5b	IFD	-4,903	-48,653	1	<b>2,6/4,4 (OH1/OH2)</b>	ASN260 & 1	
5b	IFD	-6,289	-41,656	1	<b>2,6/3,8 (OH1)</b>	ASN260 & 1 VAL283 & 3	
5c	QLPD	-4,263	-47,057	1	3,1/4,8		Pi-Pi: HID263 & 2 <sup>nd</sup>
5c	IFD	-5,834	-43,064	1	3,20	VAL283 & 6 ASN260 & 1	
7a	QLPD	-4,358	-55,225	4	4,30		Pi-Pi: HID285 & 1 <sup>st</sup> Pi-Pi: PHE192 & 1 <sup>st</sup>
7a	QLPD	-4,735	-53,019	3	5,70	ARG268 & 8	Pi-Pi: HID263 & 1 <sup>st</sup> Pi-Pi: PHE264 & 2 <sup>nd</sup>
7a	IFD	-5,779	-70,290	4	3,10	ASN81 & 3 VAL283 & 8	
7x	QLPD	-5,944	-72,953	3	5,90	ARG268 & 8 ARG268 & 8	Pi-Pi: HID263 & 1 <sup>st</sup> Pi-Pi: PHE264 & 2 <sup>nd</sup>
7x	IFD	-6,757	-77,507	3	<b>3,00</b>	VAL283 & 8	Pi-Pi: HID263 & 1 <sup>st</sup> Pi-Pi: HID244 & 2 <sup>nd</sup>
7x	IFD	-8,208	-97,532	4	3,20	VAL283 & 8 HID85 & 3	
7b	QLPD	-5,224	-80,607	3	6,00		Pi-Pi: HID263 & 1 <sup>st</sup> Pi-Pi: PHE264 & 2 <sup>nd</sup> Pi-cat: ARG268 & 2 <sup>nd</sup>
7b	IFD	-6,207	-98,534	4	<b>2,80</b>	ASN260 & 8	

**Πίνακας 28:** Αποτελέσματα *in silico* μελετών πρόσδεσης προτεινόμενων μορίων στην 1WX2

Mol.	Meth.	GSc	GEm	Cu B.	Dist.	H-bond	Other
9a	XP	-5,045	-41,973	3	6,00	ARG55 & 7 ILE42 & 7 ALA202 & 11	Pi-Pi: TRP184 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: HID54 & 2 <sup>nd</sup> Pi-cat: ARG55 & 2 <sup>nd</sup>
9a	XP	-5,015	-40,530	11/3	4,4/4,6	ASN 191 & 11 ASP45 & 7	Pi-Pi: TRP184 & 2 <sup>nd</sup> Pi-cat: ARG55 & 2 <sup>nd</sup>
9b	XP	-5,433	-49,127	3	3,80	ASP45 & 1 ARG55 & 1	Pi-cat: ARG55 & 2 <sup>nd</sup>
9c	XP	-6,514	-46,380	1	5,80	ASN 191 & 1 ARG55 & 3 ASP45 & 11	Pi-Pi: TRP194 & 2 <sup>nd</sup>
10a	SP	-4,192	-49,355	3	6,90		
10x	SP	-4,693	-62,572	5	4,80	GLY 204 & 8	
10x	SP	-5,387	-70,346	3	6,20	ASN 191 & 8	Pi-Pi: HID194 & 1 <sup>st</sup>
10b	SP	-5,493	-65,680	5	4,60	GLY 204 & 8	
12a	XP	-3,800	-36,413	3	4,40		Pi-cat: ARG55 & 2 <sup>nd</sup>
12a	QPLD	OXI- $\alpha$					
12b	XP	-6,078	-43,694	7	6,70	ARG55 & 1 ASP45 & 1	Pi-Pi: HID194 & 1 <sup>st</sup>
12b	QPLD	-5,769	-43,747	3	6,40	ARG55 & 1 ASP45 & 1	Pi-Pi: HID194 & 1 <sup>st</sup>
12c	XP	-6,030	-42,701	3	6,00	ARG55 & 11 ASP45 & 11 ALA202 & 1	Pi-cat: ARG55 & 2 <sup>nd</sup>
12c	XP	-5,531	-47,238	1	3,60	ARG55 & 11 ASP45 & 11 THR203 & 1	
12c	QPLD	-5,425	-38,829	1	4,00	SER206 & 1 THR203 & 1 ALA202 & 11	Pi-Pi: HID194 & 2 <sup>nd</sup>
12d	XP	-5,057	-41,191	1	3,80	THR203 & 1	Pi-Pi: HID194 & 1 <sup>st</sup>
12d	QPLD	-4,761	-40,669	1	4,10	THR203 & 1	Pi-Pi: HID194 & 2 <sup>nd</sup>
12d	QPLD	-5,333	-36,991	2	4,00	ASN 191 & 1 SER206 & 2	Pi-Pi: HID190 & 1 <sup>st</sup>
12e	XP	-7,110	-76,271	1	3,80	THR203 & 1	Pi-Pi: HID194 & 1 <sup>st</sup> Pi-Pi: TRP184 & 2 <sup>nd</sup>
12e	QPLD	OXI- $\alpha$					
12f	XP	-4,612	-33,931	0	4,50	THR203 & 0 ALA202 & 0	
12f	QPLD	OXI- $\alpha$					
12g	XP	-5,556	-40,990	1	5,30	ARG55 & 12 ASN 191 & 1	Pi-Pi: HID194 & 1 <sup>st</sup>
12g	QPLD	-4,170	-38,161	1	4,00	SER206 & 1 THR203 & 1	Pi-Pi: TRP184 & 1 <sup>st</sup> Pi-Pi: HID194 & 2 <sup>nd</sup>



**Πίνακας 29:** Αποτελέσματα *in silico* μελετών πρόσδεσης προτεινόμενων μορίων στην 3NM8

Mol.	Meth.	GSc	GEm	Cu B.	Dist.	H-bond	Other
<b>9a</b>	XP	-3,604	-40,374	11	<b>2,70</b>	H <sub>2</sub> O & 11	
<b>9a</b>	XP	-4,079	-41,939	7	<b>3,00</b>	ARG209 & 3	Pi-Pi: HID208 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: HID204 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: PHE197 & 1 <sup>st</sup>
<b>9b</b>	XP	-5,989	-51,103	1	<b>2,4/3,2</b>	ARG209 & 3	Pi-Pi: PHE197 & 1 <sup>st</sup>
<b>9c</b>	XP	-5,177	-45,333	1	<b>2,80</b>	H <sub>2</sub> O & 1 HID208 & 1	Pi-cat: ARG55 & 1 <sup>st</sup>
<b>10a</b>	XP	-3,294	-50,535	3	5,30	ARG209 & 8 ASN205 & 3	Pi-Pi: HID208 & 1 <sup>st</sup>
<b>10a</b>	IFD	OXI-α					
<b>10x</b>	XP	-5,040	-63,082	5	3,50		
<b>10x</b>	XP	-4,763	-66,535	6	7,60	ARG209 & 8	Pi-cat: ARG209 & 2 <sup>nd</sup>
<b>10x</b>	IFD	OXI-α					
<b>10b</b>	XP	-5,120	-77,627	3	6,00	ASN205 & 3	Pi-Pi: HID208 & 1 <sup>st</sup>
<b>10b</b>	QLPD	-3,907	-63,857	5	<b>2,6/3,9</b>		
<b>10b</b>	QLPD	-4,080	-64,982	3	5,30		Pi-Pi: HID208 & 1 <sup>st</sup>
<b>10b</b>	IFD	-7,482	-66,728	5	<b>3,05</b>	VAL218 & 8	
<b>10b</b>	IFD	-8,284	-76,658	5	4,35	VAL218 & 8	Pi-Pi: HID60 & 2 <sup>nd</sup>
<b>11a</b>	XP	-2,631	-35,855	3	7,40		Pi-Pi: HID204 & 1 <sup>st</sup>
<b>11a</b>	QLPD	-3,975	-51,362	14	<b>2,80</b>	H <sub>2</sub> O & 14	
<b>11b</b>	XP	-3,664	-40,489	11	<b>2,70</b>	H <sub>2</sub> O & 11 ASN205 & 3	Pi-Pi: HID208 & 1 <sup>st</sup>
<b>11b</b>	QLPD	-3,858	-36,504	11	<b>2,5/3,9</b>	H <sub>2</sub> O & 11 ARG209 & 3	Pi-Pi: HID208 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: HID204 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: PHE197 & 1 <sup>st</sup>
<b>11c</b>	XP	-6,177	-54,425	1	<b>2,4/3,3</b> (CU1/CU2)	H <sub>2</sub> O & 1 ARG209 & 3 ARG209 & 13	Pi-Pi: HID208 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: HID204 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: PHE197 & 1 <sup>st</sup>
<b>11c</b>	QLPD	-5,595	-45,459	1	<b>2,6/3,5</b> (CU1/CU2)	H <sub>2</sub> O & 1 ARG209 & 3 ARG209 & 13	Pi-Pi: HID208 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: HID204 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: PHE197 & 1 <sup>st</sup>
<b>11d</b>	XP	-5,373	-53,546	1	<b>2,4/3,3</b> (CU1/CU2)	H <sub>2</sub> O & 1 ARG209 & 3	Pi-Pi: HID208 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: HID204 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: PHE197 & 1 <sup>st</sup>
<b>11d</b>	QLPD	-4,773	-36,686	1	<b>2,5/3,4</b> (CU1/CU2)	H <sub>2</sub> O & 1 ARG209 & 3	Pi-Pi: HID208 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: HID204 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: PHE197 & 1 <sup>st</sup>
<b>11e</b>	XP	-5,954	-54,724	1	<b>2,4/3,3</b> (CU1/CU2)	H <sub>2</sub> O & 1 ARG209 & 3	Pi-Pi: HID208 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: HID204 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: PHE197 & 1 <sup>st</sup>
<b>11e</b>	QLPD	-5,329	-36,409	1	<b>2,5/3,4</b> (CU1/CU2)	H <sub>2</sub> O & 1 ARG209 & 3	Pi-Pi: HID208 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: HID204 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: PHE197 & 1 <sup>st</sup>
<b>11f</b>	XP	-6,006	-51,811	1	<b>2,4/3,3</b> (CU1/CU2)	H <sub>2</sub> O & 1 ARG209 & 3	Pi-Pi: HID208 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: HID204 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: PHE197 & 1 <sup>st</sup>
<b>11f</b>	QLPD	-5,328	-35,474	1	<b>2,5/3,4</b> (CU1/CU2)	H <sub>2</sub> O & 1 ARG209 & 3	Pi-Pi: HID208 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: HID204 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: PHE197 & 1 <sup>st</sup>

**Πίνακας 29-συνέχεια:** Αποτελέσματα *in silico* μελετών πρόσδεσης προτεινόμενων μορίων στην 3NM8

Mol.	Meth.	GSc	GEm	Cu B.	Dist.	H-bond	Other
12a	XP	-2,157	-38,167	3	5,30	ASN205 & 3	Pi-Pi: HID208 & 1 <sup>st</sup>
12a	QLPD	OXI-α					
12b	XP	-5,963	-44,609	1	<b>2,5/3,2</b>	ARG209 & 3 H <sub>2</sub> O & 1	Pi-Pi: HID208 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: HID208 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: PHE197 & 1 <sup>st</sup>
12b	QLPD	-5,094	-40,469	1	<b>2,7/3,4</b>	ARG209 & 3 H <sub>2</sub> O & 1	Pi-Pi: HID208 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: HID208 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: PHE197 & 1 <sup>st</sup>
12c	XP	-5,786	-54,261	1	<b>2,5/3,2</b>	ARG209 & 3 H <sub>2</sub> O & 1	Pi-Pi: HID208 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: HID208 & 2 <sup>nd</sup>
12c	QLPD	-5,068	-45,176	1	<b>2,6/3,3</b>	ARG209 & 3 H <sub>2</sub> O & 1	Pi-Pi: HID208 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: HID208 & 2 <sup>nd</sup>
12d	XP	-6,023	-44,285	1	<b>2,3/3,5 (OH1)</b>	MET215 & 1 ARG209 & 3 ARG209 & 2	Pi-Pi: HID208 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: HID208 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: PHE197 & 1 <sup>st</sup>
12d	QLPD	-7,416	-39,225	2	<b>2,3/3,5</b>	GLU158 & 1 H <sub>2</sub> O & 2	
12d	QLPD	-5,734	-44,559	1	<b>2,3/3,6 (OH1)</b>	MET215 & 1 ARG209 & 3 ARG209 & 2	Pi-Pi: HID208 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: HID208 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: PHE197 & 1 <sup>st</sup>
12e	XP	-4,202	-77,257	1	3,1/3,5	H <sub>2</sub> O & 1	Pi-Pi: HID208 & 2 <sup>nd</sup>
12e	QLPD	OXI-β					
12f	XP	-2,191	-41,018	3	5,30	ASN205 & 3	Pi-Pi: HID208 & 1 <sup>st</sup>
12f	QLPD	OXI-α					
12g	XP	-5,728	-42,816	1	<b>2,5/3,1</b>	ARG209 & 3 ARG209 & 2	Pi-Pi: HID208 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: HID208 & 2 <sup>nd</sup>
12g	QLPD	-5,189	-49,380	1	<b>2,7/3,5</b>	ARG209 & 3 ARG209 & 2	Pi-Pi: HID208 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: HID208 & 2 <sup>nd</sup>

**Πίνακας 30:** Αποτελέσματα *in silico* μελετών πρόσδεσης προτεινόμενων μορίων στην 2Y9X

Mol.	Meth.	GSc	GEm	Cu B.	Dist.	H-bond	Other
9a	QLPD	-3,155	-36,308	7	3,80	HID244 & 11	Pi-Pi: HID244 & 1 <sup>st</sup> Pi-Pi: HID259 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: HID85 & 2 <sup>nd</sup>
9a	IFD	-4,950	-39,432	7	<b>2,45</b>	VAL283 & 3	Pi-Pi: HID263 & 1 <sup>st</sup> Pi-Pi: HID259 & 1 <sup>st</sup> Pi-Pi: HID85 & 1 <sup>st</sup> Pi-Pi: PHE264 & 2 <sup>nd</sup>
9b	QLPD	-4,072	-40,762	1	3,20	HID85 & 1	Pi-Pi: HID263 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: PHE264 & 1 <sup>st</sup>
9b	IFD	-5,309	-47,441	1	<b>2,90</b>	HID244 & 11 ASN260 & 11	Pi-Pi: HID259 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: HID85 & 2 <sup>nd</sup>
9c	QLPD	-5,152	-45,848	1	<b>3,00</b>	ASN260 & 1 HID244 & 11	Pi-Pi: HID244 & 1 <sup>st</sup> Pi-Pi: HID263 & 2 <sup>nd</sup>
9c	IFD	-6,182	-48,248	1	<b>2,90</b>	ASN260 & 1 HID244 & 11	Pi-Pi: HID244 & 1 <sup>st</sup> Pi-Pi: HID263 & 2 <sup>nd</sup>
10a	QLPD	-2,559	-57,349	5	<b>2,91</b>		Pi-Pi: TYR65 & 1 <sup>st</sup>
10a	IFD	-6,730	-66,461	5	<b>2,90</b>	VAL283 & 8	
10x	QLPD	-6,540	-83,655	5	<b>2,40</b>	VAL283 & 8	
10x	IFD	-6,937	-85,564	5	<b>2,80</b>	VAL283 & 8	
10b	QLPD	-3,208	-72,897	5	<b>2,75</b>		Pi-Pi: HID285 & 1 <sup>st</sup>
10b	IFD	-6,710	-97,753	5	3,10	VAL283 & 8	

**Πίνακας 30-συνέχεια:** Αποτελέσματα *in silico* μελετών πρόσδεσης προτεινόμενων μορίων στην 2Y9X

Mol.	Meth.	GSc	GEm	Cu B.	Dist.	H-bond	Other
11a	XP	OXI-β					
11a	QLPD	OXI-β					
11b	XP	OXI-β					
11b	QLPD	OXI-β					
11c	XP	-5,892	-40,424	1	3,5 (OH1)	ASN260 & 1 VAL283 & 3 ARG268 & 13	
11c	QLPD	-5,603	-36,295	1	4,5/6,1 (CU1/CU2)	ASN260 & 1	Pi-Pi: PHE264 & 1 <sup>st</sup>
11d	XP	OXI-β					
11d	QLPD	OXI-β					
11e	XP	-6,577	-39,418	1	4,3/5,7 (CU1/CU2)	ASN260 & 1	Pi-Pi: PHE264 & 2 <sup>nd</sup>
11e	QLPD	-6,011	-36,646	1	4,5/6,0	ASN260 & 1	Pi-Pi: PHE264 & 1 <sup>st</sup>
11e	QLPD	-5,577	-40,217	15	<b>3,0/4,3</b> (OH1)	ASN260 & 15 GLY281 & 1	Pi-Pi: PHE264 & 2 <sup>nd</sup> Pi-cat: ARG268 & 2 <sup>nd</sup>
11f	XP	-4,132	-45,524	11	3,40	GLU322 & 1 GLU322 & 1	Pi-Pi: HID263 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: HID204 & 2 <sup>nd</sup> Pi-Pi: HID244 & 1 <sup>st</sup>
11f	QLPD	-6,135	-41,528	1	4,5/6,0	ASN260 & 1	Pi-Pi: PHE264 & 1 <sup>st</sup>
12a	XP	OXI-β					
12a	QLPD	OXI-β					
12b	XP	-6,169	-36,754	1	4,80	ASN260 & 1	Pi-Pi: PHE264 & 1 <sup>st</sup>
12b	XP	-4,876	-42,470	11	3,10		Pi-Pi: HID263 & 1 <sup>st</sup> Pi-Pi: PHE264 & 2 <sup>nd</sup>
12b	QLPD	-4,536	-40,646	1	3,1/4,3		Pi-Pi: HID263 & 2 <sup>nd</sup>
12c	XP	-6,194	-47,045	1	4,80	GLY281 & 11 ASN260 & 1	Pi-Pi: PHE264 & 1 <sup>st</sup> Pi-cat: ARG268 & 1 <sup>st</sup>
12c	QLPD	-5,951	-41,816	1	4,80	GLY281 & 11 ASN260 & 1	Pi-Pi: PHE264 & 1 <sup>st</sup> Pi-cat: ARG268 & 1 <sup>st</sup>
12d	XP	-7,604	-50,635	2	<b>2,90</b>		Pi-Pi: HID263 & 1 <sup>st</sup> Pi-Pi: PHE264 & 2 <sup>nd</sup>
12d	QLPD	-7,576	-45,438	2	<b>2,50</b>		Pi-Pi: HID263 & 1 <sup>st</sup> Pi-Pi: PHE264 & 2 <sup>nd</sup>
12e	XP	OXI-β					
12e	QLPD	OXI-β					
12f	XP	OXI-β					
12f	QLPD	OXI-β					
12g	XP	-5,222	-42,693	2	<b>2,70</b>		Pi-Pi: HID244 & 2 <sup>nd</sup>
12g	QLPD	-5,589	-37,384	2	<b>2,90</b>		Pi-Pi: HID244 & 2 <sup>nd</sup>

## 6.5. Συμπεράσματα

Από τις *in silico* μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε συνθετικά αλλά και προτεινόμενα μόρια έγινε δυνατή η εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την εξάρτηση της ικανότητας πρόσδεσης μιας ένωσης από τα χαρακτηριστικά της δομής της.

Σε γενικές γραμμές, τα βέλτιστα αποτελέσματα πρόσδεσης επετεύχθησαν μόνο όταν χρησιμοποιήθηκαν οι πρωτεΐνες 3NM8 και 2Y9X και όχι στην 1WX2. Η αδυναμία παραγωγής καλών αποτελεσμάτων πρόσδεσης οποιασδήποτε ένωσης στην 1WX2 μπορεί ίσως εν μέρει να εξηγηθεί από την δομή του ίδιου του ενζύμου όπως ελήφθη από την κρυσταλλογραφική βάση (RCSB PDB). Στην μορφή που παρέχεται, η δομή της 1WX2 περιέχει μια «συνοδό πρωτεΐνη» (caddie protein) η οποία τοποθετείται μπροστά από το ενεργό κέντρο και δρα ως «φύλακας», δηλαδή μετατοπίζεται από την θέση της όταν έρχεται κοντά στο ενεργό κέντρο κατάλληλο υπόστρωμα, αφήνοντάς το να προσεγγίσει το ενεργό κέντρο για την διεξαγωγή της καταλυτικής δράσης της τυροσινάσης [56]. Καθώς ακριβής ο τρόπος μετακίνησης της πρωτεΐνης αυτής είναι προς το παρόν άγνωστος, αλλά και το υπολογιστικό κόστος προσομοίωσης μιας τέτοιας μετακίνησης είναι μεγάλο, αποφασίστηκε η αφαίρεσή της από την δομή του μορίου. Πιστεύεται όμως πως ταυτόχρονα με αυτήν την μετακίνηση της caddie protein μετακινούνται ταυτόχρονα και αμινοξέα κοντά στο ενεργό κέντρο ούτως ώστε να κάνουν το ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 1WX2 πιο εύκολα προσβάσιμο από μόρια υποστρώματος. Καθώς αυτές οι μετακινήσεις αμινοξέων είναι άγνωστες, πιστεύεται πως η μη επίτευξη καλών αποτελεσμάτων πρόσδεσης οφείλεται στο γεγονός πως οι *in silico* μελέτες έγιναν σε λανθασμένη μορφή της πρωτεΐνης, αφ' ενός χωρίς την caddie protein να αποτελεί εμπόδιο για την πρόσβαση στο ενεργό κέντρο αλλά με λανθασμένη χωρική διαμόρφωση της περιοχής ενεργού κέντρου. Για αυτόν τον λόγο εξετάστηκε μικρότερος αριθμός δομών στην 1WX2 απ' ότι στις 3NM8 και 2Y9X.

Η χρήση των 3NM8 και 2Y9X ως πιθανών δομών έδωσε σε μεγάλο βαθμό παρόμοια αποτελέσματα. Παρατηρήθηκε οι ενώσεις που παρουσιάζουν κατεχολικό σύστημα στον Β δακτύλιο να παρουσιάζουν ισχυρή τάση πρόσδεσης, αλλά η ομάδα του καρβοξυλικού οξέος παρουσίασε ακόμα μεγαλύτερη τάση προσέγγισης του ενεργού κέντρου του ενζύμου, δηλαδή οι προσδέσεις στο ενεργό κέντρο μέσω αυτής της ομάδας παράγονταν πιο συχνά και είχαν καλύτερη βαθμολογία πρόσδεσης. Επίσης, παρατηρήθηκε πως, σε γενικές γραμμές οι χαλκόνες είχαν καλύτερα αποτελέσματα πρόσδεσης από τις αντίστοιχες ωρόνες τους, πιθανότατα λόγω της μεγαλύτερης ευκαμψίας που παρουσιάζουν τα μόριά τους.

Επιπροσθέτως, παρατηρήθηκε πως ενώ συνήθως οι ομάδες που περιέχονται στον Β δακτύλιο μιας ωρόνης παίζουν κυριότερο ρόλο στον τρόπο πρόσδεσης αυτής στην τυροσινάση, εισαγωγή ομάδας καρβοξυλικού ως υποκαταστάτη στον Α δακτύλιο οδηγεί σε αποτελέσματα πρόσδεσης στα οποία η ένωση σε όλες τις παραγόμενες πόζες στρέφει τον Α δακτύλιο αντί του Β προς το ενεργό κέντρο, ακόμα και αν στον Β δακτύλιο υπάρχει κατεχολικό σύστημα, το οποίο οδηγεί σε καλή πόζα πρόσδεσης. Από το ανωτέρω συμπεραίνεται η σημασία που ίσως έχει η καρβοξυλομάδα ως υποκαταστάτης σε ωρόνες ή χαλκόνες με σκοπό την αναστολή της τυροσινάσης.

## 7. *In vitro* αξιολόγηση βιολογικής δράσης των νέων ενώσεων

### 7.1. Αντιοξειδωτική δράση νέων ενώσεων

#### 7.1.1. Εισαγωγή

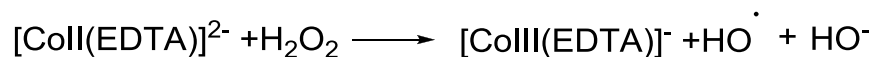
Σε αυτό το στάδιο αξιολόγησης της δράσης των νέων ενώσεων μελετήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των ωρονών **5a-c** με δύο διαφορετικούς τρόπους. Κατά πρώτον μέσω μέτρησης της ικανότητας δέσμευσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου με χρήση της μεθόδου της χημειοφωταύγειας της λουμινόλης και κατά δεύτερον μέσω μέτρησης της ικανότητας δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH. Τα πειράματα αυτά διεξήχθησαν στο Τμήμα Ποιότητας Τροφίμων και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Μεσογειακού Αγρονομικού Ινστιτούτου Χανίων.

#### 7.1.2. Μέθοδος χημειοφωταύγειας

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), είναι μια από τις δραστικές μορφές οξυγόνου που σχηματίζονται κατά τη μερική αναγωγή του μοριακού οξυγόνου. Αυτή η ένωση παράγεται συνεχώς ως παραπροϊόν του αερόβιου μεταβολισμού, από αντιδράσεις με φάρμακα και περιβαλλοντικές τοξίνες ή όταν τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών μειώνονται σημαντικά, δημιουργώντας την κατάσταση του οξειδωτικού stress. Αυτό το πολύ δραστικό ενδιάμεσο του οξυγόνου μπορεί να προκαλέσει σοβαρές χημικές βλάβες στο DNA, στις πρωτεΐνες και στα ακόρεστα λιπίδια, οδηγώντας στον κυτταρικό θάνατο. Επίσης, ως δραστική μορφή οξυγόνου, όπως και οι υπόλοιπες, έχει συσχετισθεί με έναν αριθμό παθολογικών καταστάσεων συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου, της δημιουργίας φλεγμονής και της γήρανσης. [58].

Με τον όρο χημειοφωταύγεια, εννοείται κάθε διαδικασία που αφορά στην εκπομπή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (συνήθως στην ορατή ή κοντά στην υπέρυθη περιοχή), που παράγεται από μια ουσία, μέσω μιας χημικής αντίδρασης. Γενικά, στις αντιδράσεις της μεθόδου χημειοφωταύγειας, ένα από τα προϊόντα της αντίδρασης βρίσκεται σε διεγερμένη ηλεκτρονικά κατάσταση, το οποίο παράγοντας φώς, μεταπίπτει στη θεμελιώδη κατάσταση. Η ένταση της εκπομπής του παραγόμενου φωτός είναι συνάρτηση της συγκέντρωσης των χημικών ενώσεων που συμμετέχουν στην αντίδραση χημειοφωταύγειας. Συνεπώς, η μέτρηση της έντασης της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για αναλυτικούς σκοπούς [58].

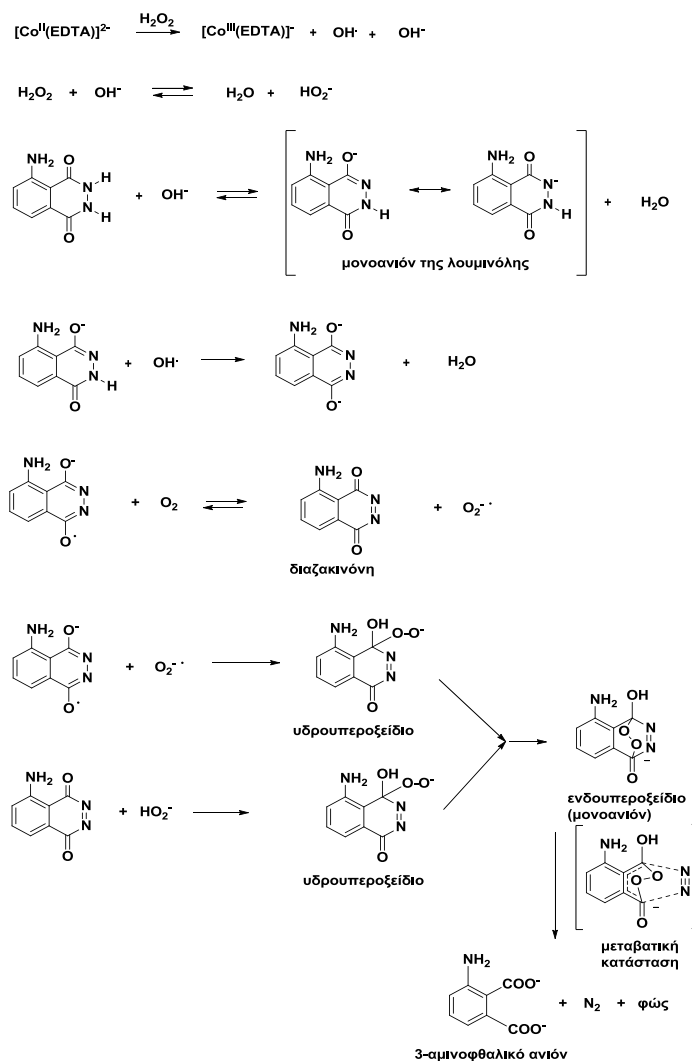
Η μέθοδος χημειοφωταύγειας της λουμινόλης χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην καταλυτική οξείδωση της λουμινόλης από Co<sup>2+</sup> και στη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος βορικών σε pH 9, παρουσία EDTA ως μεταλλικό συμπλοκοποιητή. Τα σύμπλοκα του κοβαλτίου με το EDTA καταλύουν το σχηματισμό μιας ρίζας υδροξυλίου μέσω της αντίδρασης Fenton [59].



Σχήμα 35: Αντίδραση Fenton

Η μέθοδος της χημειοφωταύγειας της λουμινόλης περιγράφεται από μια σειρά αντιδράσεων, όπου σε βασικό pH, η λουμινόλη μετατρέπεται στο αντίστοιχο

μονοανιόν, το οποίο σταθεροποιείται με δομές συντονισμού. Το ανιόν μέσα από διάφορα στάδια, καταλήγει στο σχηματισμό του ενδοϋπεροξειδίου, το οποίο παράγεται σε διεγερμένη κατάσταση και αποβάλλει την περίσσεια ενέργειας υπό μορφή ακτινοβολίας, οπότε μεταπίπτει στη θεμελιώδη ενεργειακή κατάσταση. Οι αντίστοιχες αντιδράσεις φαίνονται στο Σχήμα 36.



Σχήμα 36: Οι αντιδράσεις που συμβαίνουν κατά τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας της λουμινόλης

Ρίζες με οξυγονούχο κέντρο, όπως οι ρίζες υδροξυλίου και αλκοξειδίου, που σχηματίζονται από ομολυτική σχάση του υδροϋπεροξειδίου επίσης, προκαλούν οξείδωση της λουμινόλης, που συνοδεύεται από εκπομπή φωτός. Σε όλες τις διεργασίες φωταύγειας, η ένταση του παραγόμενου φωτός εξαρτάται από το πόσο αποτελεσματική είναι η παραγωγή μορίων στη διεγερμένη κατάσταση, μέγεθος που αντιπροσωπεύεται από την κβαντική απόδοση και την ταχύτητα της αντίδρασης:

$$\text{ICI} = \Phi\text{CI} \cdot (-dA/dt)$$

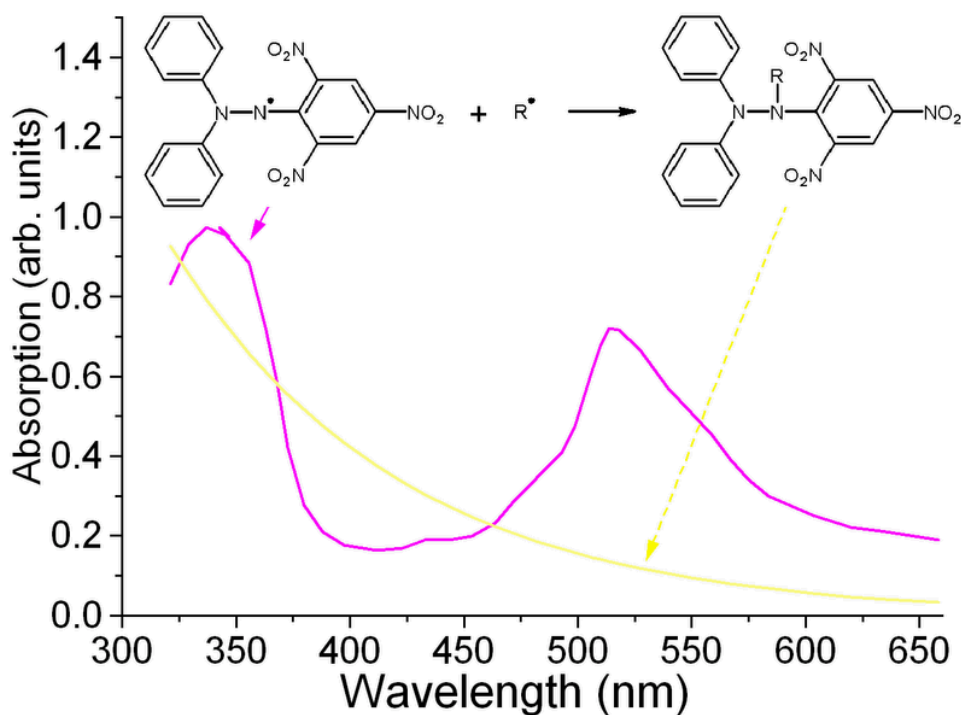
όπου ICI είναι η ένταση της εκπομπής (φωτόνια/ δευτερόλεπτο), ΦCI είναι η κβαντική απόδοση της χημειοφωταύγειας και  $-dA/dt$  είναι ο ρυθμός με τον οποίο καταναλώνεται η πρόδρομη ένωση A της διεργασίας. Η μέγιστη ένταση φωτός, εξαρτάται από τη συγκέντρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου και την κβαντική απόδοση [58].

### 7.1.3. Μέθοδος DPPH

Η μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης διαφόρων ενώσεων μπορεί επίσης να γίνει με χρήση της μεθόδου DPPH. Η ένωση 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) είναι μια σταθερή ελεύθερη ρίζα της οποίας η σταθερότητα οφείλεται στον απεντοπισμό του ελεύθερου ηλεκτρονίου στο μόριο, έτσι ώστε τα μόρια να μη διμερίζονται, όπως συμβαίνει με τις περισσότερες ελεύθερες ρίζες. Ο απεντοπισμός του ελεύθερου ηλεκτρονίου προκαλεί ένα βαθύ μωβ χρώμα στο μόριο, το οποίο χαρακτηρίζεται από ζώνη απορρόφησης σε διάλυμα αιθανόλης στα 520 nm [60].

Όταν ένα διάλυμα του DPPH αναμιγνύεται με ένα συστατικό το οποίο μπορεί να λειτουργήσει ως δότης ενός ατόμου υδρογόνου, τότε το DPPH λαμβάνει τη μη-δραστική μορφή του με ταυτόχρονη απώλεια του μωβ χρώματος. Μετά την αντίδραση με το μόριο H-A εμφανίζεται ένα ελαφρύ κίτρινο χρώμα το οποίο οφείλεται στην ομάδα του πικρυλίου που είναι παρούσα στο μόριο [60].

Ο μηχανισμός της συγκεκριμένης αντίδρασης βασίζεται στη μεταφορά ηλεκτρονίου, με την απόσπαση ενός ατόμου υδρογόνου να θεωρείται το καθοριστικό στάδιο της αντίδρασης, καθώς λαμβάνει χώρα αργά στους ισχυρά δεμένους με δεσμούς υδρογόνου διαλύτες, όπως είναι η μεθανόλη και η αιθανόλη. Η ρίζα A· μπορεί στη συνέχεια να υποβληθεί σε περαιτέρω αντιδράσεις οι οποίες ελέγχουν τη στοιχειομετρία, δηλαδή τον αριθμό των μορίων του DPPH τα οποία καταναλώνονται (αποχρωματίζονται) από ένα αναγωγικό μόριο [60].



Εικόνα 87: Η αντίδραση αποχρωματισμού του DPPH

Σημαντικές παράμετροι της αντίδρασης μεταξύ του DPPH και του αναγωγικού μορίου H-A είναι ο διαλύτης και το pH. Όσον αφορά το διαλύτη, η μέθοδος φαίνεται ότι λειτουργεί ικανοποιητικά με χρήση μεθανόλης ή αιθανόλης. Επίσης, το βέλτιστο pH της αντίδρασης κυμαίνεται στο εύρος τιμών 5,0 - 6,5 και ρυθμίζεται με χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων. Περαιτέρω παράγοντες που εξετάζονται για τη βελτιστοποίηση της αντίδρασης είναι ο χρόνος πραγματοποίησης της, η συγκέντρωση του DPPH καθώς και το ποσοστό νερού που χρησιμοποιείται [60].

#### 7.1.4. Πειραματικό μέρος

Οι μέθοδοι διεξαγωγής των μετρήσεων ήταν οι εξής:

##### 7.1.4.1. Υπολογισμός της ικανότητας δέσμευσης του $H_2O_2$ με την μέθοδο της χημειοφωταύγειας της λουμινόλης

Η μέτρηση της ικανότητας δέσμευσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας της λουμινόλης, όπως περιγράφηκε ανωτέρω. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε φθορισμόμετρο LS55 Luminescence Spectrometer- Perkin Elmer.

Τα διαλύματα προετοιμάστηκαν ως εξής:

- Ρυθμιστικό διάλυμα βορικού οξέος (0,0500 M) (ΔΙΑΛΥΜΑ Α): 3,10 g βορικού οξέος διαλύθηκαν σε 850 mL απιονισμένου νερού, στη συνέχεια, το pH ρυθμίστηκε στο 9,0 με διάλυμα NaOH 1N και αραιώθηκε μέχρι τελικού όγκου 1,000 L.
- Διάλυμα λουμινόλης ( $5,60 \cdot 10^{-4}$  M) (ΔΙΑΛΥΜΑ Β): Ζυγίστηκαν 25,0 mg λουμινόλης και διαλύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα βορικού οξέος μέχρι τελικού όγκου 250,0 mL. Αυτό το διάλυμα διατηρήθηκε σε σκουρόχρωμη φιάλη.
- Διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $5,40 \cdot 10^{-3}$  M) (ΔΙΑΛΥΜΑ Γ): 11,0 mL εμπορικά διαθέσιμου υπεροξειδίου του υδρογόνου 30% w/w αραιώθηκαν με απιονισμένο νερό μέχρι όγκου 100,0 mL (1,08 M). 5,00 mL από αυτό το διάλυμα αραιώθηκαν σε 100,0 mL με απιονισμένο νερό ( $5,40 \cdot 10^{-2}$  M). Τέλος, 5,00 mL από το τελευταίο διάλυμα αραιώθηκαν σε 50,0 mL με απιονισμένο νερό. Το διάλυμα αυτό πρέπει να είναι προσφάτως παρασκευασμένο, γιατί είναι ασταθές.

Τα δείγματα διαλύονται σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) (συνολικός όγκος: 1,00 mL) ακριβώς πριν την ανάλυση. Παρασκευάζονται διαλύματα συγκεντρώσεων 0,8-3,0 mg/mL.

Ακολουθήθηκε η εξής πειραματική διαδικασία:

- Βαθμονόμηση φθορισμετρικής διάταξης: Σε 1,00 mL ρυθμιστικού διαλύματος βορικού οξέος (ΔΙΑΛΥΜΑ Α) προστίθενται 8,4 mg  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ , 2,63mg EDTA και 0,10 mL διαλύματος λουμινόλης (ΔΙΑΛΥΜΑ Β). Το μίγμα αναδεύεται ισχυρά για 15s και σε αυτό προστίθεται 0,025mL διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου (ΔΙΑΛΥΜΑ Γ). Το προκύπτον μίγμα (τυφλό) αναδεύεται ισχυρά για 30s, μεταφέρεται σε γυάλινη κυψελίδα και η ένταση της χημειοφωταύγειας ( $I_0$ ) καταγράφεται όταν επιτευχθεί σταθερή ένταση φωτός (έως 1 min).
- Μέτρηση των δειγμάτων: x  $\mu$ L διαλύματος του δείγματος προστίθενται στο μίγμα των διαλυμάτων Α, Β και Γ, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Η ένταση της χημειοφωταύγειας (I) καταγράφεται όταν επιτευχθεί σταθερή ένταση φωτός (έως 1min).
- Το κάθε δείγμα μετρήθηκε σε τρεις συγκεντρώσεις, με προσθήκη κατάλληλου όγκου του διαλύματος των δειγμάτων (10,0  $\mu$ L-25,0  $\mu$ L-50,0  $\mu$ L) και σε κάθε μια από αυτές, πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον τρεις μετρήσεις για εξασφάλιση μεγαλύτερης ακρίβειας.
- Στη συνέχεια υπολογίζεται ο λόγος  $I_0/I$  και γίνονται τα διαγράμματα  $I_0/I$  συναρτήσει της συγκέντρωσης του δείγματος (mg/mL). Η εξίσωση που συνδέει τα δύο αυτά μεγέθη, είναι γραμμική ( $y=ax+b$ ). Από την εξίσωση αυτή υπολογίστηκε η συγκέντρωση του δείγματος ( $IC_{50}$ ). Η  $IC_{50}$ , που



αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού που απαιτείται, ώστε να μειωθεί η αρχική ένταση της χημειοφωταύγειας  $I_0$  κατά 50%, υπολογίστηκε από την εξίσωση της ευθείας, θέτοντας  $y=2$  και υπολογίζοντας το  $x$ .

#### 7.1.4.2. Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής δράσης ενάντια στην ελεύθερη ρίζα DPPH

Οι ενώσεις (25  $\mu\text{L}$ ) διαλύονται σε 975  $\mu\text{L}$  DMSO (60 $\mu\text{M}$  DPPH σε MeOH). Το μείγμα αναδεύεται έντονα επί 15 s και αφήνεται σε ηρεμία σε σκοτεινό μέρος επί 30 min. Καταγράφεται έπειτα η απορρόφηση στα 517 nm. Η ικανότητα δέσμευσης DPPH υπολογίζεται ως η διαφορά στην απορρόφηση του ελεγμένου δείγματος σε σχέση με το τυφλό μπορεί να εκφράζεται ως ποσοστό εναπομείναντος DPPH. Η επί τοις εκατό δέσμευση της ρίζας DPPH μπορεί να υπολογισθεί ως:

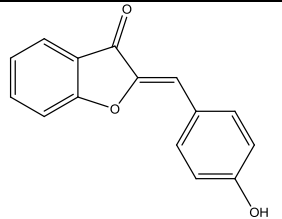
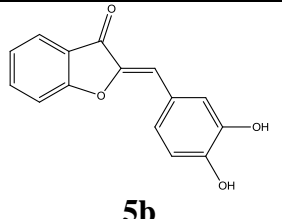
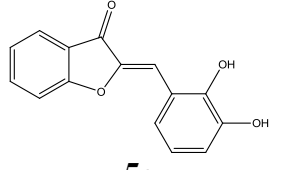
$$\text{Αντιοξειδωτική ικανότητα DPPH (\%)} = (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}/A_{\text{blank}}) \cdot 100$$

Όλα τα τεστ γίνονται τρεις φορές και τα αποτελέσματα του προκύπτουν μετά από τον υπολογισμό του μέσου όρου [61].

#### 7.1.5. Αποτελέσματα μετρήσεων

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων για τις τρεις ενώσεις που εξετάστηκαν ήταν τα εξής:

**Πίνακας 31:** Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης των ωρονών **5a-c**

Ένωση	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	
	Ικανότητα δέσμευσης του H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Ικανότητα δέσμευσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH
 <b>5a</b>	231.2	10.242
 <b>5b</b>	232.1	10.667
 <b>5c</b>	301.9	6.951

#### 7.1.6. Συζήτηση αποτελεσμάτων - συμπεράσματα

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα, οι ενώσεις **5a** και **5b** έχουν παρόμοια αντιοξειδωτική δράση όσον αφορά την δέσμευση H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, όπως μετράται με πείραμα χημειοφωταύγειας, αλλά και την δέσμευση DPPH.

Όσον αφορά την ένωση **5c**, η ύπαρξη υδροξυλίου στην θέση 2' αντί της θέσης 4' (ένωση **5b**), αυξάνει την αντιοξειδωτική δράση, όπως εκφράζεται από την δέσμευση DPPH (IC<sub>50</sub>=6,951  $\mu\text{M}$ , έναντι 10,667  $\mu\text{M}$  στην **5b**), αλλά μειώνει την ικανότητα της ένωσης να δεσμεύει το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (IC<sub>50</sub>=301,9  $\mu\text{M}$ , έναντι 232,1  $\mu\text{M}$  στην **5b**).

## 7.2. Ηλεκτροχημικό προφίλ ωρονών

### 7.2.1. Εισαγωγή

Σε αυτό το στάδιο αξιολόγησης της δράσης των νέων ενώσεων μελετήθηκε η ηλεκτροχημική συμπεριφορά των ωρονών **5a-c** σε υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα διαφορετικών pH χρησιμοποιώντας κυκλική βολταμετρία (CV) σε ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα. Ως συνέχεια των πειραμάτων αυτών έγινε προσπάθεια συσχέτισης των ηλεκτροχημικών παραμέτρων με την αντιοξειδωτική δράση των παραγώγων [62]. Τα πειράματα αυτά διεξήχθησαν στο Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ

### 7.2.2. Συσχέτιση ηλεκτροχημικού προφίλ με αντιοξειδωτικές δράσεις

Οι φυτικοί και ζωικοί οργανισμοί έχουν στην κατοχή τους ένα ευρύ φάσμα μηχανισμών για την αντιμετώπιση αυτών των ελεύθερων ριζών. Στα φυτά και τα ζώα αυτές οι ελεύθερες ρίζες απενεργοποιούνται από τα αντιοξειδωτικά, τα οποία δρουν ως αναστολείς της διαδικασίας οξειδωσης, ακόμη και σε σχετικά μικρή συγκέντρωση, και ως εκ τούτου έχουν ποικίλο φυσιολογικό ρόλο στο σώμα. Τα αντιοξειδωτικά ενεργούν ως αποικοδομητές, μετατρέποντας τις ελεύθερες ρίζες σε λιγότερο δραστικές ενώσεις. Τα αντιοξειδωτικά που χρησιμοποιούνται παραδοσιακά για να αναστείλουν την οξείδωση στα τρόφιμα, καθώς και για να αδρανοποιήσουν τις επικίνδυνες ελεύθερες ρίζες και να αποτρέψουν τις αλυσιδωτές οξειδώσεις *in vivo*, θεωρούνται από πολλούς ως η φυσική λύση για το περιβαλλοντικό και φυσιολογικό στρες, τη γήρανση, την αρτηριοσκλήρυνση και τον καρκίνο. Ο ρόλος που καλούνται να διαδραματίσουν τα φυσικά αντιοξειδωτικά είναι διττός και έγκειται τόσο στη συντήρηση των τροφίμων όσο και στη μεγιστοποίηση των ωφέλιμων επιδράσεων στην υγεία. Για το λόγο αυτό, η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των καθαρών μεμονωμένων ενώσεων και των ανάμικτων εκχυλισμάτων, καθώς και η βελτιστοποίηση των εφαρμογών τους, αποτελεί σημαντική πρόκληση τα τελευταία χρόνια.

Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες συνδέονται με τα οξειδοαναγωγικά χαρακτηριστικά, επομένως η γνώση της οξειδοαναγωγικής συμπεριφοράς των μορίων είναι πολύ σημαντική για τον προσδιορισμό του μηχανισμού της ηλεκτροχημικής οξείδωσης των μορίων αλλά και τη συσχέτιση αντιοξειδωτικής δράσης-ηλεκτροχημικού προφίλ [63].

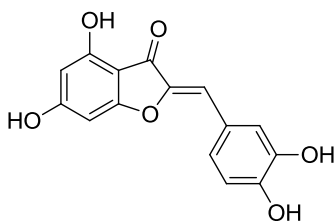
### 7.2.3. Πειραματικό μέρος

Η ηλεκτροχημική μελέτη των ωρονών πραγματοποιήθηκε με το πολαρογραφικό σύστημα 797 VA Computrace (Metrohm). Στα πλαίσια αυτής της μελέτης ως ηλεκτρόδιο εργασίας χρησιμοποιήθηκε το ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC), το σύστημα ηλεκτροδίων του πολαρογράφου συμπληρώνουν ένα ηλεκτρόδιο αναφοράς Ag/AgCl, πληρωμένο με υδατικό διάλυμα 3 M KCl ( $\geq 99.5\%$  p.a., Merck) σε δις απιονισμένο νερό από τη συσκευή EASYpure II (Model D 7381, Barnsted International), και ένα βοηθητικό ηλεκτρόδιο Pt. Το ηλεκτρόδιο εργασίας γυαλίζεται κάθε φορά πριν την μέτρηση με σκόνη αλούμινας (0.3 $\mu$ m) για 3min χρησιμοποιώντας πανί γυαλίσματος και ξεπλένεται με απιονισμένο νερό και αιθανόλη. Επιπλέον στο τέλος κάθε πειραματικής μέρας το ηλεκτρόδιο τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων για 5 min, πρώτα σε απιονισμένο νερό και μετά σε ακετόνη. Η κατάσταση του ηλεκτροδίου ελέγχεται με διάλυμα σιδηροκυανιούχου καλίου.

Επιπλέον, για τις μετρήσεις της κυκλικής βολταμετρίας χρησιμοποιήθηκαν υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα τριών διαφορετικών pH: pH 7,4 για την προσομοίωση φυσιολογικών συνθηκών, pH 4,0 και pH 11,0.

Η ηλεκτροχημική μελέτη των ενώσεων έγινε σε θερμοκρασία δωματίου (22±1 °C) και οι τελικές συγκεντρώσεις των ωρονών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 1.0 mM, σε κυψελίδα Metrohm των 10 mL. Η περιοχή σάρωσης των κυκλικών βολταγραμμογραφημάτων ήταν -500 έως 1100 mV ενώ ο ρυθμός σάρωσης 20 mV/s. Όλες οι μετρήσεις διεξήχθησαν τουλάχιστον εις τριπλούν και ελήφθη η μέση τιμή.

Επίσης, εκτός των ενώσεων **5a-c** οι οποίες συντέθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, μελετήθηκε και το ηλεκτροχημικό προφίλ μιας φυσικής ωρόνης, της ωρεοσιδίνης (**Ω**), της οποίας η σύνθεση είχε πραγματοποιηθεί με βάση τη μέθοδο που έχει αναπτυχθεί στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας, ΕΜΠ [64].



Σχήμα 37: Η δομή της ωρόνης **Ω** (ωρεοσιδίνη)

#### 7.2.4. Αποτελέσματα μετρήσεων

Η ηλεκτροχημική συμπεριφορά των εξεταζόμενων μορίων μελετήθηκε σε υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα διαφορετικών pH (pH 7,4, 4,0, 11,0) χρησιμοποιώντας κυκλική βολταμμετρία (CV) σε ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα, το οποίο έχει επιλεγεί ως ηλεκτρόδιο εργασίας και σε ανάλογες μελέτες [63, 65]. Η συγκέντρωση των βιοδραστικών μορίων ήταν 0.01M σε διαλύτη αιθανόλη.

Στις βολταμμετρικές τεχνικές, παράμετρος ελέγχου είναι το δυναμικό το οποίο εφαρμοζόμενο εξωτερικά στην ηλεκτροχημική κυψέλη προκαλεί τη διέλευση ρεύματος όταν διεξάγεται μια ηλεκτροχημική αντίδραση. Έτσι καταγράφεται το δυναμικό ανόδου (anodic peak potential,  $E_{pa}$ ) και το δυναμικό καθόδου (cathodic peak potential,  $E_{pc}$ ). Όσο μικρότερη είναι η τιμή του δυναμικού ανόδου της εξεταζόμενης ένωσης τόσο λιγότερη ενέργεια χρειάζεται για να οξειδωθεί, οπότε παρουσιάζει και καλή αντιοξειδωτική δράση.

Πίνακας 32: Ανοδικά ( $E_{pa}$ ) και καθοδικά ( $E_{pc}$ ) δυναμικά των ωρονών (σε mV)

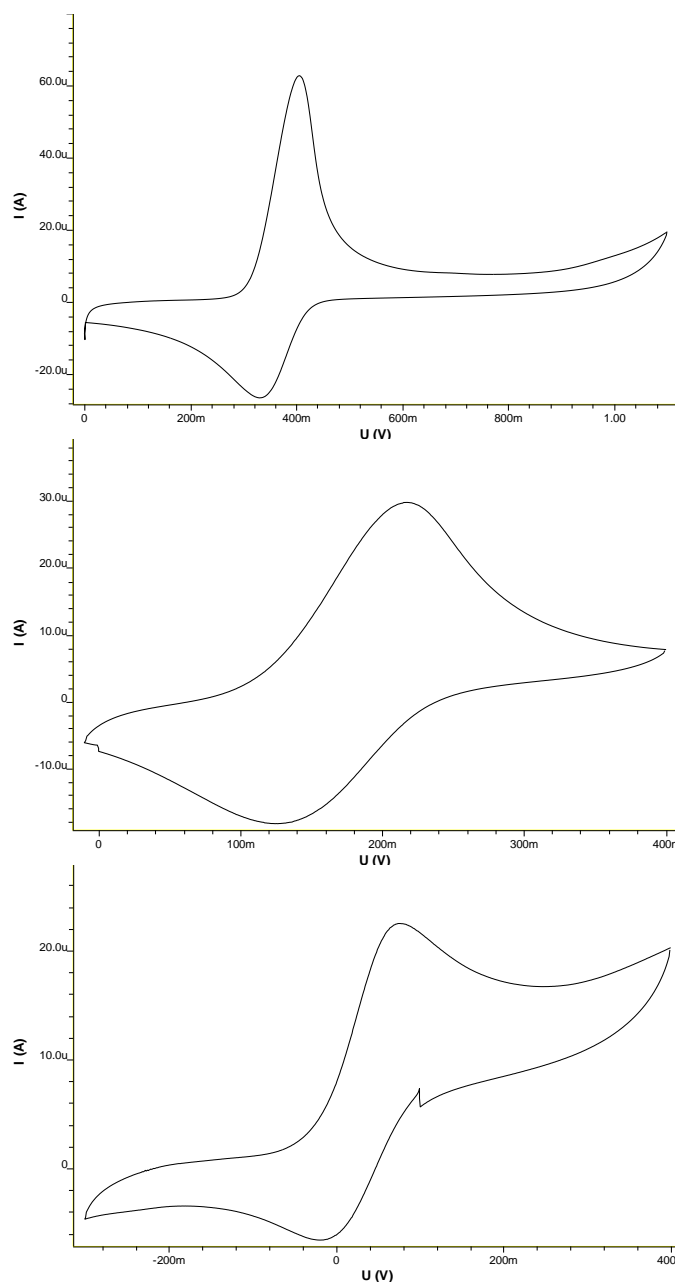
Ένωση	pH 4,0				pH 7,4				pH 11,0			
	$E_{p1a}$	$E_{p2a}$	$E_{p1c}$	$E_{p2c}$	$E_{p1a}$	$E_{p2a}$	$E_{p1c}$	$E_{p2c}$	$E_{p1a}$	$E_{p2a}$	$E_{p1c}$	$E_{p2c}$
<b>5a</b>	386,77	703,42	349,57	-	183,31	403,04	171,66	-	352,88	572,05	-	-
<b>5b</b>	405,93	-	332,94	-	215,08	-	125,84	-	77,96	-	-17,89	-
<b>5c</b>	140,16	367,47	302,65	106,72	-28,01	203,91	102,28	-135,25	34,62	-	-63,46	-
<b>Ω</b>	403,22	-	258,65	-	190,21	-	69,14	-	-46,30	-	-96,26	-

#### 7.2.5. Συζήτηση αποτελεσμάτων - συμπεράσματα

Από την ομάδα ωρονών που μελετήθηκαν, όλες οι ενώσεις παρουσίασαν αντιστρεπτή οξειδοαναγωγική δράση. Για τις ενώσεις που περιέχουν κατεχολικό σύστημα στις θέσεις 3 και 4 του δακτυλίου B (ωρόνες **5b** και **Ω**) παρατηρείται ότι με την αύξηση του pH (Πίνακας 27, Εικόνα 89) το δυναμικό οξείδωσης μετατοπίζεται προς χαμηλότερες τιμές (κατά 328 mV και 449 mV, αντίστοιχα). Οι ενώσεις **5b** και **Ω** παρουσιάζουν καλύτερη αντιοξειδωτική δράση σε βασικό pH, με την ωρεοσιδίνη **Ω** να εμφανίζει ιδιαίτερα χαμηλή τιμή δυναμικού οξείδωσης σε αυτό το pH (σε δυναμικό -46,3 mV). Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί από την παρουσία τεσσάρων ιονιζόμενων ομάδων υδροξυλίου σε αυτή την ένωση.

Οι ωρόνες **5c**, η οποία περιέχει τις δύο ομάδες υδροξυλίου στις θέσεις 2 και 3 του δακτυλίου B, και **5a**, η οποία έχει μόνο ένα φαινολικό υδροξύλιο, εμφανίζουν τη βέλτιστη αντιοξειδωτική δράση τους στο φυσιολογικό pH 7,4, με την ωρόνη **5c** να έχει την καλύτερη δράση από όλες τις ωρόνες που εξετάστηκαν σε αυτό το pH. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να συσχετιστεί με το γεγονός ότι η ωρόνη **5c** είναι αυτή που εμφανίζει επίσης τη βέλτιστη ικανότητα δέσμευσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH (Πίνακας 31).

Αξίζει επίσης να σημειωθεί πως το L(+) ασκορβικό οξύ (καθαρότητας μεγαλύτερης των 99,7%), το οποίο είναι μόριο με γνωστή αντιοξειδωτική δράση, δίνει κατά την ηλεκτροχημική μελέτη του  $E_{ap}=780$  mV σε pH 7,0. Το γεγονός πως αυτή η τιμή του δυναμικού ανόδου είναι μεγαλύτερη από όλες τις τιμές  $E_{ap}$  του πίνακα 28 συνηγορεί στο συμπέρασμα πως οι ενώσεις **5a-c** και **Ω** εμφανίζουν καλή αντιοξειδωτική δράση.



Εικόνα 88: Κυκλικά βολταμμογραφήματα του μορίου **5b** σε ρυθμιστικά διαλύματα, pH: 4, 7,4 και 11 αντίστοιχα.

## 7.3. Αντικαρκινική δράση ωρονών

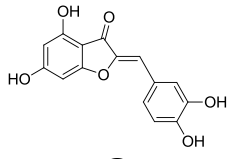
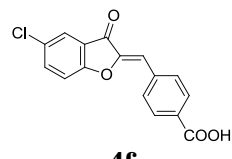
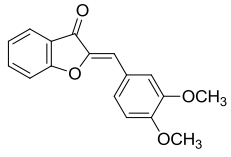
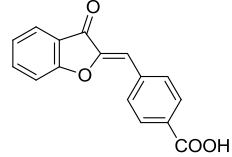
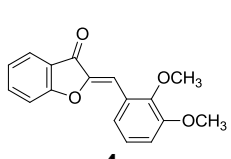
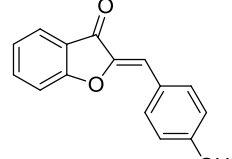
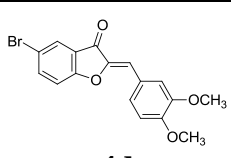
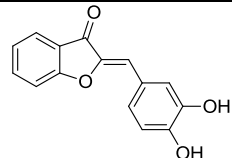
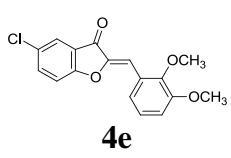
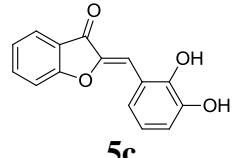
### 7.3.1. Εισαγωγή

Σε αυτό το στάδιο αξιολόγησης της δράσης των νέων ενώσεων μελετήθηκε η ικανότητα ενώσεων να δράσουν κατά του καρκίνου μέσω μέτρησης της ικανότητας των ενώσεων να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων της σειράς HeLa. Τα πειράματα αυτά διεξήχθησαν από το Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας της Σχολής Φαρμακευτικών Επιστημών του Πανεπιστημίου της Γενεύης.

### 7.3.2. Αποτελέσματα μετρήσεων

Έγιναν μετρήσεις αξιολόγησης αντικαρκινικής ικανότητας σε έναν αριθμό από ενώσεις που συντέθηκαν στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής εργασίας. Επίσης, για λόγους σύγκρισης έγιναν μετρήσεις αντικαρκινικής ιδιότητας και στην φυσική ωρόνη ωρεοσιδίνη.

**Πίνακας 33:** Αποτελέσματα αντικαρκινικής δράσης – αναστολή πολλαπλασιασμού κυττάρων HeLa

Ένωση	% αναστολή (100 µg/ml)	IC <sub>50</sub> (µM)	Ένωση	% αναστολή (100 µg/ml)	IC <sub>50</sub> (µM)
 <b>Ω</b>	102,4	29,0±0,1	 <b>4f</b>	29,7	-
 <b>4b</b>	51,2	-	 <b>4g</b>	54,7	-
 <b>4c</b>	11,5	-	 <b>5a</b>	103,9	35,7±5,0
 <b>4d</b>	14,2	-	 <b>5b</b>	108,0	13,9±0,2
 <b>4e</b>	55,0	-	 <b>5c</b>	97,6	31,3±2,7

### 7.3.3. Συζήτηση αποτελεσμάτων

Σχετικά με τις ωρόνες **4b-e**, οι οποίες χαρακτηρίζονται από ο-διμεθόξυ σύστημα στον Β δακτύλιο παρατηρήθηκε αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων από πολύ ασθενής (11,5% και 14,2% για τα **4c** και **4d** αντίστοιχα) ως μέτρια (51,2% και 55,0% για τα **4b** και **4e** αντίστοιχα). Παρατηρείται, από σύγκριση των **4b** και **4d** πως η προσθήκη Br ως υποκαταστάτη στην θέση 5 στον δακτύλιο Α οδηγεί σε μείωση στην ικανότητα αναστολής, περίπου στο ένα τέταρτο, αλλά από σύγκριση των **4c** και **4e** παρατηρείται πως η προσθήκη Cl ως υποκαταστάτη στην θέση 5 στον δακτύλιο Α οδηγεί σε τετραπλασιασμό της ικανότητας αναστολής.

Σχετικά με την ύπαρξη καρβοξυλομάδας στον Β δακτύλιο μιας ωρόνης, όπως φαίνεται από τις ωρόνες **4f-g**, αυτή οδηγεί σε ασθενή ως μέτρια αναστολή (29,7% και 54,7% για τα **4f** και **4g** αντίστοιχα). Παρατηρείται, από σύγκριση των δύο ενώσεων πως η προσθήκη Cl ως υποκαταστάτη στην θέση 5 στον δακτύλιο Α οδηγεί σε μείωση στην ικανότητα αναστολής, περίπου στο ένα δεύτερο.

Παρατηρήθηκε πως οι ωρόνες **5a-c**, οι οποίες είχαν υδροξυλομάδες στον Β δακτύλιο εμφάνισαν εξαιρετική ικανότητα αναστολής (από 97,6% ως 108,0%) ενώ η ένωση αναφοράς **Ω** παρουσίασε επίσης καλή δράση (102,4%). Λόγω της καλής δράσης που έδειξαν οι ανωτέρω ενώσεις, αποφασίστηκε η μέτρηση της συγκέντρωσης IC<sub>50</sub>. Από τα αποτελέσματα αυτών των μετρήσεων προκύπτει πως οι ενώσεις αυτές κατατάσσονται, κατά φθίνουσα δραστηριότητα ως εξής: **5b**, **Ω**, **5c**, **5a**.

### 7.3.4. Συμπεράσματα

Από τα αποτελέσματα των μετρήσεων αναστολής πυρηνικού εκχυλίσματος καρκινικών κυττάρων της σειράς HeLa προέκυψε πως οι ωρόνες **5a-c**, λόγω των καλών αποτελεσμάτων που παρουσίασαν χρήζουν περαιτέρω ελέγχων. Βρίσκονται υπό εξέλιξη *in vitro* πειράματα προσδιορισμού της ικανότητας παρεμπόδισης τεσσάρων διαφορετικών ισομορφών του ενζύμου HDAC ούτως ώστε να εξακριβωθεί ο μηχανισμός αντικαρκινικής δράσης αλλά και η πιθανή επιλεκτική τους δράση ενάντια σε κάποια συγκεκριμένη ισομορφή του ενζύμου.

## 7.4. *In vitro* μελέτη της ικανότητας αναστολής της τυροσινάσης

### 7.4.1. Εισαγωγή

Σε αυτό το στάδιο αξιολόγησης της δράσης των νέων ενώσεων μελετήθηκε *in vitro* η ικανότητα ωρονών (**4f-g**, **5a-c**) να αναστέλλουν την δράση του ενζύμου τυροσινάση από το μανιτάρι *Agaricus Bisporus*. Τα πειράματα αυτά διεξήχθησαν στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών της Σχολής Επιστημών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

### 7.4.2. Προετοιμασία ενζύμου

Κομμάτια κομμένων μανιταριών *Agaricus bisporus* (50g) προστέθηκαν σε 100 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού άλατος 50 mM, pH 6,7. Ο πολτός φυγοκεντρήθηκε στα 4000 rpm για 10 min και το υπερκείμενο υγρό διηθήθηκε για να ληφθεί το διάλυμα τυροσινάσης. Το ενζυμικό διάλυμα αραιώθηκε (1:50) και το πρωτεϊνικό περιεχόμενο προσδιορίστηκε μέσω δοκιμής Bradford (Bradford assay). Το περιεχόμενο σε ένζυμο προσδιορίστηκε στα 770  $\mu\text{g/mL}$ .

### 7.4.3. Πειραματική διαδικασία

Οι ενώσεις **4f-g** και **5a-c** ελέγχθηκαν για την ικανότητά τους να αναστέλλουν την ενζυμικώς καταλυόμενη από την τυροσινάση οξείδωση της L-DOPA προς ντοπακινόνη.

Διάλυμα τυροσινάσης μανιταριού (τελικής συγκέντρωσης 77  $\mu\text{g/mL}$ ), το οποίο μόλις είχε προετοιμαστεί προστέθηκε σε 700 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού άλατος 50 mM, pH 6,7, με ή χωρίς προσθήκη φαρμακευτικής ένωσης διαλυμένης σε DMSO. Το μίγμα επώαστηκε στους 25 °C για 10 min. Η αντίδραση ξεκίνησε με προσθήκη 150  $\mu\text{L}$  διαλύματος L-DOPA solution (τελικής συγκέντρωσης 1,5 mM). Σε όλες τις περιπτώσεις οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν παρουσία 10% DMSO. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθήθηκε μέσω φασματοφωτομέτρου Spectro UV-18 Spectrophotometer, στα 475 nm για 5 min. Οι αρχικοί ρυθμοί αντίδρασης ( $v_0$ ) υπολογίστηκαν από την κλίση του γραμμικού τμήματος των γραφικών παραστάσεων της αύξησης της απορρόφησης συναρτήσει του χρόνου.

Το ποσοστό αναστολής της δράσης της τυροσινάσης υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση:

$$\% \text{ εναπομείνασα δραστικότητα} = (v_0 \text{ αναστολέα}) * 100 / (v_0 \text{ δείγματος χωρίς αναστολέα})$$

Η ανασταλτική ικανότητα του DMSO, στις ίδιες πειραματικές συνθήκες υπολογίστηκε στο 18%.

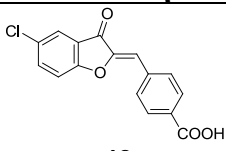
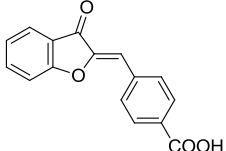
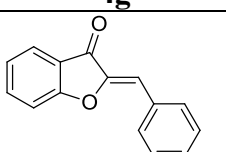
### 7.4.4. Αποτελέσματα μετρήσεων

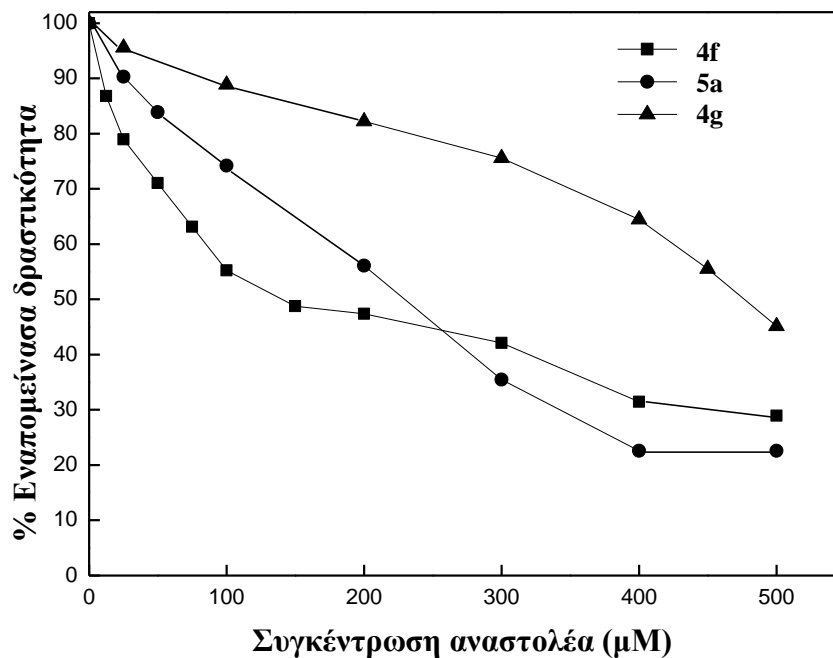
Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν οι ενώσεις **4f-g**, **5a-c** για να προσδιοριστεί αν εμφανίζουν ανασταλτική δράση στην οξείδωση της L-DOPA με καταλύτη την τυροσινάση.

Τα αρχικά αποτελέσματα έδειξαν πως οι ενώσεις **5b** και **5c** δεν αναστέλλουν την τυροσινάση, αλλά τουναντίον οδηγούν σε αύξηση της δραστικότητας (ως και 178.9% στην συγκέντρωση 250  $\mu\text{M}$ ).

Όμως οι ενώσεις **4f**, **4g** και **5a** εμφανίζουν ανασταλτική δράση στην τυροσινάση από μανιτάρι, με την ισχύ της ανασταλτικής δράσης να εξαρτάται από την δόση.

**Πίνακας 34:** Αποτελέσματα αναστολής της δράσης της τυροσινάσης

Ένωση	IC <sub>50</sub> (μM)
 <p><b>4f</b></p>	146.5 ± 14.7
 <p><b>4g</b></p>	464.4 ± 22.3
 <p><b>5a</b></p>	244.5 ± 25.8



*Εικόνα 89: Επίδραση της συγκέντρωσης αναστολέα στην % εναπομείνουσα δραστηριότητα της τυροσινάσης για την οξείδωση της L-DOPA (1,5 mM) καταλύομενης από τυροσινάση (77μg/mL) σε 50mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού άλατος 50mM, pH 6,7 που περιέχει 10% DMSO.*

#### 7.4.5. Σχολιασμός αποτελεσμάτων

Μπορούν από τα αποτελέσματα αυτής της *in vitro* μελέτης, αλλά και από την σύγκριση των *in vitro* αποτελεσμάτων με τα αποτελέσματα των *in silico* μελετών πρόσδεσης να εξαχθούν χρήσιμα αποτελέσματα όσον αφορά τις φαρμακοφόρες ομάδες που απαιτούνται σε σκελετό ωρόνης για να επιτευχθεί η αναστολή της τυροσινάσης.



Σημειώνεται κατ' αρχάς πως οι *in silico* μελέτες πρόσδεσης είχαν δείξει πως οι ενώσεις **5a-c**, και ιδίως οι **5b** και **5c** προσδένονταν αρκετά ισχυρά στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης και λόγω αυτού είχε εικασθεί πως ίσως, χάρη στην ισχυρή πρόσδεση που παρουσίαζαν, να μπορούσαν να δράσουν ως ικανοί αναστολείς της τυροσινάσης. Όμως, τα αποτελέσματα της *in vitro* μελέτης έδειξαν πως η δραστηριότητα της τυροσινάσης όχι μόνο δεν αναστέλλεται, αλλά ενισχύεται από τις **5b** και **5c**, δηλαδή οι ενώσεις αυτές δρουν ως ενεργοποιητές του ενζύμου. Αντίστοιχη παρατήρηση έχει αναφερθεί πρόσφατα από τους Dubois et al. [66] για ανάλογες ωρόνες, και μια πιθανή ερμηνεία είναι ότι οι ωρόνες αυτές αλληλεπιδρούν με το ένζυμο σε δύο τουλάχιστον διαφορετικές θέσεις: μια καταλυτική (στο ενεργό κέντρο) και μια αλλοστερική η οποία αυξάνει τη δράση του ενζύμου. Η ωρόνη **5a**, που διαθέτει μια ομάδα υδροξυλίου στη θέση 4' του δακτυλίου B έδειξε ανασταλτική δράση.

Υπενθυμίζεται πως η τυροσινάση καταλύει δύο αντιδράσεις, κατά πρώτον την αντίδραση μονοφαινολών προς ο-διφαινόλες και κατά δεύτερον την αντίδραση ο-διφαινολών προς ο-κινόνες, οι οποίες είναι πρόδρομες ενώσεις κατά την παραγωγή της μελανίνης.

Όσον αφορά τις ωρόνες **4f-g** φαίνεται πως η παρουσία της καρβοξυλομάδας στο μόριο του προσδίδει αρκετή ομοιότητα με το φυσικό υπόστρωμα ώστε να προσεγγίσει το ενεργό κέντρο της τυροσινάσης και να προσδεθεί σε αυτό, ενώ ταυτόχρονα το μόριο είναι ανίκανο να αντιδράσει στο ενεργό κέντρο, αναστέλλοντας έτσι την δράση της τυροσινάσης. Η ωρόνη **4f**, που περιέχει την ομάδα του καρβοξυλικού οξέος στη θέση 4'-του δακτυλίου B και υποκαταστάτη Cl στη θέση 5' του δακτυλίου A, επέδειξε την καλύτερη δράση έναντι της τυροσινάσης σε σχέση με τα μόρια που εξετάστηκαν σε αυτή την εργασία. Η απομάκρυνση του Cl (ωρόνη **4g**) οδηγεί σε σημαντική ελάττωση της δράσης, φαίνεται επομένως ότι η παρουσία του Cl είναι σημαντική για την αναστολή της δράσης της τυροσινάσης.

Αν και ο αριθμός των ωρονών που εξετάστηκαν ως πιθανοί αναστολείς του ενζύμου τυροσινάση από μανιτάρι είναι μικρός, μπορούν να εξαχθούν τα παρακάτω συμπεράσματα όσον αφορά τη σχέση δομής-δράσης:

- A) η παρουσία κατεχολικού συστήματος στο δακτύλιο B δεν ευνοεί την αναστολή της δράσης, αντίθετα οι ωρόνες αυτές δρουν ως ενεργοποιητές του ενζύμου.
- B) η παρουσία ομάδας υδροξυλίου στη θέση 4' του δακτυλίου B οδηγεί σε αναστολή της δράσης του ενζύμου
- Γ) η παρουσία ομάδας καρβοξυλίου στη θέση 4' του δακτυλίου B έχει ως αποτέλεσμα ελάττωση της ικανότητας της ωρόνης να αναστέλλει τη δράση του ενζύμου
- Δ) η παρουσία ομάδας καρβοξυλίου στη θέση 4' του δακτυλίου B σε συνδυασμό με την παρουσία ομάδας Cl στη θέση 5 του δακτυλίου A, ευνοεί σημαντικά τη δράση της ωρόνης ως αναστολέα της τυροσινάσης.

Ο μηχανισμός αναστολής του ενζύμου από τις ωρόνες θα πρέπει να μελετηθεί εκτενέστερα δεδομένου ότι η αναστολή δεν επιτυγχάνεται μόνο μέσω της συμπλοκοποίησης των ιόντων Cu του ενεργού κέντρου και οι ωρόνες είναι πιθανόν να δρουν μέσω αλλοστερικής τροποποίησης του ενζύμου.

## 8. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της σύνθεσης, των αποτελεσμάτων των *in silico* μελετών πρόσδεσης και των *in vitro* αποτελεσμάτων αξιολόγησης της βιολογικής δράσης των νέων ενώσεων προκύπτει μια ποικιλία προτάσεων για μελλοντική έρευνα πάνω στην επιστημονική περιοχή που κάλυψε η παρούσα διπλωματική εργασία.

Όσον αφορά την σύνθεση νέων ενώσεων προτείνεται η αναζήτηση συνθηκών που αυξάνουν την απόδοση των αντιδράσεων συμπύκνωσης Claisen-Schmidt ή η εξεύρεση εναλλακτικών τρόπων σύνθεσης χαλκονών με μεγαλύτερη απόδοση. Επίσης προτείνεται η αναζήτηση συνθηκών που αυξάνουν την απόδοση των αντιδράσεων εστεροποίησης Steglich ή η εξεύρεση εναλλακτικών τρόπων σύνθεσης εστέρων λιποϊκού οξέος με φλαβονοειδή.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα των *in silico* μελετών πρόσδεσης προτείνεται η αξιοποίησή τους με δρομολόγηση της σύνθεσης νέων ενώσεων που παρουσίασαν καλή ικανότητα πρόσδεσης στην τυροσινάση, όπως οι **11a-f**, **12b-d** και **12f**. Επίσης προτείνεται η διερεύνηση της ικανότητας χαλκονών να αναστέλλουν την δράση της τυροσινάσης, αλλά και η σύνθεση νέων υβριδικών μορίων όπως τα **10a** και **10x**. Προτείνεται επίσης η περαιτέρω μελέτη μέσω *in silico* μελετών πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης εναλλακτικών παραλλαγών πάνω στον βασικό σκελετό των χαλκονών και των ωρονών για την διερεύνηση της τάσης προσέγγισης του ενεργού κέντρου μέσω υποκαταστατών στον Β δακτύλιο αλλά και για την διερεύνηση της ικανότητας φαρμακευτικών μορίων να προσδένονται στην τυροσινάση μέσω καρβοξυλομάδας.

Επισημαίνεται επίσης πως από τα αποτελέσματα των *in vitro* πειραμάτων αναστολής της δράσης της τυροσινάσης και την σύγκριση και αντιπαραβολή αυτών με τα *in silico* αποτελέσματα προκύπτουν συμπεράσματα σχετικά με την καταλληλότητα φαρμακοφόρων ομάδων στον Β δακτύλιο. Λαμβάνοντας υπ' όψιν αυτά τα αποτελέσματα, προτείνεται να δοθεί προτεραιότητα στην σύνθεση νέων φλαβονοειδών με την καρβοξυλομάδα ή το μονοφαινολικό σύστημα ως φαρμακοφόρο, ενώ να αποφευχθεί η σύνθεση φλαβονοειδών με κατεχολικό σύστημα. Επιπλέον, εφ' όσον παρατηρήθηκε ισχυρή αναστολή της δράσης της τυροσινάσης από τις ωρόνες **4f-g** και **5a** ενδέχεται στο μέλλον να υπολογισθεί *in silico* η ενέργεια πρόσδεσης των ωρονών αυτών.

Σχετικά με την *in vitro* αξιολόγηση βιολογικής δράσης των νέων ενώσεων σημειώνεται πως θα υποβληθούν σε αξιολόγηση και ενώσεις που έχουν προκύψει από σύνθεση και δεν έχουν ακόμα αξιολογηθεί ως προς την *in vitro* βιολογική δράση. Επίσης υπάρχει πρόθεση οι ενώσεις που έχουν ήδη αξιολογηθεί να υποβληθούν σε περισσότερες μελέτες της δράσης τους ούτως ώστε να αναπτυχθεί μια σφαιρική άποψη περί της φαρμακευτικής τους δράσης.

## Βιβλιογραφία

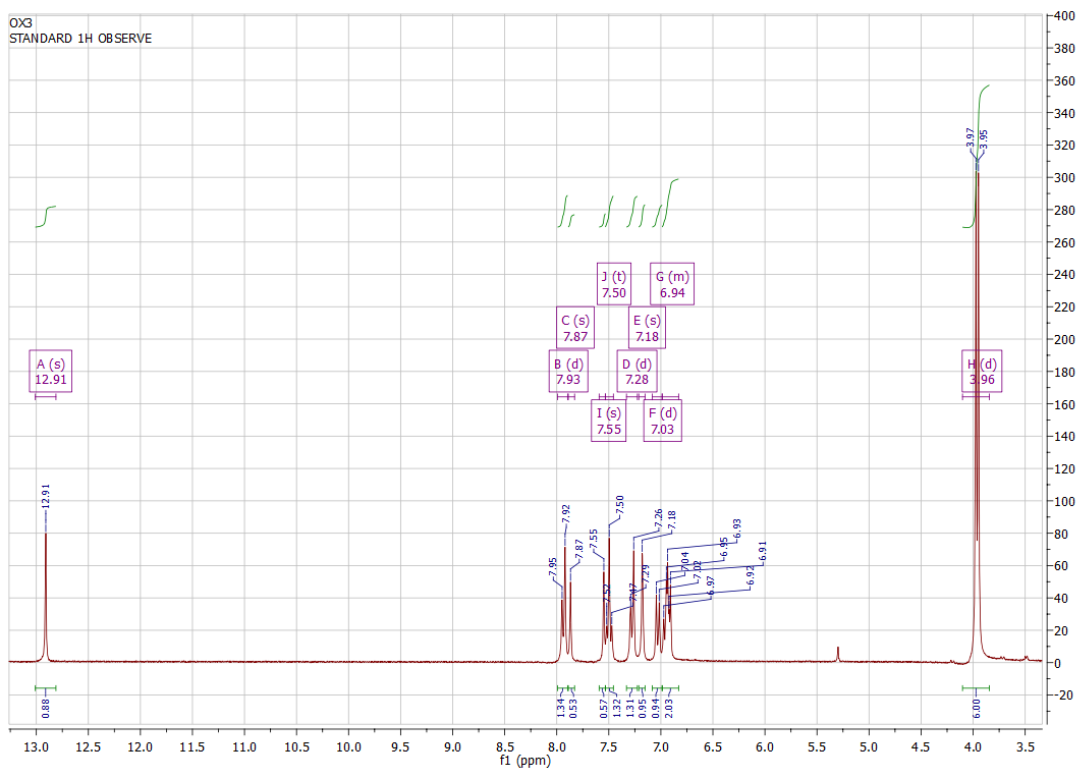
- [1] Zhang J. and Skinner, M.A., 2009, Cytoprotective Activity of Flavonoids in Relation to Their Chemical Structures and Physicochemical Properties in "Flavonoids: Biosynthesis, Biological Effects And Dietary Sources", ed. Raymond B. Keller, p.p. 53-96, Nova Science Publishers, Inc., New York
- [2] Wei Huang, Ming-Zhen Liu, et al., Design, syntheses, and antitumor activity of novel chromone and aurone derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15 (2007) 5191–5197
- [3] Jiu-Hong Wu, Xi-Hong Wang, et al., Anti-AIDS Agents 54. A Potent Anti-HIV Chalcone and Flavonoids from Genus *Desmos*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 13 (2003) 1813–1815
- [4] Jeremy P. E. Spencer, David Vauzour, Katerina Vafeiadou, 2010, Dietary Flavonoids as Neuroprotective Agents in "Micronutrients and brain health", ed. Lester Packer et al., p.p. 207-224, CRC Press, New York
- [5] Nigel C. Veitch and Renee J. Grayer , 2006, Chalcones, Dihydrochalcones, and Aurones in "Flavonoids-Chemistry, Biochemistry and Applications", ed. Øyvind M. Andersen, Kenneth R. Markham, p.p. 1003-1100, Taylor & Francis, New York
- [6] Ahmed Kamal, G. Ramakrishna, et al., Synthesis and anti-cancer activity of chalcone linked imidazolones, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20 (2010) 4865–4869
- [7] Chuanfei Jin, Yong-Ju Liang, et al., Synthesis and antitumor activity of novel chalcone derivatives, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 67 (2013) 215–217
- [8] V.Raja. Solomon, Hoyun Lee, Anti-breast cancer activity of heteroaryl chalcone derivatives, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 66 (2012) 213–220
- [9] Anastasia Detsi, Maya Majdalani, et al., Natural and synthetic 2'-hydroxy-chalcones and aurones: Synthesis, characterization and evaluation of the antioxidant and soybean lipoxygenase inhibitory activity, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17 (2009) 8073–8085
- [10] Balasubramanian Srinivasan, Thomas E. Johnson, Chengguo Xing, Chalcone-based inhibitors against hypoxia-inducible factor 1—Structure activity relationship studies, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 21 (2011) 555–557
- [11] Tamanna Narsinghani, Mukesh C. Sharma, Sakshi Bhargav, Synthesis, docking studies and antioxidant activity of some chalcone and aurone derivatives, *Med Chem Res* 2012, DOI 10.1007/s00044-012-0413-3
- [12] Balasubramanian Srinivasan, Thomas E. Johnson, et al., Structure-Activity Relationship Studies of Chalcone Leading to 3-Hydroxy-4,3',4',5'-tetramethoxychalcone and Its Analogues as Potent Nuclear Factor  $\kappa$ B Inhibitors and Their Anticancer Activities, *J. Med. Chem.* 2009, 52, 7228–7235
- [13] Rong Sheng a, Yu Xu et al., Design, synthesis and AChE inhibitory activity of indanone and aurone derivatives, *European Journal of Medicinal Chemistry* 44 (2009) 7-17
- [14] M. Koufaki, A. Detsi and C. Kizirid, Multifunctional Lipoic Acid Conjugates, *Current Medicinal Chemistry*, 2009, 16, 4728-4742
- [15] Detsi A., Bouloumbasi D., et al., Design and Synthesis of Novel Quinolinone-3-aminoamides and Their  $\alpha$ -Lipoic Acid Adducts as Antioxidant and Anti-inflammatory Agents, *J. Med. Chem.* 2007, 50, 2450-2458

- [16] G. Melagraki, A. Afantitis, et al., Synthesis and evaluation of the antioxidant and anti-inflammatory activity of novel coumarin-3-aminoamides and their alpha-lipoic acid adducts, *European Journal of Medicinal Chemistry* 44 (2009) 3020–3026
- [17] M. Koufaki, A. Detsi, et al., Synthesis of chroman analogues of lipoic acid and evaluation of their activity against reperfusion arrhythmias, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 12 (2004) 4835–4841
- [18] T. Liptaj, 2008, Nuclear Magnetic Resonance in "Mitochondrial Medicine - Mitochondrial Metabolism, Diseases, Diagnosis and Therapy", ed. Anna Gvozdjaková, p. 279-302, Springer, Berlin
- [19] E. A. Williams, 2001, Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry in "Encyclopedia of Materials: Science and Technology", ed. Buschow et al., pp. 6319-6324, Elsevier Science Ltd.
- [20] P. J. Hore, 1999, NMR Principles in "Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry", ed. John C. Lindon, p.p. 1545-1553, Academic Press
- [21] Balci, M., 2005, "Basic <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR Spectroscopy", Elsevier
- [22] Peter L Rinaldi, 1999, Two-Dimensional NMR, Methods in "Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry", ed. John C. Lindon, p.p. 2370-2381, Academic Press
- [23] Arthur S. Edison, Frits Abildgaard, et al., 1994, [1] Practical Introduction to Theory and Implementation of Multinuclear, Multidimensional Nuclear Magnetic Resonance Experiments, in "Methods in Enzymology, Volume 239", ed. Thomas L. James, Norman J. Oppenheimer, p.p. 3-79, Academic Press
- [24] Wolfgang Schoefberger, Judith Schlagnitweit and Norbert Muller, 2011, Recent Developments in Heteronuclear Multiple-Bond Correlation Experiments, in "Annual Reports on NMR Spectroscopy, Volume 72", ed. Graham A. Webb, p.p. 1-60, Elsevier
- [25] Silverman, R.B., 2004, "The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action", Elsevier
- [26] J. R. Whitaker, 2003, ENZYMES|Functions and Characteristics in "Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)", ed. Benjamin Caballero, p.p. 2119-2125 Academic Press, Oxford, 2003
- [27] Dukes, M.N.G., 1991, Enzymes and enzyme inhibitors, in "Side Effects of Drugs Annual 15", ed. M.N.G. Dukes and J.K. Aronson, p.p. 337-339, Elsevier Science Publishers B.V.
- [28] Richard B. Silverman, 1995, Mechanism-Based Enzyme Inactivators in "Methods in Enzymology, Volume 249", ed. Daniel L. Purich, p.p. 240-283, Academic Press
- [29] Μαυρομούστακος, Θ., Ζουμπουλάκης, Π., 2008, "Μοριακή Μοντελοποίηση – Εφαρμογές στην Οργανική και Φαρμακευτική Χημεία", Ιατρικές Εκδόσεις Γιάννης Β. Παρισιάνος
- [30] P.F.W. Stouten, R.T. Kroemer, 2007, 4.12 - Docking and Scoring, in "Comprehensive Medicinal Chemistry II", ed. John B. Taylor and David J. Triggle, p.p. 255-281, Elsevier, Oxford
- [31] Brian K Shoichet, Susan L McGovern, et al., Lead discovery using molecular docking, *Current Opinion in Chemical Biology* 2002, 6:439–446
- [32] Akansha Saxena, Diana Wong et al., 2009, The basic concepts of Molecular Modeling, in "Methods in Enzymology, Volume 467", ed. Michael L. Johnson; Ludwig Brand, p.p. 307-334, Academic Press

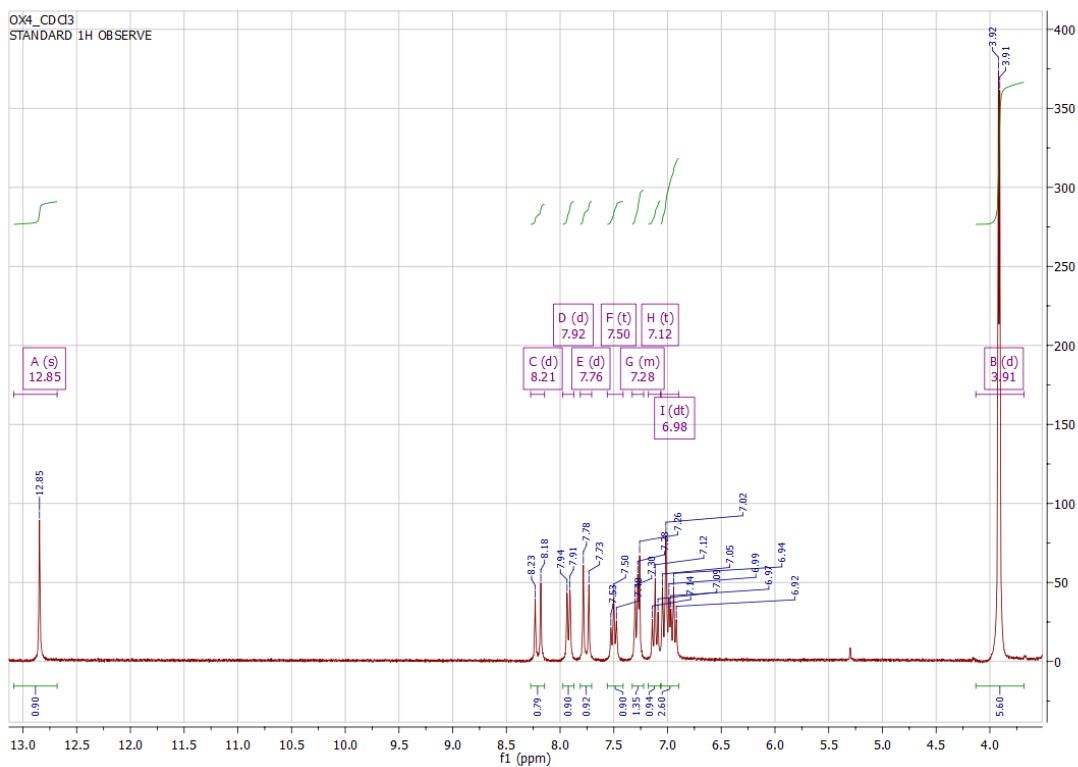
- [33] Kaushik Raha and Kenneth M. Merz Jr., 2005, Calculating Binding Free Energy in Protein–Ligand Interaction, in "Annual Reports in Computational Chemistry, Volume 1", ed. David C. Spellmeyer, p.p. 113-130, Elsevier
- [34] Te-Sheng Chang, An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors, *Int. J. Mol. Sci.* 2009, 10, 2440-2475
- [35] Isao Kubo, Ikuyo Kinoshita-Hori, et al., Flavonols from *Heterotheca inuloides*: Tyrosinase Inhibitory Activity and Structural Criteria, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 8 (2000) 1749-1755
- [36] Mahmud Tareq Hassan Khan, Molecular design of tyrosinase inhibitors: A critical review of promising novel inhibitors from synthetic origins, *Pure Appl. Chem.*, Vol. 79, No. 12, pp. 2277–2295, 2007
- [37] Shoukat Parvez, Moonkyu Kang, et al., Naturally Occurring Tyrosinase Inhibitors: Mechanism and Applications in Skin Health, Cosmetics and Agriculture Industries, *Phytother. Res.* 21, 805–816 (2007)
- [38] Antonella Fais, Marcella Corda, et al., Tyrosinase Inhibitor Activity of Coumarin-Resveratrol Hybrids, *Molecules* 2009, 14, 2514-2520
- [39] Orpheus Chatzivasiliou, Marina Roussaki, Eftichia Kritsi, Anastasia Detsi, Panagiotis Zoumpoulakis, "Exploring the potential of flavonoids as tyrosinase inhibitors: molecular docking studies of natural and synthetic chalcones and aurones", International Conference on Chemistry for Health, Athens 9-14 September 2012, Abstracts p.106
- [40] Khanapur Manjulatha, S. Srinivas, et al., Ethylenediamine diacetate (EDDA) mediated synthesis of aurones under ultrasound: Their evaluation as inhibitors of SIRT1, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22 (2012) 6160–6165
- [41] Milos Dokmanovic, Cathy Clarke and Paul A. Marks, Histone Deacetylase Inhibitors: Overview and Perspectives, *Mol Cancer Res* 2007;5:981-989
- [42] Antonello Mai, Lucia Altucci, Epi-drugs to fight cancer: From chemistry to cancer treatment, the road ahead, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41 (2009) 199–213
- [43] Philip Jones, Development of second generation epigenetic agents, *Med. Chem. Commun.*, 2011, DOI: 10.1039/c1md00199j
- [44] Raheleh Rahbari et al., A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification, *Biotechniques*. 2009 April ; 46(4): 277–284.
- [45] Ismaya, W.T., Rozeboom, H.J. et al., Crystal structure of *Agaricus bisporus* mushroom tyrosinase: identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone., (2011) *Biochemistry* 50: 5477
- [46] LigPrep, version 2.6, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012
- [47] Glide, version 5.8, Schrödinger, Inc., New York, NY, 2012
- [48] Friesner, R. A., Banks, J. L., et al, *J. Med. Chem.* 2004, 47, 1739–1749
- [49] Schrödinger Suite 2012 QM-Polarized Ligand Docking protocol; Glide version 5.8, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012; Jaguar version 7.9, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012; QSite version 5.8, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012.
- [50] Imafuku, Kimiaki; *Synthesis* 1987, (2), 199-201
- [51] Golub et al ; *Mol Cell Biochem* (2011) 356:107-115
- [52] Sekizaki, Haruo; *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 1988, V61(4), 1407-9
- [53] Venkateswarlu, Somepalli; *Tetrahedron* 2007, V63(29), 6909-6914
- [54] Schrödinger Suite 2012 Induced Fit Docking protocol; Glide version 5.8, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012; Prime version 3.1, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012.

- [55] Protein Preparation Wizard; Epik version 2.3, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012; Impact version 5.8, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012; Prime version 3.1, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012.
- [56] Matoba Y et. al, Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis, *J Biol Chem.* 2006 Mar 31;281(13):8981-90.
- [57] Sendovski M. et. al, First structures of an active bacterial tyrosinase reveal copper plasticity, *J Mol Biol.* 2011 Jan 7;405(1):227-37
- [58] Garcia-Campana A.M., Bayens W. R. G., Historical evolution of chemiluminescence. In 'Chemiluminescence in Analytical Chemistry'. Marcel Dekker. New York, 2001
- [59] Yildiz G., Demiryurek A. T., Ferrous iron-induced luminol chemiluminescence: a method for hydroxyl radical study. *J. Pharm. Toxicol. Methods.* 1998, 39, 179-184.
- [60] P. Molyneux, The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarin J. Sci. Tech.*, 2004, Vol. 26, 211-219
- [61] C. Kontogiorgis, D. Hadjipavlou-Litina, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 2003, Vol. 18, 63
- [62] Ο. Σερίφη, Α. Ο. Χατζηβασιλείου, Μ. Οξενκιουν-Πετροπούλου, Α. Δέτση, Ηλεκτροχημικό Προφίλ Βιοδραστικών Ωρονών, 9ο ΠΕΣΧΜ, Αθήνα 23-25 Μαΐου 2013
- [63] Serifi O., Tsopelas F., Kypreou A.-M., Ochsenkühn-Petropoulou M., Kefalas P., Detsi A., *J. Phys. Org. Chem.* 26:226 (2013).
- [64] Detsi A., Majdalani M., Kontogiorgis C.A., Hadjipavlou-Litina D., Kefalas P., *Bioorg. Med. Chem.* 17:8073 (2009).
- [65] Santos M.M.C., Garcia M. B. Q., Silva A.M.S., Santos R., Molière P., Fernades E., *Tetrahedron letters* 54:85 (2013).
- [66] Carole Dubois et al., Versatile Effects of Aurone Structure on Mushroom Tyrosinase Activity, *ChemBioChem* 2012, 13, 559 – 565

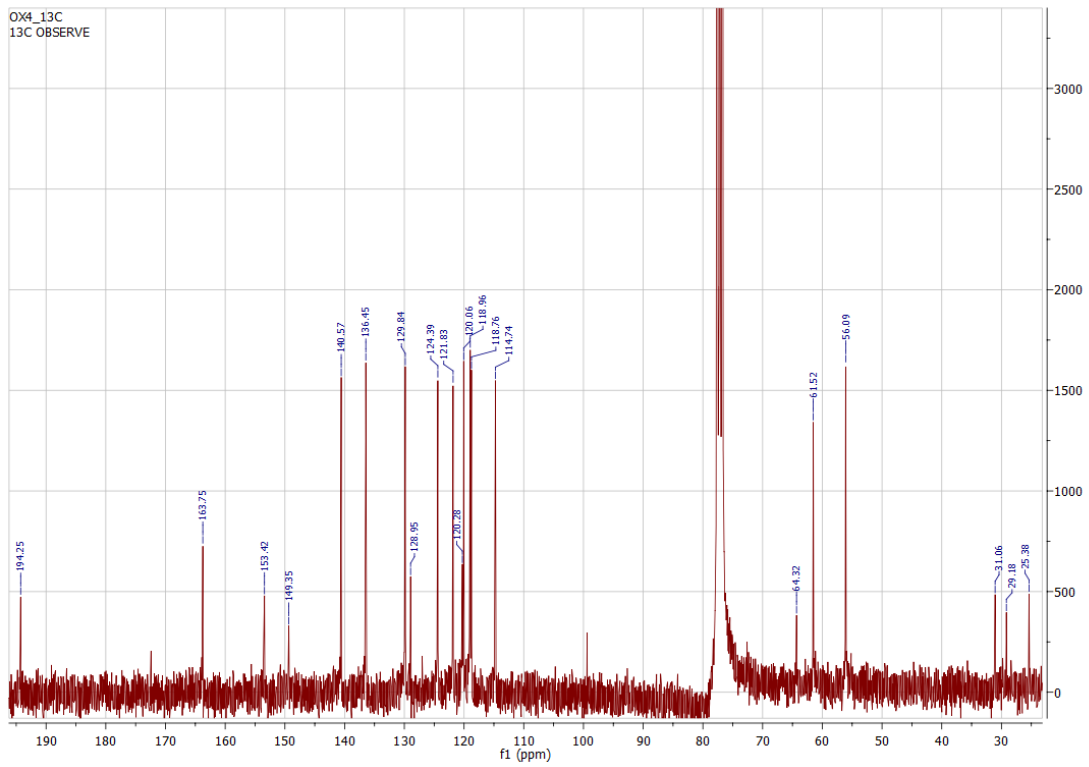
# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι: ΦΑΣΜΑΤΑ NMR



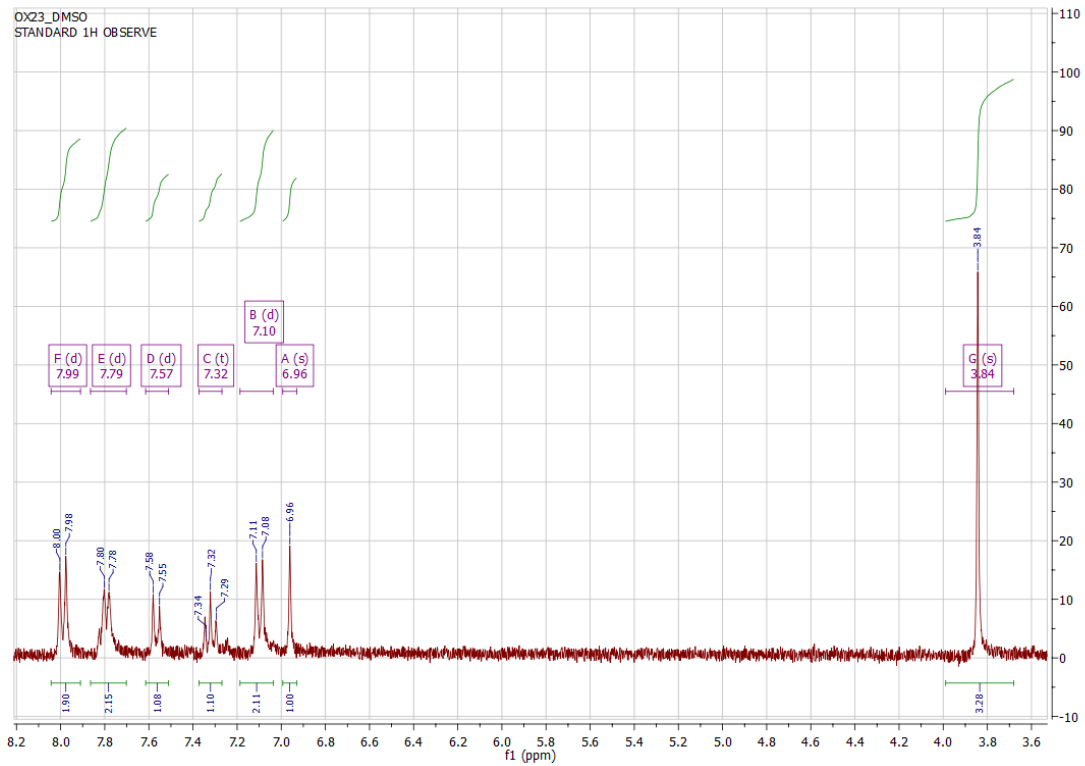
Εικόνα Π-Ι-1: Το  $^1\text{H}$  NMR φάσμα της ένωσης **3b**



Εικόνα Π-Ι-2: Το  $^1\text{H}$  NMR φάσμα της ένωσης **3c**

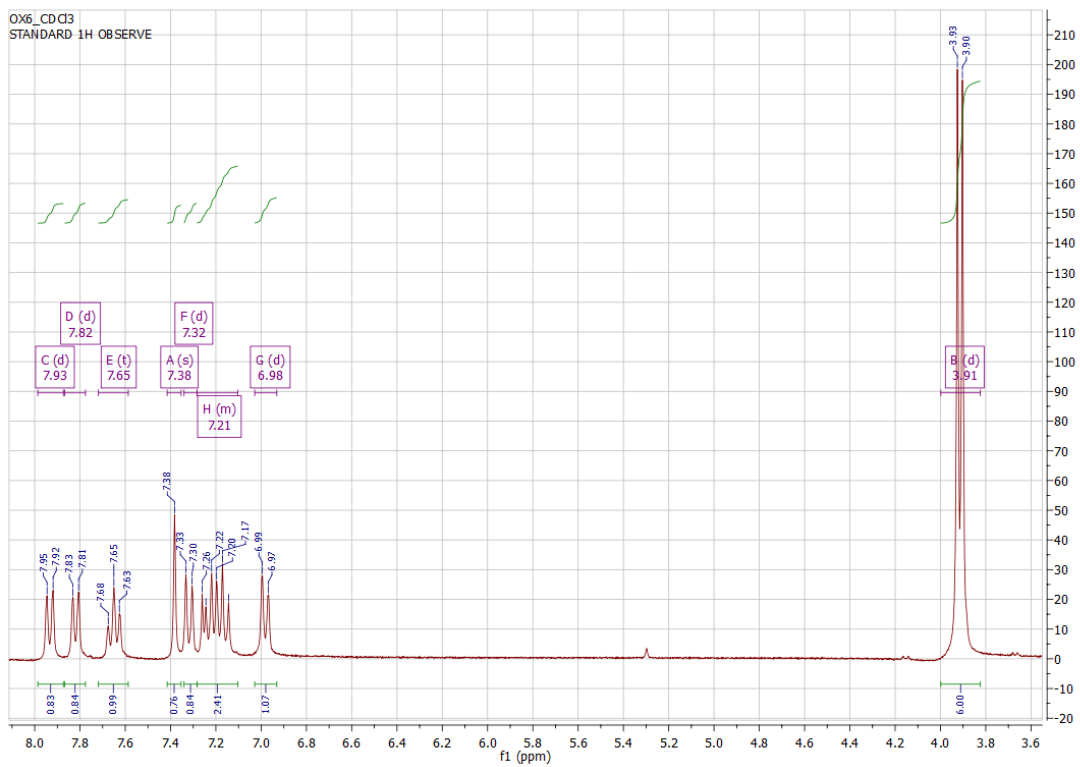


Εικόνα Π-Ι-3: Το  $^{13}\text{C}$  NMR φάσμα της ένωσης 3c

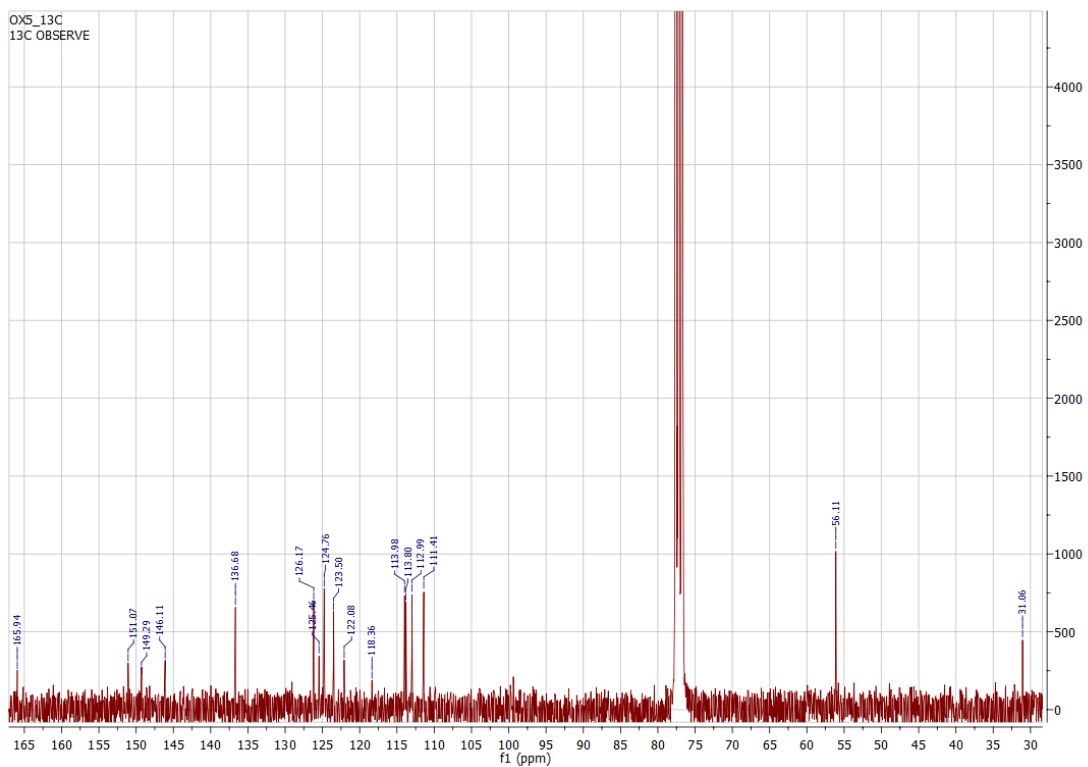


Εικόνα Π-Ι-4: Το  $^1\text{H}$  NMR φάσμα της ένωσης 4a

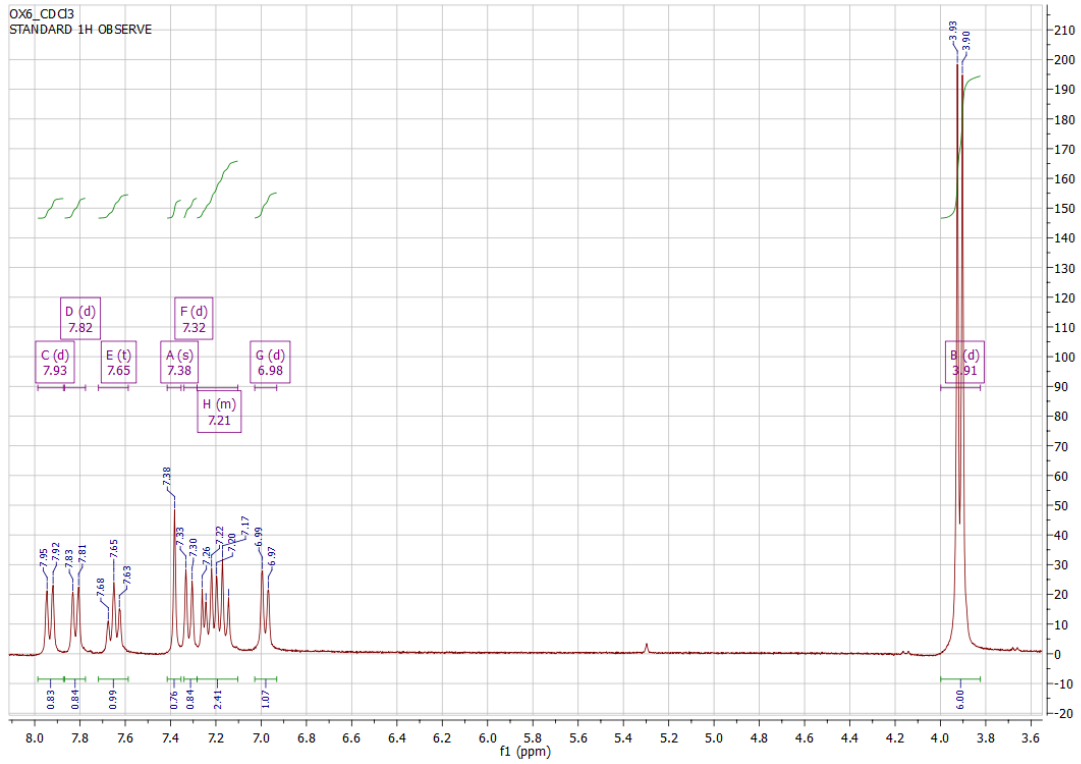




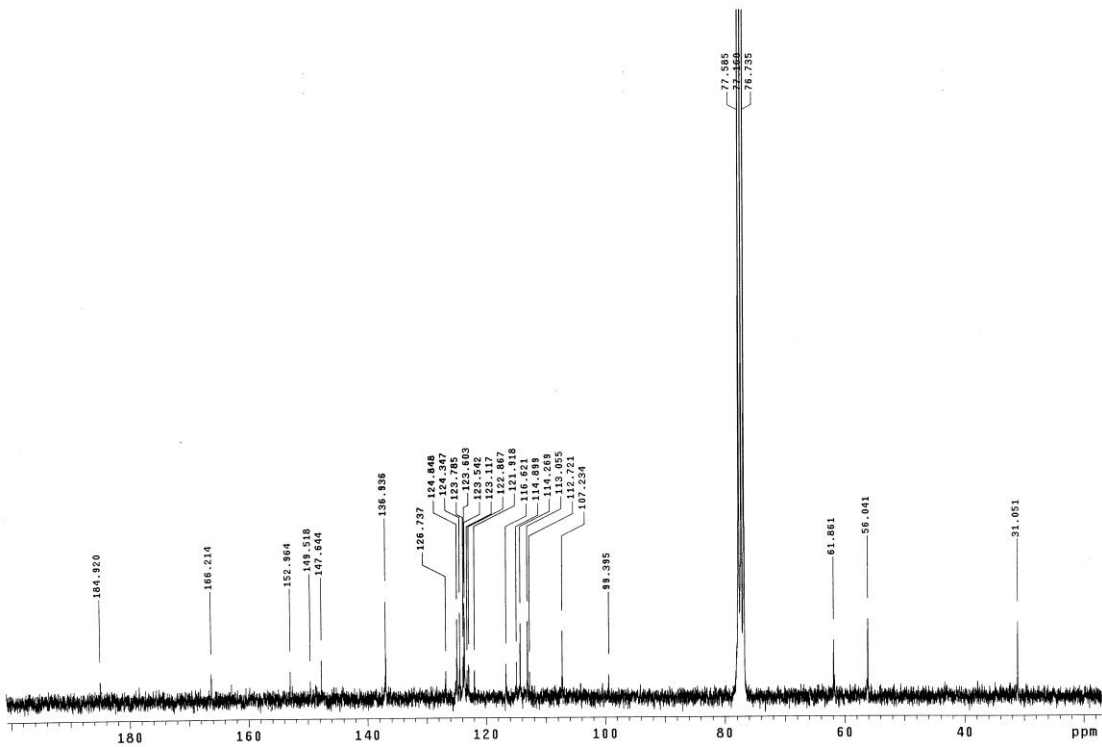
Εικόνα Π-Ι-5: Το  $^1\text{H}$  NMR φάσμα της ένωσης **4b**



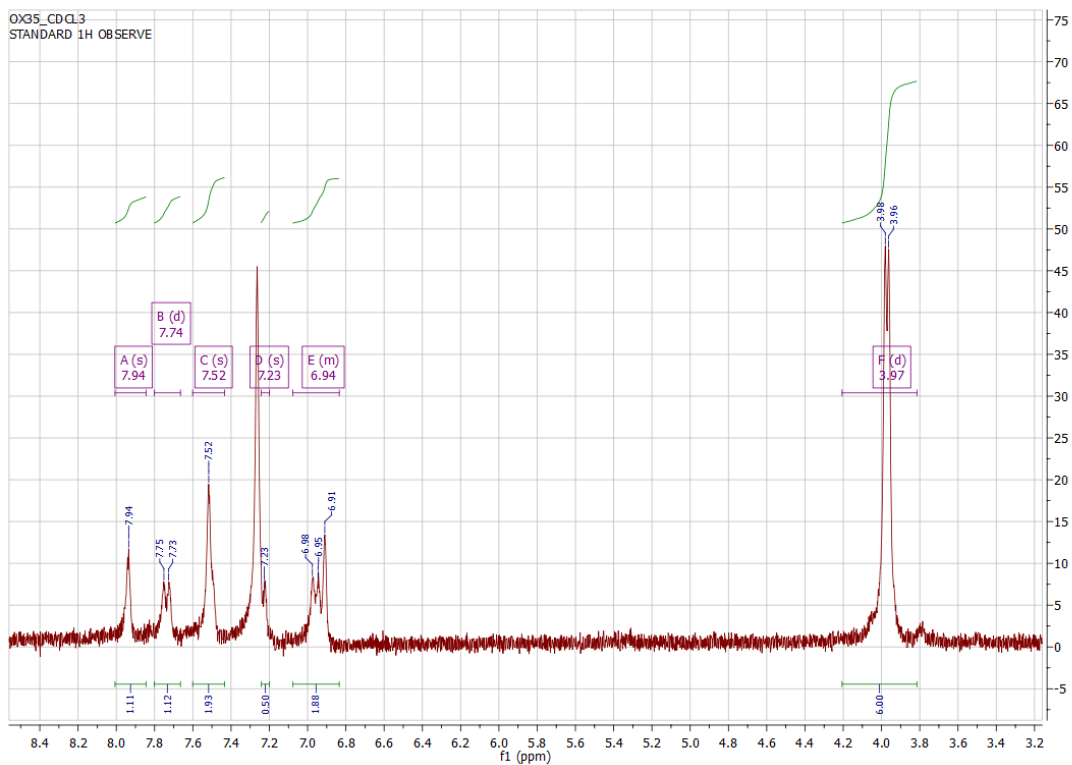
Εικόνα Π-Ι-6: Το  $^{13}\text{C}$  NMR φάσμα της ένωσης **4b**



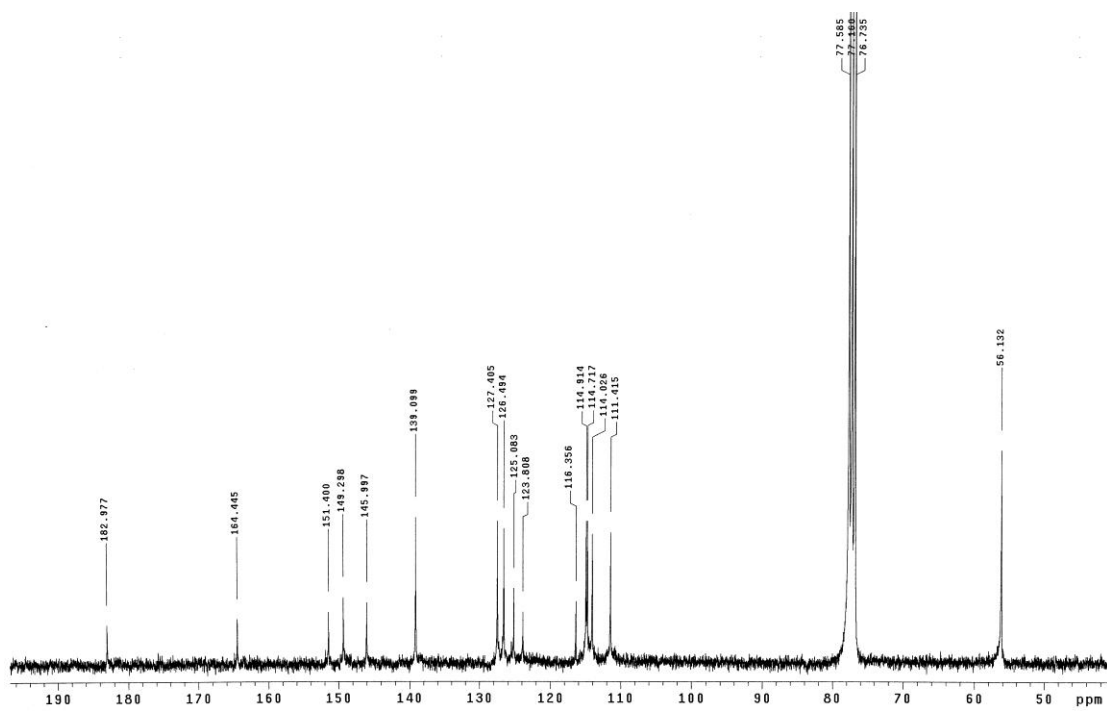
Εικόνα Π-Ι-7: Το  $^1\text{H}$  NMR φάσμα της ένωσης **4c**



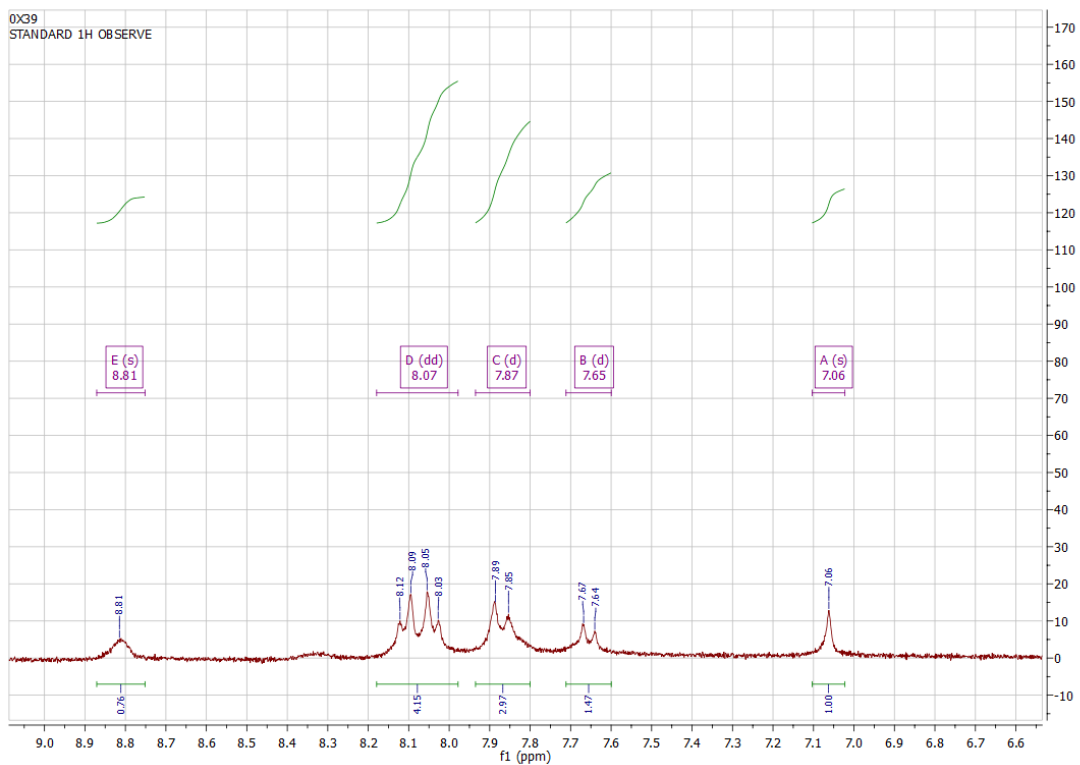
Εικόνα Π-Ι-8: Το  $^{13}\text{C}$  NMR φάσμα της ένωσης **4d**



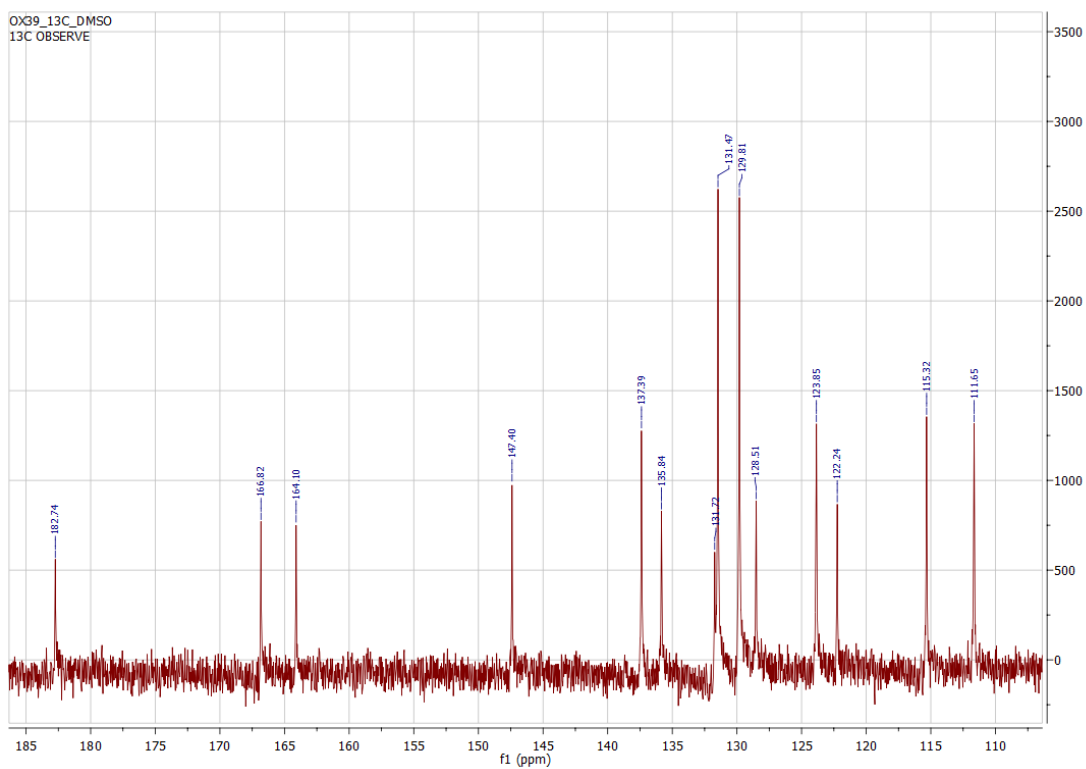
Εικόνα Π-Ι-9: Το  $^1\text{H}$  NMR φάσμα της ένωσης **4d**



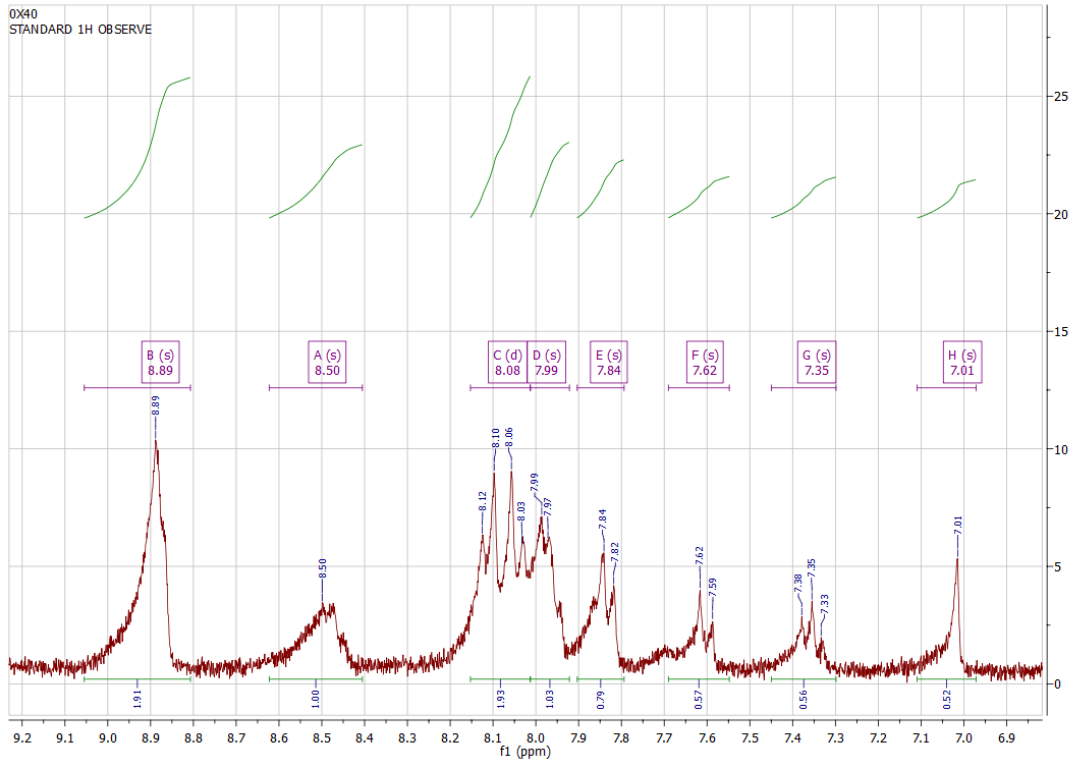
Εικόνα Π-Ι-10: Το  $^{13}\text{C}$  NMR φάσμα της ένωσης **4d**



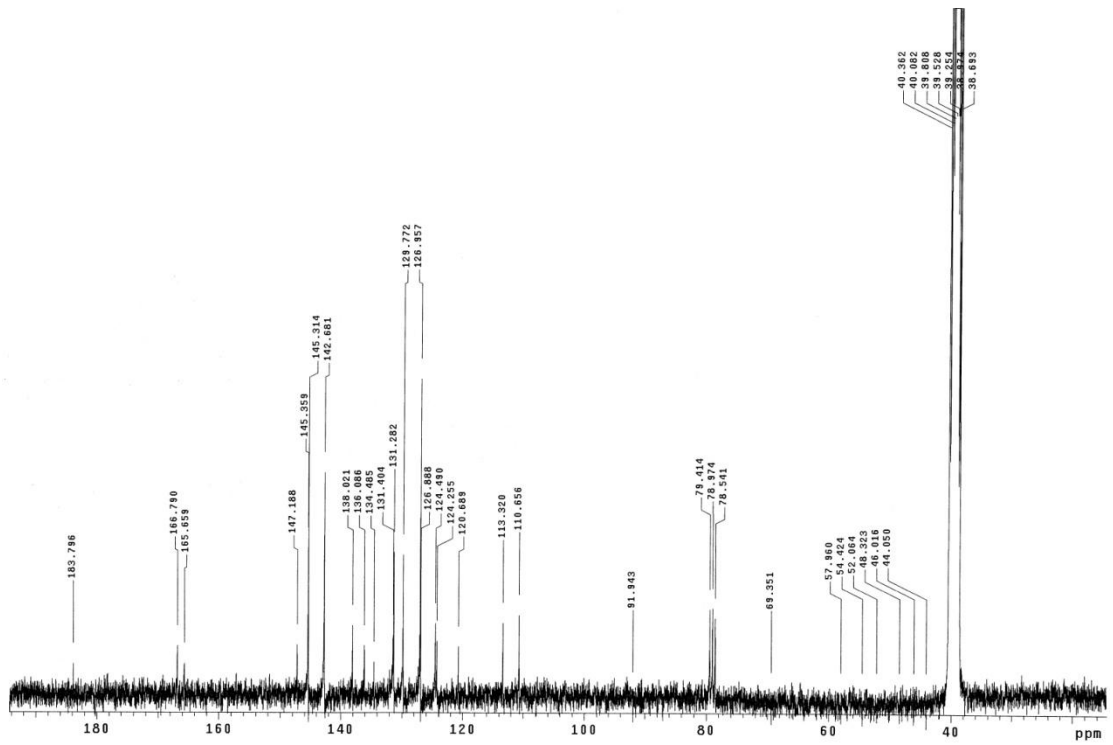
Εικόνα Π-Ι-11: Το  $^1\text{H}$  NMR φάσμα της ένωσης **4f**



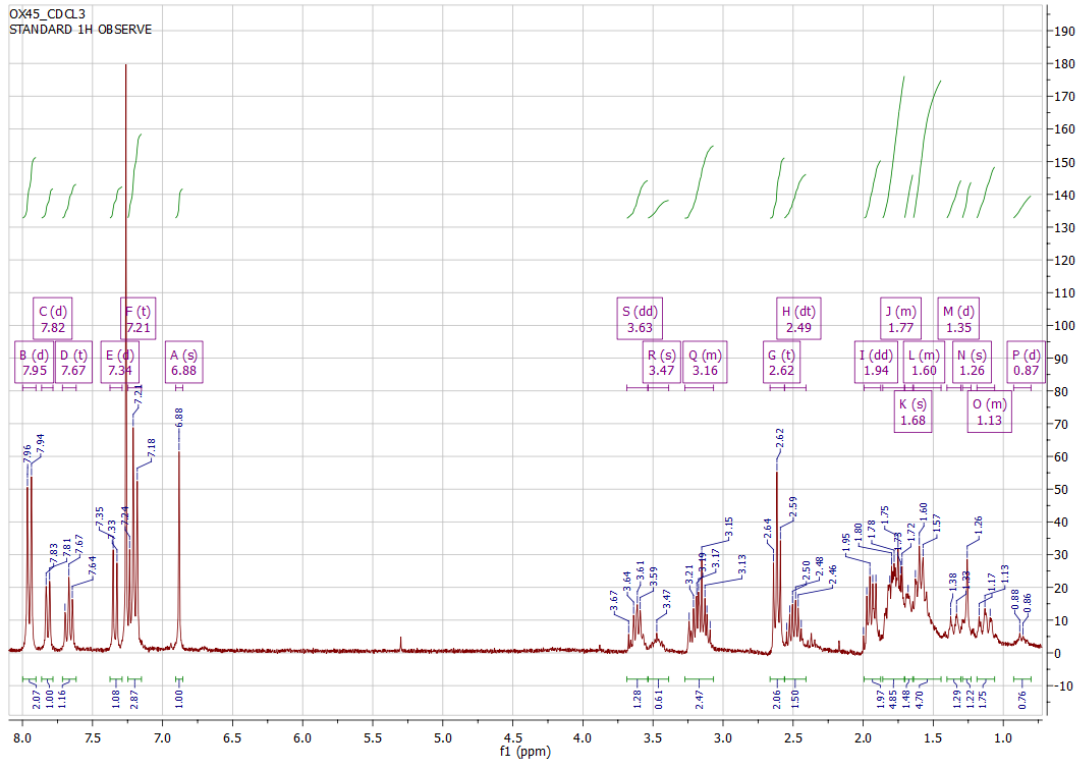
Εικόνα Π-Ι-12: Το  $^{13}\text{C}$  NMR φάσμα της ένωσης **4f**



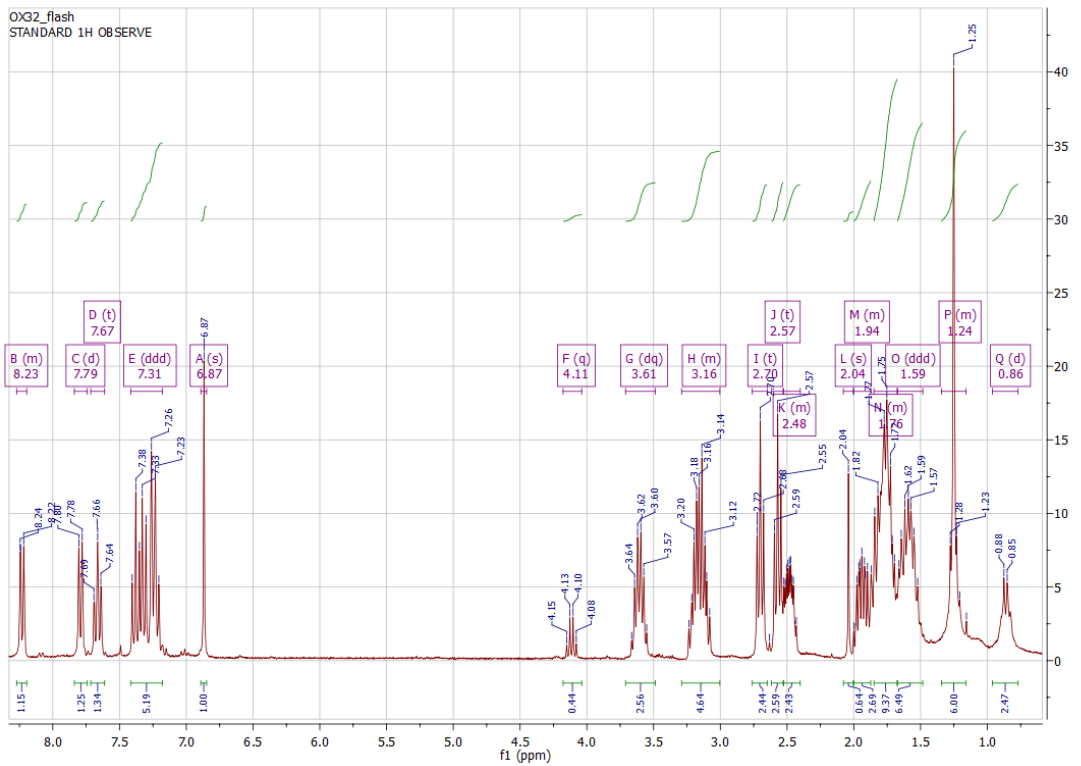
Εικόνα Π-I-13: Το  $^1\text{H}$  NMR φάσμα της ένωσης **4g**



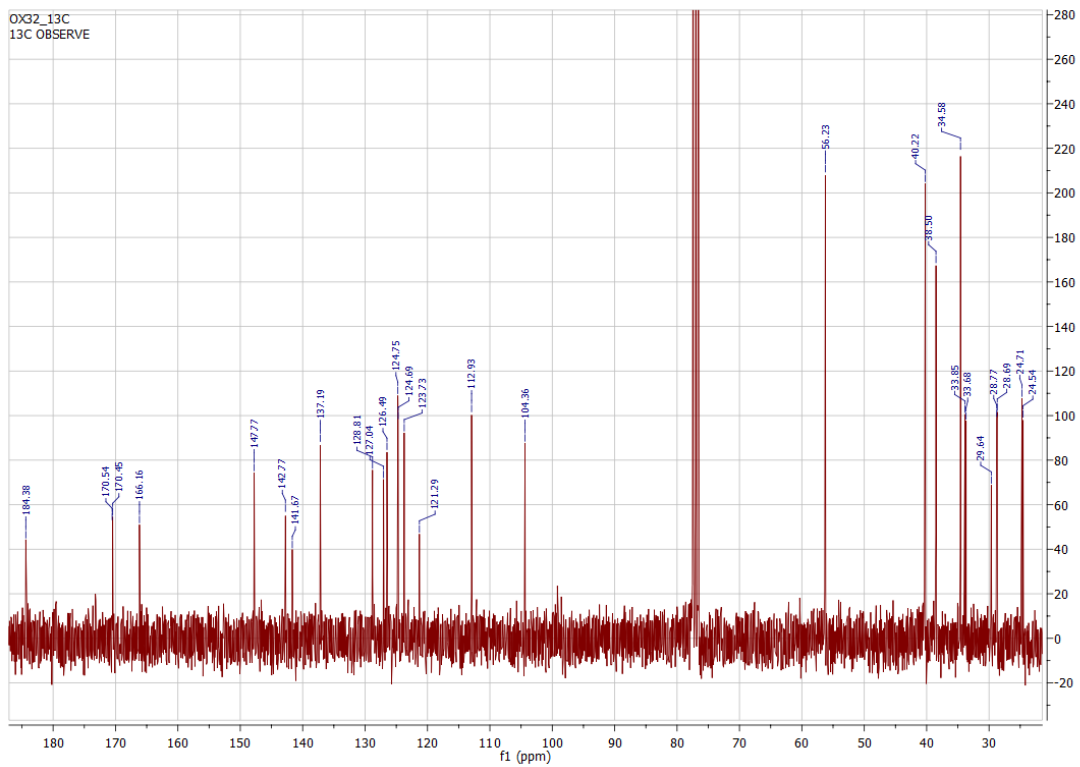
Εικόνα Π-I-14: Το  $^{13}\text{C}$  NMR φάσμα της ένωσης **4g**



Εικόνα Π-Ι-15: Το  $^1\text{H}$  NMR φάσμα της ένωσης **7a**

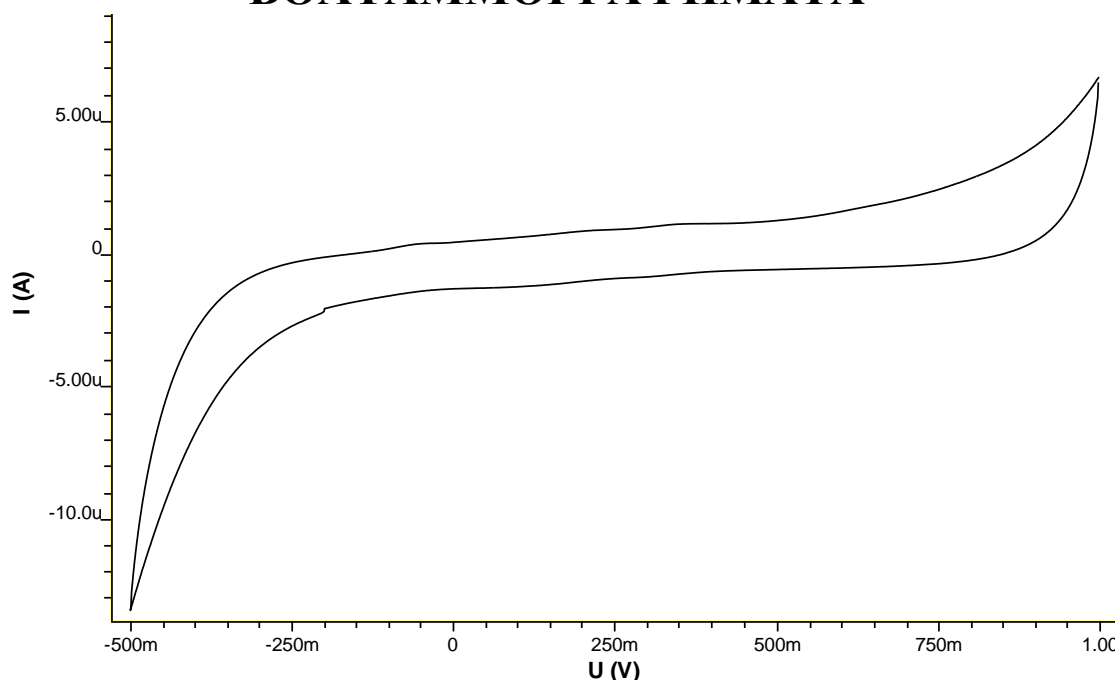


Εικόνα Π-Ι-16: Το  $^1\text{H}$  NMR φάσμα της ένωσης **7b**

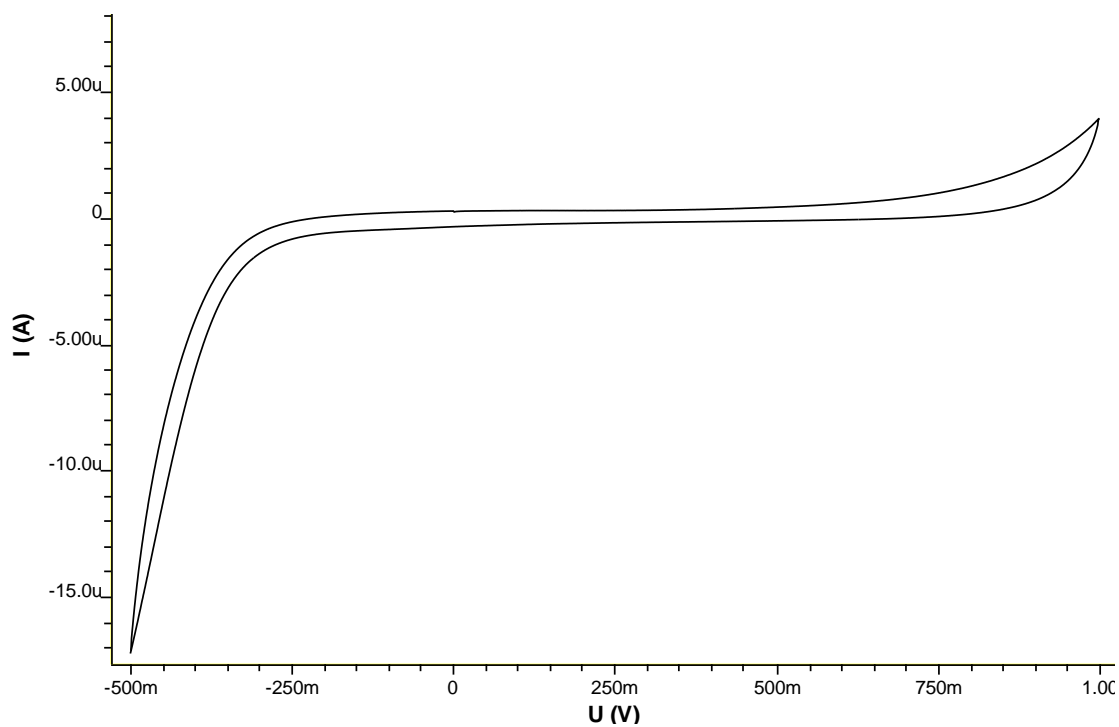


Εικόνα II-I-17: Το  $^{13}\text{C}$  NMR φάσμα της ένωσης **7b**

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ: ΚΥΚΛΙΚΑ ΒΟΛΤΑΜΜΟΓΡΑΦΗΜΑΤΑ

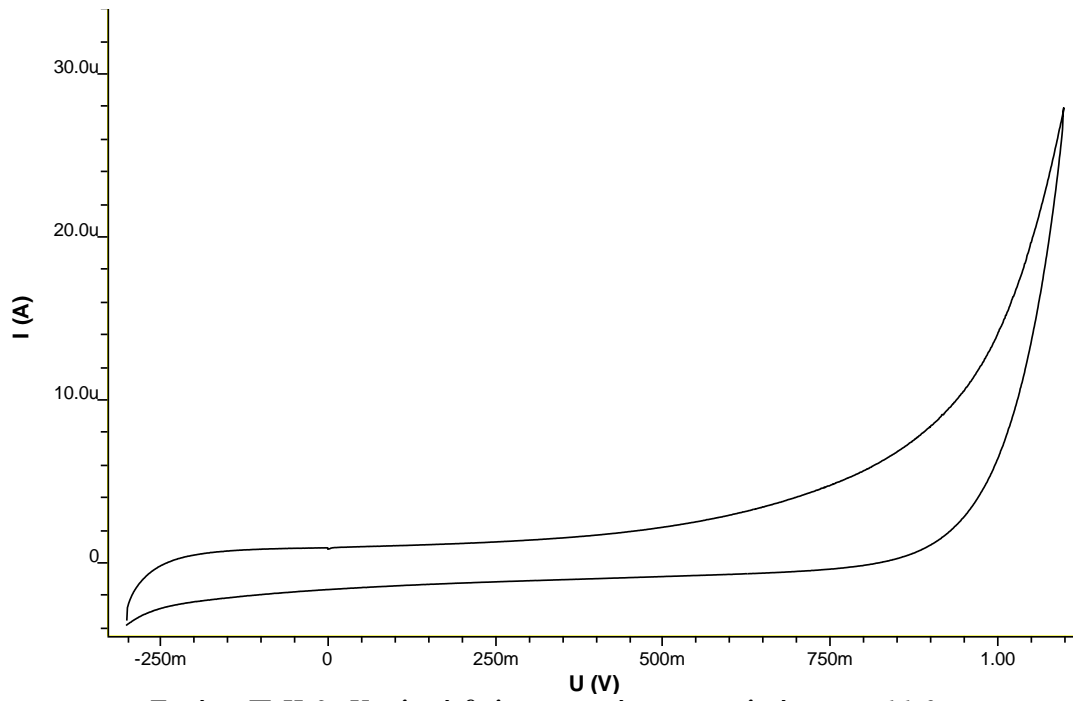


Εικόνα ΙΙ-ΙΙ-1: Κυκλικό βολταμμογράφημα τυφλού σε pH 4,0

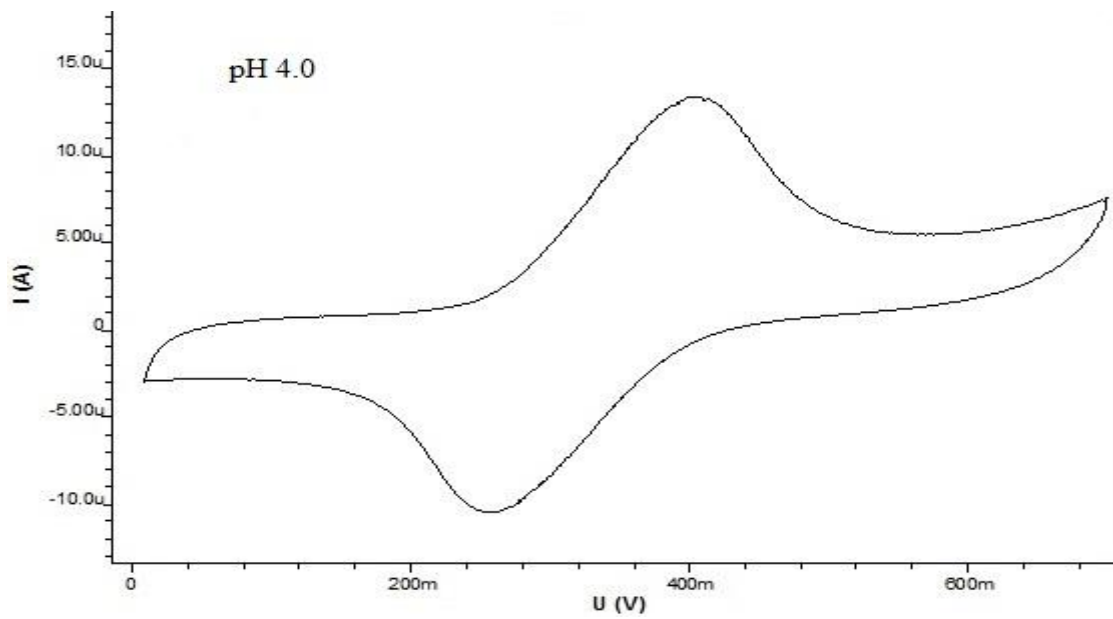


Εικόνα ΙΙ-ΙΙ-2: Κυκλικό βολταμμογράφημα τυφλού σε pH 7,4

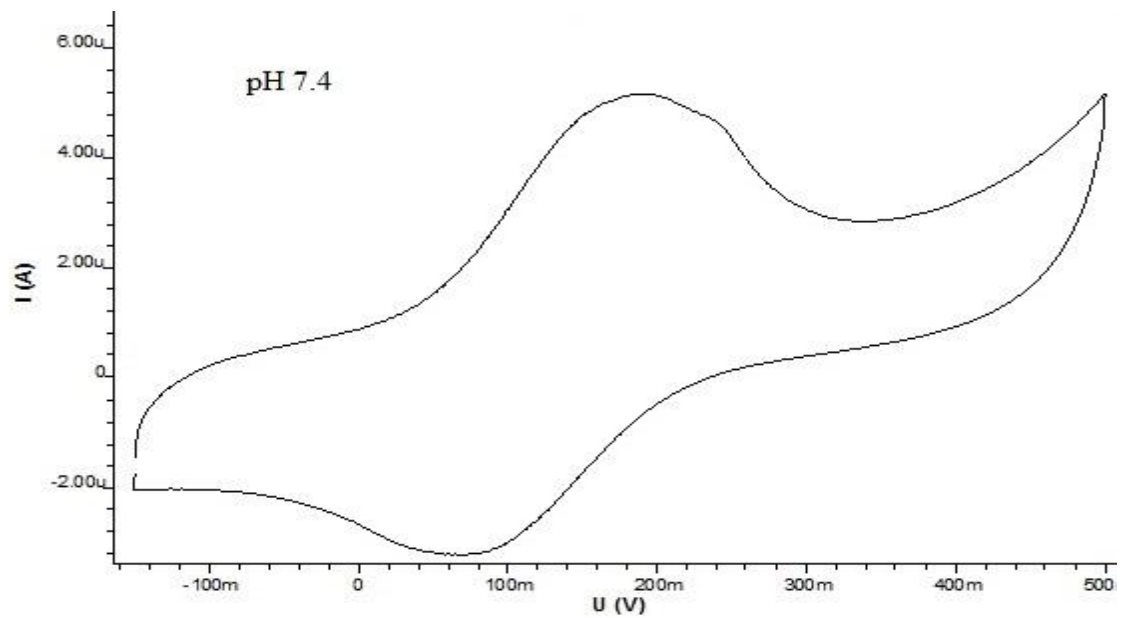




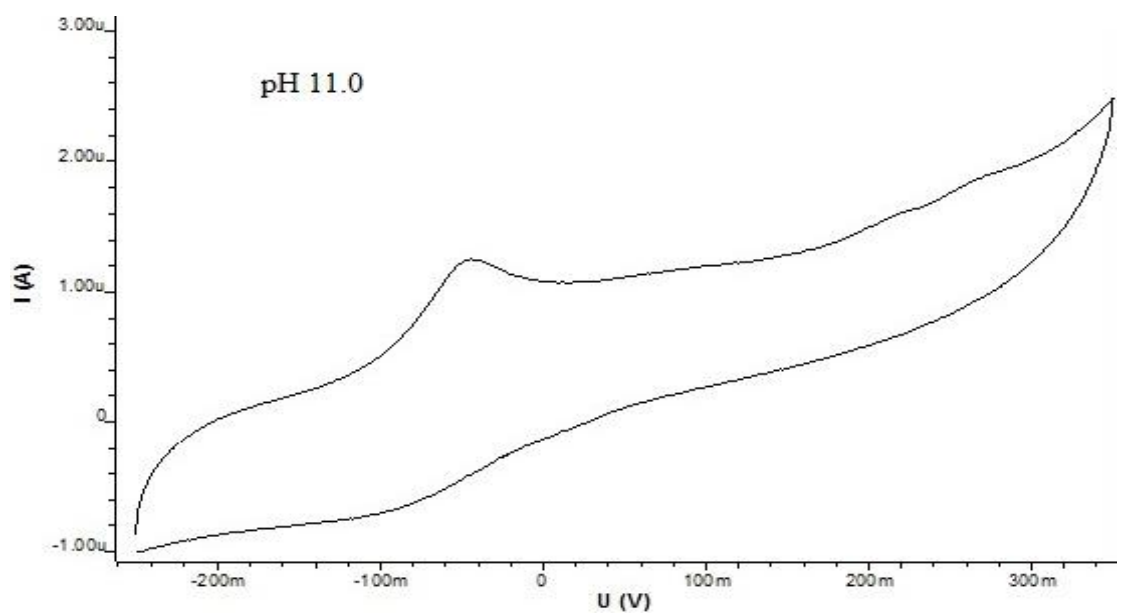
Εικόνα Π-Π-3: Κυκλικό βολταμμογράφημα τυφλού σε pH 11,0



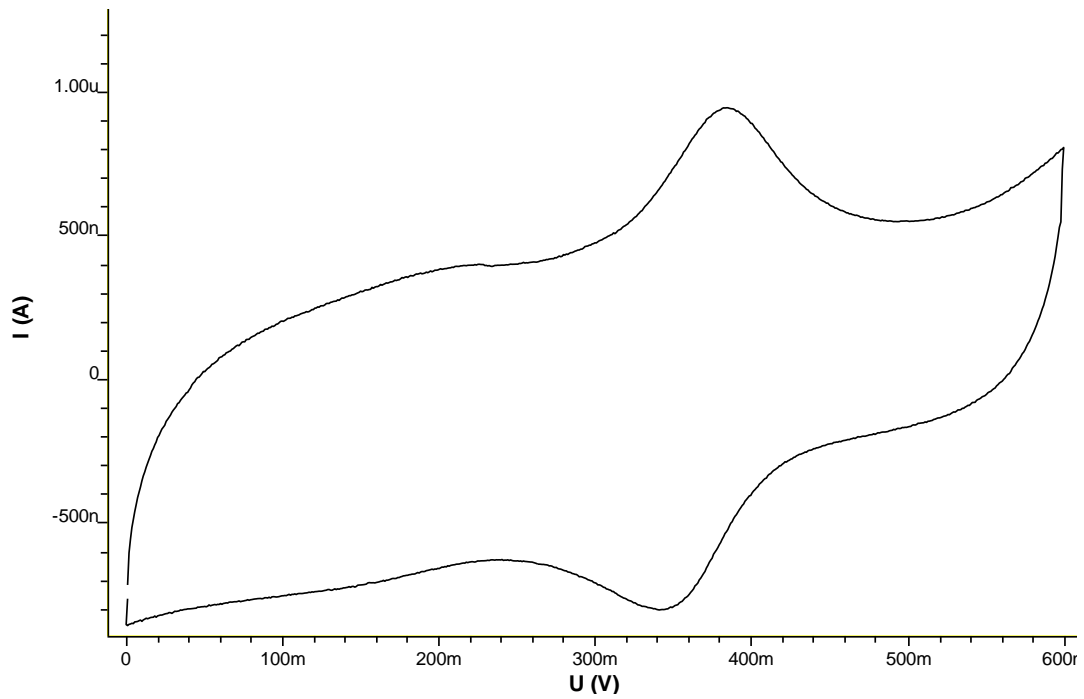
Εικόνα Π-Π-4: Κυκλικό βολταμμογράφημα του μορίου  $\Omega$  σε pH 4,0



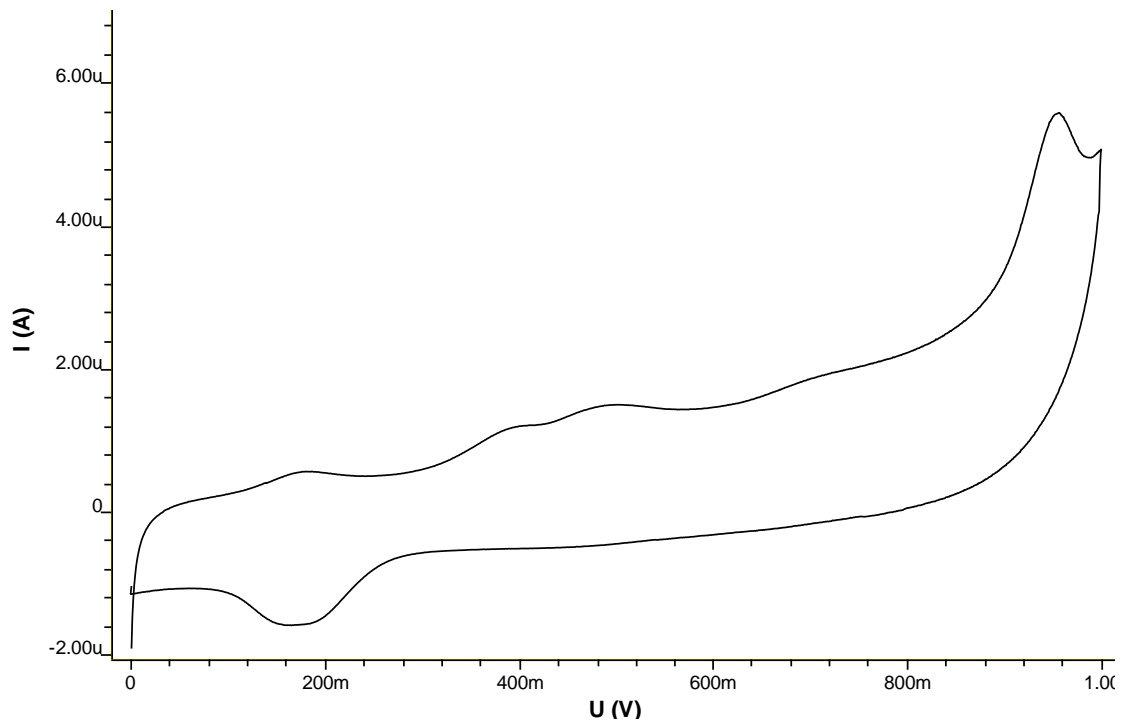
Εικόνα Π-Π-5: Κυκλικό βολταμμογράφημα του μορίου  $\Omega$  σε pH 7,4



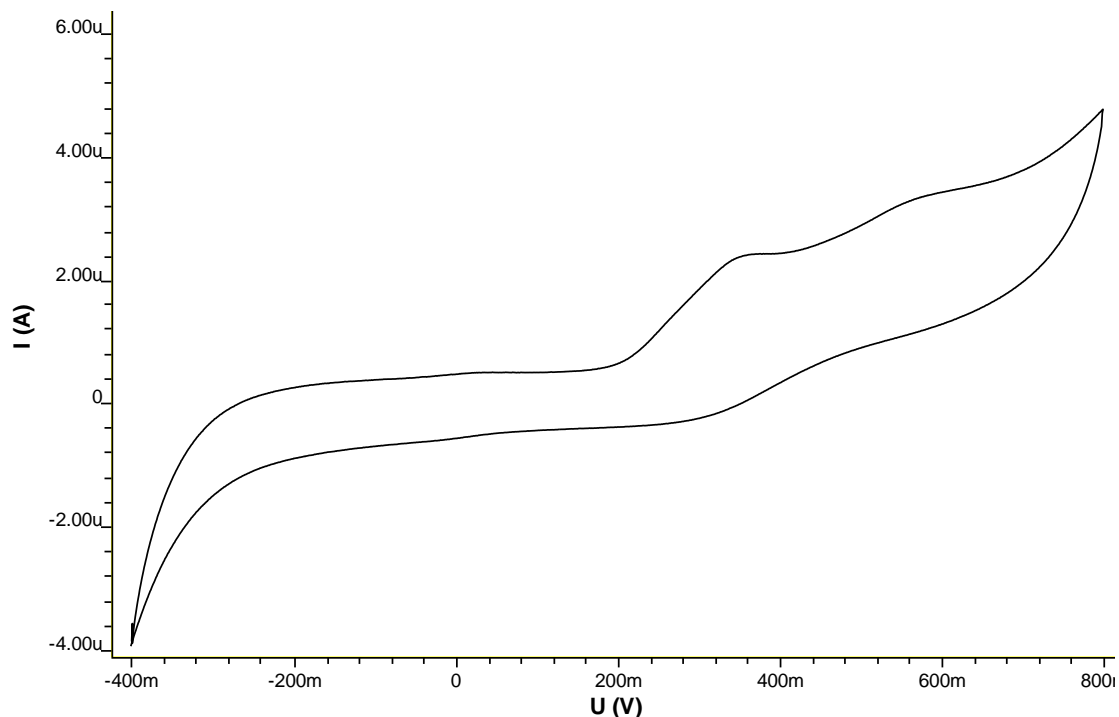
Εικόνα Π-Π-6: Κυκλικό βολταμμογράφημα του μορίου  $\Omega$  σε pH 11,0



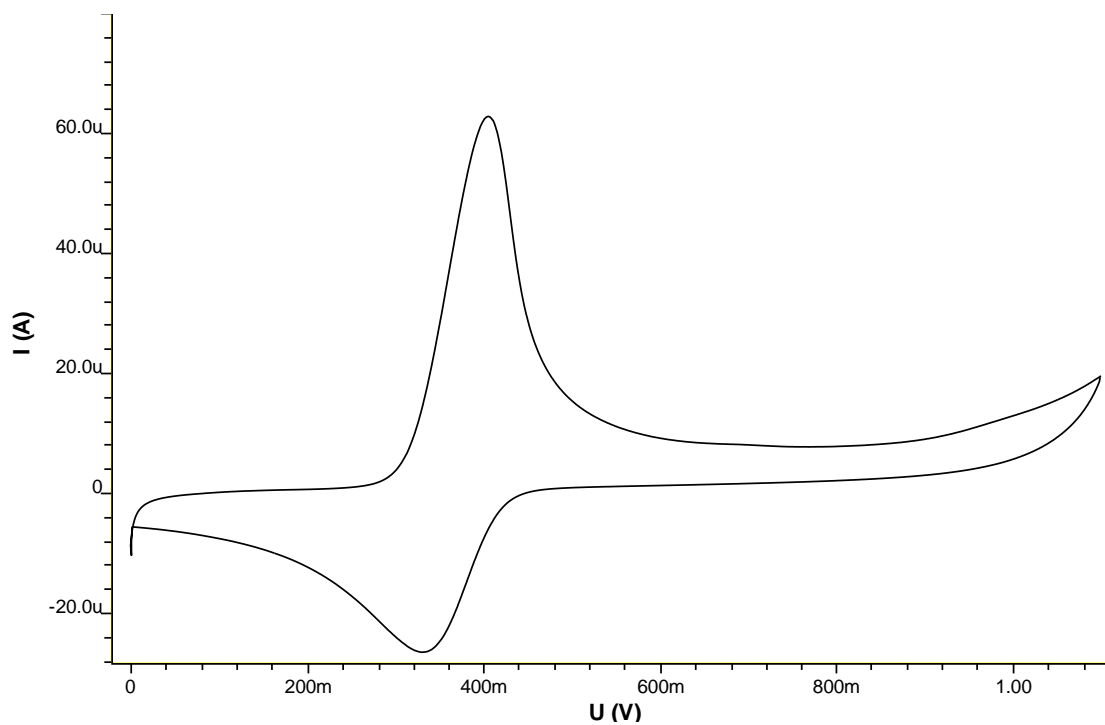
Εικόνα Π-Π-7: Κυκλικό βολταμμογράφημα του μορίου **5a** σε pH 4,4



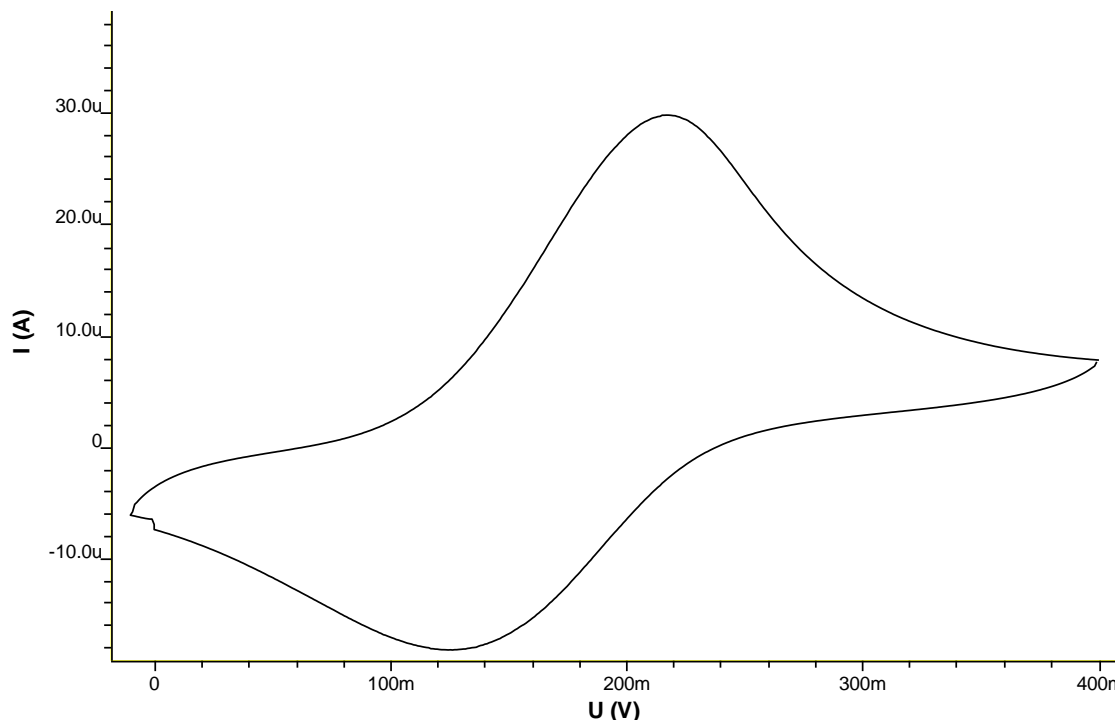
Εικόνα Π-Π-8: Κυκλικό βολταμμογράφημα του μορίου **5a** σε pH 7,8  
(χρώμα: ξεκινάει από σε κίτρινο σκούρο, αλλάζει χρώμα πορτοκαλί ανοιχτό προσωρινά και αλλάζει ξανά σε κίτρινο σκούρο)



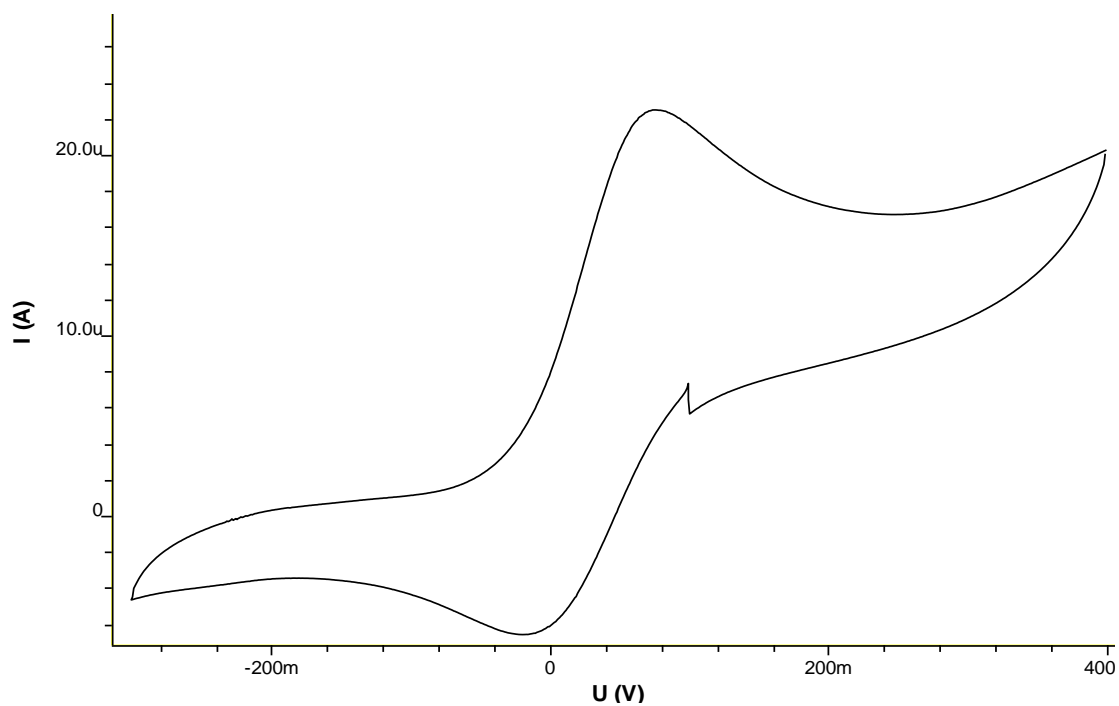
*Εικόνα Π-Π-9: Κυκλικό βολταμμογράφημα του μορίου 5a σε pH 10,7  
(χρώμα: ξεκινάει από σε κίτρινο σκούρο, αλλάζει σε χρώμα πορτοκαλί έντονο το οποίο και παραμένει)*



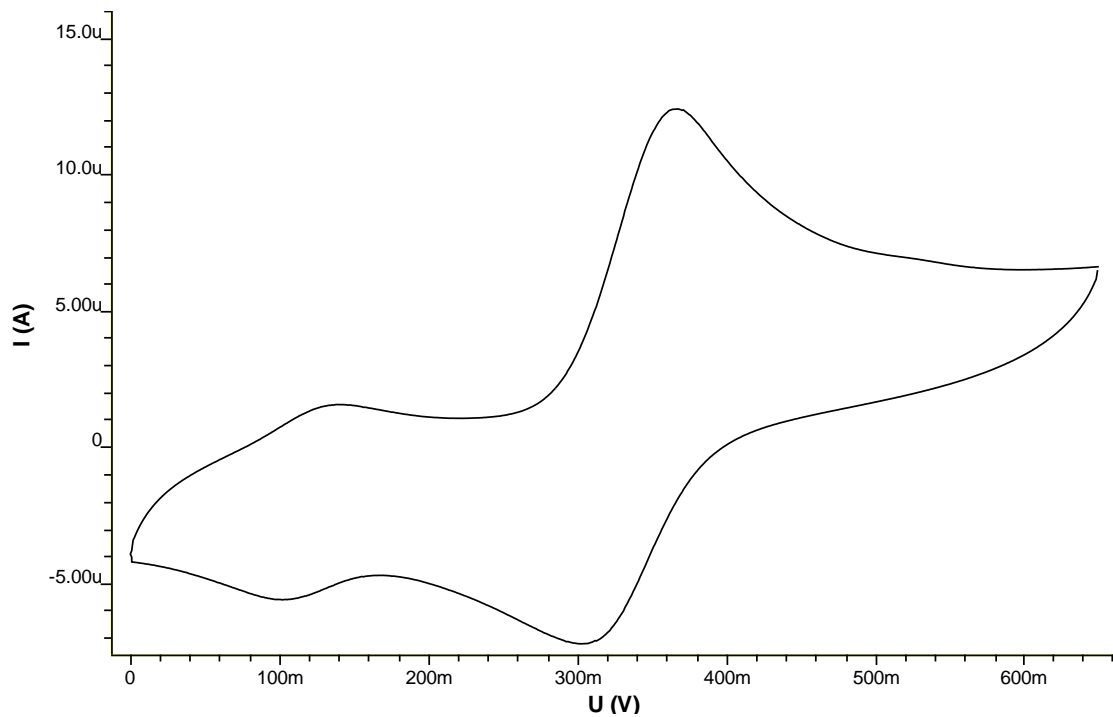
*Εικόνα Π-Π-10: Κυκλικό βολταμμογράφημα του μορίου 5b σε pH 4,4*



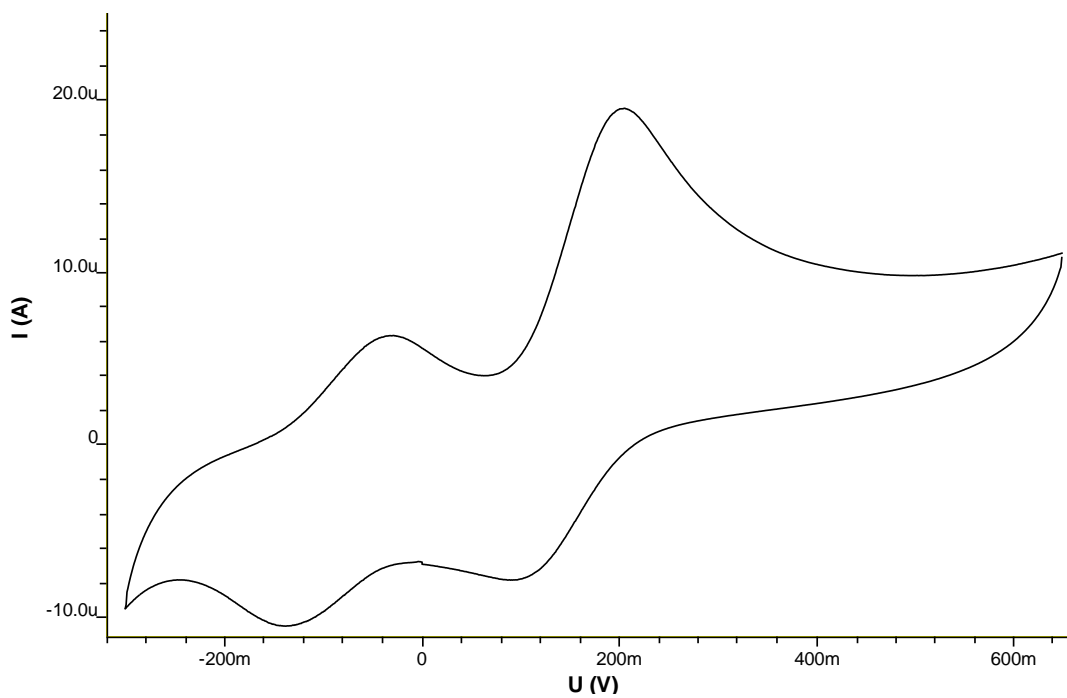
Εικόνα Π-Π-11: Κυκλικό βολταμμογράφημα του μορίου **5b** σε pH 7,8  
(χρώμα: αλλάζει σε χρώμα πορτοκαλοκόκκινο ανοιχτό)



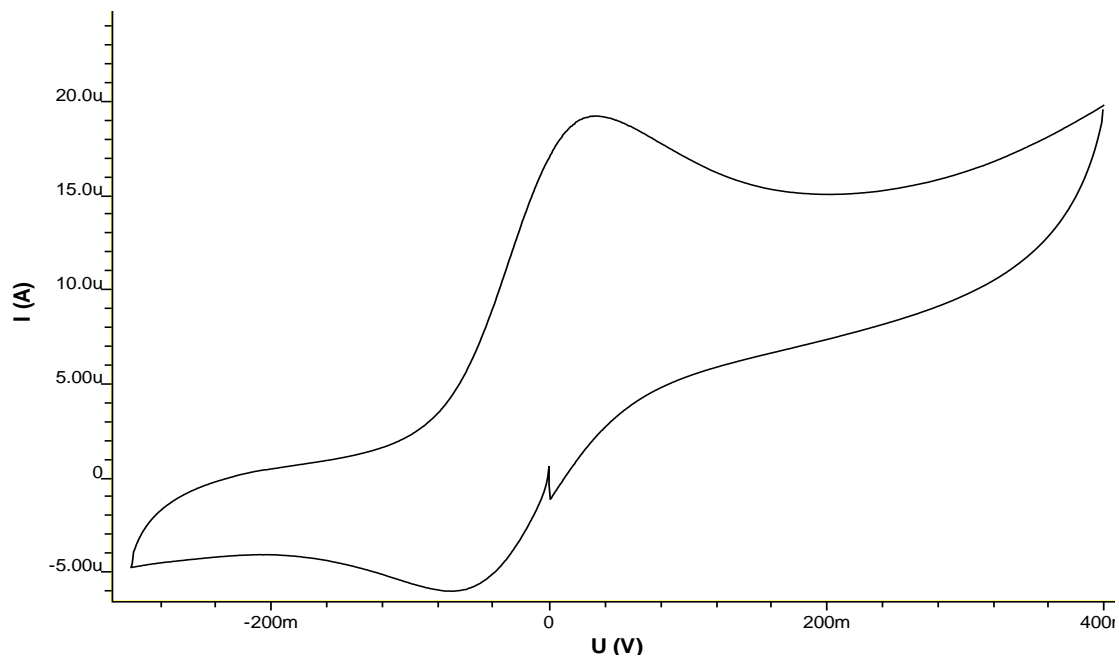
Εικόνα Π-Π-12: Κυκλικό βολταμμογράφημα του μορίου **5b** σε pH 10,7  
(χρώμα: αλλάζει σε χρώμα κόκκινο έντονο)



Εικόνα Π-Π-13: Κυκλικό βολταμμογράφημα του μορίου 5c σε pH 4,4 (χρώμα: πορτοκαλί)



Εικόνα Π-Π-14: Κυκλικό βολταμμογράφημα του μορίου 5c σε pH 7,8 (χρώμα: αλλάζει σε χρώμα κόκκινο)



*Εικόνα Π-II-15: Κυκλικό βολταμογράφημα του μορίου 5c σε pH 10,7  
(χρώμα: αλλάζει σε χρώμα κόκκινο έντονο)*

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ: ΔΟΜΕΣ/ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

### 1WX2

Ταυτότητα: Crystal Structure of the oxy-form of the copper-bound *Streptomyces castaneoglobisporus* tyrosinase complexed with a caddie protein prepared by the addition of hydrogenperoxide

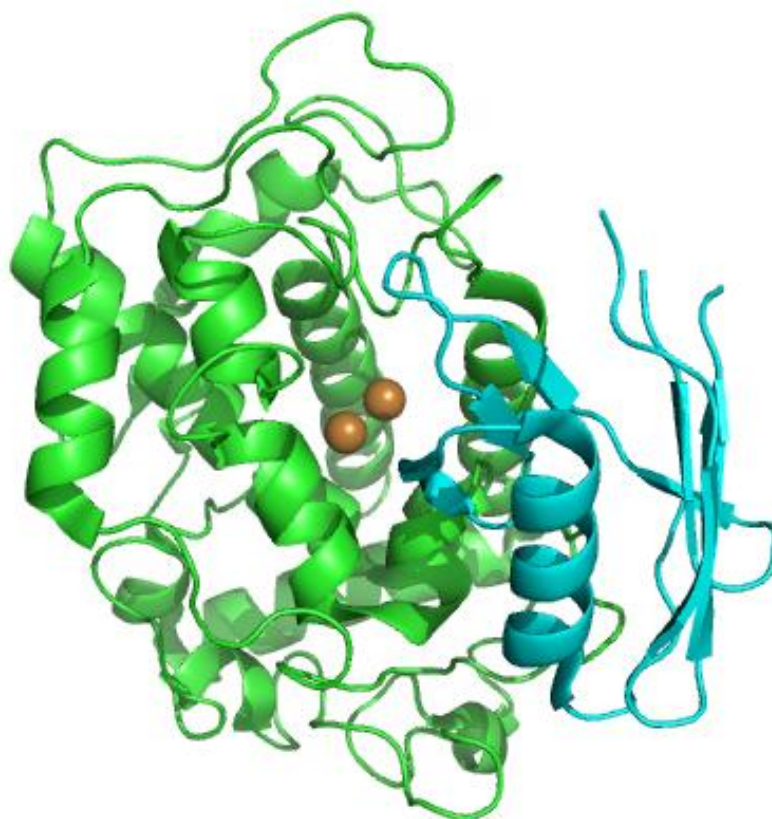
Κρυσταλλογραφικά δεδομένα:

**Method:** X-RAY DIFFRACTION

<b>Resolution[Å]:</b>	1.80
<b>R-Value:</b>	0.210 (obs.)
<b>R-Free:</b>	0.249
<b>Space Group:</b>	P 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2

#### Unit Cell:

<u>Length [Å]</u>	<u>Angles [°]</u>
a = 65.16	$\alpha = 90.00$
b = 96.55	$\beta = 90.00$
c = 54.72	$\gamma = 90.00$



Εικόνα ΙΙ-ΙΙΙ-1: Η δομή της 1WX2. Παρουσιάζονται τα ιόντα Cu στην περιοχή του ενεργού κέντρου (καφέ σφαίρες) και η caddie protein (τυρκουάζ αλυσίδα)



### **3NM8**

Ταυτότητα: Crystal structure of Tyrosinase from *Bacillus megaterium*  
Κρυσταλλογραφικά δεδομένα:

**Method:** X-RAY DIFFRACTION

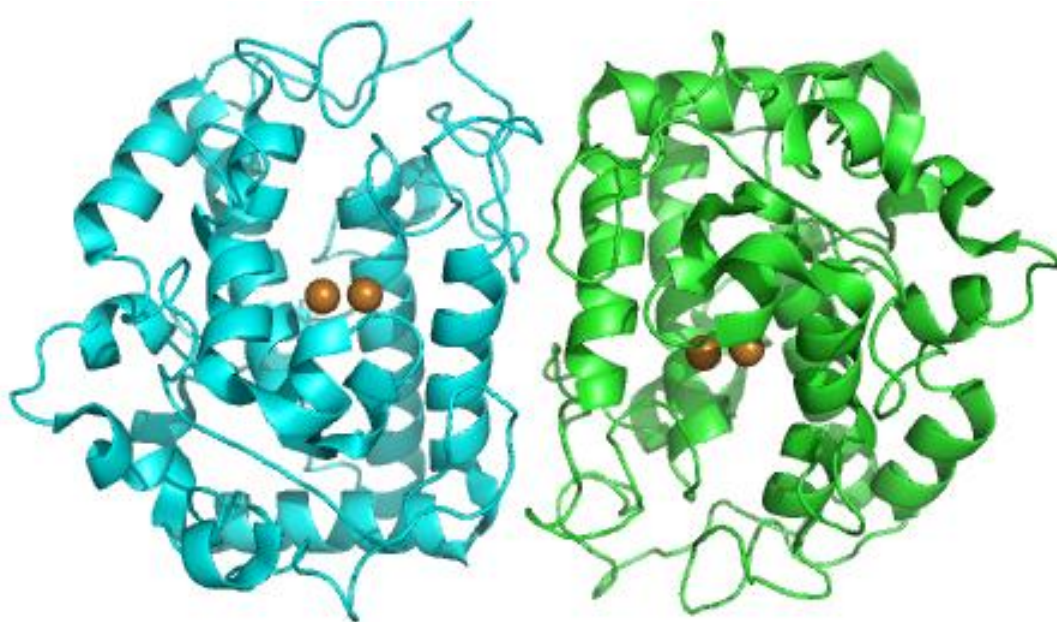
---

<b>Resolution[Å]:</b>	2.00
<b>R-Value:</b>	0.225 (obs.)
<b>R-Free:</b>	0.273
<b>Space Group:</b>	P 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>

---

#### **Unit Cell:**

<u>Length [Å]</u>	<u>Angles [°]</u>
a = 51.21	$\alpha = 90.00$
b = 84.49	$\beta = 90.00$
c = 146.31	$\gamma = 90.00$



*Εικόνα Π-III-2: Η δομή της 3NM8 (cartoon). Παρουσιάζονται τα ιόντα Cu (καφέ σφαίρες) στην περιοχή του ενεργού κέντρου έκαστης αλυσίδας*

## **2Y9X**

Ταυτότητα: Crystal structure of PPO3, a tyrosinase from *Agaricus bisporus*, in deoxy-

Κρυσταλλογραφικά δεδομένα:

**Method:** X-RAY DIFFRACTION

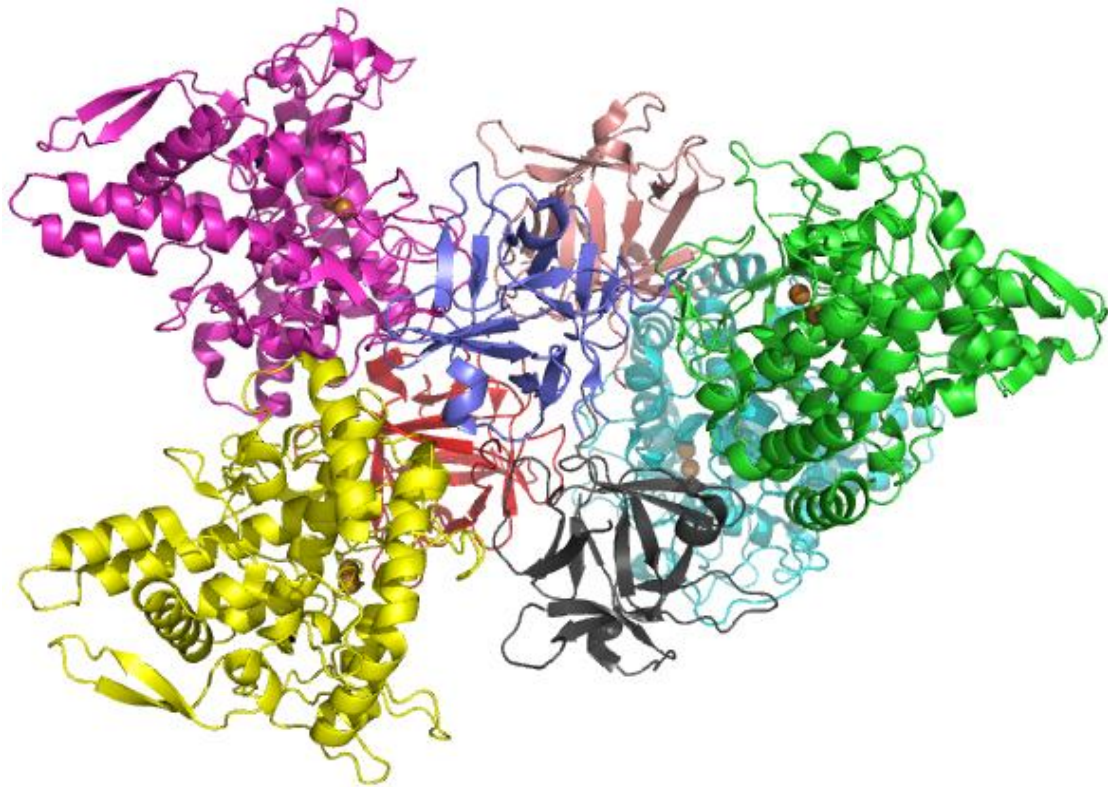
---

<b>Resolution[Å]:</b>	2.78
<b>R-Value:</b>	0.238 (obs.)
<b>R-Free:</b>	0.289
<b>Space Group:</b>	P 2 <sub>1</sub>

---

### **Unit Cell:**

<u>Length [Å]</u>	<u>Angles [°]</u>
a = 103.84	$\alpha = 90.00$
b = 104.82	$\beta = 110.45$
c = 119.36	$\gamma = 90.00$



*Εικόνα Π-III-3: Η δομή της 2Y9X (cartoon). Παρουσιάζονται τα ιόντα Cu (καφέ σφαίρες) στην περιοχή του ενεργού κέντρου έκαστης αλυσίδας*

## Σύγκριση αλληλουχιών 1WX2-3NM8

Μεθοδολογία: Needleman-Wunsch Sequence Alignment

Query: **1WX2** chain: A, Length: 281  
 Subject: **3NM8** chain: A, Length: 303  
 Identities: 131/307, i.e., 46.62 % (query) and 43.23 % (subject)  
 Similar: 174/307, i.e., 61.92 % (query) and 57.43 % (subject)

```

1WX2.A 1 MT-----VRKNQATLTADEKRRFVAAVLELKRSGRYDEFVIRTHNEFIMSDTDSG--ERTGH 54
      |.      |||  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
3NM8.A 1 MSNKYRVRKNVHLHLDTEKRDVVRTVLIILKEKGIYDRYIAWHGAAGKFHTPPGSDRNAAH 60

1WX2.A 55 RSPSFLPWHRRLDLDLFEQALQSVDSVTLPYWDWSADRTV----RASLWAPDFLGGTGRS 110
      |.|||||||.|||.|||.|||||.|||.|||.|||.|||.|||.|||.|||.|||.|||.||
3NM8.A 61 MSSAFLPWHREYLLRFERDLQSLNPEVTLPYWEWETDAQMDPSQSQIWSADFMGGNGNP 120

1WX2.A 111 TDGRVMD-GPFAASTGNW-PINVRVDSRTYLRRSLGGS--VAELPTRAEVESVLAISAYD 166
      ..| ||||| | | |. . . |. . | . | ||| . | . | |. ||
3NM8.A 121 IKDFIVDTGPFAA--GRWTTIDEQGNPSGGLKRNFGATKEAPTLPTRDDVLNALKITQYD 178

1WX2.A 167 LPPYNSASE-GFRNHLEGW-RGVNLHNRVHVWVGGQM-ATGVSPNDPVFWLHHAYVDKILW 223
      ||.. |. |||.|||. | ||||| ||||| .|||.| ||| |..|
3NM8.A 179 TPPWDMTSQNSFRNQLEGFINGPQLHNRVHRWVGGQMGVVPTAPNDPVFVLHHANVDRIW 238

1WX2.A 224 AEWQRRHPDSAYVPTGGTDPDVLNETMKPWNTVVPADLLDHTAY-YTFDALE----- 275
      | | | | . | | | . . | ||| | |...| | . | . |
3NM8.A 239 AVWQIIHRNQNYQPMKNGPFGQNFRDPMYPWNTT-PEDVMNHRKLGYYVD-IELRKSQRS 296

1WX2.A 275 -HHHHHH 281
      |||||
3NM8.A 297 SHHHHHH 303
  
```

**Legend:** Green - identical residues | Pink - similar residues | Blue - sequence mismatch | Brown - insertion/deletion |

## Σύγκριση αλληλουχιών 3NM8-2Y9X

Μεθοδολογία: Needleman-Wunsch Sequence Alignment

```

Query:          3NM8 chain: A, Length: 303
Subject:        2Y9X chain: A, Length: 391
Identities:     101/414, i.e., 33.33 % (query) and 25.83 % (subject)
Similarity:     150/414, i.e., 49.50 % (query) and 38.36 % (subject)

3NM8.A  1 MSNKYRVR-----KNVLHLTDTEKRD-----FVRTVLILKEK-----GIY  35
          | .           || |.. | | |           .|| . .|. .           ||.
2Y9X.A  1 SDKKSLMPLVGIPLGEPGEIKNRLNILDFVKNDKFFFTLYVRALQVLQARDQSDYSSFFQLGGIH  60

3NM8.A  36 D-RYIAWHGAAGKFHTPPGSDRNAAHMSSAFLPWHREYLLRFERDL-----  80
          | | | | . | .           | . | | | | .|. |
2Y9X.A  61 GLPYTEWAKAQPQLHLYKAN--YCTHGTVLFPTWHRAYESTWEQTLWEAAGTVAQRFTTS  118

3NM8.A  80 -----QSINPEVTLPYWE---WETDAQMQD-PSQ----SQIWSADFMGGN---GNPIKD  123
          |. . .|.|.           | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
2Y9X.A  119 DQAEWIQAAK-DLRQPFWDWGYWPNDFDFIGLDPDQVIRDKQVEITDYNGTKIEVENPILH  177

3NM8.A  124 F----IVDT--GPFA----AGRWTTIDEQGNPSGGLKRNFGATKEAPTLPTRDDVLNALK  173
          . | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
2Y9X.A  178 YKFHPIEPTFEGDFAQWQTMRYPDVQKQENIEGMIA---GIKAAAPGF--REWTFNML-  231

3NM8.A  174 ITQYDTPPWDMTSQN-----SFRNQLEGFINGPQLHNRVHRWVG-----GQMGVV  218
          |. | | |.. | .           . | | | | | | | | | | | | | | | | |
2Y9X.A  231 -TKNYT--WELFSNHGAVVGAHANSLE-----MVHNTVHFLIGRDPTLDPLVPGHMGSV  282

3NM8.A  219 PTAPNDPVFFLHHANVDRIWAVWQI IHRNQNYQP-MKNG-----PFGQNFR----  263
          | | | | |..|. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
2Y9X.A  283 PHAAFDP I FWMHHCNVDRLLALWQTM---NYDVYVSEGMNREATMGLIP-GQVLTEDSP  337

3NM8.A  263 -DPMYPWNTPP---EDVMNHRKLGIVY-DIELRKSKRSSH-----HHHHH  303
          .| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
2Y9X.A  338 LEPFYTKNQDPWQSDLEDWETLGFSPDFDPVKGKSKEEKSVYINDWVHKHYG  391

```

**Legend:** Green - identical residues | Pink - similar residues | Blue - sequence mismatch | Brown - insertion/deletion |

## Σύγκριση αλληλουχιών 1WX2-2Y9X

Μεθοδολογία: Needleman-Wunsch Sequence Alignment

Query: **1WX2** chain: A, Length: 281  
 Subject: **2Y9X** chain: A, Length: 391  
 Identities: 85/410, i.e., 30.25 % (query) and 21.74 % (subject)  
 Similar: 132/410, i.e., 46.98 % (query) and 33.76 % (subject)

```

1WX2.A 1  M T V R K N Q A T L T --- A D E K R R ----- F V A A -- V L E L K R S G R Y D E F V R ----- 36
      . . | . | . . | | . . | | | . . | | .
2Y9X.A 1  - S D K K S L M P L V G I P G E I K N R L N I L D F V K N D K F F T T L Y V R A L Q V L Q A R D Q S D Y S S F F Q L G G I 59

1WX2.A 36 --- T H N E F I M S D T D --- S G E R T G H R S P S F L P W H R R F L L D F E Q A L Q S V D S S V T ----- 82
      . | . . . | . | | | . . | | | . |
2Y9X.A 60 H G L P Y T E W A K A Q P Q L H L Y K A N Y C T H G T V L F P T W H R A Y E S T W E Q T L W E A A G T V A Q R F T T S D 119

1WX2.A 82 ----- L P Y W D W S A D R T V R A S L W A -- P D F L G ----- G T G R S T 111
      | . | | | | . | | | | | | . |
2Y9X.A 120 Q A E W I Q A A K D L R Q P F W D W G ----- Y W P N D P D F I G L P D Q V I R D K Q V E I T D Y N G T K I E V 171

1WX2.A 112 D G R V M ----- D G P F A A S T G N W P I N V R --- V D S R T Y L R R S I G G S V A E L P T R A E V E S V L A 161
      . . . . | . | | . . . | | | |
2Y9X.A 172 E N P I L H Y K F H P I E P T F E G D F A Q W Q T T M R Y P D V Q K Q E N I E G M I A G I K A A A P G F R E W ----- 226

1WX2.A 162 I S A Y D L P P Y N S A S E G F R N H -- L E G W R G V N L --- H N R V H V W V G ----- G Q M A T G V S 206
      . . . | | | | . | . | | | | . | | . |
2Y9X.A 226 -- T F N M L T K N Y T W E L F S N H G A V V G A H A N S L E M V H N T V H F L I G R D P T L D P L V P G H M -- G S V 282

1WX2.A 207 P N --- D P V F W L H H A Y V D K L W A E W Q R R H P D S A Y V P T G ----- G - T P - D V V D L N E T M K P W 254
      | . | | | | | | | | | . | | | | | | | | | . . . |
2Y9X.A 283 P H A A F D P I F W M H H C N V D R L L A L W Q T M N Y D - V Y V S E G M N R E A T M G L I P G Q V L T E D S P L E P F 341

1WX2.A 255 N T V ----- R P A D L L D - H T --- A Y Y T F D A L E H ----- H H H H H 281
      | . . | | | | . | | | . . | | .
2Y9X.A 342 Y T K N Q D P W Q S D D L E D W E T L G F S Y P D F P V K G K S K E E K S V Y I N D W V H K H Y G 391
  
```

**Legend:** Green - identical residues | Pink - similar residues | Blue - sequence mismatch | Brown - insertion/deletion |